



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

“IMPORTANCIA DE LAS BUENAS PRACTICAS DE LABORATORIO EN CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION”

TRABAJO ESCRITO VIA CURSOS DE
EDUCACION CONTINUA

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

PRESENTA:

DEYANIRA MIRANDA BELTRAN



EXAMENES PRO... ES
FACULTAD DE...

MEXICO, D. F.

AÑO 2004





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Deyanira Miranda Beltrán

FECHA: 30 de Agosto de 2004

FIRMA: *[Firma]*

Jurado asignado:

Presidente Prof. GEORGINA MARGARITA MAYA RUIZ
Vocal Prof. PEDRO SALVADOR VALADEZ ESLAVA
Secretario Prof. VICTOR HUGO BECERRA LÓPEZ
1er Suplente Prof. EFRÉN HERNÁNDEZ BALTASAR
2º Suplente Prof. SARA ELVIA MEZA GALINDO

TEMA DESARROLLADO EN CIUDAD UNIVERSITARIA

Georgina Maya
2

ASESOR: Q.F.B. GEORGINA MARGARITA MAYA RUIZ

[Firma]
AB

SUSTENTANTE: DEYANIRA MIRANDA BELTRÁN

AGRADECIMIENTOS

A Dios por concederme la vida y muchas bendiciones a lo largo de mi vida.

*A mis Padres: Magdalena y Leonel por todo su amor y apoyo incondicional. Por ser mis guías y ejemplo. Mis logros son suyos.
Mis hermanos: Esther y Cuauhtémoc, por todos los momentos compartidos en la vida.*

A ésta institución educativa, UNAM por formarme como profesionista al servicio de la sociedad.

A mi asesora y miembros del jurado por su apoyo y conocimientos compartidos para la realización de éste trabajo.

A la familia Orihuela Beltrán por su apoyo a lo largo de mis estudios. También a la familia Beltrán Vargas por todos los momentos vividos en mi vida.

A ti Marco Antonio por tu amor y apoyo incondicional para concluir éste eslabón en mi vida. Ya Lupita Díaz por su cariño.

*A mis amigos: Erika, Iván y Alejandra por su amistad y apoyo en todos los momentos compartidos en esta facultad y hasta la fecha.
Angélica y Eduardo por su amistad.*

Al centro de trabajo, compañeros y amigos por la comprensión y apoyo brindado para concluir ésta etapa profesional.

“Siente lo que dices con cariño, de lo que piensas con esperanza, piensa lo que haces con fe, y haz lo que debes con amor”

GANAR PERDIENDO

*Pedí a Dios fortaleza para poder triunfar,
fui hecha débil, para que aprenda humildemente a obedecer.*

*Pedí salud para poder hacer grandes cosas,
me fue dada flaqueza, para que pueda hacer mejor las cosas.*

*Pedí riqueza para poder ser feliz,
se me dio pobreza para que pueda ser sabia.*

*Pedí poder para se el orgullo de los hombres,
se me dio debilidad, para que pueda sentir la necesidad de Dios.*

*Pedí todas las cosas para poder disfrutar la vida,
se me concedió la vida, para que pueda disfrutar todas las cosas.*

*No se me dio nada de lo que pedí,
pero todo lo que deseaba y algo más incluso, a pesar de mí,
las oraciones que expresé fueron respondidas...*

¡De entre todas las mujeres, ya he recibido la mejor bendición!

Anónimo

INTRODUCCIÓN

Las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL's) surgen de la necesidad de que los organismos públicos son responsables de proteger a los ciudadanos y al medio ambiente de materiales peligrosos a través de la emisión de normas. Para ello se necesitan datos analíticos confiables y un seguimiento de todo el proceso, para poder juzgar sobre la seguridad de un producto. Las BPL's están relacionadas con la organización, proceso y condiciones bajo las que se planifican, realizan, controlan, registran e informan los estudios de los laboratorios.² Por consiguiente se definen las BPL's como los principios básicos que se desarrollan para asegurar que los estudios se conducen con una buena planeación, con la ejecución apropiada y con documentación completa.³

Los Sistemas de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) con el paso del tiempo y desarrollo de la tecnología se han convertido en instrumentos cada vez más complejos de diseño, funciones y alcances, constituyendo así una variable importante en la obtención de información en la industria farmacéutica al ser una técnica analítica instrumental de multicomponentes. El buen funcionamiento del instrumento conjuntamente con un desarrollo analítico adecuado y validación de la metodología analítica son condiciones necesarias para garantizar la calidad de los resultados analíticos generados por el sistema.

El empleo de la técnica cromatográfica de líquidos de alta resolución como una herramienta analítica de uso diario en el laboratorio, nos obliga a reconocer la importancia de las variables que pueden afectar la calidad y consistencia de la información que de ellos se obtiene. Para toda persona que se involucra suficientemente con la técnica, le resulta evidente la cantidad de factores que pueden definir el éxito de un análisis cromatográfico siendo tal que resulta difícil enumerarlos en su totalidad y aún más las interacciones entre ellos.

La presente tesina tiene como objetivo describir los factores teórico-prácticos, así como la definición de los lineamientos básicos asociados como parte de la Buenas Prácticas de Laboratorio que nos llevan a la obtención de resultados analíticos exactos, precisos, reproducibles y confiables¹ con un manejo adecuado de las metodologías analíticas y del instrumento.

INFORMACIÓN GENERAL DEL TEMA

ASPECTOS TEÓRICOS BÁSICOS

La técnica de **Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR)** emplea una fase móvil líquida para separar los componentes de una mezcla; los cuales primero son disueltos en un disolvente y son forzados a fluir (vía fase móvil) a través de una columna (fase estacionaria) a altas presiones.⁷ La distribución de un compuesto entre las dos fases es el resultado del balance de fuerzas entre las moléculas del compuesto y las moléculas de cada fase; refleja la atracción o repulsión relativas que presentan las moléculas o iones de las fases competidoras por el compuesto y entre sí. Por tanto, la migración diferencial está determinada por aquellas variables experimentales que afectan esta distribución: la composición de la fase estacionaria y la temperatura de separación.¹⁰

La CLAR se divide en dos grandes categorías:⁷

- A) **Fase Normal:** Se emplea una fase estacionaria polar (comúnmente sílica) para retener en diferente grado los compuestos polares y como fase líquida solventes poco polares.
- B) **Fase Reversa:** Se emplea una fase estacionaria no polar (sílica a la que se le ha unido grupos funcionales no polares) y solventes polares como fase móvil para eluir compuestos poco polares en diferente grado. Esta es la técnica más ampliamente usada es la reversa por sus ventajas en uso de solventes menos tóxicos.⁷ A su vez la elusión de la muestra puede efectuarse de dos maneras:¹⁰
- A) **Isocrática:** Cuando no se modifica la composición de la fase móvil durante el análisis.
- B) **Con gradiente:** Cuando la composición de la fase móvil varía durante una corrida. En este caso se utilizan dos o más disolventes de diferente polaridad y se programa con cambios en su proporción, en forma continua o escalonada, según la naturaleza de la muestra. A su vez pueden programarse también cambios de flujo en los diferentes tiempos de la corrida, éstas instrucciones se llevan a cabo a través de un controlador automático.

En la cromatografía de líquidos las separaciones se realizan en base a la diferente distribución de los compuestos de una mezcla entre las fases estacionaria y móvil.

Ésta distribución está representada por un equilibrio al que se asocia una constante llamada **Coficiente de Distribución:**¹⁰

$$S_m \Leftrightarrow S_{st} \qquad K = \frac{[S]_{st}}{[S]_m}$$

Donde:

S_m = Solute en la fase móvil

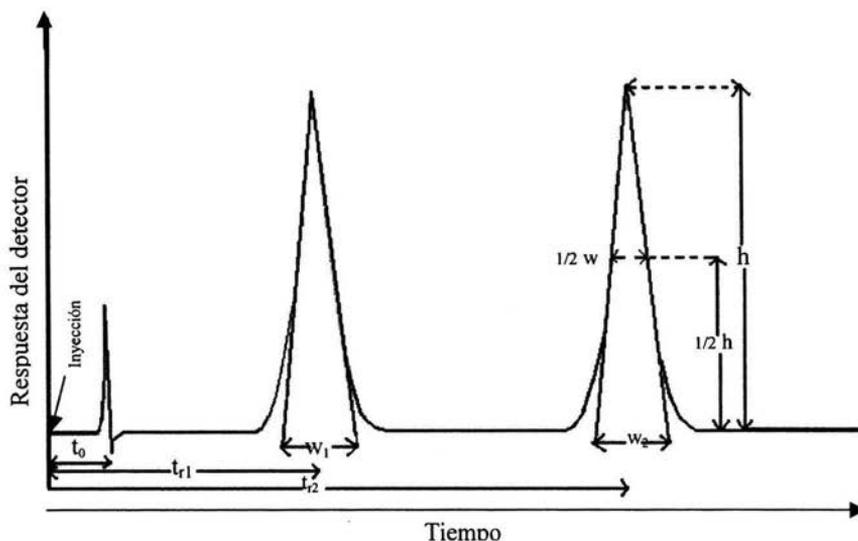
S_{st} = Solute en la fase estacionaria

K = Constante de equilibrio

$[S]_m$ = Concentración del soluto en la fase móvil.

$[S]_{st}$ = Concentración en la fase estacionaria.

A las condiciones en que se trabaja la cromatografía con fines analíticos, los coeficientes de distribución de los diferentes componentes son constantes y los solutos migran en forma de bandas simétricas que se representan por picos gaussianos; a esta representación gráfica se le llama **Cromatograma**.¹⁰



donde:

t_{r1} = tiempo de retención del pico 1

t_{r2} = tiempo de retención del pico 2

t_0 = tiempo muerto

w_1 = anchura del pico 1

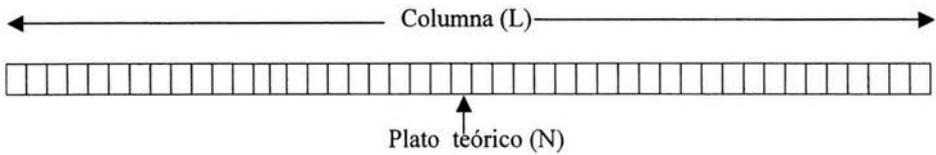
w_2 = anchura del pico 2

$1/2 w$ = ancho del pico al 50% de la altura

h = altura del pico

La calidad de una columna se juzga por el bajo grado de ensanchamiento de las bandas, pues esto es un índice de la posibilidad de lograr una buena separación; mientras más pequeño sea ese ensanchamiento la columna es más eficiente.

Esa eficiencia está vinculada al número de **platos teóricos (N)** que contiene, es decir, el número de ocasiones en que la fase móvil y los compuestos se ponen en equilibrio con la fase estacionaria contenida en el plato. Por esta razón se considera el movimiento de la fase móvil como una serie de pasos sucesivos y no como un desplazamiento continuo, lo cual permite calcular el perfil de distribución de cada especie en cada paso y en cada plato. Después de un cierto recorrido de la fase móvil por la columna, ese perfil tiene la forma de una curva de Gauss.



En realidad, los platos teóricos no existen pero el modelo teórico provee una forma de medir la eficiencia de la columna. N también depende de la longitud de la columna (L), y de otro parámetro llamado altura del plato teórico (H), que mide su eficiencia por unidad de longitud.

$$H = \frac{L}{N}$$

Entre más pequeño es el valor de H más eficiente es la columna; en general se tiene que H es más pequeña en los siguientes casos:

- Baja velocidad de flujo en la fase móvil y diámetro pequeño de la partícula en la fase estacionaria.
- Baja viscosidad en la fase móvil y aumento en la temperatura de separación y
- Con moléculas pequeñas del compuesto.

El valor de N puede ser calculado de la siguiente forma:

$$N = 5.54 \times \left(\frac{t_r}{w_{1/2}} \right)^2 = 16 \times \left(\frac{t_r}{W} \right)^2$$

donde:

t_r = tiempo de retención

$w_{1/2}$ = ancho de pico al 50% de la altura del pico

W = ancho de pico a la línea base

5.54 y 16 son constantes

El **flujo (F)** es la velocidad a la que se mueve la fase móvil en el sistema. Es un valor generalmente constante a lo largo de una determinación y está en relación a la viscosidad del disolvente.

El **tiempo de retención (t_r)**: Es el tiempo transcurrido desde la inyección de la muestra hasta que el detector registra el máximo del pico. Es característico de un compuesto dado siempre y cuando se conserven las mismas condiciones de operación.

El **volumen muerto (V_0)** es la marca al cual eluye la señal del disolvente o un compuesto no retenido.

$$V_0 = t_0 F$$

donde:

t_0 = tiempo muerto F = Flujo

El **tiempo muerto** (t_0). Es el tiempo que tarda en salir una sustancia no retenida.

El **factor de capacidad** (k'). Relaciona la cantidad del compuesto en las dos fases y se define por la siguiente ecuación:

$$k' = \frac{t_r - t_0}{t_0}$$

donde:

k' = factor de capacidad

t_r = tiempo de retención del pico

t_0 = tiempo muerto

- Las separaciones ideales son aquellas cuyas condiciones tienen un k' entre 1- 5
- Los compuestos que tienen un tiempo alto de elusión de la columna comparado con la fase móvil tienen factores de capacidad $k' > 20$
- k' puede ser manipulada por variación de la fase móvil y fase estacionaria.

El **factor de selectividad** (α) expresa la diferencia en los equilibrios de distribución entre dos compuestos y se expresa con cualquiera de las siguientes ecuaciones:

$$\alpha = \frac{k_2'}{k_1'} \quad \alpha = \frac{(t_r)_2 - t_0}{(t_r)_1 - t_0}$$

donde:

$(t_r)_2$ = es el tiempo de retención del segundo componente el cual es más fuertemente retenido

$(t_r)_1$ = tiempo de retención del primer componente

t_0 = tiempo de muerto

k' = factor de capacidad

Cuando $\alpha = 1$ no es posible la separación de los dos componentes empleando el mismo sistema.

La **resolución** (R) indica la separación entre dos picos adyacentes en un cromatograma y depende de dos factores:

1. La separación entre los máximos de los picos, relacionada con sus constantes de distribución.
2. El ensanchamiento de las bandas que migran en la fase móvil a través de la columna.
La resolución está dada por la siguiente ecuación:

$$R = \frac{t_{r2} - t_{r1}}{\left[\frac{W_1}{2} + \frac{W_2}{2} \right]} \text{ bajo la condición } t_{r2} > t_{r1}$$

donde:

t_{r2} = tiempo de retención del pico 2

t_{r1} = tiempo de retención del pico 1

w_2 = anchura del pico 2

w_1 = anchura del pico 1

La resolución está ligada con tres factores: la eficiencia (N), la retención (k') y la selectividad (α); por eso para optimizar una separación puede actuarse sobre cualquiera de esos factores. La ecuación general de la resolución muestra esta relación:

$$R = \frac{1}{4} \sqrt{N} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k'_2}{1 + k'_2} \right)$$

donde:

N = Eficiencia de la columna.

α = Factor de selectividad.

k' = Factor de capacidad.

El factor de separación se varía modificando la composición de la fase móvil y/o la estacionaria. La eficiencia varía con cambios en la longitud de la columna o en la velocidad de flujo del disolvente y el factor de capacidad se modifica con cambios en la fuerza del disolvente.¹¹

El **factor de asimetría (FA)** es una forma muy común de alejamiento de la curva gaussiana. Si FA=1, sus dos mitades separadas por un eje longitudinal son iguales. Es recomendable leer a partir del 10% de la altura del pico ya que la línea base presenta ruido a causa del detector y se hace evidente una asimetría.

Coleo se señala cuando el factor de asimetría del pico es mayor que 1.

Fronteo o cabeceo se refiere cuando el factor de asimetría es menor que 1.

Los parámetros óptimos de separación que se buscan en la optimización o desarrollo de las metodologías son los siguientes:¹³

PARÁMETRO	CRITERIO
Factor de asimetría (FA)	Entre 0.8 y 1.2
Resolución (R)	Mayor de 2.0
Platos teóricos (N)	Mayor a 2000
Factor de capacidad (k')	Entre 2 y 10
Selectividad (α)	Mayor a 1.5

1. - SISTEMA CROMATOGRÁFICO^{4,5}

Para garantizar la calidad de los resultados emitidos es importante considerar los requerimientos de los elementos presentes en un sistema cromatográfico:



A) OPERADOR O QUÍMICO ANALISTA

El personal es competente cuando¹⁴:

1. La materia prima, productos y servicios críticos son evaluados de acuerdo con los Procedimientos Normalizados de Operación (PNO's).
2. Los PNO's, Buenas Prácticas de Documentación (BPD's), BPL's y las reglas de seguridad se cumplen al 100%.
3. Los resultados son registrados durante la evaluación.
4. Los resultados fuera de especificaciones son manejados de acuerdo al PNO correspondiente.
5. La evaluación de las materias primas, productos y servicios es reportada a su supervisor.
6. La disposición de materias primas, productos y servicios críticos es documentada en el sistema de control interno.
7. Posee conocimientos sobre el funcionamiento, operación y resolución de problemas presentes en la ejecución de una técnica analítica cromatográfica.

B) MÉTODO

Para que un resultado analítico concuerde con el propósito requerido (método indicativo de estabilidad, método de residuales o liberación de producto etc.), el método debe ser lo suficientemente confiable para que cualquier decisión basada en él pueda tomarse con confianza. Así el desempeño del método debe ser validado y la incertidumbre del resultado, a un nivel de confianza dado, estimada. La incertidumbre deberá ser evaluada y establecida de una forma que sea ampliamente reconocida, consistente y fácil de interpretar. La mayor parte de la información requerida para evaluar la incertidumbre se puede obtener durante la validación del método.¹⁵

*Incertidumbre¹⁷: Es un parámetro asociado con el resultado de una medición, que caracteriza la dispersión de los valores que podrían ser atribuidos razonablemente al mensurado. Un análisis cuantitativo es un tipo particular de medición y el mensurado muchas ocasiones puede ser la concentración de un analito, pH, % de humedad etc.

Robustez del método, entendiéndose como: la capacidad del método para no ver afectado los parámetros por cambios de algunas o todas las condiciones de trabajo como por ejemplo: pH de la solución amortiguadora de la fase móvil, reactivos, temperatura de la columna de las normalmente empleadas.⁶

Reactivos, solventes, materiales y su limpieza sean de la requerida para CLAR.

C) EQUIPO¹⁶

Éste debe de contar con un programa de mantenimiento preventivo en el que se debe incluir también el programa de calificación al menos una vez al año o cuando así lo requieran, generalmente el mantenimiento lo proporciona el proveedor o el departamento de mantenimiento y servicio de la propia empresa, cuando el personal es entrenado previamente.

Deben realizarse las siguientes calificaciones a un cromatógrafo de líquidos¹⁸:

- Calificación de Diseño: Define las especificaciones funcionales y operacionales del instrumento, y detalla las decisiones conscientes en la selección del proveedor.
- Calificación de Instalación: Estable que el instrumento es recibido de acuerdo a como se diseñó y especificó, que está adecuadamente instalado en el ambiente que se seleccionó y que es apropiado para la operación del instrumento.
- Calificación de Operación: Es el proceso en donde se demuestra que el instrumento funcionará de acuerdo a la especificación operacional en el ambiente seleccionado.

En el caso de la bomba se realiza la prueba de exactitud del flujo, y en bombas binarias o cuaternarias la proporción de fase en cada una de las líneas.

Para el inyector: Prueba de posición del carrusel, de aspiración de la muestra, de temperatura en caso de contar con el controlador de ésta y linealidad del inyector.

En el detector: La prueba de exactitud de la longitud de onda y de linealidad.

- Calificación de Desempeño: El proceso en donde se demuestra que un instrumento se desempeña de acuerdo a la especificación adecuada para su uso rutinario.

Que en el caso de un cromatógrafo de líquidos corresponde a la adecuabilidad del sistema en un análisis rutinario. Como es reproducibilidad de áreas, tiempo de retención.

El laboratorio debe programar las calificaciones en base a:

- Las especificaciones del fabricante.
- Frecuencia de uso.
- Tipo de mediciones realizadas.
- Evaluación de cartas control.

Además del Cromatógrafo de Líquidos deben de considerarse también los equipos accesorios en la preparación de muestras para CLAR como son los siguientes:

- Balanzas Analíticas.
- Potenciómetros.

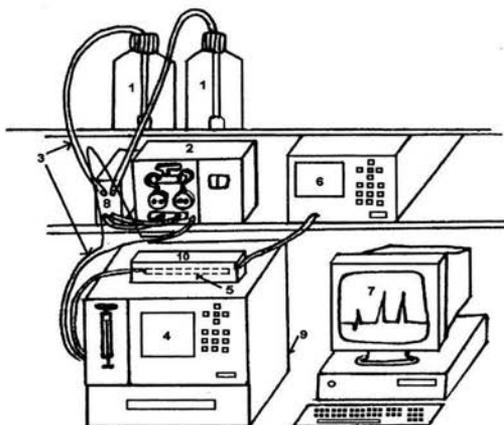
- Espectrofotómetros UV visible.
- Calorímetro diferencial de barrido.
- Baños para control de temperatura.
- Evaporadores con control de temperatura y presión.
- Termómetros
- Cronómetros

Componentes de un cromatógrafo de líquidos.

1. Fase Móvil
2. Bomba
3. Tuberías y conectores
4. Inyector
5. Columna
6. Detector
7. Procesador de Datos o integrador

Opcionales:

8. Desgasificador
9. Controlador de temperatura de las muestras.
10. Horno de la Columna



2. -MÉTODO

2.1 MATERIALES EMPLEADOS

2.1.1 FILTROS

- Si el tipo de filtro requerido para las muestras no se especifica por la metodología analítica, es conveniente verificar en el catálogo del proveedor y seleccionar la membrana cuyo material sea resistente al solvente y permeable al compuesto de interés (por ejemplo: para polisulfatos, fibra de vidrio y policarbonatos para acuosas, PTFE para orgánicos y nylon para mezclas). Preferentemente se debe de filtrar a través de un tamaño de filtro de $0.45 \mu\text{m}$ o menos.⁵
- Verificar la capacidad de recobro de los filtros haciendo una comparación con las mismas muestras pero preparadas por centrifugación. Se sugiere tener un reporte de precisión intermedia en la validación del método analítico para la equivalencia de filtros.⁵

2.1.2 MATERIAL DE VIDRIO

- Para la preparación de las muestras se recomienda emplear matraces volumétricos y pipetas clase A calibrados.⁵

- Seleccionar material de vidrio que protejan de la luz a los principios activos sensibles a ella. Emplear vidrio con bajo contenido actínico cuando el principio activo es susceptible a los metales.⁵
- Emplear pipetas volumétricas TD (deliver class: volúmen de liberación) para transferir o diluir muestras y soluciones de referencia.⁵
- Emplear pipetas volumétrica clase TC (contain class: volumen contenido) para transferir jarabes o muestras viscosas. Las cuales se deben enjuagar con el diluyente.⁵
- Los viales, tapas y septas deben ser materiales apropiados y compatibles con el diluyente para prevenir su evaporación.⁵
- Los materiales de la jeringa del automuestreador y holders de las membranas de filtración deben ser compatibles con el diluyente. No se deben usar agujas metálicas cuando el principio activo es susceptible al metal.⁵

2.1.3 SOLVENTES Y REACTIVOS

- Emplear únicamente reactivos grado HPLC ya que las impurezas incrementan el ruido de la línea base.⁵
- a) Emplear agua grado HPLC⁵: Agua desmineralizada grado USP o Tipo I en la preparación de la fase móvil. (TOC: <50 ppm y/o 18 MΩ de resistividad⁸, absorbancia a 204 nm con celda de 1 cm=0.001).
- Todos los solventes preparados deberán estar etiquetados apropiadamente y cerrados apropiadamente como corresponde a las BPL's.⁵
- Las mezclas acuosas: solventes-aguaⁱ, ácidos fuertesⁱⁱ o bases fuertesⁱⁱⁱ deben estar en contenedores apropiados y permitir que alcancen la temperatura ambiente antes de su uso.⁵

ⁱ Almacenar en vidrio o HDPE (polietileno de alta densidad), pero no policarbonatos.

ⁱⁱ Adicionar el ácido al agua, nunca viceversa.

ⁱⁱⁱ Almacenar en contenedores plásticos y no en vidrio.

2.2 RECOMENDACIONES GENERALES PARA LA PREPARACIÓN DE MUESTRAS Y ESTÁNDARES.⁵

- Usar balanzas calibradas con sensibilidad del ± 0.1 mg para pesar más de 30 mg y una de ± 0.01 mg para menos de 30 mg.⁵
- Registrar: los pesos, número de lote y potencia de los estándares en forma adecuada de acuerdo al procedimiento correspondiente de manejo de estándares. Seguir las

indicaciones descritas antes de su uso de cada sustancia de referencia (por ejemplo secar).

- Preparar por duplicado las soluciones de referencia, para verificar la exactitud de éstas.
- Preparar por duplicado las muestras o según lo indique el método.
- Para mezclas de polvos granulados pesar tal cual sin pulverizar.
- Para análisis de uniformidad de contenido, registrar los pesos de las tabletas/cápsulas/grageas como control interno.
- Adicionar al matraz volumétrico no más del 70% del disolvente, agitar hasta la desintegración total de la forma farmacéutica antes de sonicar la muestra.
- Limpiar la espátula, balanza y área de trabajo después de pesar, como lo señalan las BPL's.
- Se debe desgasificar el diluyente/solvente para preparar muestras y así eliminar el posible oxígeno disuelto cuando se usa una detección amperométrica (Ejem.: potenciométrica, amperométrica o conductividad)
- Esperar a que la solución alcance la temperatura ambiente antes de aforar, cuando se le adiciona un solvente orgánico a una solución amortiguadora o solución acuosa.
- Sonicar por no más de 10 min., al menos que indique el método otra cosa. Después de la sonicación, esperar a que la solución alcance la temperatura ambiente antes de continuar con el siguiente paso del método.
- Al centrifugar, el tubo debe estar tapado adecuadamente y no centrifugar por más de 15 min. (criterio USP)¹².
- La solución de estándar interno se debe adicionar a los estándares y muestras de la misma preparación. Para prevenir un cambio en la concentración del mismo estándar interno por evaporación, no dejar esta solución destapada durante su uso.
- Las muestras de la disolución se deben ser filtrar inmediatamente después de tomarla descartando los primeros mililitros.
- Los viales deben llenar únicamente hasta un 80% de su capacidad, y se deben tapar inmediatamente. Este paso es crucial para principios activos susceptibles a la oxidación. Un llenado a su totalidad puede causar no sólo una contaminación si no también problemas de compresión al momento de la inyección en algunos sistemas y causar una desviación del volumen de inyección.

2.3 SECUENCIA CROMATOGRÁFICA⁵

- Inyectar las soluciones estándar (indicadas en el punto 2.2) al inicio de la corrida para verificar que la exactitud de su preparación se encuentra dentro del rango establecido en el método.
- Inyectar soluciones estándar intercalándolos entre las muestras y al menos que otra cosa especifique el método, como recomendación no se deben inyectar más de 6 muestras entre estándar y estándar.
- Hacer una inyección del diluyente (como blanco) antes de las muestras para evaluar la pureza.
- Inyectar una muestra a la cual se le adicionó solución de referencia de la impureza para ayudar a identificar si los tiempos de retención de las impurezas se ven afectados por la concentración mayor del principio activo.
- Inyectar la solución diluyente o solución de lavado de la columna /aguja después de inyectar muestras viscosas o muy concentradas, (esto limpia la línea de inyección y ayuda a mantener la exactitud y precisión de la inyección y reduce el ruido de la línea base).

3. INSTRUMENTO CROMATOGRÁFICO

3.1 SISTEMAS⁴

Con el objetivo de garantizar a través de la operación adecuada de la instrumentación, una duración mayor de las partes de desgaste de los instrumentos cromatográficos, se sugieren tener las siguientes prácticas en el uso y operación.

- Voltaje de alimentación adecuado y regulado con No-Brake en operación.
- Verificar la operación del ventilador al encender el módulo si el cromatógrafo cuenta con un automuestreador con temperatura controlada.
- Verificar la conclusión exitosa de las rutinas de auto-diagnóstico.
- Asegurar que todos los servicios necesarios estén disponibles (aire, temperatura de operación adecuada, disolventes de lavado).
- Mantener bitácoras de uso diario, mantenimiento y calibración.

3.2 FASE MÓVIL⁷

La selección correcta de la composición de la fase móvil es importante por que determina la separación. Sin embargo esta selección está limitada por el tipo de fase estacionaria empleada. Los factores más importantes a considerar en la fase móvil son: la

polaridad, miscibilidad con otros solventes, inercia química, la longitud de onda UV de corte y toxicidad.

Recomendaciones prácticas:

- b) Considerar la pureza de los solventes empleando únicamente grado HPLC, ya que las impurezas incrementan el ruido de la línea base.
- c) Usar agua grado HPLC.
- d) Asegurar que la fase móvil está libre de polvo u otras partículas filtrándolas a través de membranas apropiadas según la mezcla con un poro de 0.45 μm . Conectando un filtro en la línea conectada al reservorio de la fase móvil para la bomba y tapando la fase móvil correctamente.
- e) Desgasificar la fase móvil ya que puede causar un bombeo irregular y fluctuaciones en la señal del detector, empleando uno o más de las siguientes técnicas:
 - Desgasificar la fase móvil burbujeando helio en la fase móvil por 10 min. aproximadamente.
 - Poner bajo vacío la fase móvil con agitación constante por 10-15 min.
 - Agitar la fase móvil en un baño ultrasónico por al menos 10 min.
- e) Cuando se mezclan los solventes para formar la fase móvil :
 - Comprender la terminología empleada para describir los componentes de la fase. Expresiones comunes son 75/25 v/v ó 75:25 de metanol /agua, indica lo siguiente: 75 mL de metanol más 25 mL de agua.
 - Cuando el equipo cuenta con una bomba cuaternaria y los componentes de la fase se encuentran en reservorios diferentes el analista únicamente debe indicar el porcentaje de cada uno (Ejem. 75% de Metanol y 25% de agua)
 - Si la composición de la fase móvil se prepara manualmente, el volumen de cada solvente se debe medir por separado antes de hacer la mezcla.
- f) Los reservorios de las fases móviles deben ser de color ámbar para protegerlas de la exposición directa a la luz.⁸
- g) Si la fase móvil es únicamente agua se debe de minimizar la posibilidad de crecimiento bacteriano empleando reservorios color ámbar, reemplazarla todos los días y de ser posible emplear recipientes estériles.⁹
- h) Minimizar la volatilidad de los componentes de la fase móvil de la siguiente manera:
 - Mantener la solución fría durante el proceso de desgasificación.

- Mantener el reservorio cerrado todo el tiempo.
- i) Asegurar que la muestra a ser analizada es soluble en la fase móvil y que ésta no reacciona con los componentes de la fase estacionaria. Por ejemplo, soluciones amortiguadoras o modificadores de pH que contienen amonio el cual puede reemplazar grupos N-R de una amina en una fase estacionaria de amino propil.
- j) Monitorear y asegurarse que los niveles de fase móvil son los suficientes para efectuar la corrida.
- k) Etiquetar adecuadamente la fase móvil la cual debe contener al menos la siguiente información: Composición, fecha de preparación, fecha de expiración, nombre de la persona que lo preparó, análisis, nombre del producto o materia prima en el que se va a utilizar.

3.3 BOMBA^{4,7}

La bomba es el corazón del sistema cromatográfico ya que garantiza el flujo constante de la fase móvil por el sistema y debe cumplir especificaciones como reproducibilidad y precisión con lo que se caracteriza su calidad.¹¹; alcanzando presiones superiores a los 340 bares, son de acero inoxidable o aleaciones de titanio que resisten la corrosión y desgaste, algunas partes son de zafiro o de rubí.¹⁰

Las recomendaciones para el uso de ésta son las siguientes:

- a) Mantener los filtros de las fases móviles o disolventes limpios.
- b) Conservar las válvulas de drenado y uniones de tubería sin sales y fugas.
- c) Usar fases móviles o disolventes filtrados y desgasificados previamente.
- d) Mantener el límite de presión no mayor a 4000 psi en el trabajo de rutina.
- e) Purgar las líneas antes de su uso para asegurar que no existen burbujas en el sistema.
- f) Asegurar que cuando se emplee un gradiente de elusión, todos los componentes de la fase móvil son miscibles, ya que las sales de las soluciones amortiguadoras tienden a precipitarse cuando se incrementa la proporción del solvente orgánico.
- g) Habilitar el desgasificador (en bombas que cuenten con este sistema) y dejar funcionar durante 10 min. sin circular disolvente previa purga de las líneas a utilizar.
- h) Para las bombas con sistema de desgasificación con helio, asegurarse de que el cilindro cuenta por lo menos con 500 psi de presión y la salida del regulador debe contar con una presión no menor a 80 psi y no mayor a 120 psi a la salida hacia la línea, para realizar purgas y desgasificar solvente utilizar un flujo de 100 mL/min de helio para cada reservorio a emplear, para el trabajo de rutina dependerá de la concentración de agua, variando desde 15 a 50 mL/min de helio.

3.4 TUBERÍAS Y CONECTORES

- a) Mantener las líneas de las fases móviles o disolventes sin fugas y sin sales.
- b) Emplear los ferrules y uniones preferentemente de la misma marca de la columna o tubería para prevenir posibles fallas de ajuste en las uniones.⁸
- c) Para mejorar la eficiencia de la columna, resolución y reducir el volumen muerto; las tuberías que van del inyector a la columna y de ésta al detector deben ser lo más cortas posibles con un diámetro apropiado para reducir el efecto de dilución de la muestra.⁵

3.5 SISTEMA DE INYECCIÓN^{4,11}

Un factor muy importante para obtener una resolución en la separación es la adecuada introducción de la muestra en el sistema. La manera ideal de introducir o inyectar la muestra, es en forma de “paquete” pequeño ya que esto ayuda en la obtención de picos simétricos y angostos.

Existen varios mecanismos de inyección. El más sencillo consiste en introducir la muestra mediante una jeringa; esta tiene que soportar la presión del sistema aunque hay dispositivos que desvían el flujo del disolvente mientras se introduce la muestra reanudándolos posteriormente a través del inyector mediante un sistema de válvulas, o bien, se introduce la muestra y posteriormente se reanuda. Un sistema que minimiza errores en la introducción de la muestra consiste en un inyector automático. Este dispositivo ayuda a mantener la reproducibilidad entre inyecciones y elimina el error en la medición del volumen por inyectar.

Algunas de las recomendaciones prácticas son:

- a) Verificar que no haya fugas o sales precipitadas en ninguna de sus partes.
- b) Verificar el volumen del loopⁱ, el rango de uso es generalmente de 5 – 100 µL pero este dependerá más bien de lo indicado por el método de acuerdo a la concentración del analito y la columna en uso.

ⁱ Tubo de acero inoxidable de diámetro interno pequeño y de volumen fijo, que permite inyectar siempre el mismo volumen. El cual puede ser intercambiable.

- c) Verificar que los tornillos y ferrules sean de la medida adecuada y del mismo material que el inyector. (En caso de que los inyectores sean de un material plástico conocido como PEEK).
- d) Si la presión provocada por el inyector tiende a subir más de lo normal (normalmente cercana a 0) invertir la entrada y salida del flujo. Lavar con agua a 60°C-70°C durante 30 min. Si el material del rotor lo permite inactivar con ácido nítrico 6N por 30 min.
- e) Verificar que el cable de la señal de disparo no se encuentre desconectado o fragmentado.
- f) Si es un sistema de automuestreador verificar que pasa todas las pruebas automáticas a las cuales se debe someter periódicamente (prueba de compresión, purgas, lavado de aguja).

- g) La fase de lavado del automuesteador deberá ser reemplazada con la frecuencia requerida, recordando que ésta tiene como función eliminar restos de muestra inyectada por lo que debe ser compatible con la fase móvil empleada para el análisis.

3.6 COLUMNAS^{4,5,7}

La columna es el componente más importante del sistema cromatográfico y es crucial en la determinación de la resolución. Dentro de las recomendaciones generales para en el uso de las columnas podemos citar las siguientes:

- a) Verificar que la columna es la indicada por la metodología y es la apropiada para el análisis.
- b) Colocar la columna en la dirección adecuada indicada en la misma.
- c) Usar un filtro en línea y precolumna, ya que este es un factor de protección instalado entre el inyector y la columna principal. Esencialmente está diseñado para remover las partículas indeseables, prolongan la vida de la columna y debe tener un volumen interno que minimize el ensanchamiento del pico. Se debe cambiar una vez que el pico empiece a deformarse.
- d) Evitar cambios de velocidad de flujo o temperatura súbitos. Incrementar ó disminuir el flujo gradualmente.
- e) No se debe calentar una columna sin que se encuentre circulando fase móvil.
- f) Nunca permitir que se quede la columna sin disolvente o fase móvil.
- g) Revisar en el manual de uso de la columna el límite de presión al igual que el intervalo de operación adecuado (pH, compatibilidad con los disolventes orgánicos, velocidades de flujo, temperaturas máximas de operación).
- h) Es muy importante la estabilidad del pH en las condiciones de operación indicadas por el fabricante. Cualquier desviación fuera de los límites indudablemente afecta la columna disminuyendo su tiempo de vida. La mayoría de los sistemas emplean soluciones amortiguadoras para éste propósito. Por ejemplo si no se controla el pH en una fase móvil cuando se emplea una columna ODS podría ocurrir lo siguiente:
 - A un pH < 2.5 los uniones de los grupos silano podrían hidrolizarse.
 - A un pH > 8.5 ocurriría la disolución de la sílica.
- i) Realizar la determinación de la eficiencia de la columna cada vez que se realice el análisis, llevando un registro de uso de la columna el cual debe incluir por lo menos: fecha de inicio de uso, solvente de almacenamiento, método de lavado, producto para el cual se utiliza, fecha de uso, número de inyecciones, platos teóricos, resolución, factor de coe y tiempo de retención para el principio activo principal, No de lote del producto analizado en ella, nombre del analista que la empleó y observaciones. Para poder monitorear el daño que ésta va sufriendo al paso del tiempo y llegar a establecer el número de platos teóricos mínimos que debe tener la columna para llevar a cabo un análisis cumpliendo con los estándares establecidos por el método y saber si es necesario un cambio de columna.

Una disminución considerable del tiempo de retención, resolución y deformidad del pico indican la necesidad del cambio de columna.
- j) Después de su uso se debe de llevar a cabo un procedimiento de lavado, en caso de requerir uno más profundo consultar en el manual de operación o con el proveedor el

procedimiento específico a emplear. Muchas veces esto se detecta cuando hay presencia de picos inesperados, un incremento del ruido en la línea base y presión significativa de la columna. No se deben almacenar las columnas con 100 por ciento de agua o soluciones con sales o ácidos a menos que el manual de uso lo indique y evitar dejar las columnas destapadas.

- k) Mantener la columna a una temperatura constante $\pm 2^{\circ}\text{C}$. La variación en la temperatura puede causar problemas como la inconsistencia en la identificación de los componentes del cromatograma debido a la variación de los tiempos de retención. Esto hace necesario el empleo de hornos en los métodos que lo indiquen (normalmente 40°C) para optimizar el desempeño de la columna. Por lo que es importante verificar que la temperatura registrada corresponda con la real en el horno. Éste se recomienda emplear por que:
- Mejora la reproducibilidad del análisis
 - Fomenta la consistencia de los tiempos de retención.
 - Se eliminan las variaciones debidas a las fluctuaciones de la temperatura del laboratorio debidas a las estaciones del año.

3.7 DETECTORES^{4,11}

Pueden ser de dos tipos: aquellos que miden alguna propiedad del soluto y la fase móvil, por ejemplo, índice de refracción y aquellos que miden alguna propiedad del soluto únicamente, como absorción ultravioleta o fluorescencia. La selección del detector estará basada en las propiedades del o los solutos que se deseen analizar. Los detectores más empleados son:

Detector de UV convencional
Detector UV de arreglo de diodos
Detector de índice de refracción
Detector electroquímico
Detector de infrarrojo
Detector de Fluorescencia
Detector de Radioactividad

Para su uso se debe verificar:

- a) Que en la calificación los parámetros de exactitud y reproducibilidad sean satisfactorios.
- b) Que las tuberías empleadas sean de la medida adecuada (longitud y diámetro interno), sin fugas y sales precipitadas a la entrada y salida de la celda.
- c) Los parámetros adecuados para la determinación a realizar (longitudes de onda, sensibilidad, factores de escala, filtros, constante de tiempo, temperatura etc)
- d) El tiempo adecuado de estabilización.
- e) Que antes de encender los equipos halla flujo por la celda de muestra y no existan fallas en el diagnóstico automático.
- f) No exceder los límites de presión de las celdas respectivas.

- g) En caso de colocar detectores en serie, que los últimos deben ser los que resistan menores presiones en la celda (Índice de refracción, fluorescencia y conductividad)

3.7.1 DETECTORES UV/FLUORESCENCIA

- Verificar el tiempo de vida de la lámpara con frecuencia, verificando el desempeño de éstas contra las especificaciones del fabricante.
- Reemplazar las lámparas UV antes de que sean ineficientes.
- Se recomienda permitir una estabilización de al menos 30 min. después de encendida la lámpara para que ésta alcance su máxima intensidad de energía.
- Se recomienda mantener un registro de las energías en las celdas de muestra y referencia a una longitud de onda y disolvente específico.

3.7.2 ÍNDICE DE REFRACCIÓN Y CONDUCTIVIDAD

- Asegurar que la temperatura del laboratorio en el área es estable.
- Purgar las celdas de estos detectores, (es vital para obtener una línea base estable ya que la propiedad que mide es dependiente de la composición de la fase móvil, temperatura de la misma y la velocidad de flujo)
- Controlar la temperatura de la celda para obtener una línea base horizontal.

4. - CAMBIOS DE FASES MÓVILES⁸

Aplicar las siguientes consideraciones antes de cambiar de una fase a otra, considerando principalmente la miscibilidad de los solventes.

- Los cambios entre dos solventes miscibles se pueden hacer directamente. Cambios de dos solventes que no son totalmente miscibles entre sí, como metanol por ejemplo: de cloroformo a agua, requieren un solvente intermedio como el metanol.
- Cuando el cambio es de una solución amortiguadora acuosa a un solvente orgánico, cambiar primero a agua.
- Cada solvente debe tener su propia línea y filtro. Cuando es necesario sustituir el solvente en la línea por otro, purgar el solvente previo, tomando en cuenta las dos recomendaciones anteriores (a, b)
- Para cambiar de fase móvil en todo el instrumento debe hacerse sin columna siguiendo las recomendaciones del fabricante. Frecuentemente con 2 ft de largo y 0.04 in de tubería conectada de la salida del inyector a la entrada del detector es suficiente cambiar el sistema cromatográfico con la nueva fase móvil, a un flujo de 2.0 mL/min por aproximadamente 4 min.

5. - ESTABLECIMIENTO DEL SISTEMA HPLC⁵

- Lavar el sistema con agua, luego con metanol y/o acetonitrilo seguido por la fase móvil antes de conectar la columna para un sistema de fase normal. Usar acetonitrilo o fase móvil como solución de lavado de aguja.
- Cambiar la aguja o columna y lavar si es necesario.

- c) Conectar el inyector a la entrada de la columna sin conectarla al detector y lavar la columna cerca de 10 min. con el disolvente adecuado antes de introducir la fase móvil. Purgar la aguja al menos dos veces.
- d) Verificar las fluctuaciones de la presión, si hay burbujas atrapadas en la jeringa del inyector, fugas y/o sales en las conexiones.
- e) Equilibrar la columna con fase móvil por un periodo de tiempo hasta obtener una línea base estable.
- f) Inyectar en el sistema una solución estándar y verificar los tiempos de retención y la respuesta del pico sea consistente en dos inyecciones consecutivas.
- g) Inyectar una solución muestra y comprobar que los tiempos de retención concuerdan con los de la solución estándar, especialmente si ésta es sumamente viscosa o concentrada en un análisis de impurezas.
- h) Inyectar un blanco o disolvente para verificar que no halla un arrastre del analito. También puede ser tomada como la línea base. Esto previene se cuantifique un pico como impureza desconocida, cuando se encuentra presente en el solvente de dilución. Es útil para estabilizar el sistema.
- i) Inyectar un compuesto que no retenga la columna como por ejemplo la acetona para ayudar a localizar el tiempo muerto (t_0) para calcular el factor de capacidad (k')

6. - EVALUACIÓN DEL SISTEMA CROMATOGRÁFICO⁵

La adecuabilidad del sistema pasa cuando cumple con los requerimientos mínimos establecidos en el método analítico.

- a) Con la finalidad de cumplir con la adecuabilidad del sistema la composición de la fase móvil puede ser ajustada en algunos de sus componentes por no más del $\pm 10\%$, y ± 0.5 unidades de pH y $\pm 10\%$ de la fuerza iónica, pero ninguno de los componentes podrán ser reemplazados.
- b) Para una prueba de identificación la diferencia del tiempo de retención no deberá ser mayor al 2% al menos que el método indique otra cosa.
- c) Para el principio activo principal al menos que el método especifique otra cosa, con 5 inyecciones consecutivas, la desviación estándar relativa no debe ser mayor al 2%,¹² en compuestos menores, no debe exceder el 10%.
- d) Verificar la adecuabilidad del sistema después de un cambio mayor como la regeneración de la columna, instalación de una nueva, ajuste de la fase móvil, cambio de tiempo de retención, forma del pico dentro de un análisis.
- e) Se recomienda verificar la adecuabilidad del sistema después de que ha corrido el sistema por más de 24 h., esto es haciendo 4 inyecciones de un estándar y una de la muestra de resolución para verificar que los parámetros del sistema continúan siendo adecuados.

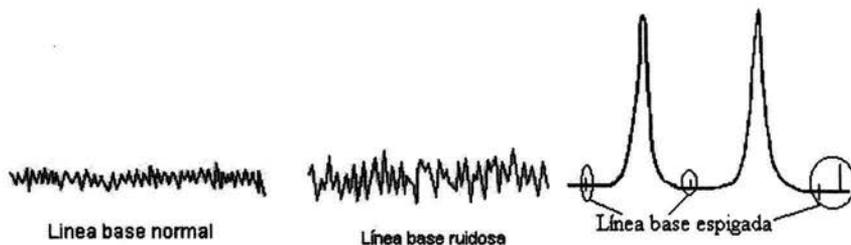
7. - SOLUCIÓN DE PROBLEMAS

		CAUSA	SOLUCIÓN
PRESIÓN	ALTA		Verificar que se esté empleando la fase móvil y el flujo correctos
		Bloqueo en las líneas de flujo	Puede deberse al no lavar adecuadamente el sistema y se le pasó directamente algún solvente causando precipitación. Sistemáticamente desconecte cada una de las partes del detector a la columna verificando el flujo y presión para encontrar la parte bloqueada. Lave con solvente adecuado o reemplace la parte bloqueada.
		Formación de partículas en la columna	Reemplazar o limpiar filtros. Emplear precolumnas de 0.5 μm de tamaño de partículas para eliminar contaminantes de la muestra. Filtrar las muestras a través de filtros de 0.45 μm
		Sistemas agua /solvente orgánico- Precipitación de Sol.Amortiguadoras	Verificar la compatibilidad de la fase móvil con la concentración de la solución amortiguadora. Disminuya la fuerza iónica de la fase móvil. El operador prepara la fase móvil.
		Tamaño de partícula pequeño de la columna	Emplear un tamaño de partícula más grande.
		Fase móvil con viscosidad alta	Emplear disolventes con viscosidad baja.
		BAJA	
	Bloqueo del filtro de entrada		Remover el filtro de entrada y si la presión regresa a la normal indica que éste está tapado. Reemplazar o lavarlo.
	Fugas en las líneas		Ajustar las conexiones o reemplazarlas para impedir fugas a lo largo del sistema.
	Fugas en la bomba		Reemplazar o limpiar las válvulas check. Reemplazar los empaques o sellos de la bomba.
	INESTABLE	Aire en la bomba	Desgasificar los solventes o fase móvil y purgar el aire del sistema.
		Fugas en la bomba	Reemplazar los empaques o sellos de la bomba.
		Bloqueo del filtro de entrada	Reemplazar o lavar el filtro de entrada de la línea.

		CAUSA Y/O SOLUCIÓN
Falta de Reproducibilidad de área en el pico	Y altura pico	El sello de la válvula del inyector no está bien ajustada.
		La jeringa está parcialmente bloqueada.
		Aire en la jeringa del inyector.
	Y tiempo de retención	Variabilidad en el flujo de la bomba.
Otros	Alguna micro fuga de la tubería del inyector al detector.	
	Problemas de equilibrio del detector.	
	Verificar que el error no es debido a la muestra en sí, es decir, que ésta es estable con el tiempo.	
	Verificar que los parámetros de integración son los apropiados.	
	Verificar la intensidad de la lámpara del detector.	
Falta de Reproducibilidad en los tiempos de retención	Generales	El tiempo de equilibrio de una nueva fase es insuficiente. Pasar 20 volúmenes de la nueva fase a través de la columna.
		La evaporación selectiva de los componentes de la fase móvil. Tapar los reservorios de los solventes o fase móvil.
		Si es debido a las fluctuaciones de la temperatura, emplear un horno para columna.
		Deterioro de la columna.
		Tiempos de retención variables debidos a aire en el sistema: Desgasificar fases y purgar el sistema para eliminar el aire.
	Disminución	El incremento del flujo, verificar la bomba y si es necesaria reencender la bomba.
		Incremento en la temperatura del sistema.
		La degradación de la sílica de la fase estacionaria por que el pH de la fase móvil este fuera de los límites de tolerancia de la columna.
	Aumento	Disminución del flujo de la fase móvil, verificar y si es necesario reiniciar la bomba
		Verificar que no halla burbujas en la bomba.
		Las fluctuaciones debidas a la disminución de la temperatura. Se recomienda emplear hornos de columna

		CAUSA Y/O SOLUCIÓN
Problemas con la línea base	Línea Base variable	Taponamiento de la columna por contaminación y deterioro de la misma. Lavar la columna, emplear precolumna ó cambiar columna.
		Los debidos a cambios de temperatura emplear horno de columna.
		Tiempo insuficiente de equilibrio del sistema.
		Cambios súbitos en la línea base pueden ser por fluctuaciones de temperatura.
	Línea base ruidosa	Celda del detector sucia. Lavar la celda del detector.
		Fase móvil contaminada y/o no fue mezclada en forma correcta. Emplear solventes grado HPLC y filtrar.
		Falla de la lámpara del detector. Cambiarla si es necesario.
		Pulsaciones de la bomba (si son periódicos)
		Efectos de la temperatura (si el detector es Índice de Refracción)
		Aire atrapado en la bomba y/o en la celda del detector o por la celda electroquímica de referencia. Purgar sistema y desgasificar la fase móvil.
		Inmiscibilidad de solventes en una fase móvil normal o en la solución de lavado de la aguja.
		Gradiente de elusión.
		Está siendo burbujeadada con exceso de helio.
		Preparar la mezcla de solventes. Que el equipo no realice la mezcla si se cuenta con una bomba binaria o cuaternaria.
	Línea base espigada	Aire en el sistema o detector por lo que se debe desgasificar la fase móvil y asegurarse que todas las conexiones estén bien ajustadas.
Interferencias eléctricas es necesario identificarlas y eliminarlas. Por ejemplo el horno de la columna.		
El deterioro de la columna por lo que debe cambiarse y usar precolumna.		

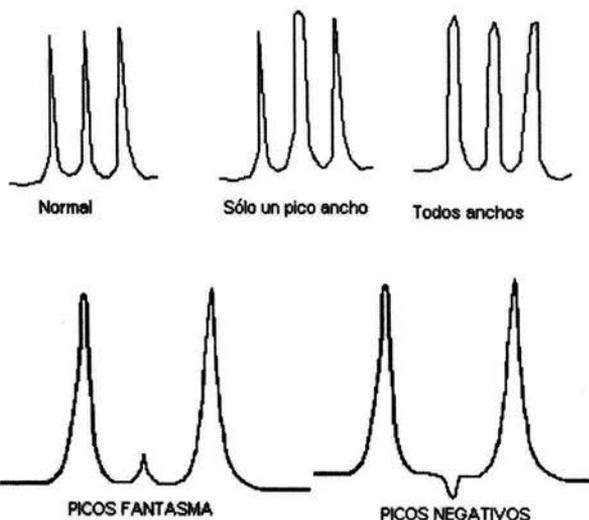
A continuación se muestran algunos ejemplos gráficos:



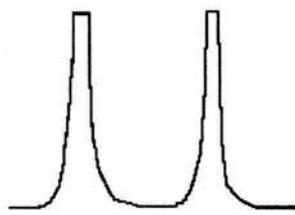
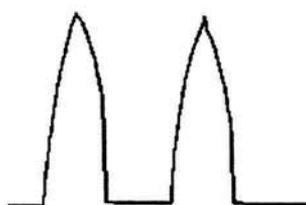
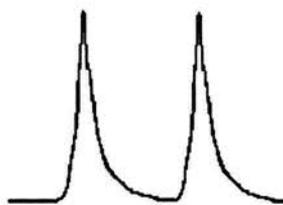
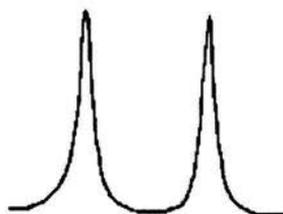
		CAUSA Y/O SOLUCIÓN
Forma del (los) pico (os)	Picos Anchos	Es por muestras muy concentradas por lo que se deben diluir.
		Volumen de inyección muy grande. Inyectar un menor volumen
		Deterioro de la columna. Lavar o reemplazar columna y usar precolumna.
		Volumen muerto. Verificar que las conexiones estén ajustadas apropiadamente.
		Alta viscosidad de la fase móvil.
		Si es sólo para alguno de los picos es probable que sea debido a una elusión tardía de una muestra anterior, una molécula de alta masa molecular o bien sea una proteína o polímero.
	Picos Fantasma	Contaminación de la muestra, fase móvil. Hacer una inyección del solvente de dilución o blanco de la muestra, fase móvil y solución de lavado para determinar la fuente de la contaminación.
		Acumulación de contaminantes en la cabeza de la columna. Lavar la columna con solventes más o menos polares a los usados para remover los contaminantes retenidos.
		Compuestos retenidos de inyecciones previas. Reinyectar la muestra y dar un tiempo de corrida mayor hasta que salga el pico desconocido.
	Picos Negativos	La absorbancia de la fase móvil es mayor a la de los picos de interés. Emplear una fase móvil que no absorba a la longitud de onda empleada.
		Verificar la polaridad de las conexiones del registrador de señal.
		Perturbaciones del equilibrio cuando el solvente de la muestra pasa a través de la columna.
		Puede ser normal en detectores de Índice de Refracción.
	Picos dobleteados	Si debiera aparecer sólo un pico puede ser por la co-elusión de compuesto de interferencia. Implementar una limpieza de la muestra o una fraccionamiento previo de la misma.
		Ajustar la selectividad de la muestra cambiando la fase móvil/ fase estacionaria.
		Emplear una fase estacionaria de una eficiencia mayor, usar una columna de un diámetro mayor o disminuir el volumen de muestra
		Espacio vacío en la columna por su deterioro por lo que hay que reemplazar la columna.
Filtros de entrada parcialmente bloqueados.		
Fronteados (simetría menor a 0.9)	Debida a la sobrecarga de la muestra. Disminuir el tamaño de muestra o debido al deterioro de la columna, es necesario reemplazarla.	
	Una co-elusión de una pequeña cantidad de un sustancia con un tiempo de retención menor al del siguiente pico; ésta sustancia puede ser también una contaminación.	

		CAUSA Y/O SOLUCIÓN
Forma del (los) pico (os) (continuación)	Coleados (Simetría mayor a 1.2)	Alguno de los picos: Interacciones entre ácidos y bases débiles con residuos de grupos silanoloides. Se puede controlar el pH con la adición de un modificador como trietilamina para prevenir el coeolo por una base débil. Por efecto de co-elución de picos pequeños en la parte final del pico.
		Cuando todos los picos están coleados es por el resultado del deterioro de la columna o efectos externos a la columna como la presencia de metales pesados.
		Contaminación del filtro de entrada de la columna.
	Cortados en la base	El cero del integrador está puesto muy bajo así que ponerlo en cero correctamente.
		Emplear la función de auto-cero en caso de contar con ella.
	Cortados en la punta del pico	El rango de detección del detector es muy sensible por lo que es conveniente disminuir el nivel de sensibilidad.
Sobrecarga de la columna, por lo que es conveniente diluir la muestra.		

Ejemplos gráficos de problemas con la forma de los picos.



Ejemplos gráficos de problemas con la forma de los picos (continuación)



DISCUSIÓN

Como usuarios de la técnica cromatográfica, reconocemos que tras la ejecución repetida de una metodología es posible experimentar variaciones en algunos de los parámetros cromatográficos como pueden ser el tiempo de retención, área o altura etc. Sin embargo éstas variaciones se deben de mantener dentro de intervalos de aceptación. Cuando éstas variaciones se alejan de dichos intervalos, tenemos la necesidad de identificar la fuente de variación para solucionar el problema. Esta labor puede resultar en un gran consumo de tiempo y en ocasiones frustrante si no se realiza empleando un procedimiento ordenado para ello, por lo que la capacitación, constante aprendizaje de la técnica y el conocimiento de la importancia de las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL's) para minimizar las fuentes de variación son de gran relevancia al ser ésta una técnica analítica instrumental.

Es responsabilidad de los usuarios de ésta técnica analítica dar un resultado exacto cuando procesa una muestra para cuantificar uno o más analitos, por lo que es recomendable conocer, monitorear y perfeccionar todos los factores que afectan la exactitud de los resultados. La implementación de las BPL's en un laboratorio hacen que los resultados emitidos sean exactos, consistentes y comparables a los de cualquier otro laboratorio competente. Una acción sumamente útil es la medición de la incertidumbre.

CONCLUSIONES

La Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) se ha convertido en una herramienta analítica aceptada de manera general con un amplio abanico de técnicas de separación. Los resultados de análisis cuantitativos, como la mayor parte del tiempo son los de ésta técnica instrumental, son importantes en decisiones en cuestión de salud, medio ambiente, industriales y legales. Por lo tanto es importante la capacitación del personal en el uso de la técnica analítica y la concientización de la importancia de las BPL's para llevar a cabo con éxito el mantenimiento del buen uso de los equipos, obtener resultados analíticos confiables y exactos.

Las BPL's cubren aspectos del trabajo diario en el laboratorio que deben documentarse y habilitarse formalmente ya que en muchas ocasiones son determinantes en los resultados finales. El contenido de las BPL's debe elaborarse por el propio personal y ésta información debe optimizarse, especificarse, actualizarse y detallarse en las operaciones críticas que afectan directa o indirectamente la exactitud y su influencia en la desviación de los resultados. Hay factores inherentes a la metodología y aquellos resultantes de cómo se aplica ésta. Los inherentes a la metodología sólo pueden mejorarse con la investigación y desarrollo, en cambio los resultantes de cómo se aplica se pueden mejorar y controlar paso a paso mejorando las prácticas de laboratorio.

Las BPL's son independientes de las técnicas usadas y llevan al mantenimiento de la infraestructura, registros, manejo y disposición de muestras y datos, control de reactivos y limpieza del material de vidrio.

Sabemos que en gran parte las Buenas Prácticas de Laboratorio son cuestión de actitud, aptitud y responsabilidad y deben ser adoptadas de manera adecuada, tomando conciencia de la importancia que éstas tienen en la calidad de los análisis. El impacto económico, social que éstas tienen por el tiempo empleado en encontrar las fallas del equipo creadas por una mala práctica, los mantenimientos innecesarios del equipo y columnas, baja productividad, emisión de resultados inconsistentes e inexactos con sus respectivas repercusiones que tienen finalmente sobre los clientes, sin hacer mención a las sanciones por los organismos gubernamentales.

BIBLIOGRAFÍA

1. Comisión Interinstitucional de Prácticas Adecuadas de Manufactura (CIPAM) "Guía de Procedimientos Adecuados de Laboratorio Analítico" México 1988. Pág. 1
2. Huber, Ludwing. "Buenas Prácticas de Laboratorio y Buenas Prácticas de Fabricación Actuales" Hewlett-Packard. Holanda 1995. Pág. iii, 4
3. Wila Y. Garner. "Good Laboratory Practices Standars: Applications for Field and Laboratory Studies", USA ACS Professional Reference Book. Pag.27
4. Memorias del "Seminario de Actualización en Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución" por la compañía WATERS
5. DRAFT GUIDELINES HPLC BEST PRACTICES. <http://pgm.pfizer.com>
6. VALIDATION OF CHROMATOGRAPHIC METHODS. Reviewer Guidance by Center for Drug Evaluation and Research (CDER) Nov. 1994.
7. "Training Guide: High Performance Liquid Chromatography" Valid Analytical Measurement (VAM) Nov.2000.
8. Bidlingmeyer, Brian A. "Practical HPLC Methodology Applications" John Wiley & Sons Inc. USA 1992
9. "Agilent 1100 Series HPLC Troubleshooting and Maintenance" Course Number H8969A .Student Manual. USA September 2000.
10. INTRODUCCIÓN A LA CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN. Número 35 de la Colección Cuadernos. UAM Diciembre de 1996.
11. FARMACOPEA DE LOS ESTADOS UNIDOS MEXICANOS 7ª Edición México 2000
12. USP 27th EDITION USA 2004.
13. Memorias del "Curso básico de HPLC y Selección de Columnas Analíticas" por la compañía WATERS. México DF. 2000
14. www.conocer.org.mx
15. Pedrero. I. Martha E.; "Métodos Analíticos Adecuados a su propósito" Guía de Laboratorio para Validación de Métodos y Tópicos Relacionados. CNM-MRD-PT-030. CENAM México, 1998
16. Arce. O. Mariana; "Buenas Prácticas de Laboratorio en Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución" Publicación CNM-MRD-PT-022. CENAM México, 2002
17. Castro. G.; Esther; Mercader. T. Flora; "Cuantificación de la Incertidumbre en Mediciones Analíticas" Publicación CNM-MRD-PT-029. CENAM México, 2002
18. "Guía sobre la Calificación de Equipo de Instrumentos Analíticos" DI-2-PTC-620-RAT-001-2004. CENAM México, 2004.