



Universidad de San Carlos de Guatemala
Facultad de Ingeniería
Escuela de Ingeniería Mecánica Eléctrica

**GUÍA PARA LA INSTALACIÓN, CALIFICACIÓN Y
MANTENIMIENTO DE SISTEMAS DE CROMATOGRAFÍA,
DENTRO DE UN LABORATORIO ACREDITADO ISO 17025**

Alexis Osorio Villagrán
Asesorado por el Ing. Romeo A. Ruíz D.

Guatemala, mayo de 2009

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA



FACULTAD DE INGENIERÍA

**GUÍA PARA LA INSTALACIÓN, CALIFICACIÓN Y
MANTENIMIENTO DE SISTEMAS DE CROMATOGRFÍA,
DENTRO DE UN LABORATORIO ACREDITADO ISO 17025**

TRABAJO DE GRADUACIÓN

PRESENTADO A LA JUNTA DIRECTIVA DE LA
FACULTAD DE INGENIERÍA

POR:

ALEXIS OSORIO VILLAGRÁN
ASESORADO POR EL ING. ROMEO A. RUÍZ D.

AL CONFERÍRSELE EL TÍTULO DE

INGENIERO ELECTRICISTA

GUATEMALA, MAYO DE 2009

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

FACULTAD DE INGENIERÍA



NÓMINA DE JUNTA DIRECTIVA

DECANO	Ing. Murphy Olympo Paiz Recinos
VOCAL I	Inga. Glenda Patricia García Soria
VOCAL II	Inga. Alba Maritza Guerrero de Lòpez
VOCAL III	Ing. Miguel Ángel Dávila Calderón
VOCAL IV	Br. José Milton De León Bran
VOCAL V	Br. Isaac Sultán Mejía
SECRETARIA	Inga. Marcia Ivónne Véliz Vargas

TRIBUNAL QUE PRACTICÓ EL EXAMEN GENERAL PRIVADO

DECANO	Ing. Murphy Olympo Paiz Recinos
EXAMINADOR	Inga. Lenny Virginia Gaitan
EXAMINADOR	Inga. Alba Maritza Guerrero de Lòpez
EXAMINADOR	Ing. Juan José Peralta Dardón
SECRETARIA	Inga. Marcia Ivónne Véliz Vargas

HONORABLE TRIBUNAL EXAMINADOR

Cumpliendo con los preceptos que establece la ley de la Universidad de San Carlos de Guatemala, presento a su consideración mi trabajo de graduación titulado:

GUÍA PARA LA INSTALACIÓN, CALIFICACIÓN Y MANTENIMIENTO DE SISTEMAS DE CROMATOGRFÍA, DENTRO DE UN LABORATORIO ACREDITADO ISO 17025,

tema que me fuera asignado por la Dirección de la Escuela de Ingeniería Mecánica Eléctrica, el 22 de abril de 2008.



Alexis Osorio Villagrán

Guatemala, 27 de abril de 2009

**Ingeniero
JULIO SOLARES
Coordinador del Área de Electrónica
Facultad de Ingeniería
Universidad de San Carlos de Guatemala
Presente**

Señor Coordinador:


Atentamente me dirijo a usted para presentarle el trabajo de tesis titulado **Guía para la Instalación, Calificación y Mantenimiento de Sistemas de Cromatografía, dentro de un Laboratorio Acreditado ISO 17025**, realizado por el Bachiller Alexis Osorio Villagrán.

A mi juicio, el presente trabajo cumple con los objetivos planteados, con un contenido interesante, útil y de actualidad. Por tanto el autor de esta tesis y yo, como su asesor, nos hacemos responsables por el contenido y conclusiones de la misma.

Me es grato informarle que el presente trabajo de Tesis me es completamente satisfactorio por lo que me permite someterlo a su consideración y aprobación.

Sin otro particular me suscribo de usted.

Atentamente,


Romeo A. Ruiz D.
Ingeniero Electricista
Colegiado 6516

Ing. ROMEO A. RUÍZ D.
Colegiado 6516
Asesor



FACULTAD DE INGENIERIA

Escuelas de Ingeniería Civil, Ingeniería
Mecánica Industrial, Ingeniería Química,
Ingeniería Mecánica Eléctrica, Técnica
y Regional de Post-grado de Ingeniería
Sanitaria.

Ciudad Universitaria, zona 12
Guatemala, Centroamérica

Guatemala, 5 de mayo de 2009

Señor Director
Ing. Mario Renato Escobedo Martínez
Escuela de Ingeniería Mecánica Eléctrica
Facultad de Ingeniería, USAC.

Señor Director:

Por este medio me permito dar aprobación al Trabajo de Graduación titulado: **"GUIA PARA LA INSTALACION, CALIFICACION Y MANTENIMIENTO DE SISTEMAS DE CROMATOGRAFIA, DENTRO DE UN LABORATORIO ACREDITADO ISO 17025"**, desarrollado por el estudiante **Alexis Osorio Villagrán**, ya que considero que cumple con los requisitos establecidos.

Sin otro particular, aprovecho la oportunidad para saludarlo.

Atentamente,

ID Y ENSEÑAD A TODOS


Ing. Julio César Solares Peñate
Coordinador de Electrónica





REF. EIME 30.2009.

El Director de la Escuela de Ingeniería Mecánica Eléctrica, después de conocer el dictamen del Asesor, con el Visto Bueno del Coordinador de Area, al trabajo de Graduación del estudiante; Alexis Osorio Villagrán titulado: GUÍA PARA LA INSTALACIÓN, CALIFICACIÓN Y MANTENIMIENTO DE SISTEMAS DE CROMATOGRFIA, DENTRO DE UN LABORATORIO ACREDITADO ISO 17025, procede a la autorización del mismo.

Ing. Mario Renato Escobedo Martinez

DIRECTOR



GUATEMALA, 14 DE MAYO 2,009.



El Decano de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de San Carlos de Guatemala, luego de conocer la aprobación por parte del Director de la Escuela de Ingeniería Mecánica Eléctrica, al trabajo de graduación titulado: **GUÍA PARA LA INSTALACIÓN, CALIFICACIÓN Y MANTENIMIENTO DE SISTEMAS DE CROMATOGRAFÍA DENTRO DE UN LABORATORIO ACREDITADO ISO 17025**, presentado por el estudiante universitario **Alexis Osorio Villagrán**, autoriza la impresión del mismo.

IMPRÍMASE.


Ing. Murphy Olimpo Paiz Recinos
DECANO

Guatemala, mayo de 2009



/cc

ACTO QUE DEDICO A:

Dedico la presente a:

DIOS	Por ser la fuerza generadora de todo cuanto existe y quien me guía hoy y siempre
MI ESPOSA	Mildred, por su inmenso amor, comprensión y apoyo incondicional.
MIS HIJOS	Aldo Daniel, Ever Alexis y María Regina, por ser mi fuente de inspiración para seguir luchando por obtener nuestras metas...a ellos por un futuro brillante
MIS PADRES	Gustavo Osorio y Juana María de Osorio Con amor y aprecio infinito, que con su ejemplo siempre me han guiado por el camino correcto
TODA MI FAMILIA EN GENERAL	Concilio, refugio, apoyo y amor es lo primordial para lograr lo deseado.
MIS COMPAÑEROS DE ESTUDIO	Con aprecio sincero y en reconocimiento a su apoyo incondicional ayer, hoy y siempre
MIS AMIGOS	Que como yo luchan por forjar un país mejor.
USTED	Mil gracias

AGRADECIMIENTOS A:

EL ING. ROMEO RUIZ

Por su valiosa asistencia brindada durante todas las fases de la elaboración de este trabajo de graduación.

AL LABORATORIO NACIONAL DE SALUD

Por su colaboración para realizar el presente trabajo

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES	VII
LISTA DE SÍMBOLOS	IX
GLOSARIO	XI
RESUMEN	XV
OBJETIVOS	XVII
INTRODUCCIÓN	XIX
1. TEORÍA DE LA CROMATOGRAFÍA Y SU APLICACIÓN	1
1.1 Teorías del proceso cromatográfico	1
1.2 Tipos de cromatógrafos	2
1.2.1 Cromatografía de gas	2
1.2.2 Cromatografía en papel	3
1.2.3 Cromatografía en capa fina	4
1.2.4 Cromatografía líquida	4
1.2.5 Cromatografía de fluidos supercríticos	5
1.2.6 Cromatografía líquida de alta eficacia	5
1.2.7 Cromatografía de fase normal	7
1.3 Métodos cromatográficos	7
1.3.1 Métodos principales	8
1.3.1.1 Cromatografía frontal	8
1.3.1.2 Cromatografía de desplazamiento	8
1.3.1.3 Cromatografía de elusión	9
1.3.2 Clasificación de los métodos cromatográficos	9
2. GUÍA DE INSTALACIÓN DE HPLC	11
2.1 Especificaciones generales	11

2.2	Requisitos	11
2.2.1	Requisitos de ventilación	11
2.2.2	Requisitos de electricidad	11
2.2.3	Requisitos de espacio	12
2.3	Lista de verificación de preinstalación	15
2.3.1	Instrumento HPLC	15
2.3.2	Unidad de procesamiento	15
2.3.3	Detectores	15
2.3.4	Operadores	15
2.3.5	Opciones	15
3.	GUÍA PARA LA CALIFICACIÓN DE HPLC	17
3.1	Ejemplo de procedimiento para la calificación de operación de sistemas HPLC	17
3.2	Objeto	17
3.3	Alcance	17
3.4	Definiciones	17
3.4.1	Cromatógrafo líquido de alta resolución	17
3.4.2	Para términos prácticos	18
3.4.3	Formulario de servicio	18
3.5	Materiales y equipo necesario	18
3.6	Condiciones generales	19
3.6.1	Verificación de materiales y equipo	19
3.7	Mantenimiento preventivo	20
3.7.1	Unidad de bomba	20
3.7.2	Sistema de inyección	20
3.7.3	Horno para columna	20
3.7.4	Detector	20
3.7.5	Interface	21
3.7.6	Computadora e impresora	21

3.7.7	Protección eléctrica (UPS)	21
3.7.8	Finalización del procedimiento	21
3.8	Calificación operativa	22
3.8.1	Unidad de bomba	22
3.8.2	Rango de flujo	22
3.8.3	Presión cero	22
3.8.4	Error de presión mínima	22
3.8.5	Error de presión máxima	23
3.8.6	Rango de fuga	23
3.8.7	Exactitud de flujo	23
3.8.8	Precisión de flujo	23
3.8.9	Prueba de exactitud de gradiente	24
3.8.10	Sistema de inyección	26
3.8.11	Precisión de inyección	26
3.8.12	Linealidad de inyección	26
3.8.13	Revisión de posición de aguja	27
3.8.14	Sistema de inyección	27
3.8.15	Detector UV/VIS/DAD/FL	27
3.8.16	Auto cero	27
3.8.17	Energía de lámpara	27
3.8.18	Exactitud de longitud de onda	28
3.8.19	Sensibilidad de detector de fluorescencia	29
3.8.19.1	Señal	29
3.8.19.2	Ruido	29
3.8.19.2.1	Detector de índice de refracción	29
3.8.20	Auto cero	30
3.8.21	Sensibilidad	30
3.8.22	Forma de pico	30
3.8.23	Horno para columna	30
3.8.24	Exactitud de temperatura	30
3.8.25	Estabilidad de temperatura	31

3.8.26	Sensor de fuga	31
3.8.27	Ensayo GLP	31
3.8.28	Finalizado de servicio	32
4.	GUÍA PARA EL MANTENIMIENTO DE HPLC	35
4.1	Puntos críticos del sistema cromatográfico	35
4.1.1	Entrega de disolventes (bomba)	37
4.1.2	Puntos críticos en la interacción entre disolventes y contenedores	37
4.1.3	Fases móviles de HPLC	39
4.2.4	Puntos críticos de los disolventes	40
4.1.5	Bomba	42
4.1.6	Puntos críticos en bombas	43
4.1.7	Puntos en la introducción de muestra (inyectores)	46
4.1.8	Columnas de HPLC	48
4.8.9	Puntos críticos en columnas y empaques	49
4.1.10	Detectores de HPLC	53
4.1.11	Puntos críticos en detectores	54
5.	GENERALIDADES SOBRE UN LABORATORIO DE ANÁLISIS ACREDITADO BAJO LA NORMA ISO 17025	69
5.1	COGUANOR NTG/ISO/IEC 17025	69
5.1.1	Generalidades	70
5.1.1.1	Muchos factores determinan	70
5.1.1.2	El grado	70
5.2	Personal	71
5.2.1	La dirección del laboratorio	71
5.3	Instalaciones y condiciones ambientales	71
5.4	Equipos	71
5.5	Trazabilidad de la medición	74

5.5.1 Generalidades	74
5.5.2 Requisitos específicos	74
5.5.2.1 Calibración	74
5.5.2.2 Ensayos	75
CONCLUSIONES	77
RECOMENDACIONES	79
REFERENCIAS	81
BIBLIOGRAFÍA	83

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

FIGURAS

1	Diagrama de un cromatógrafo de gases	3
2	Cromatografía líquida de alta eficiencia o rendimiento	6
3	Dimensiones de un sistema típico que incluye: bomba, detector, un procesador de datos.	12
4	Dimensiones de un sistema típico que incluye: automuestreador, calentador del horno de columna, bomba, detector, un procesador de datos.	13
5	Configuración típica que incluye bomba, detector, inyector, manual y procesador de datos	14
6	Configuración típica que incluye automuestreador calentador del horno de columna, bomba detector y procesador de datos.	14

TABLAS

I	Tabla de clasificación de métodos cromatográficos	9
II	Programa de tiempo para exactitud de gradiente de unidad de bomba	25
III	Densidad del agua (ρ [g/ml]) en dependencia	33

IV	Puntos críticos del sistema cromatográfico	35
V	Puntos críticos en la interacción entre disolventes y contenedores	37
VI	Puntos críticos de los disolventes por si solos	40
VII	Puntos críticos en bombas	44
VIII	Puntos críticos en bombas	44
IX	Puntos en la introducción de muestra (inyectores)	46
X	Puntos críticos en columnas y empaques	49
XI	Puntos críticos en detectores	54
XII	Fallas típicas/causas/solución	57

LISTA DE SÍMBOLOS

GC	Cromatografía de gases
GSC	Cromatografía gas-sólido
GLC	Cromatografía gas-líquido
TLC	Del inglés Cromatografía de campo frío
SFC	Cromatografía de fluidos supercríticos
HPLC	Del inglés (Cromatografía líquida de alta eficacia)
CA	Corrientes adicionales
seg	Segundo
mm	Milímetro
ND	No disponible
NA	No aplica
min	Minuto
(S)	Sensibilidad
(N)	Ruido
BPL	Buenas prácticas de laboratorio
SI	Sistema internacional de unidades

GLOSARIO

- Absorción** Acción de un sólido o un líquido tomando y reteniendo uniformemente otra sustancia por toda su estructura externa. Esta acción es solamente mecánica, como la absorción de un líquido por un sólido.
- Adsorción** Unión de moléculas de un gas o de un líquido a la superficie de otra sustancia (generalmente un sólido); estas moléculas forman una película o capa adherente que se mantienen unidas por fuerzas electrostáticas que son considerablemente más débil que los enlaces químicos.
- Análisis cuantitativo** Examen de una muestra de un material para determinar la cantidad o porcentaje de sus constituyentes. Se han usado métodos convencionales de determinaciones volumétricas y gravimétricas para el análisis de rutina, pero para una evaluación precisa se requieren métodos instrumentales. .
- Análisis instrumental** Este término se refiere a los métodos de la química analítica para los cuales se requieren instrumentos. Los más importantes son los que implican luz o energía radiante (métodos ópticos), que se usan en muchos tipos de espectroscopia (infrarrojo, rayos X RMN, etc.) y los que utilizan medidas eléctricas,

incluidas la potenciometria, la calorimetría, la susceptibilidad magnética y la espectrometría de masa.

Analito Isotopo(s) o compuesto(o) químicos a ser caracterizados y cuantificados en una muestra.

BPL o GPL Siglas de buenas prácticas de laboratorio

Cromatografía Método de separación física o química de una mezcla de solutos, usando un disolvente, conocido como fase móvil y un medio separador, conocido como fase estacionaria.

Disolución Mezcla homogénea de partículas en una fase dispersa, formada por diferentes componentes, que pueden separarse de ella por métodos físicos pero su apariencia es totalmente uniforme. El componente que está en exceso se conoce como disolvente. El componente o los componentes que se encuentran en menor proporción se llaman solutos.

Eluotrópica Es un rango de sustancia de diferentes polaridades que actúan como fase móvil y que permiten observar un mejor desplazamiento sobre una fase estacionaria.

HPLC Siglas del inglés High performance liquid chromatography es un tipo de cromatografía en

columna utilizada frecuentemente en bioquímica y química analítica.

Intercambio iónico	Tipo de separación cromatográfica en donde la fase estacionaria es un intercambio iónico.
Isopropilico	Alcohol monohidroxilico secundario, derivado del gas propileno, del petróleo por reacción con ácido sulfúrico. Su fórmula es altamente inflamable.
Línea base	Gráfica obtenida de la señal que emite el detector cuando se le hace pasar por un período de tiempo determinado sólo la fase móvil bajo las condiciones de análisis
Matriz	Se refiere a todos los componentes de la muestra excepto el analito o los analitos de interés.
Puntos críticos	Aspectos que afectan directa o indirectamente los resultados analíticos del laboratorio.
Ruido	Señal electrónica adicional que afecta la línea base.
Sistema de gradiente	Es aquel equipo de cromatografía de líquido, donde la bomba permite variar la composición de la fase móvil durante el análisis.

RESUMEN

La cromatografía es un conjunto de técnicas basadas en el principio de retención selectiva, cuyo objetivo es separar los distintos componentes de una mezcla, permitiendo identificar y determinar las cantidades de dichos componentes. La configuración de los picos puede ser también un indicador de la eficiencia y eficacia de la columna de cromatografía. Suciedad en el sistema de inyección, incompatibilidades en el flujo, una compatibilidad incorrecta entre el analito y la polaridad de la columna o una sobrecarga que impide la debida separación entre las fases estacionarias gaseosa y líquida.

La HPLC es una técnica que exige atención constante para mantener una sensibilidad y separación óptimas. Las bombas pueden dañarse, las columnas bloquearse y deteriorarse y los detectores contaminarse, lo que redundaría en un flujo bajo, una presión inversa alta, absorbancia de fondo e interferencias. Durante el proceso de cierre hay que tener cuidado para que no entre en el sistema ninguna materia extraña. Los componentes del sistema de HPLC a los que hay que prestar atención sistemáticamente son la bomba, la columna del sistema de inyección, los detectores y los disolventes.

OBJETIVOS

1. Compilar información importante sobre el tema de cromatografía para que el usuario tenga claros los conceptos más relevantes.
2. Indicar de forma clara y concreta los procedimientos más importantes en la instalación, calificación y mantenimiento de un HPLC.

INTRODUCCIÓN

Como sucede con todo instrumento, para asegurar la fiabilidad de un cromatógrafo es necesario prestar atención a diversos aspectos del equipo y a su modo de empleo. Además, la experiencia en este tipo de instrumentación como sistema total es insustituible. Una parte importante del procedimiento de comprobación consiste en la vigilancia continua, por parte de especialistas en cromatografía experimentados.

Por tanto hay que reconocer que el mantenimiento ha de ser una tarea compartida entre el personal del servicio técnico de la empresa representante del fabricante del sistema instrumental y los usuarios de los componentes expuestos a los materiales de ensayo, que sufren un deterioro como consecuencia del uso y necesitan frecuentes cuidados entre las visitas del servicio técnico.

Sin embargo, los usuarios se ven obligados con frecuencia a reparar fallos cuando es imposible conseguir los servicios del personal de mantenimiento o cuando estos fallos se repiten y los usuarios se familiarizan con el modo de resolverlos.

1. TEORÍA DE LA CROMATOGRAFÍA Y SU APLICACIÓN

1.1 Teorías del proceso cromatográfico

El proceso cromatográfico, aparentemente simple en práctica, es en realidad una compleja unión de fenómenos tales como hidrodinámica, cinética, termodinámica, química de superficie y difusión.

Hasta la fecha se han propuesto muchas teorías, que incluyen complejos modelos matemáticos para poder explicar el comportamiento de los solutos en las columnas cromatográficas. Las más estudiadas son: La Teoría de los Platos Teóricos (Martin y Synge), la Teoría Cinética (Van Deemter, Zuiderweg, Klinkenberg y Sjenitzer) y la Teoría Desarrollada (Golay) para Columnas Capilares.

Según la Teoría de los Platos, una columna cromatográfica está constituida por una serie de platos que contiene una fase estacionaria. Supone que el volumen de fase estacionaria en cada plato es constante; que el volumen de fase móvil es constante de plato a plato; que en cada plato las dos fases están en equilibrio, y que el valor del coeficiente de distribución es constante e independiente de la concentración del soluto. La principal desventaja de la teoría de los platos teóricos es la falta de conexión entre la eficiencia de la columna cromatográfica, el tamaño de la partícula, la difusión, la velocidad de flujo y la temperatura. Otra desventaja es que utiliza un modelo basado en muchas suposiciones.

La teoría cinética considera el proceso cromatográfico en función de los factores cinéticos que intervienen en él. Siendo estos factores:

- Las múltiples trayectorias (diferentes rutas) que toma un soluto durante su movimiento (migración) a través del empaque de la columna, provocando variaciones en la velocidad del flujo.
- La difusión axial o longitudinal del soluto en la fase móvil.

- La cinética de la resistencia a la transferencia de masa entre las fases móvil y estacionaria.

1.2 Tipos de cromatógrafos

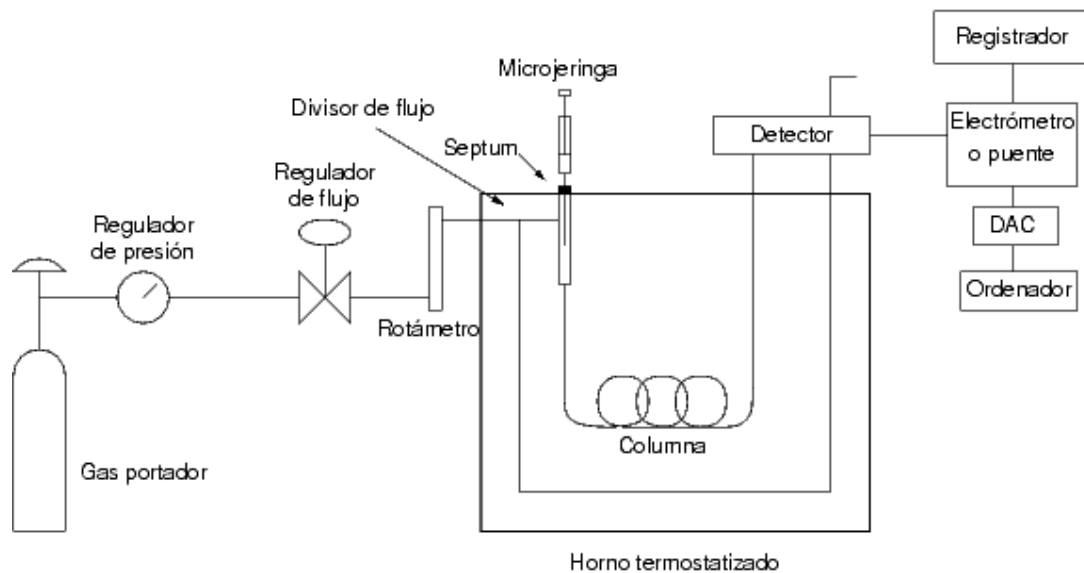
1.2.1 Cromatografía de gas

Es una de las técnicas más utilizadas e importantes, de forma que ha revolucionado el campo de la química analítica. En donde la muestra se volatiliza y se inyecta en la cabeza de una columna cromatográfica. La elución se produce por el flujo de una fase móvil de gas inerte. A diferencia de los otros tipos de cromatografía, la fase móvil no interacciona con las moléculas del analito; su única función es la de transportar el analito a través de la columna.

Existen dos tipos de cromatografía de gases (GC): la cromatografía gas-sólido (GSC) y la cromatografía gas-líquido (GLC), siendo esta última la que se utiliza más ampliamente, y que se puede llamar simplemente cromatografía de gases (GC). En la GSC la fase estacionaria es sólida y la retención de los analitos en ella se produce mediante el proceso de adsorción. Precisamente este proceso de adsorción, que no es lineal, es el que ha provocado que este tipo de cromatografía tenga aplicación limitada, ya que la retención del analito sobre la superficie es semipermanente y se obtienen picos de elución con colas. Su única aplicación es la separación de especies gaseosas de bajo peso molecular. La GLC utiliza como fase estacionaria moléculas de líquido inmovilizadas sobre la superficie de un sólido inerte.

La GC se lleva a cabo en un cromatógrafo de gases. Éste consta de diversos componentes como el gas portador, el sistema de inyección de muestra, la columna (generalmente dentro de un horno), y el detector.

Figura 1. Diagrama de un cromatógrafo de gases



1.2.2 Cromatografía en papel

Es un proceso muy utilizado en los laboratorios para realizar análisis cualitativos ya que pese a no ser una técnica muy potente no requiere de ningún tipo de equipamiento.

La fase estacionaria está constituida simplemente por una tira de papel de filtro. La muestra se deposita en un extremo colocando pequeñas gotas de la solución y evaporando el solvente. Luego el disolvente empleado como fase móvil se hace ascender por capilaridad. Esto es, se coloca la tira de papel verticalmente y con la muestra del lado de abajo dentro de un recipiente que contiene fase móvil en el fondo.

Después de unos minutos cuando el solvente deja de ascender o ha llegado al extremo se retira el papel y seca. Si el solvente elegido fue adecuado y las sustancias tienen color propio se verán las manchas de distinto color separadas. Cuando los componentes no tienen color propio el papel se somete a procesos de revelado.

Hay varios factores de los cuales depende una cromatografía eficaz: la elección del solvente y la del papel de filtro.

1.2.3 Cromatografía en capa fina

O más comúnmente TLC (*thin layer chromatography*, en inglés), es una técnica cromatográfica utilizada, entre otros posibles usos, para separar los componentes puros que forman parte de una mezcla.

Esta separación se consigue mediante la diferencia entre las fuerzas de adhesión de las moléculas de los componentes a una fase móvil (normalmente, un disolvente) y a una fase estacionaria (la llamada capa fina, que puede ser papel o gel de sílice). Esta diferencia se traduce en un mayor o menor desplazamiento o movilidad de cada componente individual, lo cual permite su separación e identificación.

1.2.4 Cromatografía líquida

También conocida como cromatografía de líquidos, es una técnica de separación y no debe confundirse con una técnica cuantitativa o cualitativa de análisis. Es una de las técnicas analíticas ampliamente utilizada, la cual permite separar físicamente los distintos componentes de una solución por la absorción selectiva de los constituyentes de una mezcla. En toda cromatografía existe un contacto entre dos fases, una fija que suele llamarse fase estacionaria, y una móvil (fase móvil) que fluye permanente durante el análisis, y que en este caso es un líquido o mezcla de varios líquidos. La fase estacionaria por su parte puede ser alúmina, sílice o resinas de intercambio iónico que se encuentran disponibles en el mercado. Los intercambiadores iónicos son matrices sólidas que contienen sitios activos (también llamados grupos ionogénicos) con carga electrostática (positiva o negativa). De esta forma, la muestra queda retenida sobre el soporte sólido por afinidad electrostática.

Dependiendo de la relación carga/tamaño unos constituyentes de la mezcla serán retenidos con mayor fuerza sobre el soporte sólido que otros, lo que provocará su separación. Las sustancias que permanecen más tiempo libre en la fase móvil, avanzan más rápidamente con el flujo de la misma y las que quedan más unidas a la fase estacionaria o retenidas avanzan menos y por tanto tardarán más en salir o fluir. Éste es el principio fundamental de la cromatografía. Un ejemplo notable es la cromatografía de intercambio iónico. Las columnas más utilizadas son las de sílice.

1.2.5 Cromatografía de fluidos supercríticos

Es una técnica híbrida entre la cromatografía de gases (GC) y la HPLC, que combina lo mejor de ambas técnicas. Esta técnica es importante porque permite la separación de mezclas en las que no es adecuada la aplicación de la GC ni de la HPLC. En concreto, se aplica a compuestos no volátiles o térmicamente inestables que no pueden ser separados mediante GC, o aquellos que contienen grupos funcionales que imposibilitan su detección en HPLC.

1.2.6 Cromatografía líquida de alta eficacia

Llamada también *High performance liquid chromatography* (HPLC) es un tipo de cromatografía en columna utilizada frecuentemente en bioquímica y química analítica. También se la denomina a veces **Cromatografía líquida de alta presión** o *High pressure liquid chromatography* (HPLC), aunque esta terminología se considera antigua y está en desuso. El HPLC es una técnica utilizada para separar los componentes de una mezcla basándose en diferentes tipos de interacciones químicas entre las sustancias analizadas y la columna cromatográfica.

Las distintas técnicas cromatográficas se pueden dividir según cómo esté dispuesta la **fase estacionaria**.

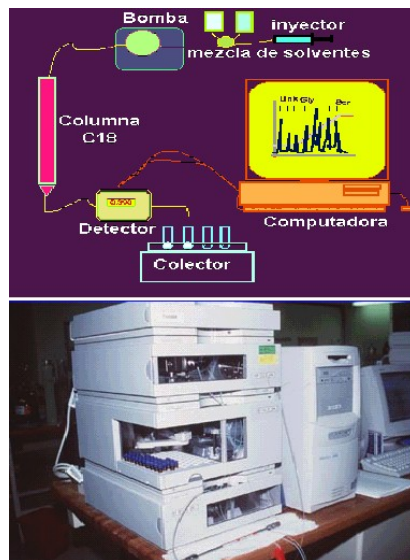
Sobre una placa o papel

- Cromatografía en papel
- Cromatografía en capa fina

Dentro de una columna

- Cromatografía de líquidos
- Cromatografía de gases
- Cromatografía de fluidos supercríticos

Figura 2. Cromatografía líquida de alta eficiencia o rendimiento



1.2.7 Cromatografía de fase normal

La cromatografía de fase normal o "Normal phase HPLC" (NP-HPLC) fue el primer tipo de sistema HPLC utilizado en el campo de la química, y se caracteriza por separar los compuestos en base a su polaridad. Esta técnica utiliza una fase estacionaria polar y una fase móvil apolar, y se utiliza cuando el compuesto de interés es bastante polar. El compuesto polar se asocia y es retenido por la fase estacionaria. La fuerza de adsorción aumenta a medida que aumenta la polaridad del compuesto y la interacción entre el compuesto polar y la fase estacionaria polar (en comparación a la fase móvil) aumenta el tiempo de retención.

1.3 Métodos cromatográficos

Métodos variados de separación de mezclas se conocen como cromatografía. Según la definición dada por Keulemans la cromatografía es un método de separación en el que los componentes a desglosar se distribuyen entre dos fases, una de las cuales constituye un lecho estacionario de amplio desarrollo superficial y la otra es un fluido que pasa a través o a lo largo del lecho estacionario.

- La fase estacionaria puede ser un sólido o un líquido soportado en un sólido o en un gel (matriz). La fase estacionaria puede ser empaquetada en una columna, extendida en una capa, distribuida como una película, etc. Se utiliza el término general de lecho para definir las distintas formas en que puede encontrarse la fase estacionaria.
- Las separaciones cromatográficas se consiguen mediante la distribución de los componentes de una mezcla entre la fase fija y la fase móvil. La separación entre dos sustancias empieza cuando una es retenida más fuertemente por la fase estacionaria que la otra, que

tiende a desplazarse más rápidamente en la fase móvil. las retenciones mencionadas pueden tener su origen en dos fenómenos de interacción que se dan entre las dos fases y que pueden ser :

1.-La *adsorción*, que es la retención de una especie química por parte de los puntos activos de la superficie de un sólido quedando delimitado el fenómeno a la superficie que separa las fases o superficie interfacial.

2.- La *absorción*, que es la retención de una especie química por parte de una masa, y debido a la tendencia que esta tiene a formar mezcla con la primera, *absorción pura*, o a reaccionar químicamente con la misma, *absorción con reacción química*, considerando ambas como un fenómeno másico y no superficial.

1.3.1 Métodos principales

1.3.1.1 Cromatografía frontal

Procedimiento en el que la muestra (líquida o gaseosa) se alimenta de forma continua al lecho cromatográfico. No se utiliza ninguna fase móvil adicional

1.3.1.2 Cromatografía de desplazamiento

Procedimiento en el cual la fase móvil contiene un compuesto (el desplazante) que es retenido más fuertemente que los componentes de la muestra analizada. La muestra se alimenta al sistema en forma discreta, como una pequeña cantidad en un intervalo breve.

1.3.1.3 Cromatografía de elusión

Procedimiento en el que la fase móvil se pasa de forma continua a través o a lo largo del lecho cromatográfico y la muestra se suministra al sistema de forma discreta, como una pequeña cantidad en un tiempo breve.

1.3.2 Clasificación de los métodos cromatográficos

La clasificación de los métodos cromatográficos según el procedimiento de separación, el principio básico de la separación de las sustancias que componen una mezcla se fundamenta en una serie de sucesivos equilibrios entre la fase estacionaria y la fase móvil. El equilibrio dependerá de la partición o diferente adsorción que tengan la fase estacionaria y los componentes de la mezcla.

La diferencia dependerá de las propiedades físicas y químicas de los componentes. El mayor o menor avance en el sistema cromatográfico dependerá de la afinidad del componente y la fase estacionaria. El componente con menor afinidad por la fase estacionaria en presencia de una fase móvil llamada eluyente será eluido en primer lugar, y por tanto se desplazará con mayor velocidad por el sistema cromatográfico.

Tabla I. Tabla de clasificación de métodos cromatográficos

<i>Tabla de clasificación de métodos cromatográficos</i>				
F. estacionaria	F. móvil	Soporte	<i>Cromatografía</i>	Siglas
Sólido (adsorción)	gas líquido	columna columna capa fina	sólido-gas líquida en papel y/o capa fina	G.S.C / G.C C.L / H.P.L.C T.L.C
líquido (partición)	gas líquido	columna columna	líquido-líquido gas-líquido	C.G.L C.L.L / H.P.L.C
resina (intercambio iónico)	Líquido	columna	intercambio iónico	
gel (filtración en)	Líquido	columna	filtración de gel	

Luego de ampliar el conocimiento respecto al tema de cromatografía, se cuenta con los criterios para seleccionar correctamente un equipo según el análisis a efectuar. En el siguiente capítulo se listaran los parámetros más relevantes para efectuar la instalación física del HPLC.

2. GUÍA DE INSTALACIÓN DE HPLC

Esta guía le será útil al usuario para identificar las medidas necesarias a tomar en su laboratorio para la instalación correcta y el funcionamiento óptimo de un Sistema HPLC y la capacitación de los operadores designados. Para ayudarlo en el proceso, la guía incluye una lista de verificación de reinstalación de los elementos que deben tenerse en cuenta antes de instalar el equipo.

2.1 Especificaciones generales

Dependiendo del modelo que se adquiera el proveedor de dicho equipo indicará las especificaciones (peso, temperatura, espacio, soporte, etc.)

2.2 Requisitos

2.2.1 Requisitos de ventilación

Debe dejarse suficiente espacio de ventilación alrededor del instrumento y para acceder a las conexiones de comunicación. Deje por lo menos 30,48 cm (12 pulgadas) a cada lado del instrumento.

2.2.2 Requisitos de electricidad

El Sistema HPLC viene con un cable eléctrico apropiado para las instalaciones. El instrumento requiere una toma de corriente conectada a tierra.

La línea de alimentación de energía al laboratorio debe estar conectada directamente del transformador principal de un circuito de suministro que no

tenga cargas ni sobrecargas erráticas o interferencia electromagnética. Las líneas de suministro reservadas para el instrumento deben tener una capacidad de reserva adecuada. La carga normal no debe exceder el 50% de la capacidad nominal permitir la carga de encendido y la adición de otros instrumentos.

Tenga en cuenta que el ordenador personal, la impresora y los accesorios necesitan tomas de corriente CA adicionales.

2.2.3 Requisitos de espacio

Las dimensiones del instrumento están indicadas en la Figura 3. Además del espacio necesario para el instrumento mismo, debe proveerse espacio adicional para el ordenador y la impresora (si la hay). La Figura 4 ilustra la configuración recomendable del sistema.

El sistema deberá estar colocado sobre una superficie a nivel y suficientemente resistente como para no arquearse más de 3,17 mm (1/8 pulgada) bajo el peso del instrumento.

Figura 3. Dimensiones de un sistema típico que incluye: bomba, detector y procesador de datos

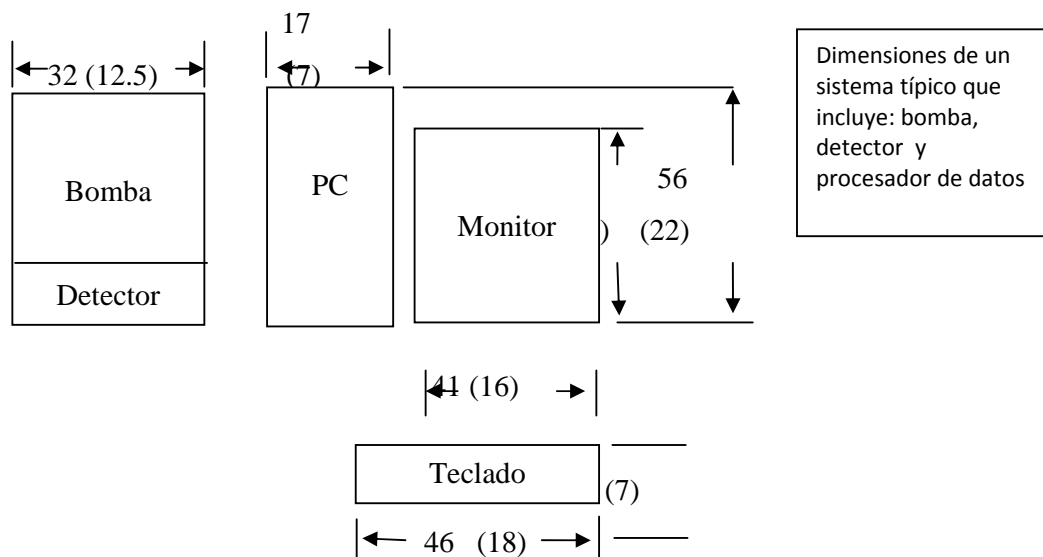


Figura 4. Dimensiones típicas de un sistema que incluye: automuestreador, calentador del horno de columna, bomba, detector y procesador de datos

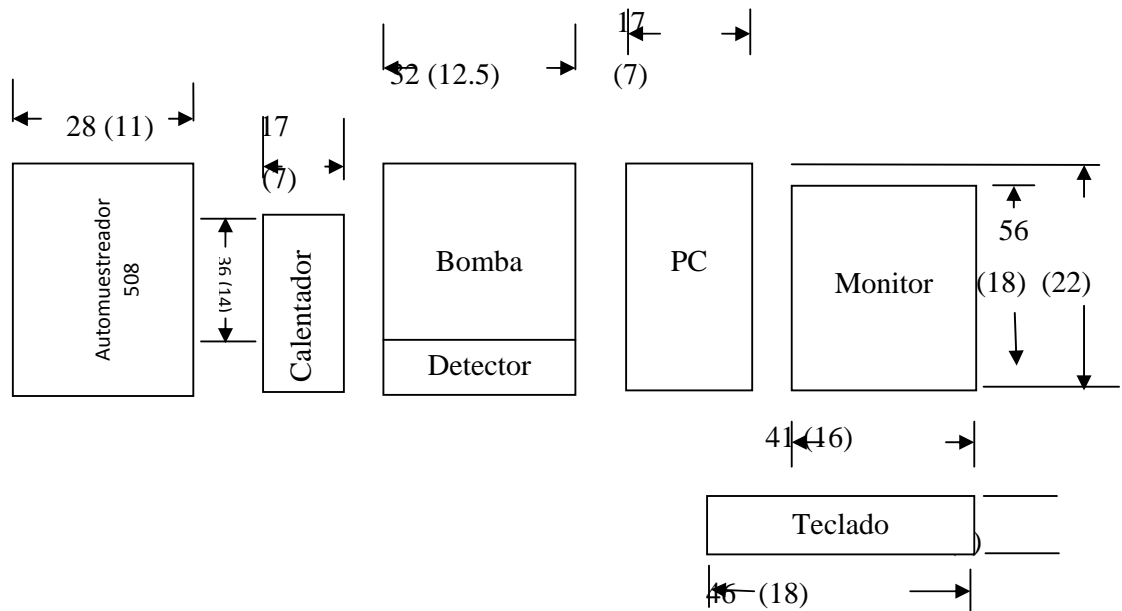
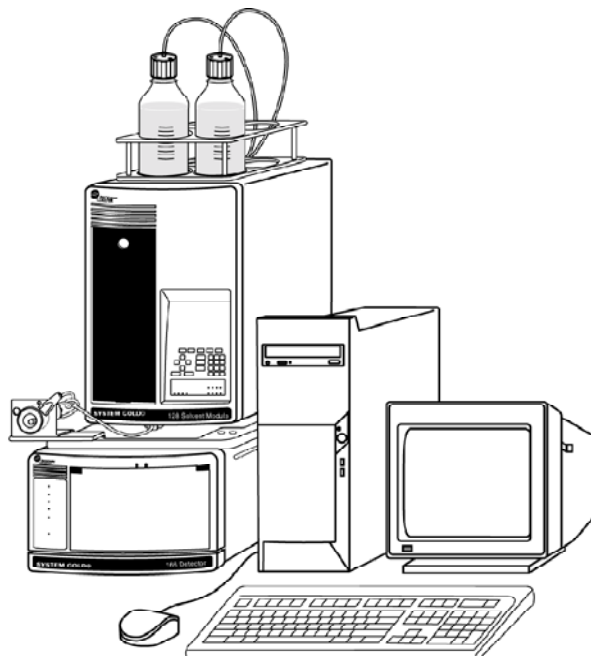
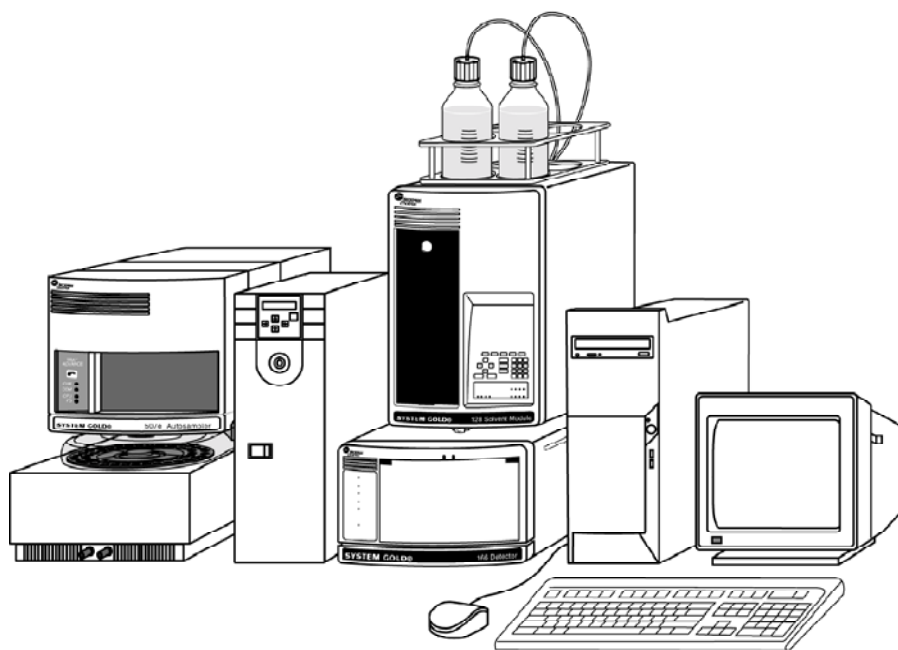


Figura 5. Configuración típica que incluye: bomba, detector, inyector manual y procesador de datos



n



901222L.AI

2.3 Lista de verificación básica de preinstalación

La lista siguiente detalla los requisitos y elementos necesarios para la instalación del Sistema HPLC. Utilice esta lista para marcar lo que ya está en lugar, y luego el resto a medida que estén disponibles. Para asegurar una instalación exitosa, cerciórese de que todos los requisitos listados hayan sido satisfechos y que los componentes estén a mano para la instalación del equipo.

2.3.1 Instrumento HPLC

- Requisitos de energía
- Espacio en una mesa de laboratorio o similar
- Mezcla de ensayo de instalación (enviada por separado)

2.3.2. Ordenador

- Suministrado por Empresa que suministre el HPLC
- Ordenador equivalente
- Impresora (opcional)
- Interface de comunicaciones

2.3.3 Detectores

- Detector de UV (si fue pedido)
- Detector de arreglo de yodos (según pedido)
- Detector LIF (si fue pedido)

2.3.4 Operadores – Hasta dos

- Capacitados en el uso de sistema operativo.
- El día de la instalación los operadores deben estar disponibles para recibir capacitación durante 4 horas.

2.3.5 Opciones

- Automuestreador
- Horno de columna

Luego de instalar físicamente el HPLC, en el siguiente capítulo veremos unas pruebas que se deben efectuar para calificar la correcta operatividad del HPLC.

3. GUÍA PARA LA CALIFICACIÓN DE HPLC

3.1 Ejemplo de procedimiento para la calificación de operación de sistema HPLC

3.2 Objeto

Proporcionar los lineamientos para realizar el mantenimiento preventivo y la calificación de operaciones (ingres OQ) de los sistemas HPLC.

3.3 Alcance

Personal del departamento de servicio técnico con la competencia técnica para realizar el mantenimiento y calificación de operación de sistemas HPLC.

3.4 Definiciones

3.4.1 Cromatógrafo líquido de alta resolución

El sistema es utilizado para realizar cuantificaciones de compuestos a través de la detección de absorción de luz, luego de la separación en una columna cromatografía (fase estacionaria) en una fase móvil (fase líquida) y con la ayuda de una herramienta de integración (software). La medición puede realizarse por diferentes tipos de detección: fotométrica, fluorescencia a índice de refracción entre otras, de acuerdo a una metodología que establece las condiciones de cuantificación y del sistema como lo son: columna cromatográfica, fase móvil, flujo de fase móvil, longitud de onda de detección, muestra estándar, volumen de inyección, etc.

3.4.3 Formulario de servicio

Este documento es en el cual se escribe la información del sistema junto con los resultados obtenidos durante las pruebas efectuadas durante la calificación operativa. Si algunos de los datos requeridos del sistema no son legibles se deberá colocar ND (No Disponible), o bien se podrán obtener del manual o registro del equipo en posesión del cliente; cuando algún dato no aplique deberá anotarse NA (No Aplica), y de ser posible anotar la razón.

3.5 Materiales y equipo necesario

- 1 termómetro-Hidrómetro,
- 1 multímetro,
- 1 cronómetro certificado,
- 1 termómetro certificado,
- 1 probeta de 10ml, Baño de ultrasonido,
- Juego de herramienta para HPLC,
- 1 bobina de tubería de 0,25mmDIxmtL,
- 1 tornillo tapón,
- 5 ml de solución de metilparabeno de 60 mg/L en metanol,
- 1 Columna Merck RP-18 125MM CAT. 1509430001,
- Solución de hidrocarburos: tolueno 8,6 ug/mL, naftaleno 161,5 ug/mL, y antraceno 1751,2 ug/m en acetonitrilo: agua (75:25),
- Solución de óxido de holmio,
- Solventes para fase móvil y solución de lavado: agua, metanol y acetonitrilo grado HPLC, solución de lavado: alcohol isopropílico o isopropanol y ácido nítrico.
- Balanza con calibración vigente (proporcionada por el cliente en sus instalaciones)
- Sacarosa para fines bioquímicos.

3.6 Condiciones generales

3.6.1 Verificación de materiales y equipo

Verificar que los materiales y equipo se encuentran en buen estado y con fase de calibración vigente para los equipos que aplique.

- a) Revisión del sistema; se debe efectuar previo a cualquier trabajo.
- b) El instrumento debe ser claramente identificado
- c) Se comprueba que no muestre errores y que el mismo no tenga partes visiblemente dañadas y las funciones esenciales para su uso se encuentren disponibles, de lo contrario reportar al responsable y proceder a un mantenimiento correctivo,
- d) Monitorear que las condiciones ambientales del área en donde se encuentra ubicado el sistema sean las apropiadas para su desempeño.
- e) Los solventes para la fase móvil y solución de lavado deben ser filtrados y desgasificados antes de su uso en el sistema.
- f) Los manuales de usuario de cada módulo indican cómo realizar el mantenimiento preventivo. Los manuales deben encontrarse disponibles por medio del cliente.
- g) Las pruebas para la calibración operativa se encuentran realizadas de acuerdo a los SOP's del fabricante. Los SOP's del fabricante se encuentran en el archivo general del departamento de Servicio Técnico o Jefatura del Laboratorio

Es recomendación del representante del fabricante realizar en su totalidad las pruebas comprendidas en el presente procedimiento una vez el año en los sistemas HPLC. El departamento de Mantenimiento dispone que las pruebas a realizar se efectúen de acuerdo a la disponibilidad del equipo,

a la experiencia del técnico y a las necesidades del cliente en cuanto a las pruebas críticas o las que aporten mayor valor para la realización del documento de calificación operativa.

3.7 Mantenimiento preventivo

3.7.1 Unidad de bomba

- ✓ Limpieza interna y externa, verificación de operaciones. Se realiza ajuste de presión cero. Se lava en baño de ultrasonido las piezas de la etapa de flujo:
- ✓ Filtros de botellas y filtros de líneas en ácido nítrico 6 N, luego en agua, cada ciclo de 7 minutos.
- ✓ Tuberías, válvulas, cabezales y demás piezas en agua, luego en alcohol isopropílico, cada ciclo de 7 minutos.
- ✓ Cambio de empaque y sellos necesarios, según necesidad.

3.7.2 Sistema de inyección

- ✓ Limpieza interna y externa, verificación de funciones de operación.
- ✓ Cambio de empaques y sellos necesarios, aproximadamente cada 4 meses.

3.7.3 Horno para columna

Limpieza interna y externa, verificación de funciones de operación.

3.7.4 Detector

Limpieza interna y externa. Verificación de funciones de operación.
Limpieza y verificación de sistema óptico y de estado de lámparas.

De acuerdo del modelo de detector se pueden realizar ajustes de espejos y limpieza de lentes a fin de conseguir el mayor valor de referencia de la lámpara según el modelo.

* **IMPORTANTE:** Para los detectores de fluorescencia e índice de refracción, la limpieza del sistema óptico no aplica.

3.7.5 Interface

Limpieza interna y externa. Verificación de funciones de operación.

3.7.6 Computadora e impresora

Limpieza interna y externa. Verificación de funciones de operación. Pruebas de comunicación del sistema HPLC con la computadora. Se realiza mantenimiento de las carpetas de resultados. (Backup)

3.7.7 Protección eléctrica (UPS)

El sistema HPLC debe tener un sistema de protección eléctrica adecuado. Se realiza limpieza externa, prueba de verificación de trabajo con carga.

3.7.8 Finalización del procedimiento

Se requiere llenar el formato de mantenimiento del sistema HPLC según modelo, con el fin de dejar registro de las actividades realizadas según modelo y como ejemplo tenemos los sistemas.

El documento totalmente lleno se puede entregar al cliente junto al formato propio de la empresa o de la empresa prestadora de servicio para el registro de la calificación de mantenimiento (MQ).

Se deben actualizar los contadores de uso de los empaques y sellos en los módulos que lo permitan para llevar el control de la frecuencia de uso.

3.8 Calificación operativa

3.8.1 Unidad de bomba

Se realiza purga de líneas confirmando ausencia de burbujas.

3.8.2 Rango de flujo

Se comprueba con agua a flujo lento y a flujo rápido, con 1 y 5 ml/min de flujo, evaluando el correcto trabajo y funcionamiento de motor de la bomba.

3.8.3 Presión cero

Se realiza ajuste de presión cero. El resultado esperado es 0 ± 1 bar.

3.8.4 Error de presión mínima

Se programa la bomba a una presión mínima de 10 bares con flujo de 1 ml/min utilizando la bobina de teflón como columna. Abrir la llave de purga y al pasar unos segundos, la bomba se apaga al llegar el mínimo de presión programado e indica una señal auditiva y la indicación del error en pantalla.

3.8.5 Error de presión máxima

Se programa la bomba a una presión máxima 390 bares con flujo de 0,2 ml/min utilizando el tornillo tapón en la salida del filtro de línea de la bomba. La llave de purga debe estar cerrada. La bomba se apaga al llegar al máximo de presión programado y muestra en pantalla el error.

3.8.6 Rango de fuga

Después de generar el error de presión máxima del numeral anterior, iniciar el cronómetro y anotar el valor de presión mostrando en pantalla después de 5 minutos. El valor esperado para todos los modelos de bomba es de Presión > 300 bares.

3.8.7 Exactitud de flujo

Tarar en la balanza analítica la probeta. Se realiza la toma de agua en la probeta lo más exacto posible a la salida de la celda con la bobina de teflón como columna y durante 5 minutos utilizando el cronómetro. Pesar el agua de la probeta, medir la temperatura del agua y realizar la corrección del valor obtenido.

El resultado corregido es igual al resultado obtenido en la balanza multiplicado por el factor de la tabla. El valor esperado es de $5 \pm 0,2$ ml.

3.8.8 Precisión de flujo

Realizar una prueba de repetibilidad de $n=6$ con la solución de metilparabeno según las siguientes condiciones:

Columna: bobina de teflón 0,25 DI x 10mtL

Volumen de inyección: 10 ul,

LO: 254 nm,

Fase móvil: Metanol,

Flujo: 1 ml/min.

Evaluar el resultado de tiempo de retención del pico de cuantificado para un %RSD ≤ 1 .

3.8.9 Prueba de exactitud de gradiente

Se realiza de acuerdo a las siguientes condiciones:

Fase móvil A: 40% Metanol / 60% Agua

Fase móvil B: 0,1 % Acetona en 40% Methanol / 60% Agua

Fase móvil C: 40% Metanol / 60% Agua

Fase móvil D: 0,1% Acetona en 40% Metanol / 60% Agua

Flujo: 1,0 mL/min

Columna: Bobina de teflón 0,25mm x 10mtL

Detector: 254 nm

Tabla II. Programa de tiempo para exactitud de gradiente de unidad de bomba

Tiempo	%A	%B	%C	%D
0.0	100	0	0	0
0.1	75	25	0	0
6.0	75	25	0	0
6.1	50	50	0	0
12.0	50	50	0	0
12.1	0	100	0	0
18.0	0	100	0	0
18.1	0	0	100	0
24.0	0	0	100	0
24.1	0	0	75	25
30.0	0	0	75	25
30.1	0	0	50	50
36.0	0	0	50	50
36.1	0	0	0	100
42.0	0	0	0	100
42.1	100	0	0	0
50.0	100	0	0	0

Los solventes deben ser des gasificados. Purgar el sistema con cada fase móvil a 25% por 3 minutos. Correr la línea A al 100% a flujo de 2 mL/min hasta que la línea base estabilice. Mida el gradiente a la línea de mezcla de 25% (H 25). Mida la altura de la señal de la línea base a la mezcla del 100% de la línea B (H 100). Mida el gradiente a la mezcla de la línea del 50% (H 50). Mida la altura de la señal desde la línea base a la línea de mezcla del 100% de B (H100). Repita las mediciones para los rangos C y D.

Evaluación de resultados:

Exactitud de mezcla 25% = $H_{25} / H_{100} \times 100$

Exactitud de la mezcla 50% = $H_{50} / H_{100} \times 100$

Los resultados obtenidos deben estar dentro de una tolerancia de $\pm 2\%$

3.8.10 Sistema de inyección

Aplica solo para los sistemas con automuestreador. Utilizar como solución de lavado la misma fase móvil. Evaluar por ausencia de burbujas en jeringa, purgar la jeringa las veces que sean necesarias.

3.8.11 Precisión de inyección

Se realiza una prueba de repetibilidad de $n=6$ según las condiciones descritas en el numeral 6.1.7, evaluando el resultado de área o concentración del metilparabeno para $\%RSD \leq 1$.

3.8.12 Linealidad de inyección

Se realiza un método con 5 soluciones estándar de acuerdo a las condiciones del numeral 6.1.g, según los volúmenes de inyección siguientes:

S1= 1 % = 1 ul

S2= 2 % = 2 ul

S3= 5 % = 5 ul

S4= 10 % = 10 ul

S5= 20 % = 20 ul

Evaluar el coeficiente de correlación $r^2 \geq 0,999$.

3.8.13 Revisión de posición de aguja

Se realiza la revisión de la posición de la guja en varias posiciones del rack de viales, posiciones de vial extremos y medios.

3.8.14 Para los sistemas de inyección manual

Se realiza Ensayo GLP.

3.8.15 Detector UV/VIS/DAD/FL

Las pruebas se realizan de acuerdo al modelo de detector que tenga el sistema después de no menos de 30 minutos de estabilización, las pruebas a realizar con las siguientes:

3.8.16 Auto cero

Con la celda llena de agua destilada activar la función de auto cero, los resultados esperados son, por ejemplo en los sistemas:

LiChrograph UV/Vis y laChrom UV/vis: 0,0000A.

LaChrom Elite UV/Vis: ± 1200 conteos

La Chrom FL: $\pm 0,1$ FLU

La Chrom Elite: ± 400 conteos

3.8.17 Energía de lámpara

Activar la función de energía según el modelo del detector, los resultados esperados son, por ejemplo en los sistemas:

LiChrograph UV/Vis:	E ref @ 250 nm \geq 1000 conteos E ref @ 500 nm \geq 1600 conteos
La Chrom UV/Vis:	E ref @ 250 nm y 600 nm \geq 150 conteos
La Chrom Elite UV/Vis:	E ref @ 250 y 600 nm \geq 75000 conteos
La Chrom DAD	Eslit coarse \geq 20000 conteos
laChrom Elite DAD	Eslit coarse \geq 20000 conteos

3.8.18 Exactitud de longitud de onda

Realizar la función de calibración de longitud de onda según modelo, los resultados esperados son, por ejemplo en los sistemas:

LiChrograph UV/Vis:	656,1 nm \pm 2 nm
LaChrom UV/Vis:	656,1 nm \pm 1 nm
Lachrom DAD	486 nm y 656,1 nm \pm 3nm
Lachrom Elite UV/Vis/DAD	254 nm, 486 nm y 656 nm \pm 1 nm
Lachrom FL	452 nm \pm 3 nm
Lachrom Elite FL	254 nm \pm nm

El pico de 254 nm es emitido por la lámpara de Mercurio.

Los picos de 486 y 656,1 nm son emitidos por la lámpara de Deuterio.

El pico de 452 nm corresponde a las líneas de emisión de la solución estándar de Holmio.

3.8.19 Sensibilidad de detector de fluorescencia

Se realiza de sensibilidad al obtener los resultados de Pico de Raman (S) y de ruido (N), de acuerdo a la siguiente especificación:

$$\text{Sensibilidad} = \text{Señal} / \text{Ruido (SN)}$$

3.8.19.1 Señal

Prueba de Pico Raman, de acuerdo al valor de altura obtenido del pico. Utilizando agua destilada como muestra con un mínimo de una hora de estabilización en la celda. Se debe utilizar el método de la tangente para el cálculo de altura del pico.

3.8.19.2 Ruído

Estabilidad de línea base durante 15 minutos en 450 nm. Se debe calcular la altura de los picos encontrados durante la adquisición de la línea base, el cálculo se hace manualmente.

- Los resultados esperados son, por ejemplo en los sistemas:
- LaChrom: $S/N \geq 120$
- LaChrom Elite: $S/N \geq 225$

3.8.19.2.1 Detector de índice de refracción: Las pruebas se realizan después de permitir 1 hora de estabilización del detector con la función de purga activa con agua destilada en el sistema.

3.8.20 Auto cero

Presionar la tecla de auto cero y observar en pantalla "0" de índice de refracción.

3.8.21 Sensibilidad

Preparar una solución de 0,35 % de sacarosa, inyectar 5 ml en la celda y observar en pantalla un valor de 512 ± 35 . Ajustar el span del detector si es necesario.

3.8.22 Forma de pico

Preparar una solución de 0,05% de sacarosa, conectar la bobina de 0,25 mmDlx10mtL y realizar una inyección de 20 ul de la solución descrita. Después de la estabilización del sistema obtener el pico de la sacarosa y esperar por 5 minutos para el fin de adquisición, observar por la ausencia de picos negativos.

3.8.23 Horno para columna

Realizar las mediciones después de media hora de estabilización de la temperatura fijada para asegurar el acondicionamiento del sistema.

3.8.24 Exactitud de temperatura

Se realiza la medición de temperatura con el termómetro certificado lo más cercano al sensor de temperatura de horno. Los resultados son, por ejemplo en los sistemas:

LaChrom:	$50\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$
LaChrom Elite	$20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$

3.8.25 Estabilidad de temperatura

Se realiza la medición durante 10 minutos, observando los resultados cada minuto. El cambio de temperatura esperado es, por ejemplo en los sistemas:

LaChrom: $\Delta = \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$

LaChrom Elite: $\Delta = \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$

3.8.26 Sensor de fuga

Se inyecta con una jeringa 50uL de mentol desde el panel frontal, con el horno a 50 °C. Se debe obtener una señal de error de fuga de acuerdo al modelo.

3.8.27 Ensayo GLP

Realizar una prueba de repetibilidad de n=6 con la solución de hidrocarburos según las siguientes condiciones, por ejemplo en los sistemas Hitachi LaChrom:

Columna: Merck RP – 18 125mm, cat. 1509430001,

Volumen de inyección: 10ul,

LO: 254 nm,

Fase móvil: ACN:H2O (75:25)

Flujo: 1 ml/min.

Evaluar el resultado de áreas o concentración de los picos obtenidos para un %RSD ≤ 2 .

3.8.28 Finalizado del servicio

Se revisa el correcto llenado de los documentos asociados. Se le entrega al cliente el reporte de servicio para la aceptación del trabajo realizado.

Se le entrega al Encargado de Servicio de OQ y MQ para el envío de los mismos al cliente.

En este capítulo se efectúa una revisión exhaustiva a todos los módulos, en sus puntos más críticos, esto para garantizar al usuario del equipo y a la institución que están dando resultados exactos.

Lo más importante para obtener resultados exactos es brindarle el procedimiento de mantenimiento preventivo al HPLC, o correctivo cuando así lo necesite. Por lo que en el siguiente capítulo damos a conocer los puntos críticos y formas de resolución de las fallas típicas.

Tabla III. Densidad del agua (ρ [g/ml]) en dependencia de la temperatura.

Temperatura (°C)	P[g/ml]	Temperatura (°C)	P[g/ml]
18	0.9986	28	0.9962
18.5	0.9985	28.5	0.9961
19	0.9984	29	0.9960
19.5	0.9983	29.5	0.9958
20	0.9982	30	0.9957
20.5	0.9981	30.5	0.9955
21	0.9980	31	0.9953
21.5	0.9979	31.5	0.9955
22	0.9978	32	0.9950
22.5	0.9977	32.5	0.9949
23	0.9975	33	0.9947
23.5	0.9974	33.5	0.9945
24	0.9973	34	0.9944
24.5	0.9972	34.5	0.9942
25	0.9971	35	0.9940
25.5	0.9970	35.5	0.9939
26	0.9968	36	0.9937
26.5	0.9967	36.5	0.9935
27	0.9965	37	0.9933
27.5	0.9964	37.5	0.9931

4 GUÍA PARA EL MANTENIMIENTO DE HPLC

4.1 Puntos críticos del sistema cromatográfico

La tabla IV contiene los puntos críticos correspondientes a aspectos que afectan al sistema de manera general y se toma como referencia para realizar las BPL referentes al Sistema Cromatográfico

Tabla IV. Puntos críticos del sistema cromatográfico

Punto Critico	Problema(s)	Posible BPL que previene o evita que se presente el o los problema(s)
1. Limpieza	-Aumento paulatino de presión debido a obstrucción total o parcial del sistema	-Lavado general del sistema cromatográfico.
2. Funcionamiento.	-Fallas técnicas.	-Programa y ejecución del mantenimiento preventivo del equipo. -Verificar que la alimentación de poder éste dentro del intervalo de trabajo del equipo. -Registrar el funcionamiento, en forma de cartas de operación del equipo en general y de los módulos por separados, o una bitácora para el sistema en general con divisiones por módulo. Los registros se deben revisar, antes de usar el equipo,

		<p>cuando existen más de un operador; si es un solo operador lo debe hacer, dependiendo de la carga de trabajo, periódicamente (diario, cada tercer día, semanal o mensual). Adicionalmente en ambos casos cada vez que se requiera por causas fortuitas. En casos de sospechar de alguna posible anomalía, atenderla, solicitando el mantenimiento de inmediato en los casos en que el operador no lo puede hacer.</p>
--	--	---

En el formato que se sugiere utilizar para la BPL del punto crítico de “Limpieza” que aplica específicamente al equipo del HPLC que estemos tratando, la empresa es responsable de diseñar su propio formato, y los puntos que básicamente puede contener son:

- 1.- Nombre del laboratorio.
- 2.- Área departamento o división.
- 3.- Clave de identificación y número consecutivo, proporcionado por el Sistema de Aseguramiento de Calidad de la empresa o institución que es quien debe controlar el número de copias de cada documento.
- 4.- Título general.
- 5.- Subtítulos.
- 6.- Objetivo o introducción.

- 7.- Campo de aplicación o alcance.
- 8.- Notaciones y definiciones.
- 9.- Desarrollo o procedimientos.
- 10.- Referencias.

4.1.1 Entrega de disolventes (bombas)

Para el caso de la entrega de disolventes se tienen tres partes importantes a considerar que son:

- La interacción entre los disolventes y contenedores,
- De los disolventes por si solos,
- La bomba que los provee.

4.1.2 Puntos críticos en la interacción entre disolventes y contenedores

En la tabla V, se listan los puntos críticos más sobresalientes que se deben considerar en la selección de disolventes (fase móvil). Esta se refiere a las características y condiciones que tanto los disolventes como en los contenedores para un análisis específico se pueden cuidar para aumentar la reproducibilidad y exactitud de los resultados

Tabla V. Puntos críticos en la interacción entre disolventes y contenedores

Punto críticos	Problema(s)	Posible BPL que previene o evita que se presente el o los problema(s)
1.- Fases móviles	-Cambio de concentración de	-la boca debe ser de menor diámetro posible.

	<p>disolventes para el caso de mezclas, cuando la volatilidad de alguno de ellos es mayor que la de los otros.</p> <p>-Si existen impurezas, se concentran y pueden dar interferencias mayores.</p>	<p>-Emplear tapones diseñados para que el orificio donde se inserta la tubería selle a la misma</p>
2.-Heterogeneidad de los disolventes	<p>-Cambios en los tiempos de retención cuando la fase móvil se renueva.</p>	<p>-Si es un análisis rutinario se puede emplear el envase original del disolvente.</p> <p>-En caso de ser necesario, tratar de emplear el mismo lote, hasta donde sea posible.</p>
3.Viales	<p>-Cambios en los tiempos de retención cuando la fase móvil se renueva</p>	<p>-Análisis de polímeros – No usar contenedores de plástico.</p> <p>-Análisis de iones metálicos-No usar contenedores de vidrio.</p>
4.Disolventes sensibles a la luz	<p>-Degradación del disolvente, cambios en la concentración en el caso de mezclas</p>	<p>-Para todos los disolventes que vienen protegidos de la luz, usar su propio contenedor de la luz,</p>

		usar su propio contenedor si es posible o en su defecto proteger el contenedor, se puede emplear un plástico obscuro o papel aluminio.
--	--	--

4.1.3 Fases de móviles de HPLC

Lo ideal sería preparar las fases móviles cuando fueran necesarias a partir de un tipo conocido de disolventes de calidad HPLC y filtrarlas con un filtro de 0,45 micras para eliminar cualquier materia sin disolver. A continuación se desgasifica la fase móvil utilizando helio o técnicas ultrasónicas y se evalúan las impurezas haciendo pasar el nuevo disolvente por el sistema de HPLC y midiendo cualquier interferencia de fondo a las longitudes de onda de la detección. Esto puede resultar problemático cuando se utiliza acrilonitrilo con detección UV. Todos los disolventes se conservarán de modo que se evite la contaminación con partículas transportadas por el aire y la contaminación atmosférica con contaminantes como dióxido de carbono, cloruro de hidrógeno, cloro y compuestos volátiles de azufre. También debe evitarse cuidadosamente la formación de productos inestables de reacción (por ejemplo peróxidos en el tetrahidrofurano una vez eliminados los estabilizadores durante la redestilación).

4.1.4. Puntos críticos de los disolventes por sí solos

Los puntos críticos que se deben considerar en los disolventes por sí solos, se refiere a que el solvente que se emplee en el análisis debe cumplir ciertas características para obtener mejores resultados y los puntos que se deben considerar corresponden a la tabla VI.

Tabla VI. Puntos críticos de los disolventes por sí solos

Punto críticos	Problema(s)	Posible BPL que previene o evita que se presente el o los problema(s)
1.-Los disolventes usados como fase móvil	-Daños a columnas	-La pureza debe ser grado HPLC o no menor del 99%. -Inyectar el disolvente puro para verificar que no interfiera. -Filtrar y desgasificar los disolventes antes de usarse y usar filtros en línea. -Lavar los filtros de acero inoxidable o de teflón de la línea de entrada de los disolventes o cambiarlos frecuentemente si se tienen en línea.
2.-Solubilidad de la muestra en la fase	-Tuberías y/o columnas tapadas por	-Hacer pruebas de solubilidad de la muestra

móvil.	precipitación de la muestra.	previas al análisis.
3.-Diseño del método.	<ul style="list-style-type: none"> -Muestras no retenidas, por lo tanto hay separaciones pobres. -Muestras retenidas excesivamente, y en consecuencia tiempos de análisis muy largos. 	<ul style="list-style-type: none"> -Pruebas previas con disolventes puros. -Mezcla de disolventes para lograr separaciones con factor de capacidad entre 1 y 10. -Intentar gradientes de elusión.
4.-Desgasificación.	<ul style="list-style-type: none"> -Tiempos de retención modificados por cambios en la presión. -Señal de ruido proveniente del detector, señales confusas. -Columnas sensibles al oxígeno, como NH_2 o NH_3 	<ul style="list-style-type: none"> -Desgasificar con gas inerte a flujo y presión constante sobre todo en bombas reciprocantes.
5.-Compatible con el detector.	<ul style="list-style-type: none"> -Problemas en la línea base debido a la señal la fase móvil, sobre todo en gradientes. 	<ul style="list-style-type: none"> -Seleccionar disolventes que no den señal del 10% de la escala a las condiciones de trabajo en el detector.
6.-Viscosidad alta.	<ul style="list-style-type: none"> -Presión alta. 	<ul style="list-style-type: none"> -Aumentar la

	-Picos coleados.	temperatura, provoca disminución de la viscosidad, de la presión y mayor solubilidad del analito en el solvente por lo que disminuyen los tiempos de retención
--	------------------	--

Durante el proceso de optimización de un método, el analista debe preguntar para cada uno de los factores críticos, como está éste interfiriendo en sus resultados, para responder la pregunta es posible evaluar el factor, diseñando un experimento específico por factor, para evitar que la variación de resultados esté dada por más de un factor crítico. Con base al análisis de los datos ver cómo afecta el resultado, obtener el punto óptimo para cada factor y documentarlo para ese análisis en particular.

En métodos ya caracterizados y establecidos solo se deben evaluar cuando se sospecha de un problema específico a excepción de actividades rutinarias como desgasificación, filtración, tapar bien los contenedores y cubrirlos de la luz, etc.

4.1.5 Bomba

La función principal de la bomba de HPLC es proporcionar un flujo continuo de fase móvil a la columna de separación a una presión constante. Las piezas principales de la bomba aspirante e impelente son los pistones, los cierres de los pistones y las válvulas de retención, el motor y las levas de la barra impulsora.

Antes de su uso diario, hay que comprobar si el flujo de la bomba es constante. Si se observa que el flujo es débil o intermitente, hay que introducir en el sistema disolvente desgasificado para eliminar el aire atrapado, limpiar a fondo las válvulas de retención y, si está ajustado,

comprobar el correcto funcionamiento del regulador de impulsos. Cuando se sustituyen los cierres y las válvulas de retención, hay que actuar con cuidado para no dañarlos apretando excesivamente las piezas. El valor de la columna bombeada deberá ser preciso. Sin embargo, sólo ha de ser exacto cuando el analista instala y valida un sistema analítico. Una vez validado el sistema, lo único que importa es la precisión del flujo. Se comprobará la columna bombeada a intervalos periódicos fijando la bomba en un volumen dado y pasando el disolvente bombeado a un cilindro u otro aparato de medición.

4.1.6 Puntos críticos en bombas

Hay dos tipos principales de bombas empleadas en la entrega de la fase móvil en HPLC que son las de presión constante y las de flujo constante:

- las de presión constante, basadas en el empuje constante que ejerce un gas sobre la fase móvil haciéndola pasar por la columna, por lo que el flujo de la fase móvil depende de la resistencia que a su paso opone la columna.
- las de flujo constante, varían su presión para alcanzar un flujo determinado (éstas son las más empleadas).

Ambas tienen modalidades que se mencionan en la tabla VII

Tabla VII. Puntos críticos en bombas


De presión constante (actualmente en desuso)	De presión directa mediante un gas. De intensificador neumático. De intensificador hidráulico.
De flujo constante	De pistón o diafragma. De pistón recíprocante. De jeringa o desplazamiento continuo.

Independientemente del tipo de bomba que se trate, las Buenas Prácticas de Laboratorio para las bombas (tabla VIII)

Deben de dirigirse a conocer el desempeño de la bomba y prevención de la corrosión del sistema de bombeo (cabezales, pistones y válvulas “check”).

Tabla VIII. Puntos críticos en bombas

Punto críticos	Problema(s)	BPL que previene o evita que se presente el o los problema(s)
1.-Reproducibilidad del Flujo.	-Variaciones en los tiempos de retención.	-Se debe verificar la velocidad de flujo cuando se enciende la bomba o cuando se cambia el tipo de disolvente.

<p>2.-Línea base</p>	<p>-Línea base con fluctuaciones por pulsaciones: Línea base: normal</p> <hr/> <p>con fluctuaciones:</p> 	<p>-Purgar adecuadamente la bomba. -Evitar que la bomba trabaje con los contenedores con poco disolvente o sin disolvente. -Evitar mezclar disolventes que no son miscibles tanto en el lavado como cuando se trabaja con sistema de gradiente. -Usar atenuadores de pulsos como: a) Colocar una sección larga de tubo (6 m de largo por 1mm de diámetro) entre la bomba y la cámara de inyección, este tubo capilar se deja flotar libremente y así absorbe las pulsaciones producidas por la bomba. b) Entubados de Bourdon. c) Columna rellena de pequeños cristales.</p>
<p>3.-Cabezales</p>	<p>-Sellos del pistón dañados. -Pistón dañado. -Válvulas "check" dañadas-</p>	<p>-Depende del diseño de cada equipo, en su mayoría estos problemas se pueden prevenir. -Con el proceso de lavado del sistema</p>

		cromatográfico. -En los sistemas que cuentan con tubería especial para el lavado de cabezales, no olvidar colocarlos en el contenedor adecuado (generalmente agua).
--	--	--

4.1.7 Puntos en la introducción de muestras (inyectores)

La inyección es muy importante para obtener resultados veraces, esto es, que el volumen inyectado corresponda al que se está tomando en cuenta en los cálculos, sobre todo cuando se trabaja con curvas de calibración con estándar externo. La reproducibilidad del volumen de inyección depende en gran medida del analista para el caso de inyectores manuales o de la calidad de autoinyector (que generalmente dan mejores resultados que la mano humana). Los puntos críticos más sobresalientes que se deben considerar se mencionan en la tabla IX.

Tabla IX. Puntos en la introducción de muestras (inyectores)

Punto críticos	Problema(s)	Posible BPL que previene o evita que se presente el o los problema(s)
1.-Volumen de inyección	-Variaciones en el volumen inyectado.	-Verificar el volumen de inyección programado. -Colocar suficiente volumen de muestra en el vial.

		-No colocar muestras muy viscosas.
	-Variación evidente el tamaño de los picos.	-Asegurarse de no crear vacios en el vial.
	-Fugas de líquido.	-Verificar si la guja de inyección tiene el diámetro apropiado y la punta está en buen estado. -Verificar que el sello del puerto de inyección se encuentre en buen estado. -Verificar que el "loop" este bien conectado.
	-Agujas dobladas.	-No colocar septas rígidas en los viales. -Verificar que la tapa del vial esté colocada correctamente.
2.-Inyector obstruido	-Precipitación de muestras.	-Lavar el inyector diariamente con la fase móvil, cuando trabaje con disoluciones amortiguadoras lavarlos con abundante agua. -Verificar miscibilidad de muestras con la fase móvil o disoluciones de lavado.
	-Partículas en la muestra.	-Filtrar las muestras antes de inyectarlas-

3.-Tiempo de retención.	-Variaciones en los tiempos de retención de los picos debido a variaciones en la señal de arranque o activación en el inyector.	-Cuando se da la señal de activación de manera manual, homogenizar el tiempo que se toma en dar dicha señal.
-------------------------	---	--

4.1.8 Columnas de HPLC

Como cualquier medio de separación cromatográfica, la columna de HPLC debe funcionar con la eficiencia necesaria, como mínimo, para llevar a cabo la separación de los analitos. Por consiguiente, se calibrará periódicamente y se vigilará la resolución por medio de patrones.

Las columnas pueden deteriorarse por diversas razones, como la contaminación, el cambio de polaridad debido a la pérdida de actividad o una perturbación en la geometría de la columna. La contaminación puede producirse en el cuerpo de la columna, a causa de la unión irreversible de un componente a la fase estacionaria o, más frecuentemente, debido a la retención de materia extraña en la parte superior de la columna. Sólo es necesario prestar atención a las columnas si el deterioro de la resolución es analíticamente significativo. Si es necesario puede quitarse el extremo superior de la columna; a continuación se quita la "frita" de retención y se inspecciona el relleno de la columna. La supresión de unos pocos milímetros de relleno y su sustitución por nuevo relleno y una nueva "frita" resolverá tal vez este problema, pero podría causar otros con algunos rellenos de alta resolución.

El problema más grave es la pérdida de sensibilidad de una columna por razones que varían ampliamente según el tipo de columna (intercambio de

iones, sílice, FR, fase unida). Se deberá tratar de limpiar la columna introduciendo en ella el disolvente utilizado habitualmente en el análisis, y si con esto no se consigue una mejora, se utilizará disolvente de distinta polaridad, teniendo presente la necesidad de elegir un disolvente miscible y la naturaleza del relleno de la columna. Introducir por detrás el disolvente no da buenos resultados, ya que altera el relleno y hace que el flujo de disolvente sea desigual. Si se dispone del equipo y los conocimientos necesarios, puede que la solución más rentable sea rellenar una nueva columna.

4.1.9 Puntos críticos en columnas y empaques

De lo anterior, es claro que la caracterización de la columna es fundamental, y como un punto crítico, se debe realizar para conocer una columna nueva, y contar con esos datos como punto de referencia en las subsecuentes caracterizaciones así como el historial de la misma. Los puntos críticos más sobresalientes que se deben considerar se mencionan en la tabla X.

Tabla X. Puntos críticos en columnas y empaques

Punto críticos	Problema(s)	Posible BPL que previene o evita que se presente el o los problema(s)
1.- Eficiencia	-Pérdida de eficiencia	-Siempre que se adquiriera una columna nueva se deben evaluar los parámetros N (eficiencia), k' , R, y α con los que se

		<p>puede llevar un control de vida de la columna.</p> <p>-Es recomendable tener una carpeta de control o bitácora con el historial de cada columna.</p> <p>-Cuando se tenga pérdida en la eficiencia de la columna esta debe ser regenerada, reemplazar los filtros y comprobar su eficiencia caracterizándola (N, k', R, y α).</p>
	-Columna dañada	<p>-Seleccionar adecuadamente las condiciones de trabajo, en base a indicaciones del proveedor.</p> <p>-Evitar disminuir o aumentar bruscamente el flujo cuando la columna esté conectada para evitar cambios bruscos de presión.</p> <p>-Evitar disolventes que reaccionen con la columna (que sangren la columna).</p>
2.- Temperatura	-Variaciones en los	-Controlar la temperatura

	<p>tiempos de retención y afinidad entre analito y columna.</p> <p>-Formas de los picos.</p>	<p>con la mayor precisión posible dentro de los límites, puede ser con baño recirculador de agua u horno de resistencia eléctrica.</p>
	<p>-Disminución de la eficiencia de la columna por altas temperaturas.</p>	<p>-Seguir las indicaciones del proveedor, por ejemplo: -columnas con base de sílica no se deben calentar por arriba de 60 °C así como algunas columnas de tamaños de partículas pequeños debido a que pierden eficiencia (N) hasta un 50 % cuando se calientan a temperaturas altas; para tamaños de partícula de 3 μ se degradan con temperatura por arriba de 40 °C.</p>
3.- Conexión	<p>-Fugas</p>	<p>-Verificar que las tuercas o ferrul no estén mal apretadas.</p> <p>-Verificar que el filtro sea el adecuado.</p> <p>-Verificar que la columna no esté tapada por objetos extraños.</p>

		<ul style="list-style-type: none"> -Verificar que el diámetro de las tuberías sea el correcto.
	<ul style="list-style-type: none"> -Columnas obstruidas. -Presión alta. -Picos fantasmas. -Picos coleados. 	<ul style="list-style-type: none"> -Usar filtros y guarda columnas en línea. -Filtrar y limpiar hasta donde sea posible muestras sucias. -Cambiar los filtros frecuentemente. -Lavar la columna frecuentemente con un disolvente fuerte.
5.- Almacenamiento	<ul style="list-style-type: none"> - Crecimiento bacteriano 	<ul style="list-style-type: none"> - Almacenar las columnas después de lavarlas en disolución de algún disolvente orgánico con agua en una proporción 2:8, como por ejemplo metanol, acetonitrilo, etc. Excepto para columnas de permeación en gel que se deben de almacenar en disoluciones amortiguadoras con 0.1% de azida. -Ver las recomendaciones del fabricante. -Asegurarse de colocar bien los tapones en los extremos de la columna

		antes de almacenarlas.
6.- pH	<ul style="list-style-type: none"> -Cambios en la forma de los picos. -Degradación de columnas. -Decrece el tiempo de retención en compuestos no básicos y aumenta el tiempo de retención para compuestos básicos. 	<ul style="list-style-type: none"> -Para empaques de fase unida, donde la base es sílica, usar fases móviles con pH entre 2.5 y 7. Usar precolumnas con el mismo empaque o de sílica.

4.1.10 Detectores de HPLC

En el análisis de alimentos se utilizan diversos detectores, el más frecuente de los cuales es el basado en UV visible, fluorescencia, índice de refracción y propiedades electroquímicas de los analitos. La respuesta de estos detectores se comprobará diariamente utilizando el patrón que recomiende el fabricante para detectar cualquier "desviación" en el rendimiento, que suele ser una advertencia oportuna de un fallo inminente en el detector.

Los detectores, especialmente los que se utilizan para medir componentes derivados después de la columna, deben enjuagarse a fondo al final de cada jornada o al completar una serie de análisis. Hay que tener especial cuidado con los detectores cuando se utilizan junto con bloques móviles modificados con aminas o sulfanatos amortiguados. Después del uso, el detector se desconectará y limpiará haciendo pasar ácido nítrico disuelto en agua (1:10) a través de la unidad. Se dejará reposar durante diez minutos y se aclarará a fondo con agua. Este procedimiento garantiza la eliminación de componentes que pueden producir sedimentos insolubles y obstruir el instrumento.

4.1.11 Puntos críticos en detectores

Los problemas que se suelen presentar en los detectores depende del tipo de detector, pero existen problemas comunes como los que se listan en la tabla XI. Los problemas particulares de cada detector generalmente se resuelven con el mantenimiento preventivo del mismo. El ruido en la línea base proveniente del detector es un problema frecuente, e interfiere de manera directa en el cálculo del área de los picos y en consecuencia en los resultados del análisis.

Tabla XI. Puntos críticos en detectores

Punto críticos	Problema(s)	Posible BPL que previene o evita que se presente el o los problema(s)
1.-Ruido.	<ul style="list-style-type: none"> -Problemas en la integración por presencia de señales de ruido, lo que disminuye el nivel de detección. -Picos fantasmas debido a ruido 	<ul style="list-style-type: none"> -Permitir que se caliente el detector por aproximadamente media hora, o una hora para que alcance su máxima sensibilidad. -Control del tiempo de uso de las lámparas. -Contar con una lámpara para repuesto. -Cambiar la lámpara cuando el tiempo de vida está por terminar (2500 horas), limpiar la superficie de la lámpara

		<p>con algodón o metanol, no dejar residuos de grasa, ni de algodón.</p> <p>-Si se cambia la lámpara, calentar una hora.</p> <p>-desgasificar la fase móvil.</p>
	-Problemas de carga estática.	<p>-Conexión adecuada del detector a tierra.</p> <p>-Usar tapetes antiestáticos.</p>
2.- Linealidad de la respuesta.	-Deriva en la línea base causada por el detector, no por un gradiente: esto se traduce en problemas en la cuantificación.	<p>-Control de temperatura del ambiente.</p> <p>-verificar que la fuente de energía sea adecuada.</p>
3.- Sensibilidad.	- Picos pequeños en soluciones con concentraciones altas.	<p>-Seleccionar adecuadamente los parámetros de trabajo del detector, ejemplos: <u>UV-VIS</u>, que la longitud de onda (λ) sea la adecuada para el o los analito(s), y que la fase móvil no de respuestas altas en λ.</p> <p><u>Electroquímico</u>, que el</p>

		electrodo de trabajo sea el correcto.
4.- Contaminación.	-Interferencias por contaminación en la celda.	-Lavar bien la celda y tuberías del detector después de cada jornada de trabajo con disolvente de alta fuerza de elusión, no olvidar que cuando se trabaja con soluciones amortiguadoras como fase móvil, se debe lavar con abundante agua y dejarse en una disolución de agua/disolvente orgánico 8:2.
	-Generación de presión alta debida a tuberías obstruidas del detector.	-Cuando no se utilicen los detectores se deben cerrar los puertos de entrada y salida, para evitar que la celda se seque y se contaminen las tuberías o la misma celda.
5.-Fugas.	-Fugas en las conexiones. -Fugas en la celda.	-Verificar que los tornillos de conexión estén bien colocados y apretados.

En la tabla XII se listan de una forma ordenada las fallas típicas que se podrían presentar en los equipos de Cromatografía, dicha tabla incluye las posibles causas de la falla y posibles soluciones tipificadas, para el mantenimiento correctivo y/o preventivo.

Tabla XII. Fallas típicas / causas / solución

TIPO DE SÍNTOMA	CAUSA POSIBLE	SOLUCIÓN
Distorsión línea base en tiempo muerto	Positiva/negativa- Diferencia en el índice de refracción del disolvente de inyección	Usar fase móvil para disolver la muestra
Fugas en el detector	Catastrófico-Fallo del sello del detector	Cambiar sellos/juntas
Desviación de la línea base	Dirección positiva- Acumulación de contaminantes/elución	Lavar la columna, eliminar la contaminación de la muestra, usar disolventes puros
	Dirección negativa (gradiente) Absorbancia del disolvente de fase móvil "A"	Usar disolvente no absorbente o de calidad HPLC
	Dirección positiva (gradiente) Absorbancia de fase móvil "B"	Usar longitudes de onda UV mayores
	Dirección ´ positiva	Usar disolvente no

	(gradiente)- Absorbancia del disolvente de fase móvil "B"	absorbente o de calidad HPLC
	Aleatoria – Cambios de temperatura	Aislar la columna y los tubos
	Aleatoria – Cambios de temperatura	Termostatar la columna y los tubos
	Ondulatoria – Cambios de temperatura en la sala	Vigilar y controlar la temperatura de la sala
Picos fantasma	Picos de inyecciones previas	Lavar la columna al final del análisis con un disolvente fuerte
	Contaminación	Lavar la columna para eliminar los contaminantes
	Interferencia desconocidas en la muestra	Limpia la muestra o pre-fraccionarla
	Par iónico- equilibrio inestable	Preparar la muestra en la fase móvil para minimizar la distorsión
	Mapeo de péptidos – Oxidación del TFA	Preparar en el día; usar un antioxidante
	Fase reversa – Agua contaminada	Comprobar la idoneidad del agua analizando distintas

		cantidades en la columna de fase reversa y medir la altura de los picos al eluir, utilizando grado HPLC
	Picos extra – Burbujas en disolvente	Desgasificar el disolvente
Retropresión elevada en la columna	Bloqueo de columna por adsorción irreversible de muestra	Purificar mejor la muestra, usar pre-columna
	Viscosidad de la fase móvil demasiado elevada	Usar disolventes de menor viscosidad o temperatura superior
	Tamaño de partícula demasiado pequeño	Usar empaquetado de mayor d.p.
	Frita de entrada taponada	Cambiar la conexión terminal
	Frita de entrada taponada	Invertir el flujo del disolvente
Fugas	Sutil; polvo blanco en la conexión – conexión floja	Apretar la conexión, cortar el tubo o cambiar la férula
Fuga en la válvula de inyección	Catastrófico – Rotor de la válvula gastado	Cambiar el rotor de la válvula
Fuga en la	Catastrófico – Conexiones	Apretar o cambiar las

columna u otras conexiones	flojas	conexiones
Fuga en la bomba	Catastrófico – fallo del sello de la bomba	Cambiar el sello de la bomba
Picos de negativos	Detector RI – El índice de refracción del soluto es menor que el de disolvente	No hay problema, invertir la polaridad para hacerlo positivo
	Detector UV – La absorbancia del soluto es menor que la de la fase móvil	Usar fase móvil con menor absorbancia UV; no reciclar el disolvente mucho tiempo
Línea base con ruido	Aleatorio-Acumulación de contaminantes	Lavar la columna, purificar la muestra; usar disolvente de calidad HPLC
	Continuo- Problema con la lámpara del detector	Cambiar la lámpara UV (dura 1000 horas)
	Esporádico – Interferencia eléctrica externa	Usar estabilizador de voltaje para LC
	Picos extra – burbuja en el detector	Desgasificar la fase móvil o regular la retropresión
Picos dobles	Volumen de muestra demasiado grande	El volumen de muestra debe ser 1/6 cuando se use fase móvil para inyección
	Disolvente de inyección	Usar un disolvente o fase

	demasiado fuerte	móvil más débil
	Frita bloqueada	Cambiar o usar un filtro en línea de porosidad 0.5 I
	Vacios en columna o canalización	Empaquetar los vacios con empaquetado o perlas de vidrio; rellenar de nuevo la columna
	No hay barrido del paso de flujo del inyector	Cambiar el rotor del inyector
	Vacio en la cabeza de columna	Rellenar hasta arriba la columna con empaquetado o perlas de vidrio
	Sobrecarga de muestra en la columna	Utilizar una fase estacionaria de mayor capacidad Aumentar el diámetro de la columna Disminuir el tamaño de la muestra
	Pico único – componentes interferentes	Purificar la muestra; pre-fraccionamiento
Colas de picos	Inicio de picos dobles	Vea los picos dobles

	No hay barrido de volúmenes muertos	Minimizar el número de conexiones Comprobar el sello del inyector Comprobar el ajuste de las conexiones
	Interacción compuestos básicos – silanol	Cambiar a fase polimérica
	Interacción sustancias básicas – silanol	Usar fase móvil más fuerte o añadir una base competitiva (ej. TMA)
	Degradación de la columna – basada en sílice	Usar columnas especiales, poliméricas o con protección esférica
	Interacción del silanol – basada en sílice	Añadir sal a la fase móvil para aumentar la conexión del tapón Disminuir el pH de la fase móvil Derivatizar el soluto para cambiar las interacciones polares
Picos muy anchos	Volumen de inyección demasiado grande	Disminuir la fuerza del disolvente de inyección para localizar el soluto
	Dispersión del pico en la	Introducir burbujas de aire

	válvula de inyección	delante/detrás de la muestra para disminuir la dispersión
	Velocidad de muestreo demasiado lenta	Aumentar la frecuencia de muestreo
	Constante de tiempo del detector lenta	Ajustar la constancia de tiempo para que coincida con la anchura de pico
	Elevada viscosidad de la fase móvil	Aumentar la temperatura de la columna
	El volumen de la celda del detector es demasiado grande	Usar el menor volumen de celda posible sin intercambiador de calor en el sistema
	Volumen del inyector demasiado grande	Disminuir el volumen de inyección
	Tiempos de retención largos	Usar la elución en gradiente o una fase móvil más fuerte
Fluctuación de la presión	Fuga en la válvula de seguridad	Cambiar la válvula de seguridad
	Burbujas en la bomba	Desgasificar, purgar con helio
	Fugas en el sello de la bomba	Cambiar los sellos de la bomba

Incremento de la presión	Acumulación de partículas	Filtrar la muestra, colocar un filtro en línea, filtrar la fase móvil
	Sistema acuosos/orgánicos- Precipitación del tampón	Comprobar las mezclas tampón-orgánicas para asegurar la compatibilidad
Retención superior al volumen de permeación total	Exclusión por tamaño- Interacciones específicas con la fase estacionaria	Añadir modificadores de fase móvil o cambiar el disolvente
Cambios en los tiempos de retención	Variación de la temperatura de la columna	Termostatar o aislar la columna, mantener constante la temperatura
	Tiempo de equilibrado insuficiente con análisis en gradiente o cambios en la fase móvil isocrática	Asegurarse de que como mínimo 10 volúmenes de columna pasan a través de la columna tras el cambio de disolvente o finalización del gradiente
	Evaporación selectiva de componentes de la fase móvil	Purgar con helio menos vigorosamente, mantener tapados los disolventes, preparar la fase móvil en el momento

	Insuficiente capacidad del tampón	Usar una concentración de tampón >20 mM
	Inconsistencias en la mezcla de la fase móvil en línea	Asegurarse de que el sistema de gradiente proporciona una composición constante; comprobar frente a la preparación manual de la fase móvil
	Acumulación de contaminación	Lavar esporádicamente la columna para eliminar los contaminantes
	Primeras inyecciones- Adsorción en los centros activos	Acondicionar la columna con la inyección inicial de muestra concentrada
Disminución de los tiempos de retención	Incremento de la velocidad de flujo	Comprobar el funcionamiento de la bomba, reiniciarla si fuera necesario
	Sobrecarga de muestra en la columna	Disminuir el tamaño de la muestra
	Pérdida de fase estacionaria ligada	Mantener el pH de la fase móvil entre 2 y 8,5
Aumento de los tiempos de retención	Disminución de la velocidad de flujo	Reparar las fugas de las líneas de líquido, cambiar los sellos de la bomba y

		comprobar la cavitación de la bomba o las burbujas de aire
	Centros activos en el empaquetado de sílice	Usar modificadores de fase móvil
	Pérdida de fase estacionaria ligada	Mantener el pH de la fase móvil entre 2 y 8,5
	Cambios de la composición de la fase móvil	Asegurarse de que el contenedor de la fase móvil esté tapado
	Centros activos en el empaquetado de sílice	Añadir una base competitiva a la fase móvil
	Centros activos en el empaquetado de sílice	Usar empaquetado de mayor cobertura para la fase estacionaria
Problemas de sensibilidad	Los picos salen fuera del rango lineal del detector	Diluir/concentrar para ajustarlos a la región lineal
	Primeras inyecciones de muestra-Absorción de muestra en el loop o columna	Acondicionar el loop/columna con muestra concentrada
	Obstrucción de las líneas de flujo del inyector automático	Comprobar el flujo y asegurarse de que no haya obstrucciones
	Loop de muestra de inyección	Asegurarse de que el loop

	semilleno	esté completamente lleno de muestra
	Pérdidas relacionadas con la muestra durante la preparación	Usar un patrón interno durante la preparación de la muestra, optimizar el método de preparación
Tiempos de equilibrio de la columna lentos (pares iónicos)	Tiempo de equilibrado lento para reactivos de pares iónicos de cadena larga	Usar reactivos de cadena química más corta

Los anteriores capítulos nos guían al buen funcionamiento del HPLC. En el siguiente capítulo encontraremos las normas, o partes más relevantes de la Normativa del ente regulador Nacional (COGUANOR), que aplica a las instituciones ACREDITADAS, o en proceso de ACREDITACIÓN, realizar todos los procedimientos para mantener los equipos funcionando correctamente para dar resultados exactos.

5 GENERALIDADES SOBRE UN LABORATORIO DE ANÁLISIS ACREDITADO BAJO LA NORMA ISO 17025

En un Laboratorio acreditado bajo la Norma COGUANOR NTG/ ISO /IEC 17025, la cual se enfoca a LOS REQUISITOS GENERALES PARA LA COMPETENCIA DE LOS LABORATORIOS DE ENSAYO Y CALIBRACIÓN, dado a estos requerimientos vemos la importancia que tienen los de calibración, calificación, instalación y mantenimiento de los equipos analíticos entre los cuales juegan un rol muy importante los CROMATÓGRAFOS LÍQUIDOS DE ALTA PRESIÓN. Teniendo en cuenta que son aspectos o requisitos fundamentales para obtener y conservar la acreditación en las pruebas de análisis, vemos la importancia de citar algunos fragmentos importantes de los capítulos de la NORMA 17025.

5.1. Coguanor NTG/ISO/IEC 17 025

Contiene todos los requisitos que tienen que cumplir todos los laboratorios de ensayo y de calibración si desean demostrar que poseen un sistema de gestión, son técnicamente competentes y son capaces de generar resultados validos.

El capítulo 4 establece los requisitos para una gestión sólida. El capítulo 5 establece los requisitos para la competencia técnica en los tipos de ensayos o calibraciones que el laboratorio lleva a cabo.

La aceptación de los resultados de ensayo y de calibración entre países debería resultar más fácil, si los laboratorios cumplen con esta norma internacional y obtienen la acreditación de organismos que han firmado acuerdos de reconocimiento mutuo con organismos equivalentes que utilizan esta norma internacional en otros países.

Del capítulo 5 de la Norma COGUANOR NTG/ISO/IEC 17025 titulado Requisitos Técnicos citaremos algunos incisos de mayor relevancia y relación con el informe de tesis.

5.1.1 Generalidades

5.1.1.1 Muchos factores determinan

La exactitud y la confiabilidad de los ensayos o de las calibraciones, realizados por un laboratorio. Estos factores incluyen elementos provenientes de:

- Los factores humanos (5.2),
- Las instalaciones y condiciones ambientales (5.3);
- Los métodos de ensayo y de calibración, y la validación de los métodos (5.4) ;
- Los equipos (5.5);
- La trazabilidad de las mediciones (5.6);
- El muestreo (5.7);
- El manejo de los objetos a ensayar o calibrar (5.8).

5.1.1.2 El grado

En el que los factores contribuyen a la incertidumbre total de la medición difiere considerablemente según los ensayos (y los tipos de ensayo) y las calibraciones (y los tipos de calibración). El laboratorio debe tener en cuenta estos factores al desarrollar los métodos y procedimientos de ensayo y de calibración, en la formación y la cuantificación del personal, así como en la selección y la calibración de los equipos que se utilizan.

5.2 Personal

5.8.19 La Dirección del Laboratorio

Debe asegurar la competencia de quienes operan los equipos específicos, realizan los ensayos o las calibraciones, evalúan los resultados y firman los informes de ensayo y los certificados de calibración. Al emplear personal en formación, se debe proveer una supervisión apropiada. El personal que realiza tareas específicas debe estar calificado sobre la base de una educación, formación y experiencia apropiadas, así como de habilidades demostradas, según sea requerido.

5.3 Instalaciones y condiciones ambientales

5.3.1 Las instalaciones

De laboratorio para realizar los ensayos o las calibraciones, incluidas pero no limitadas a, las fuentes de energía, la iluminación y las condiciones ambientales, deben facilitar la ejecución correcta de los ensayos o de las calibraciones.

El laboratorio debe asegurar que las condiciones ambientales no invaliden los resultados o afecten adversamente la calidad requerida de cualquier medición.

5.4 Equipos

5.4.1 El laboratorio debe estar provisto con todos los componentes de los equipos para el muestreo, la medición y el ensayo requeridos para la ejecución correcta de los ensayos o de las calibraciones (incluido el muestreo, la preparación de los objetos a ensayar o a calibrar y el procesamiento y análisis de los datos de ensayo o de calibración). En

aquellos casos en los que se necesite utilizar equipos que estén del control permanente del laboratorio, éste debe asegurar que se cumplan los requisitos de esta Norma.

5.4.2 El equipo y su software utilizado para los ensayos, las calibraciones y el muestreo deben permitir lograr la exactitud requerida y deben cumplir con las especificaciones pertinentes para los ensayos o las calibraciones concernientes. Se deben establecer programas de calibración para las magnitudes o los valores clave de los instrumentos, cuando dichas propiedades afecten significativamente a los resultados. Antes de poner en servicio un equipo (incluido el utilizado para el muestreo) debe ser calibrado o verificado con el fin de establecer que satisface los requisitos especificados del laboratorio y cumple con las especificaciones normalizadas pertinentes. El equipo debe ser verificado o calibrado antes de su uso (véase 5.6).

5.4.3 Los equipos deben ser operados por personal autorizado. Las instrucciones actualizadas sobre su uso y el mantenimiento de los equipos (incluido cualquier manual pertinente suministrado por el fabricante del equipo) deben estar fácilmente disponibles para ser utilizadas por el personal apropiado del laboratorio.

5.4.4 Cada componente del equipo y su software utilizado para los ensayos y las calibraciones, que sea importante para el resultado, debe ser identificado de forma única, cuando sea factible.

5.4.5 Se deben mantener registros de cada componente del equipo y su software que sea importante para la ejecución de los ensayos o de las calibraciones.

5.4.6 El laboratorio debe tener procedimientos para el manejo seguro, el transporte, almacenamiento, uso y mantenimiento planificado de los equipos de medición con el fin de asegurar el funcionamiento apropiado y de prevenir la contaminación o el deterioro.

5.4.7 Los equipos que hayan sido sometidos a una sobrecarga o un maltrato, que den resultados dudosos, o se haya demostrado que están defectuosos o que están fuera de los límites especificados, deben ser puestos fuera de servicio.

5.4.8 Cuando sea factible, todos los equipos bajo el control del laboratorio que requieran calibración, deben ser rotulados, codificados o identificados de alguna manera para indicar el estado de calibración, incluida la fecha en la que fueron calibrados por última vez y su fecha o criterio de vencimiento para recalibración.

5.4.9 Cuando por cualquier razón el equipo quede fuera del control directo del laboratorio, éste debe asegurar que el funcionamiento y el estado de calibración del equipo sean verificados y muestren ser satisfactorios, antes de volver a ser puestos en uso.

5.4.10 Cuando se necesiten verificaciones intermedias para mantener la confianza en el estado de calibración de los equipos, éstas se deben efectuar según un procedimiento definido.

5.4.11 Cuando las calibraciones den lugar a un conjunto de factores de corrección, el laboratorio debe tener procedimientos para asegurar que las copias (por ejemplo, en el software de la computadora), se actualizan correctamente.

5.4.12 Se deben proteger los equipos de ensayo y de calibración, tanto el hardware como el software, contra ajustes que pudieran invalidar los resultados de los ensayos o de las calibraciones.

5.5 Trazabilidad de la medición

5.5.1 Generalidades

Todos los equipos utilizados para los ensayos o las calibraciones, incluidos los equipos para mediciones auxiliares (por ejemplo, para las condiciones ambientales) que tengan un efecto significativo en la exactitud o en la validez del resultado del ensayo, la calibración o el muestreo, deben ser calibrados antes de ser puestos en servicio. El laboratorio debe tener establecido un programa y un procedimiento para la calibración de sus equipos.

5.5.2 Requisitos específicos

5.5.2.1 Calibración

5.5.2.1.1 Para los laboratorios de calibración, el programa de calibración de los equipos debe ser diseñado y operado para asegurar que las calibraciones y las mediciones hechas por el laboratorio sean trazables al Sistema Internacional de Unidades (SI).

5.5.2.1.2 Existen ciertas calibraciones que actualmente no se pueden realizar de forma estricta en unidades SI. En estos casos, la calibración debe proporcionar confianza en las mediciones al establecer la trazabilidad a patrones de medición apropiados por medio del uso de:

- Materiales de referencia certificados.
- Métodos especificados o normas consensuadas.

5.5.2.2 Ensayos

5.5.2.2.1 Para los laboratorios de ensayo, los requisitos dados en 5.6.2.1 se aplican a los equipos de medición y de ensayo con funciones de medición que utiliza, a menos que se haya establecido que la incertidumbre introducida por la calibración contribuye muy poco a la incertidumbre total del resultado de ensayo. Cuando se dé esta situación, el laboratorio debe asegurar que el equipo utilizado puede proveer la incertidumbre de medición requerida.

5.5.2.2.2 Cuando la trazabilidad de las mediciones a las unidades del SI no sea posible o pertinente, se deben requerir los mismos requisitos de trazabilidad que para los laboratorios de calibración, por ejemplo, a materiales de referencia certificados, métodos acordados o normas consensuadas.

CONCLUSIONES

1. Es de vital importancia para un laboratorio acreditado, recopilar y ordenar información sobre la instalación, calificación y mantenimiento de un HPLC, para tener claros los conceptos más relevantes y los cuidados adecuados de dichos equipos.
2. Agilizar los procesos analíticos en las aplicaciones que tengan como principal equipo de análisis Cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC).

RECOMENDACIONES

1. Es responsabilidad del analista dar un resultado exacto cuando procesa una muestra para cuantificar uno o más analitos, por lo que se recomienda conocer, monitorear y perfeccionar todos los aspectos que afecten la exactitud de los resultados de un método analítico.
2. En cromatografía de líquidos de alta resolución por ser una técnica analítica instrumental, una forma de perfeccionar el desempeño y optimizar los resultados proporcionados por esta técnica es la identificación de las fuentes de error y documentarlas en un Manual de Buenas Prácticas de Laboratorio específico para Cromatografía de Líquidos.
3. El mantenimiento preventivo y la calificación son muy importantes para que los Cromatógrafos de Líquidos de Alta Resolución de los mejores resultados de los análisis realizados, y en un Laboratorio acreditado bajo las normas ISO 17025 generalmente es un requisito que se debe de cumplir.

REFERENCIAS

1. Sánchez G. Mónica, Castro G. Esther, Sáinz U. Judith G., González R. Norma, Arvizu T. Rocio, Lora S, Ana Maria., Lara M. Velina J. y Ramirez M. Estela; "Manual de Buenas Prácticas de Laboratorio"; Publicación CNM-MRD-PT008, CENAM; Mexico 1995.
2. Annual Book of ASTM Standards; Method Number D1193-91; "Standard Specification for Reagent Water"; Vol. 11.01; Philadelphia, PA; 1992.
3. Arce O. Mariana y Godina G. Susana; "Procedimientos del Manejo de Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución del Sistema de Gradiente 600s . CENAM-LAB. QRO. México, 1995
4. Dolan Jonh W. and Snyder Lloyd R.; "TROUBLESHOOTING LC Systems"; Humana Press; LC Resources Inc., Walnut Creek, California, 1989.

BIBLIOGRAFÍA

1. BUENAS PRÁCTICAS DE LABORATORIO EN CROMATOGRFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN

- a. Q.F.B. Mariana Arce Osuma
- b. Primera Edición, febrero de 1998
- c. Primera reimpresión, diciembre de 2002

2. USER-MANUAL

- a. D-7000 HPLC Sistem Manager
- b. HITACHI,
- c. 1st Edición 1994
- d. Printed in Japan

3. AGILENT CHEMSTATION

- a. © Agilent Technologies, Inc. 2004, 2005-2007
- b. Edición 02/07
- c. Impreso en Alemania, Agilent Technologies
- d. Hewlett-Packard-Strasse 8, 76337 Waldbronn

E-grafia

4. www.google.com (2009)
 - a. Wikipedia, enciclopedia libre
 - b. Cromatografía

