UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

CALIBRACION DEL CROMATOGRAFO DE GASES VARIAN 3800

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A:

MARIO BARAJAS MEDINA

U N A M
FES
ZARAGOZA

LO HUMANOEJE DE
NUESTRA REFLEXION

MEXICO, D.F. FEBRERO DE 2006

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

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.

A MIS PADRES

ADELFA MEDINA Y RAFAEL BARAJAS

QUIENES ME ENSEÑARON QUE LOS SUEÑOS SOLO SE LOGRAN CUANDO SE ESTA DESPIERTO.

A MI FAMILIA

A MIS HERMANOS QUIEN DE ELLOS ENCONTRE EL CARIÑO Y LA FUERZA PARA RESOLVER LOS PROBLEMAS QUE SE NOS PRESENTEN

A MIS HIJAS Y ESPOSA

SACHENSKA, KANISCHA,MONSERRAT

A QUIEN TANTO AMO Y ADMIRO POR MANTENER UNIDOS NUESTROS LAZOS FAMILIARES

NO SE CUANTAS VECES LO INTENTE Y NO LOGRE ALCANZAR MI SUEÑO HOY NO RECUERDO CUANTOS FRACASOS TUVE SOLO SE QUE HOY SOÑE Y SOY FELIZ

JURADO

PRESIDENTE	Q.F.B. MAURO ARRIETA SANCHEZ
VOCAL	Q.F.B.JOSE OSCAR GONZALEZ MORENO
SECRETARIO	Q.F.B. IDALIA LETICIA FLORES GOMEZ
SUPLENTE	Q.F.B MA ISABEL GARDUÑO POZADAS
SUPLENTE	Q.F.B. LETICIA CECILIA JUAREZ

TABLA DE CONTENIDO

Pág.

1. FUNDAMENTACION TEORICA.

1.1 Aplicación de la cromatografía de gases 2

1.2 Descripción del cromatógrafo de gases 2

1.3 Términos cromatograficos 3

1.4 Cuidados en un cromatógrafo de gases 4

1.5 Calibración del cromatógrafo de gases varian 3800 5

1.5.1 Ajuste en líneas de transferencia 5

Medición de Nitrógeno
Medición de Hidrógeno

1.5.2 Pruebas para evaluar limpieza de un cromatógrafo 5

Ruido a corto plazo
Ruido a largo plazo

1.5.3 Pruebas para evaluar el detector 5

Sensibilidad

1.5.4 Pruebas para evaluar horno e inyector 5

Tiempo de retención
Reproducibilidad

1.5.5 Pruebas para evaluar eficiencia de una columna 5

Resolución
Simetría

1.6 Importancia de la calibración en auditorias 6

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA 7

3. OBJETIVOS 8

3.1 General 8

3.2 Específicos 8

4. MANEJO DE DATOS ESTADISTICOS 9

4.1 Responsabilidades 11

5. REACTIVOS, MATERIAL Y EQUIPO 12

5.1 Equipo 12

5.2 Material 12

5.3 Reactivos 13

5.4 Proceso a seguir 13

6. PROCEDIMIENTO 14

6.1 Mantenimiento preventivo 14

6.1.1 Limpieza de columna 15

6.1.2 Limpieza de inyector capilar 17

6.1.3 Limpieza de inyector empacado 19

6.1.4 Limpieza para el detector 20

6.1.5 Limpieza del horno 23

6.1.6 Limpieza de microjeringas 23

6.2 Calibración del cromatógrafo de gases 25

6.2.1 Ajuste de gases en líneas de transferencia 25

6.2.2 Ruido a corto plazo en FID 33

6.2.3 Ruido a largo plazo en FID 33

6.2.4 Sensibilidad 34

6.2.5 Reproducibilidad en tiempos de retención 35

6.2.6 Resolución 36

6.2.7 Reproducibilidad por el método del estándar interno 36

6.2.8 Comparativo con un producto de línea 37

7. DIAGRAMA DE FLUJO 38

8. INSTRUCCIONES DE SEGURIDAD Y MANTENIMIENTO 39

9. RESULTADOS 40

9.1 Columna 41

9.2 Inyector 42

9.3 Detector 43

9.4 Microjeringa 44

9.5 Ajuste de gases en líneas de transferencia 45

9.6 Ruido a largo y corto plazo 57

9.7 Sensibilidad 61

9.8 Resolución 65

9.9 Reproducibilidad en tiempos de retención 67

9.10 Reproducibilidad por el método del estándar interno 69

9.11 Comparativo del producto líder 71

10. CONCLUSIONES 75

11. REFERENCIA BIBLIOGRAFICA 76

1. FUNDAMENTACION TEORICA

Antes de entrar al estudio de la cromatografía se considera su origen y evolución que ha seguido hasta llegar a ser una de las técnicas de análisis mas importantes en la química actual.

En 1850 F.F Runge comprobó que los cationes inorgánicos se separaban por migración diferencial cuando se deposita una solución que los contenga sobre un material poroso como papel.

1941 Martín y Synce esbozan la idea de cromatografía de gases.
1952 Martín y James utilizan por primera vez la cromatografía de gases realizando mediante esta técnica la separación de algunos ácidos grasos volátiles.
1958 Golay es el primero en proponer columnas capilares con relleno comenzando su desarrollo analítico.

En 1954 Se introduce en el mercado el primer cromatógrafo de gases comercial, rápidamente fue aceptado como una importante herramienta para el análisis químico (Storch, 1998).

La cromatografía es una técnica de separación donde los componentes a separar se distribuyen en dos fases una de las cuales constituye un lecho estacionario de polaridad conocida, constituida de sílica de carácter sólido o una película delgada y la otra es un flujo de gas o un liquido inerte que pasa a través ó a lo largo del lecho estacionario (Raymond, 2002, Robert, 1998, Harold, 2001).

Clasificación de las técnicas en Cromatografía

	OPERACIÓN	DISPOSICION DE LA FASE ESTACIONARIA	FASE ESTACIONARIA FASE MOVIL
CROMATOGRAFIA	EN ESPACIO	CAPA FINA	LÍQUIDO SÓLIDO
		PAPEL	LÍQUIDO SÓLIDO
		COLUMNA	LÍQUIDO SÓLIDO
	EN EL TIEMPO	COLUMNA	LIQUIDO SÓLIDO GAS SÓLIDO (C. G-S) GAS LIQUIDO (C. G-L)

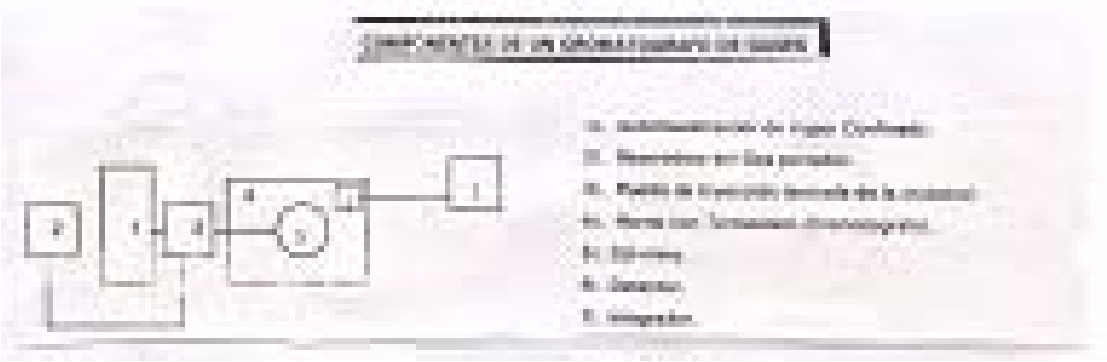
Actualmente la cromatografía de gases ha desplazado muchas técnicas analíticas que se utilizaban para identificar ó cuantificar sustancias químicas debido a su exactitud y precisión para reproducir y cuantificar.

1.1 APLICACIÓN DE LA CROMATOGRAFIA DE GASES

La cromatografía de gases es una técnica de separación donde el lecho estacionario es un soporte sólido y la fase móvil es un gas inerte (Joseph ,1979).

Estas técnicas son utilizadas para separar identificar y cuantificar analitos a presiones y temperaturas elevadas.

Los equipos que logran estas condiciones son los cromatógrafos de gases. Constituidos por un inyector, un horno con una columna empacada o capilar en su interior, un detector y un graficador.



Para que los equipos de precisión y medición sean confiables en sus resultados, deben cumplir con las propiedades analíticas básicas de sensibilidad, precisión y selectividad mediante la calibración y mantenimiento del equipo. (Frank 1997, Harold, 2001).

1.2 DESCRIPCION DEL CROMATOGRAFO DE GASES

Un cromatógrafo de gases cuenta con cilindros ó contenedores de gases de ultra alta pureza, los más utilizados son nitrógeno, hidrogeno, aire y helio. En el mercado comercialmente existen de alta pureza y ultra alta pureza.

Su flujo es controlado por un monorreductor que regula la presión y salida del gas**.** Un inyector capilar o empacado donde se deposita la muestra para su separación. Un horno con una columna capilar ó empacada en su interior. Aquí se lleva acabo la separación del analito, un detector donde se manda la señal en milivolts a un graficador que registra la señal en forma de cromatógrama. (Ray, 1991).

En el cromatógrafo de gases en la columna se lleva a cabo la separación y cuantificación a temperaturas y presiones altas. Cuando la muestra se deposita en el inyector se evapora y en forma gaseosa pasa a la columna, en la columna se lleva a cabo la separación considerando propiedades como polaridad, peso molecular, punto de fusión. Las muestras con peso molecular mas bajo serán arrastradas con rapidez por el gas inerte Nitrógeno utilizado como fase móvil en la columna y las de peso molecular más alto. Se retendrán más originando un mayor número de platos teóricos.

1.3 TERMINOS CROMATOGRAFICOS

Los platos teóricos se consideran como el número de veces que el analito interactúa con la fase estacionaria para su resolución y a consecuencia una mejor separación y cuantificación.

Cuando los analitos son separados pasan al detector donde son ionizados por combustión a la flama y transformados a una señal en milivolts, todo este proceso se lleva acabo en un tiempo determinado llamado tiempo de retención (Littlewood 1970, Gary, 1986, Robert ,1998).

Estos equipos por sus propiedades de cuantificación deben cumplir con las propiedades analíticas de medición, precisión, sensibilidad y selectividad para tener trazabilidad en sus resultados y lograr la precisión de un equipo en los resultados, debe existir concordancia entre un grupo de resultados obtenidos, estos se deben fundamentar en parámetros estadísticos basados en distribuciones normales ó gauseanas, medias aritméticas y desviación estándar.

Cuanto más diferentes son las condiciones experimentales, mayores serán las causas de variabilidad, la dispersión del conjunto de resultados será mayor y menor la precisión de un equipo.

La sensibilidad se considera como la capacidad para poder detectar o determinar pequeñas concentraciones de analito en la muestra, esta es una propiedad básica que soporta a la exactitud la cual no se alcanza si el método no tiene la capacidad discriminatoria de la detección a bajas concentraciones.

Límite de detección, concentración del analito que origina una señal y se distingue de la señal del blanco solo se usa para identificar analitos.

El límite de cuantificación se define como la concentración del analito que origina una señal donde se puede tener resultados reproducibles para cuantificar un analito (vailarcel, 1999).

La selectividad es una propiedad analítica básica atribuible a un método analítico que puede definirse como su capacidad para originar resultados que dependen de forma exclusiva del analito para su identificación ó cuantificación de una muestra, todas estas herramientas estadísticas se verifican con la calibración del equipo(Walter,1997).

La calibración es un seguimiento donde un instrumento ó aparato funcione correctamente es decir, tiene connotación de verificación.

Su objetivo es corregir la respuesta instrumental hasta encontrar el valor considerado como verdadero

La calibración de un equipo debe ser verificada con la confirmación del cumplimiento de los requisitos especificados por medio del examen y aporte de evidencias objetivas.

La confirmación metrológica es el conjunto de operaciones necesarias para asegurar que el equipo de medición cumpla con los resultados para su uso previo. Con la confirmación metrológica debe incluir calibración y verificación del equipo a utilizar (Ckwood ,1993).

1.4 CUIDADOS PARA UN CROMATOGRAFO DE GASES

En la actualidad hay cromatógrafos de gases con sensibilidad muy alta detectan y cuantifican impurezas hasta nanogramos, debido a estas características sus componentes son muy sensibles y frágiles, un manejo inadecuado originaria daño al equipo dando resultados erróneos.

Antes de calibrar un cromatógrafo de gases se debe tener un sistema cromatografico completamente limpio, de aquí la importancia de un mantenimiento previo antes de la calibración.

El mantenimiento implica, limpieza de cada componente del cromatógrafo de gases (Dennos, 1981, Fair, 1965).

Cada componente que forma parte del equipo (detector, inyector, horno y columnas). Es muy selectivo y sensible.
Debido a esto para su calibración se realizaran pruebas específicas de sensibilidad, reproducibilidad, ruido a corto y largo plazo, limpieza del equipo para verificar y justificar su funcionamiento.

El cromatógrafo de gases dentro de sus componentes tiene líneas de transferencia donde fluyen gases, unas se distribuyen al detector sobre estas fluyen Hidrogeno y Aire. Otras hacia el inyector y columna que fluye Nitrógeno como gas de acarreo.
El flujo de los gases que se transporta por las líneas de transferencia se mide en mL / Seg. Con un flujometro electrónico marca varian (John, 1988).

1.5 CALIBRACION DEL CROMATOGRAFO DE GASES

1.5.1 Las pruebas a realizarse para la calibración de un cromatografo y verificación de un mantenimiento preventivo en las líneas de transferencia son.

Medición de Nitrógeno como gas de arrastre en la columna.

Medición de Hidrogeno, Aire como gases combustibles en el detector ionizacion de flama (FID).

1.5.2 Para evaluar limpieza de equipo y pureza de gases las pruebas son.

Determinación de ruido a corto plazo.

Determinación de ruido a largo plazo.

1.5.3 La prueba a evaluar según el tipo de detector es:

Sensibilidad.

1.5.4 Para el horno e inyector las pruebas a realizarse son:

Determinación en tiempos de retención.

Determinación de reproducibilidad.

1.5.5 Para evaluar eficiencia de la columna en relación a la fase móvil se realiza:

Determinación de la resolución de un analito.

Ancho de pico y simetría.

Todas estas pruebas se realizan por el método de la relación estándar/estándar interno (Dennos, 1981, Robert, 1975).

Los resultados obtenidos se documentan y se conforma un procedimiento detallado, para que las próximas calibraciones y mantenimientos preventivos se realicen internamente.
Teniendo un respaldo analítico para auditorias.

1.6 IMPORTANCIA DE LA CALIBRACION EN AUDITORIAS

En la industria farmacéutica e investigación estos equipos son calibrados por sus proveedores originando un alto costo anual.
Estos equipos cuentan con un historial donde se documentan. Las calibraciones, mantenimiento y acciones correctivas, estos historiales son respaldos analíticos para comprobar en auditorias la trazabilidad de un equipo de medición.

Si un cromatógrafo de gases es utilizado sin calibrar los resultados obtenidos podrían variar de un día a otro. En la industria farmacéutica seria crítico un resultado emitido en estas condiciones, puesto que los medicamentos dependen de resultados confiables a consecuencia no se sabría si el método es reproducible ó es error instrumental (Takayaki, 1998).

En Armstrong laboratorios de México se cuenta con un cromatógrafo de gases para la investigación y desarrollo de nuevos métodos, este equipo cuenta con un historial que garantiza la credibilidad en su funcionamiento. Con documentos que garantizan la veracidad de sus resultados en auditorias de calidad.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La disponibilidad actual de utilizar equipos de medición lleva la responsabilidad de cumplir con variables de calibración establecidas, basadas en fundamentos analíticos y estadísticos diseñados y documentados.

La cromatografía de gases es una técnica de medición y prueba en la industria e investigación, actualmente es una de las técnicas empleadas para la valoración e identificación de activos en medicamentos, estas técnicas analíticas solo se logran por medio de equipos con una alta sensibilidad y reproducibilidad en sus resultados. El equipo empleado para estas técnicas es un cromatógrafo de gases es indispensable que antes de su uso este completamente limpio y calibrado para asegurar resultados confiables (Henry, 1968, manual de instalación y mantenimiento, 1998).

En Armstrong laboratorios de México. Hay un cromatógrafo de gases este anteriormente no contaba con una documentación que demostrara el funcionamiento del equipo, además de solicitar la calibración y mantenimiento a proveedores. Lo que originaba gastos elevados. Con una estimación del 0.01% en relación al valor del equipo. Esto originaba gastos y retrasos ya que se tenía que estar a disposición del proveedor.

El mantenimiento preventivo y calibración se realizo internamente, tomando como referencia las condiciones cromatografícas, soluciones, materiales y reportes de la calibración emitida por el proveedor del equipo varian.

Todo esto se verifico experimentalmente y con un soporte estadístico. Así mismo los resultados obtenidos se documentaron llevando un historial del equipo para facilitar el manejo y tener la seguridad de un resultado muy próximo al teórico.

En auditorias los documentos son un respaldo indicativo donde se justifica la calidad y veracidad de los resultados.

Este trabajo de investigación tiene relevancia por ser el primer documento que especifica condiciones y acciones para un mantenimiento preventivo y calibración de un cromatógrafo de gases.

En la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, existe en funcionamiento cromatógrafos de gases. Este trabajo puede ser de gran utilidad y ser utilizado como guía, para realizar sus calibraciones internamente así como tener documentos que avalen sus resultados de investigación.

Recordemos que todo equipo de medición y prueba se debe justificar y comprobar su funcionamiento para asegurar la calidad de un trabajo de investigación y desarrollo.

3. OBJETIVO

3.1 GENERAL

Calibrar el cromatógrafo de gases varían 3800 con detector de ionización a la flama.

3.2 ESPECIFICOS

Realizar el mantenimiento preventivo del cromatógrafo de gases varian 3800 con detector de ionización a la flama.

Realizar la prueba de ruido a corto y largo plazo para verificar la limpieza de cada componente del cromatógrafo de gases.

Realizar el ajuste de flujos de los gases Nitrógeno, Aire e Hidrogeno en las líneas de transferencia utilizando un flujometro.

Realizar las pruebas de sensibilidad, reproducibilidad en tiempos de retención, resolución, reproducibilidad de inyecciones por el método del estándar interno para calibrar el cromatógrafo de gases.

Recopilar los resultados obtenidos para integrar una carpeta. Que incluya resultados de la calibración, fechas de calibración mantenimiento y composturas externas del proveedor.

4. MANEJO DE DATOS ESTADISTICOS

Realizar un estudio comparativo entre los resultados obtenidos internamente con los del proveedor y las especificaciones, e indicar con base a un análisis estadístico si los resultados cumplen con los parámetros de exactitud y precisión, para un equipo de medición como el cromatógrafo de gases.

Para realizar el comparativo descargar los datos obtenidos en la siguiente tabla de resultados.

AJUSTE DE GASES EN LAS LINEAS DE TRANSFERENCIA

TABLA N.1 RESULTADOS Y ESPECIFICACIONES DEL PROVEEDOR (VARIAN)

Parámetros	**S**	$\bar{X}$	**DER**	% error	**CV**	**Especificación**	**Resultados internos**
Gas de arrastre	0.1	3.44	0.2	12.8	0.003	3.0(+/-)0.5	**¿?**
Make-up	0.04	26.58	0.2	1.6	0.002	27(+/-)3	**¿?**
Purga de septa	0.01	3.51	0.2	12.3	0.003	4.0(+/-)1	**¿?**
Hidrogeno	0.42	31.20	0.35	4.0	0.013	30(+/-)1	**¿?**
Aire	0.32	300.1	0.11	0.04	0.001	300(+/-)10	**¿?**
Venteo	0.0	103	0.0	3.0		100(+/-)10	**¿?**

S = desviación estándar
DER = desviación estándar relativa
$\bar{X}$ = media aritmética
CV = coeficiente de variación

PRUEBAS PARA LA CALIBRACION DEL CROMATOGRAFO DE GASES VARIAN 3800

TABLA N.2 RESULTADOS Y ESPECIFICACIONES DEL PROVEEDOR (VARIAN)

Especificación	Proveedor	Resultados internos	Especificación
Ruido a corto plazo	0.30%	**¿?**	< 2.0 %
Ruido a largo plazo	7.88%	**¿?**	< 20 %
Sensibilidad	0.51302	**¿?**	➢ 0.008 Coul/gr
Resolución	X= 1.96	**¿?**	> 1.5 %
Repetibilidad por std/std int	DER =1.43	**¿?**	< 2.0 %
Tiempo de retención	Metanol DER= 0.0709 Isopropanol DER=0.1037	**¿?**	< 2.0 %

4.1 RESPONSABILIDADES

Del químico encargado del equipo.

En las industrias los equipos se asignan a personas con experiencia en su manejo teniendo como responsabilidades:

Realizar el mantenimiento preventivo en un periodo de cada seis meses o antes si lo requiere.

Realizar la verificación de parámetros de calibración en un periodo no mayor de un año.

Recopilar los reportes de calibración, mantenimiento externo y cualquier documentación procedente al cromatógrafo de gases.

Verificar un stock en consumibles y reactivo.

5. REACTIVOS, MATERIAL Y EQUIPO

5.1 EQUIPO

* Cromatógrafo de gases varian 3800
* Monitor y cpu marca DELL Pentium ll
* Software con programa varian 4.5 star
* Impresora Compaq IJ 650

5.2 MATERIAL

* Columna Quadrex DB 007 megaboro. (Quadrex 2001)
  30 mts de longitud y 0.5 de ID (diámetro interno)
* Férulas con aleación vaspat-grafito (Buyer's, 1 guide 2001)
* Septas de bajo sangrado (Edgar, 2000)
* Microjeringas Hamilton de 10 microlitros
* Hisopos de algodón.
* Matraces volumétricos de 100 mL marca kimax (18)
* Vasos de precipitado de 500 mL y 100 mL marca kimax
* Pipetas volumétricas de 2 mL marca Brand
* Contenedores para gases Nitrógeno, Aire, Hidrogeno. (Proveedor praxair)

5.3. REACTIVOS

* Metanol marca omnisolv Pureza 99.99 % Lote un1219 (Aldrich, 2001)
* Agua marca omnisolv Lote un1245
* Ácido nítrico diluido Lote ac4518 (15mL/100mL agua)
* Isopropanol marca omnisolv. Pureza 99.99 % Lote un1321
* Etanol marca omnisolv. Pureza 99.99 % Lote un1452
* Acetona marca omnisolv. Pureza 99.99 % Lote un 1265

5.4 PROCESO A SEGUIR

Nota- Requisitos para el usuario

* Conocimiento de cromatografía de gases
* Limpieza y cuidados de columnas
* Mantenimiento en detectores FID
* Reglas de seguridad en manejo de gases explosivos
* Conocimientos básicos estadísticos

6. PROCEDIMIENTO.

Para establecer el programa de calibración se consideran las siguientes sugerencias según PGA-00714 (control de equipos de inspección, medición y prueba).

Reportes analíticos de calibraciones emitidos por el proveedor varian.

Revisión bibliografíca a partir del año 1968 al 2002 en fuentes primarias de información.

Realizar una revisión bibliografíca en fuentes de información primarias como son diarios, jornal y secundarias en libros.

6.1 MANTENIMIENTO PREVENTIVO

Un mantenimiento se realiza antes de iniciar la calibración de un cromatógrafo de gases. Este se realiza para evitar problemas en el funcionamiento del equipo durante la calibración, así como evitar impurezas que puedan afectar los resultados de la calibración.

El mantenimiento preventivo consiste en la limpieza de los siguientes componentes.

6.1.1 Limpieza de columna

6.1.2 Limpieza de inyector capilar

6.1.3 Limpieza de inyector empacado

6.1.4 Limpieza del detector

6.1.5 Limpieza del horno

6.1.6 Limpieza de microjeringa

6.1.1 COLUMNA

Aquí se lleva la separación del analito si la columna esta sucia puede afectar la señal para el detector o bien acarrear impurezas que se detectaran como picos extraños en los cromatógramas de los resultados.

Si el mantenimiento no se realiza bajo las condiciones que se describen a continuación podría dañarse el empaque y sufriríamos la perdida de la columna. Para evitar esto proseguir como se indica.

Extender los extremos de la columna si estos están sucios, limpiar los extremos de la columna con algodón remojado en metanol, si las impurezas no se eliminan se procede a cortar los extremos de la columna con una punta de diamante.

Colocar una férula con su ferrul en un extremo de la columna a una distancia de 7.5 cm y montar la columna en la entrada del inyector medio, para el otro extremo de la columna realizar la misma operación pero a 9.5 cm este extremo no se conecta quedando libre ver figura 1.

Programar una temperatura del horno a una temperatura de 30 grados más baja que su temperatura limite de la columna (250 °C).

Se debe tener flujo constante de Nitrógeno por la columna, mantener la temperatura por 4 h. Transcurrido el tiempo bajar la temperatura a 50 ºC y desmontar la columna.

Para verificar si la columna esta completamente limpia realizar la prueba de ruido a corto y largo plazo esta prueba no debe registrar ningún pico extraño durante su corrida.

FIGURA 1

Columna megaboro DB5 longitud 30 metros, observar los extremos se observan impurezas en sus terminaciones**.** Así como su respectivo ferrul en cada extremo.

6.1.2 INYECTOR CAPILAR

Es una pieza del cromatógrafo de gases entre sus componentes esta un inserto de vidrio donde se deposita la muestra debido a esto las impurezas son frecuentes en su interior si la limpieza no es completa existe el riesgo de ensuciar la columna y microjeringa.Otra precaución que se debe tomar en cuenta es durante su ensamblé si las piezas quedan flojas existirán fugas lo que originara variaciones en la presión y una inestabilidad en el equipo. Para evitar esto proseguir como se indica.

Desmontar del inyector la tuerca del septo posteriormente quitar la septa de bajo sangrado en su parte baja se observa el inserto, el cual se quita desatornillando.

Remojar un hisopo con metanol e introducirlo en el interior hasta que este no quede sucio, sonicar el inserto por 1h con metanol, si a un queda sucio utilizar ácido nítrico diluido a una concentración 50:50 v/v en agua sonicar por 1h.

Posteriormente enjuague con abundante agua y luego con metanol ensamblar los componentes del inyector y colocar septa nueva.
Ver figura 2 (Manual de mantenimiento e instalación 1998).

Para verificar su limpieza se realiza la prueba de ruido a largo plazo.

FIGURA 2

Septa, inserto, tuerca de septo componentes del inyector capilar desmontados del cromatógrafo de gases varian 3800.

6.1.3 INYECTOR EMPACADO

La diferencia entre un inyector capilar y un empacado son las siguientes, el inyector empacado no tiene inserto y el diámetro del cuerpo del inyector es más ancho, lo que permite introducir en su interior el hisopo con metanol para su limpieza. El procedimiento para su limpieza es el mismo que se realiza para el inyector empacado ver figura 3.

FIGURA 3

6.1.4 DETECTOR (IONIZACION A LA FLAMA)

Nota: Por su sensibilidad del equipo se debe tener mucho cuidado en la limpieza de cada componente que integra el detector. Si uno de sus componentes sufre daño el equipo deja de operar y el costo para su reparación seria elevado.

La limpieza del detector se realiza cuando el ruido en el detector aumenta y la línea base no es estable, también se debe realizar al inicio de una calibración.

Para realizar la limpieza proseguir según se indique.

Con un desarmador tipo cruz quitar los tornillos que fijan el detector ver figura 4. Desconectar los cables de señal y cables del quemador de sus respectivas sondas, antes de quitar las sondas del interior de la torre FID extraer el colector y el aislador de cerámica ver figura 5.

Con precaución jalar las sondas de señal y del quemador para no romper sus puntas metálicas.

La boquilla de inflamación se desatornilla con precaución para no romperla ya que esta constituida de cerámica y metal.

Cuando se tengan las piezas por separado colocarlas en el interior de un vaso de precipitados de 500 mL y cubrirlas con metanol posteriormente sonicar por 1h.

Si las piezas permanecen sucias sonicar 1 h mas con una mezcla de ácido nítrico al 50:50 v/v en agua, enjuagar con agua y luego con metanol. (Manual de Operación varian, 1998).

Ensamblar los componentes conectando correctamente los cables de señal para evitar alguna descarga de potenciales ver figura 5.

Para verificar que el detector no se daño durante su limpieza la prueba de ruido a largo y corto plazo deben cumplir, así como la de sensibilidad además de registrar una señal en milivols estable.

FIGURA 4

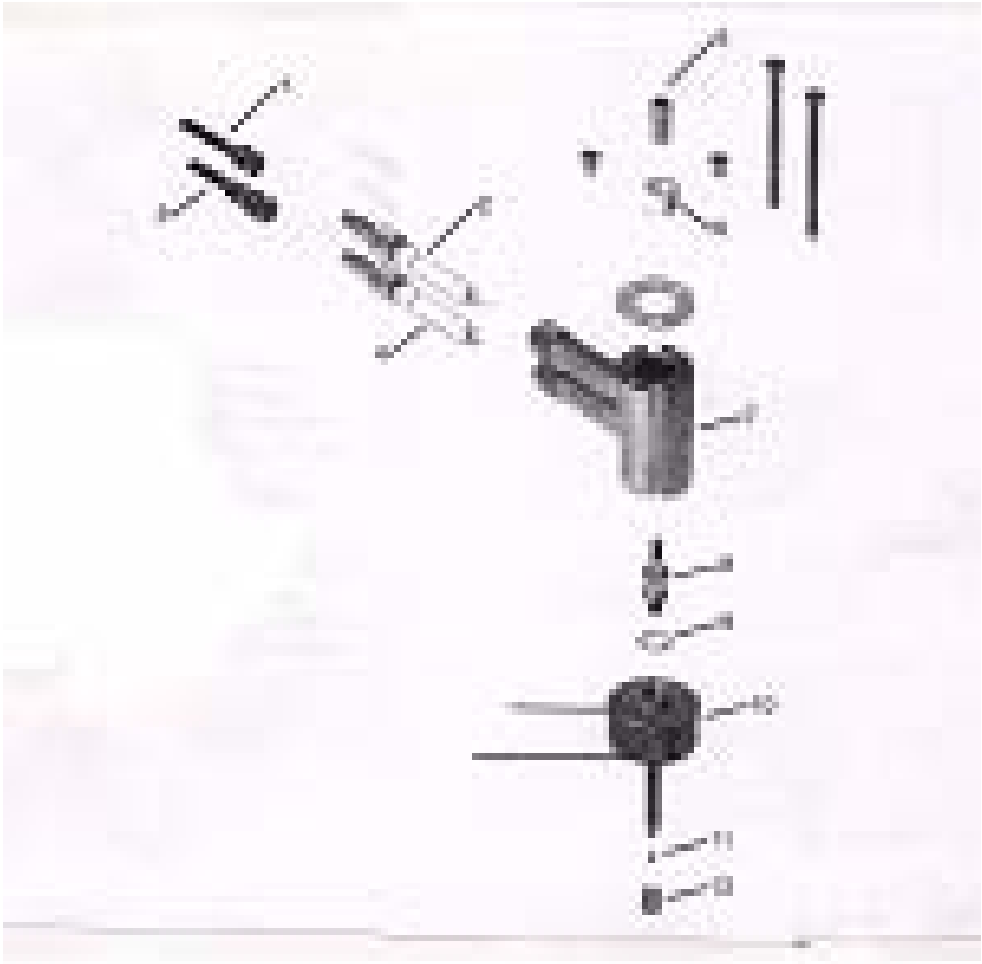


FIGURA 5

Detector de ionizacion a la flama y cables de señal

6.1.5 LIMPIEZA DEL HORNO

Humedecer una franela con una mezcla de agua y metanol 50:50 v/v.
Limpiar el interior del horno y partes exteriores del cromatografo para eliminar el polvo, nunca se debe utilizar detergentes para su limpieza.

6.1.6 LIMPIEZA DE MICROJERINGA

La importancia de mantener en buenas condiciones la microjeringa para su uso es indispensable, pues de ello depende la reproducibilidad de los resultados, si estas están sucias estaríamos ensuciando el sistema cromatografico. Para evitar esto se realiza la limpieza con lavados dimetilformamida seguido de cloroformo, etanol, agua hasta que el embolo se deslicé libremente.

Si no ocurre esto se realiza un lavado previo con ácido nítrico o clorhídrico al 50:50 v/v repetir el procedimiento anterior ver figura 6.

La microjeringa queda completamente limpia cuando el embolo se desliza libremente por su interior.

FIGURA 6

Material utilizado para la calibración del cromatógrafo de gases varian 3800 (ferulas, microjeringas, hisopos, insertos)

6.2 CALIBRACION DEL CROMATOGRAFO DE GASES

Después que el mantenimiento se realizo se puede proceder a calibrar el cromatógrafo de gases varian 3800 realizando las siguientes pruebas.

6.2.1 Flujos en líneas de transferencia. (Detecto, purga de septa y gas de arrastre)

6.2.2 Ruido a corto plazo

6.2.3 Ruido a largo plazo

6.2.4 Sensibilidad

6.2.5 Reproducibilidad en tiempos de retención

6.2.6 Resolución

6.2.7 Reproducibilidad por el método del estándar interno

6.2.8 Comparativo con un producto de línea

6.2.1 Los gases que fluyen por las líneas de transferencia según su localización se calibran con un flujometro y se verifica su variación con parámetros estadísticos.

FLUJOS EN EL DETECTOR

El detector es una de las partes mas sensibles del cromatógrafo de gases, aquí se produce la combustión del Hidrogeno y Aire produciendo una flama, la intensidad debe ser uniforme para evitar ruido y respuesta baja en la señal. Debido a esto se debe ajustar la cantidad de flujo de gases Hidrogeno y Aire para la combustión (kart, 1977, Henry ,1968).

PROCEDIMIENTO

Abrir la puerta del horno y colocar en un extremo de la columna un ferrul con su respectiva férula a una distancia de 7.5 cm de su extremo.

Realizar la misma operación del otro extremo de la columna colocando el ferrul a una distancia de 9.5 cm, abrir la puerta del horno y montar la columna en el inyector inserte el extremo de 7.5 cm y para el detector el extremo de 9.5 cm ver figura 7 y 8.

Para verificar fugas con una jeringa adicionar en las uniones una solución de 50:50 v/v metanol: agua no debe existir ningún burbujeo.

Colocar el flujometro en la parte superior de la torre TSD, cerrar las llaves de paso de los gases (Aire, Hidrogeno y Nitrógeno) ver figura 9.
Abrir solamente la llave del Hidrogeno y esperar 15 min. Para que se estabilice ajustar a un flujo de 30mL/min, con las válvulas de paso del cromatógrafo de gases localizadas en la parte frontal ver figura 10.

Registrar 10 lecturas del flujometro a intervalos de 10 segundos, los resultados deben estar dentro de un rango de 30(+/-)1.0 mL/min. Calcular media y desviación estándar.

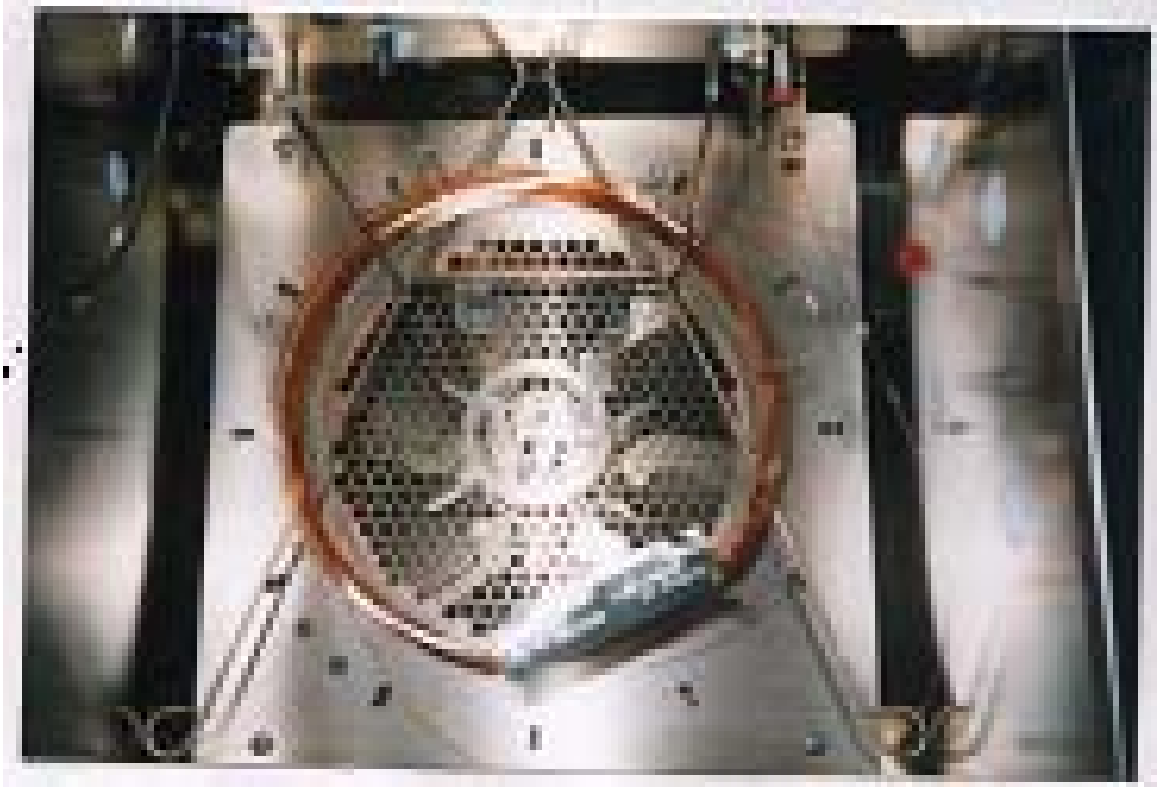
Para ajustar el flujo del Aire cerrar la llave de Hidrogeno y abrir la del Aire, esperar 15 minutos, proseguir como se ajusto el Hidrogeno. Registrar 10 lecturas del flujometro a intervalos de 10 segundos, los resultados deben estar dentro de un rango de 300(+/-) 10 mL/min. Calcular media y desviación estándar.

Para ajustar el flujo del make-up cerrar llaves de Aire e Hidrogeno y abrir las de Nitrógeno, ajustar flujos a 27(+/-)3 mL/min. Con la válvula make-up registrar 10 lecturas cada 10 segundos. Calcular media y desviación estándar.

FIGURA 7

Interior del horno del cromatógrafo de gases varian 3800, parte superior unión del inyector parte superior izquierda unión del detector.

FIGURA 8



Columna montada en el interior del horno, parte superior se observa la unión del ferrul con el inyector capilar.

FIGURA 9

Flujometro colocado en la parte superior del detector para medir el flujo de gases de combustión (aire, hidrogeno).

FIGURA 10

Válvulas de ajuste de gases (Hidrogeno, Aire, Nitrógeno, Make up)

PURGA DE SEPTA

Cuando se realiza una inyección al penetrar la aguja quedan residuos de muestra para evitar contaminaciones y acumulaciones. Existe un flujo de gas acarreador en el inyector, su función es eliminar las impurezas adheridas, a la septa. Para que esto suceda debe de ajustarse el flujo de la siguiente forma.

Colocar tapón de flujometro en la purga septa del horno, esperar a que se estabilice por 15 minutos y ajustar a 4(+/-) 1 mL/min. Con el tornillo localizado parte superior del cromatógrafo ver figura 11 Registre 10 lecturas 1 por cada 10 segundos. Calcular media y desviación estándar.

FIGURA 11

Línea de transferencia localizada en el extremo superior derecho por donde fluye gas de arrastre para la limpieza de la septa.

GAS DE ARRASTRE

El gas de arrastre o fase móvil fluye por la columna esta debe ser constante para evitar variaciones en tiempos de retención, simetría de picos y resolución de analitos a cuantificar (Gunter 1972, Alan 1970).

Para su verificación proseguir como se indica.

Abrir la puerta del horno desmontar el extremo de la columna que va al detector. Colocar el tapón del flujometro en el extremo y esperar.

10 Minutos a que se estabilice, ajuste el flujo a 10(+/-) 0.5 mL/min. Registrar 10 lecturas 1 por cada 10 segundos, calcular media y desviación estándar ver fig. 12.

FIGURA 12

Columna montada en el interior del horno uno de sus extremos conectado al inyector y el otro libre para medir el gas de arrastre.

6.2.2 RUIDO A CORTO PLAZO

Proseguir como se indique

Montar la columna en el interior del horno, colocar el extremo mas largo en el inyector y presione el ferrul, colocar el otro extremo en el detector tener mucho cuidado al presionar para evitar se rompa la columna, estabilizar el sistema cromatografico a las siguientes condiciones por 2 h.

* Columna 140 ºC
* Detector 300 ºC
* Inyector 220 ºC
* Tiempo 20 min
* Gas de arrastre Nitrógeno

Presione run y dejar correr por 20 minutos, con una regla determine el ancho de la línea base no debe exceder el <2.0%. Realizar el cálculo con la siguiente ecuación

ECUACION 1

$$\text{Ruido a corto plazo} = \frac{\text{Desplazamiento}}{\text{Escala total}} \times 100$$

6.2.3 RUIDO A LARGO PLAZO

Del cromatógrama anterior trazar una línea recta que abarque el inicio y termino de la corrida, la desviación debe ser <20%. Realizar el cálculo con la siguiente ecuación.

ECUACION 2

$$\text{Ruido a largo plazo} = \frac{\text{Desplazamiento de la línea base}}{\text{Escala total}} \times 100$$

6.2.4 SENSIBILIDAD

Esta prueba es de suma importancia para determinar la cantidad de analito que puede cuantificar y detectar el equipo (Robert ,1998).

Para realizar esta prueba se prepara una sustancia de referencia con una mezcla de metanol y alcohol isopropilico en medio de disolución agua de la siguiente manera.

Adicionar a un matraz de 100 mL, 1 mL de metanol y 1mL alcohol isopropilico, llevar al aforo con agua de esta dilución, tomar 2 mL transferir a un matraz de 100 mL y llevar al aforo con agua para obtener una concentración de 0.0002 mL/mL, proseguir según se indique.

Con una microjeringa tomar 3 mcL de la solución de referencia y depositar el contenido en el inyector medio introduciendo la aguja completamente.

Realizar una inyección de la sustancia de referencia bajo las siguientes condiciones.

Atenuación		11
Temperatura	Inyector	220 °C
Temperatura	Detector	300 °C
Temperatura	Columna	60 °C x 5 min.
Volumen	inyección	3 mcL
Gas de arrastre	Nitrógeno	

Del cromatógrama obtenido identifique el pico de isopropanol y determine el ancho y altura del pico como se indica en el cromatógrama anexo en los resultados y proceda a calcular la sensibilidad esperando un resultado mayor a >0.008 coul/gramo. Calcular la sensibilidad sustituyendo en las siguientes ecuaciones.

ECUACION 3

$$\text{Altura de pico} = \frac{\text{Altura de pico}}{\text{Escala total}} \times 100$$

ECUACION 4

$$\text{Sensibilidad} = \frac{\text{altura de pico \% / 2}}{\text{Escala total}} \times 100$$

6.2.5 REPRODUCIBILIDAD EN TIEMPOS DE RETENCION

Entre los componentes a evaluar mas importantes del cromatógrafo es el horno. Aquí se controlan las temperaturas, factor indispensable para la separación del analito para identificar si no hay variación, se realiza una serie de inyecciones se determina su tiempo de retención si este es constante y su desviación estándar es menor a 1.5% se considera que no existen fallas en el control de temperaturas.

Estabilizar el cromatógrafo de gases a las siguientes condiciones:

Temperatura	Inyector	220 ºC
Temperatura	Detector	300 ºC
Temperatura	Columna	60 ºC x 3min.
Atenuación		11
Gas de arrastre	Nitrógeno	

Localizar el inyector medio con una microjeringa realizar una serie de 10 inyecciones manualmente de 3 mcL estas deben ser consecutivas si la desviación es mayor a la indicada.

Se realizaran otras 10 inyecciones y si la desviación sigue siendo mayor dejar estabilizar el sistema cromatografico por 1h y revisar posibles fugas.

Estabilizar nuevamente a las condiciones ante mencionadas y efectuar nuevamente otra serie de 10 inyecciones manualmente Calcular media y desviación estándar.

El equipo es completamente automatizado y tiene integrado un soffwear con el programa varian 4.5 star el cual calcula directamente los parámetros de tiempo de retencion,areas,resolucion,platos teoricos,simetría monbre delanalito,directamente en los resultados de los cromatógramas.

6.2.6 RESOLUCION

Es la eficiencia por la cual el sistema cromatografico puede separar los analitos en esta prueba se verifica los parámetros ya antes calibrados si alguno de estos no cumpliera la eficiencia se vera afectada.

De las inyecciones obtenidas en las pruebas de tiempo de retención para FID determinar los anchos de pico y proceda a calcular la resolución de r1 y r2, su media debe estar dentro de los limites r mayor a 1.5 la resolución se calculara con la ecuación.

ECUACION 5

$$\text{Resolución} = \frac{T2 - T1}{2\ W1 + W2}$$

T1 Y T2 Tiempos de retención

W1 Y W2 Anchos de pico

6.2.7 REPRODUCIBILIDAD POR EL METODO DEL ESTANDAR INTERNO

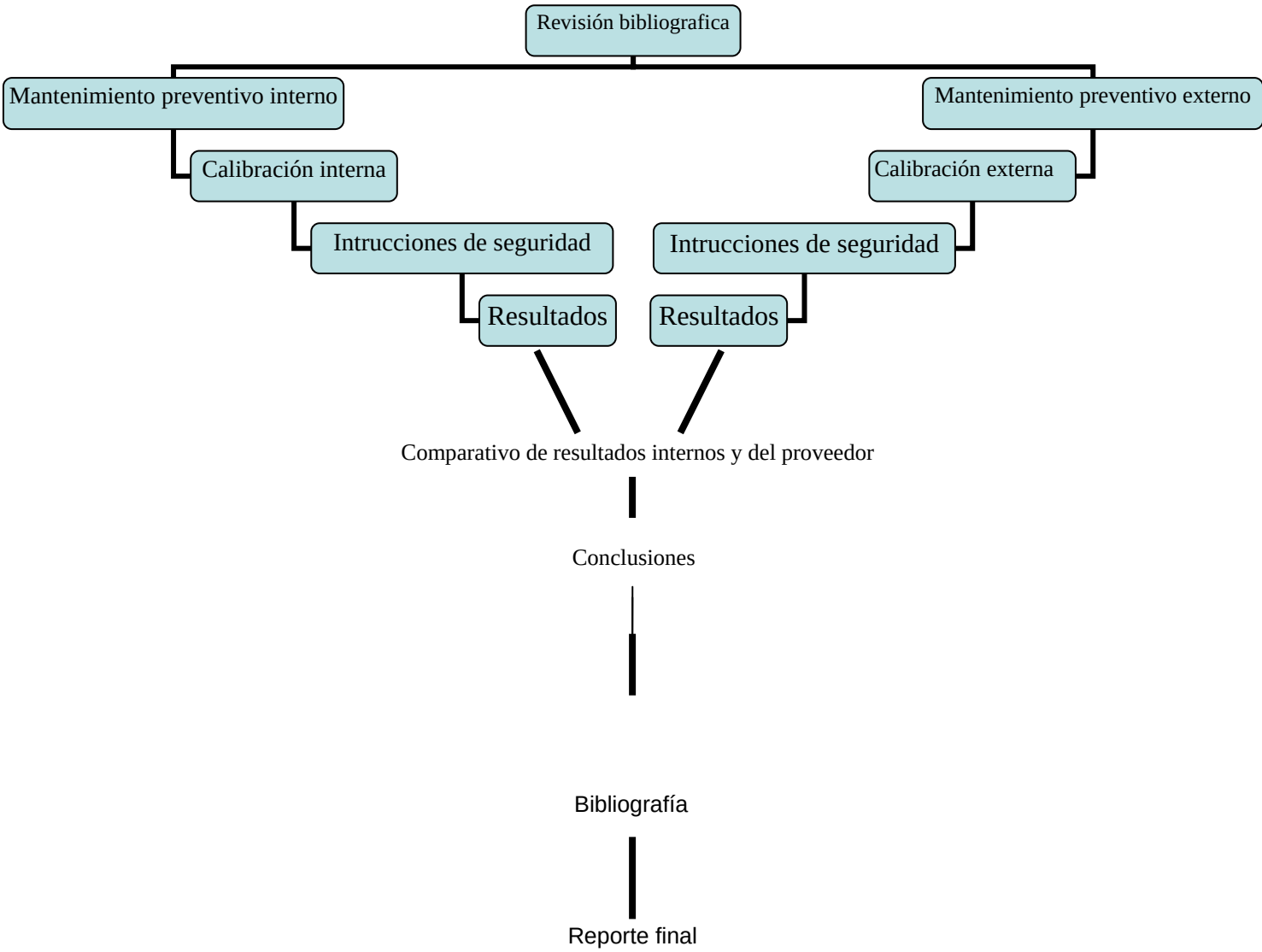
Esta prueba es de verificación para determinar el error analítico del instrumentista y el funcionamiento del equipo.

Si en una serie de diez inyecciones consecutivas un resultado esta fuera de especificación, se tendrá que iniciar una nueva serie de diez inyecciones las cuales deberán de tener un valor no mayor de un 2% en su desviación estándar. Si esto ocurre se considera un equipo calibrado y listo para identificar y cuantificar un analito en proceso. Calcular media y desviación estándar.

6.2.8 COMPARATIVO DE RESULTADOS ENTRE UN PRODUCTO DE LINEA

Como análisis complementario realizar una serie de 10 inyecciones de un producto de línea, sus resultados en tiempo de retención, resolución reproducibilidad no deben varias de un 2 % en comparación con sus resultados antes de la calibración.

7. DIAGRAMA DE FLUJO



8. INSTRUCCIONES DE SEGURIDAD Y MANTENIMIENTO

* Al instalar la columna asegurarse que no existan fugas Utilizando metanol, no utilizar detergentes.

* Verificar que exista flujo de gases antes de dar temperatura al horno.

* Si la línea base sigue alta, desmontar el detector y limpiar con Metanol esto si la persona esta capacitada.

* Si durante la corrida aparecen picos no deseados, limpiar el Inyector con metanol y el lainer se debe limpiar con algodón o Sonicar.

* Si no este capacitado no intente reparar cualquier anomalía del Instrumento.

* La calibración de gases se realizara en un periodo de 1 año o antes si lo requiere.

* Realizar el mantenimiento preventivo en un periodo de 6 meses o antes si lo requiere.

* Los gases utilizados deben de ser de alta pureza.

*Siempre verifique al término del trabajo que no exista flujo de gases.

9. RESULTADOS

Se realizo la consulta para la calificación de equipos de instrumentos de medición analítica (ceima).cumpliendo con los requisitos de instalación y funcionamiento para el cromatógrafo de gases.

Se realizo una revisión bibliografíca a partir del año 1968 al 2002 en fuentes primarias de información.

Realizo una revisión bibliografica en fuentes de información primarias como son diarios, jornal y secundarias en libros.

Se solicito al proveedor del equipo varian la calibración del cromatógrafo de gases varian 3800 con detector de ionizacion a la flama.

El proveedor entrega resultados donde especifica condiciones cromatograficas, material y soluciones de referencia para la calibración del cromatógrafo de gases varian 3800.

Se procede a calibrar el equipo y entrega el proveedor un reporte donde registra pruebas realizadas, resultados, así como rangos de aceptación y rechazo para cada prueba.

Con este respaldo analítico se procede a realizar la calibración internamente adquiriendo soluciones y materiales utilizados por el proveedor. Las condiciones cromatograficas empleadas son las referenciadas por el proveedor.

El propósito de realizar la calibración de equipos internamente en la industria farmacéutica y áreas de investigación es reducir costos además de tener trazabilidad en sus resultados, así como no estar sujetos a la disposición del proveedor lo que origina retrasos en análisis y pérdidas económicas a la empresa.

Se procede a realizar las pruebas de ruido a corto plazo y largo plazo, reproducción en tiempos de retención, sensibilidad, resolucion, calibración de flujos, anchos de pico, resolución, obteniéndose los siguientes resultados.

9.1 COLUMNA

Como se aprecia en la figura 1. La columna tiene en sus extremos impurezas estas no se pudieron eliminar con un algodón remojado en metanol se cortan los extremos para eliminar las impurezas.

Al cortar los extremos con las impurezas estamos evitando ensuciar el sistema cromatografico y tener picos extraños que alteren los resultados de la calibración.

FIGURA 1

Columna megaboro DB5 longitud 30 metros, observar los extremos se observan impurezas en sus extremos.

9.2 INYECTOR

Otra de las piezas que ayudo a evitar estos problemas es el inserto de vidrio ver figura 6 este no fue necesario sustituirlo debido a que no quedaron impurezas en su interior y su limpieza fue total.

El inyector capilar y empacado quedan limpios sin ningún problemas utilizando hisopos remojados en metanol logrando extrae de su interior las impurezas acumuladas por las inyecciones repetidas. Esto lo comprobamos durante la limpieza, los hisopos al principio salían sucios después de varias limpiezas estos salían limpios, la importancia de tener los inyectores limpios dan la seguridad de un sistema cromatografico limpio si estos tienen impurezas estas son arrastrada al detector y ensucian sus componentes del detector originando problemas en la línea base.

FIGURA 6

Material utilizado para la calibración del cromatógrafo de gases varian 3800 (ferulas, microgeringas, hisopos, insertos)

9.3 DETECTOR

Como se a mencionando una de las partes mas delicadas del equipo es el detector si una pieza sufre daño al estar desmontándolo para su mantenimiento. Se tendría problemas en la línea base y esta no se estabilizaría o bien no existiría ninguna señal de registro.

Como se puede apreciar en la figura 4 y 5. Las partes metálicas se pudieron limpiar sin ningún problema con la solución de metanol al 50:50 v/v en agua.

Para las partes de porcelana (sonda de señal, sonda de quemador, aislador de cerámica y boquilla de inflamación) fue necesario utilizar la solución de ácido nítrico diluido 50:50 v/v para eliminar sus impurezas.

Se procedió a montar el detector con el cuidado de armar cada componente teniendo el cuidado de no romper las piezas.

Verificamos su funcionamiento con dos pruebas sencillas. Una es acercar un vidrio de reloj en la parte superior de la torre Fid si se empaña el vidrio indicado la combustión de gases a consecuencia una flama uniforme.

La otra prueba es introducir un hisopo en el interior y observamos una respuesta en la línea base en forma de un pico cromatografico con esto aseguramos la integridad del detector ver figura 5.

Para la instalación de la columna se tuvo el cuidado de cambiar las férulas por unas nuevas estas ya estaban deformes pudiendo originar fugas en las uniones ver figura 6.

Las fugas se verificaron con una mezcla de metanol agua 50:50 v/v con una jeringa en las uniones donde se apretó el ferrul, como no se observo un burbujeo en las uniones se concluye que no hay fugas ver figura 8.

Antes de iniciar cualquier prueba en el equipo es necesario hacer un recuento de todo lo que se realizo y estar seguro que a todas las piezas se les dio mantenimiento, en ocasiones ocurre el equipo esta limpio pero se olvida verificar la limpieza de la microgeringa y al realizar las inyecciones ensuciamos nuevamente el sistema cromatografico ver figura 6.

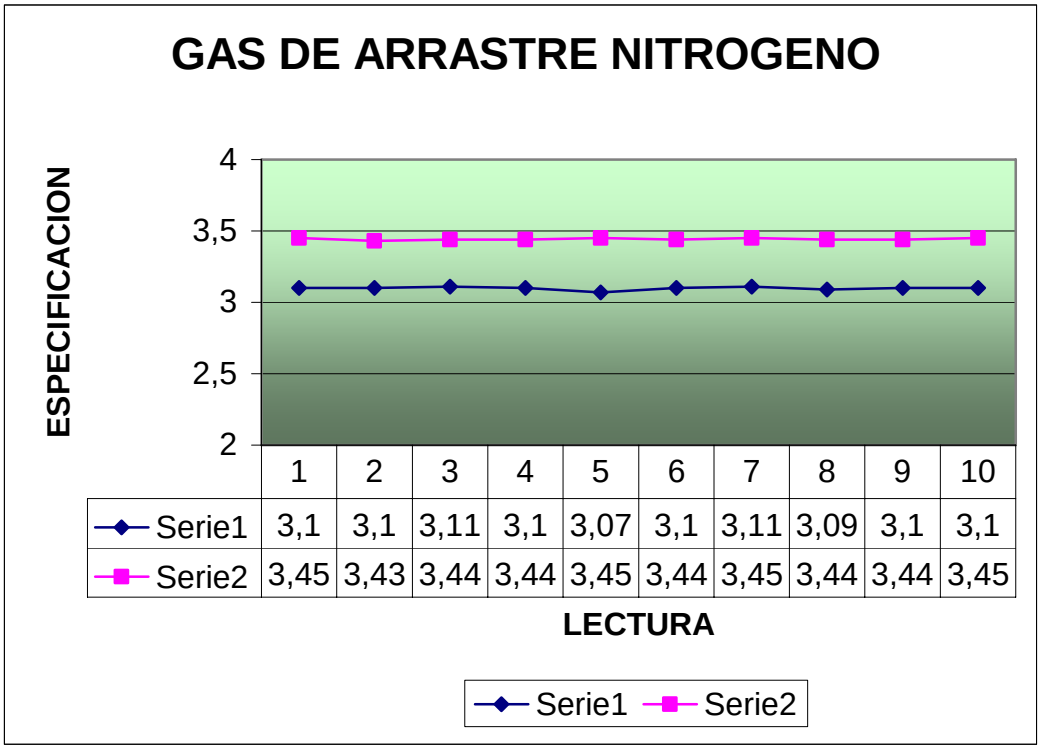
9.4 MICROJERINGA

Para la limpieza de la microjeringa se logro eliminar las impurezas, para confirmar esto el embolo se desliza libremente, con esto se concluye una limpieza total del cromatógrafo y se procede a realizar el ajuste de gases en las líneas de transferencia.

Los resultados obtenidos indican una reproducibilidad y exactitud dentro de los límites proporcionados por el proveedor varian.

9.5 AJUSTE DE GASES EN LINEAS DE TRANSFERENCIA

GRAFICA 1



Serie 2 resultados proveedor Serie 1 resultados internos

Resultado de 10 lecturas tomadas consecutivamente con un flujometro tanto del proveedor varian y lecturas de la calibración interna.
Sobre el eje x correspondiente al numero de lecturas y sobre el eje y representa el flujo del gas nitrógeno en mL/min.

Resultados

Parámetros	**S**	$\bar{X}$	**DER**	% error	**CV**	**Especificación**	**Resultados**
Gas de arrastre	0.1	3.44	0.2	12.8	0.003	3.0(+/-)0.5	**Proveedor**
Gas de arrastre	0.044	3.098	0.37	3.27	0.014	3.0(+/-)0.5	**Internos**

Análisis

Para la medición del gas de arrastre se registro 10 mediciones todas entran dentro de un rango de aceptación de 3.0 (+/-) 0.5 mL / min, obteniéndose un valor medio de 3.098 una desviación estándar de 0.044 con una desviación calculada en % de error de 3.27.

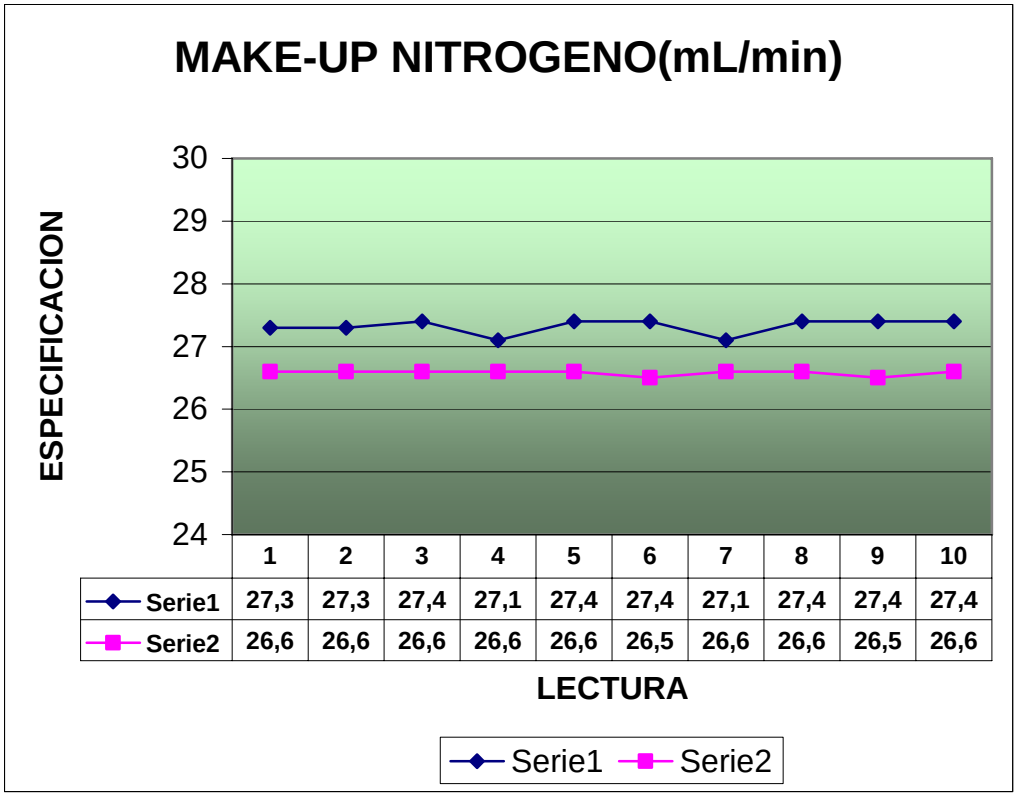
Comparando los resultados obtenidos, contra los resultados del proveedor se tiene un valor medio de 3.44 y un % de error de 12.8. Esto hace que los resultados obtenidos internamente sean mas próximos al teórico, lo que indica mayor precisión y a consecuencia un % de error en la desviación menor, pero la desviación estándar del proveedor es menor a la desviación estándar obtenida internamente y a consecuencia se obtiene un coeficiente de variación mucho menor con esto los resultados del proveedor son mas exactos.

Esto se aprecia mejor en la grafica 1, los resultados de ambos están por arriba del valor teórico. Pero se observa que los resultados del proveedor están muy próximos al limite de aceptación superior 3.5 mL / min esto explica su % de error mucho mas alto que el obtenido internamente.

Con estos resultados obtenidos se logró obtener reproducibilidad en tiempos de retención.

AJUSTE DE GASES EN LINEAS DE TRANSFERENCIA

GRAFICA 2



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Serie1	27,3	27,3	27,4	27,1	27,4	27,4	27,1	27,4	27,4	27,4
Serie2	26,6	26,6	26,6	26,6	26,6	26,5	26,6	26,6	26,5	26,6

Serie 2 resultados proveedor Serie 1 resultados internos

Resultados de 10 lecturas tomadas consecutivamente con un flujometro tanto del proveedor varian y lecturas de la calibración interna.
Sobre el eje x correspondiente al numero de lecturas y sobre el eje y representa el flujo del gas nitrógeno en mL/ min.

Resultados

Parámetros	**S**	$\bar{X}$	**DER**	%	**CV**	**Especificación**	**Resultados i**
Make-up	0.04	26.58	0.2	1.6	0.002	27(+/-)3	**Proveedor**
Make-up	0.449	27.32	0.45	1.19	0.016	27(+/-)3	**Internos**

Análisis

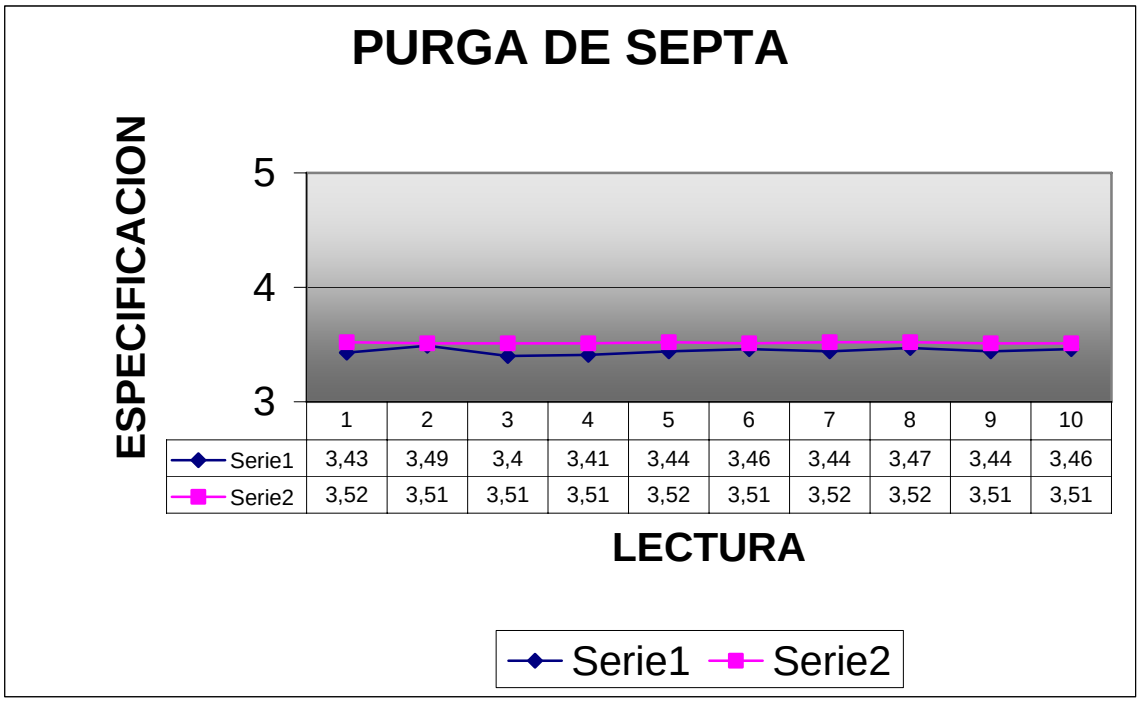
Para la medición de flujo en make –up los resultados del proveedor son mucho mas reproducibles y a consecuencia su coeficiente de variación 0.002 es mucho menor que el coeficiente de variación obtenido por la calibración interna 0.016 sin embargo el % de error 1.6 es mas elevado que los resultados internos 1.2 ver grafica 2.

En esta grafica se observan dos valores de 27.1 en las lecturas 3 y 7 tomando como referencia su media de 27.32 su exactitud es baja lo que hace ver la grafica una línea de resultados no uniforme. Caso contrario con los resultados del proveedor su media de 26.58 sus determinaciones son muy próximas a su media e incluso hay varios resultados que se reproducen, esto hace ver la grafica una línea mas uniforme a consecuencia de esto su exactitud aumenta pero a un los resultados obtenidos internamente tienen menor variación.

La entrada del analito depende mucho de estos resultados como están dentro de especificación la reproducibilidad de áreas no rebaso mas de un 2% en su desviaciones.

AJUSTE DE GASES EN LA LINEAS DE TRANFERENCIA

GRAFICA 3



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Serie1	3,43	3,49	3,4	3,41	3,44	3,46	3,44	3,47	3,44	3,46
Serie2	3,52	3,51	3,51	3,51	3,52	3,51	3,52	3,52	3,51	3,51

Serie 2 resultados proveedor Serie 1 resultados internos

Resultados de 10 lecturas tomadas consecutivamente con un flujometro tanto del proveedor varian y lecturas de la calibración interna.
Sobre el eje x correspondiente al numero de lecturas y sobre el eje y representa el flujo del gas Nitrógeno en mL/min.

Resultados

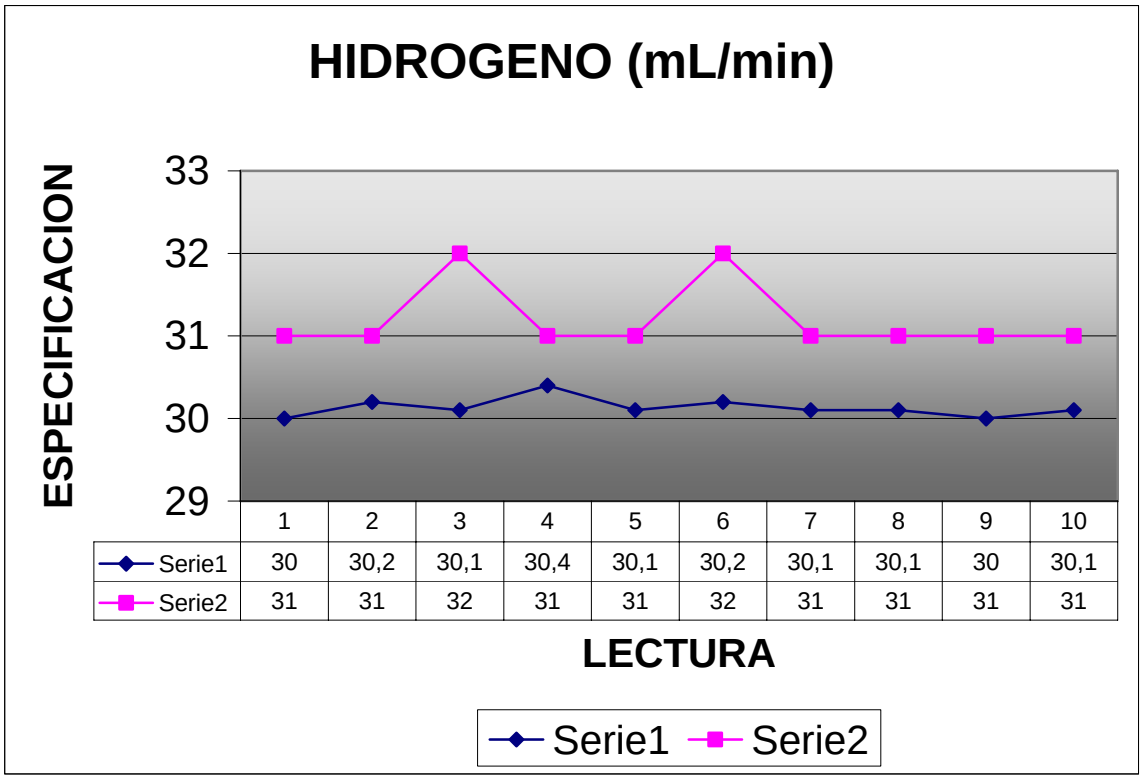
Parámetros	**S**	**$\bar{X}$**	**DER**	%	**CV**	**Especificación**	**Resultados**
Purga de septa	0.01	3.51	0.2	12.3	0.003	4.0(+/-)1	**Proveedor**
Purga de septa	0.01	3.51	0.2	12.3	0.003	4.0(+/-)1	**Internos**

Análisis

Como se aprecia en los resultados los valores son reproducibles esto hace que los resultados entre el proveedor y los obtenidos internamente no tengan diferencia alguna pero en la grafica los valores caen por debajo de la media del rango de aceptación lo que hace que el % de error se eleve en ambos casos auque los resultados están dentro del rango de aceptación la prueba realizada cumple y en base a esto no deberá existir ningún problema durante las inyecciones y mantener un sistema cromatografico libre de impurezas.

AJUSTE DE GASES EN LA LINEAS DE TRANFERENCIA

GRAFICA 4



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Serie1	30	30,2	30,1	30,4	30,1	30,2	30,1	30,1	30	30,1
Serie2	31	31	32	31	31	32	31	31	31	31

Serie 2 resultados proveedor Serie 1 resultados internos

Resultados de 10 lecturas tomadas consecutivamente con un flujometro tanto del proveedor varian y lecturas de la calibración interna.
Sobre el eje x correspondiente al numero de lecturas y sobre el eje y representa el flujo del gas Hidrogeno en mL/min.

Resultados

Parámetros	**S**	$\bar{X}$	**DER**	% error	**CV**	**Especificación**	**Resultados**
Hidrógeno	0.42	31.20	0.35	4.0	0.013	30(+/-)1	**proveedor**
Hidrógeno	0.12	30.13	0.38	0.4	0.004	30(+/-)1	**internos**

Análisis

Los resultados obtenidos internamente son mas próximos a la especificación, los puntos 3,6 del proveedor están fuera del limite de aceptación esto hace que el % de error sea mas alto 4.0 en comparación con los resultados internos 0.4.

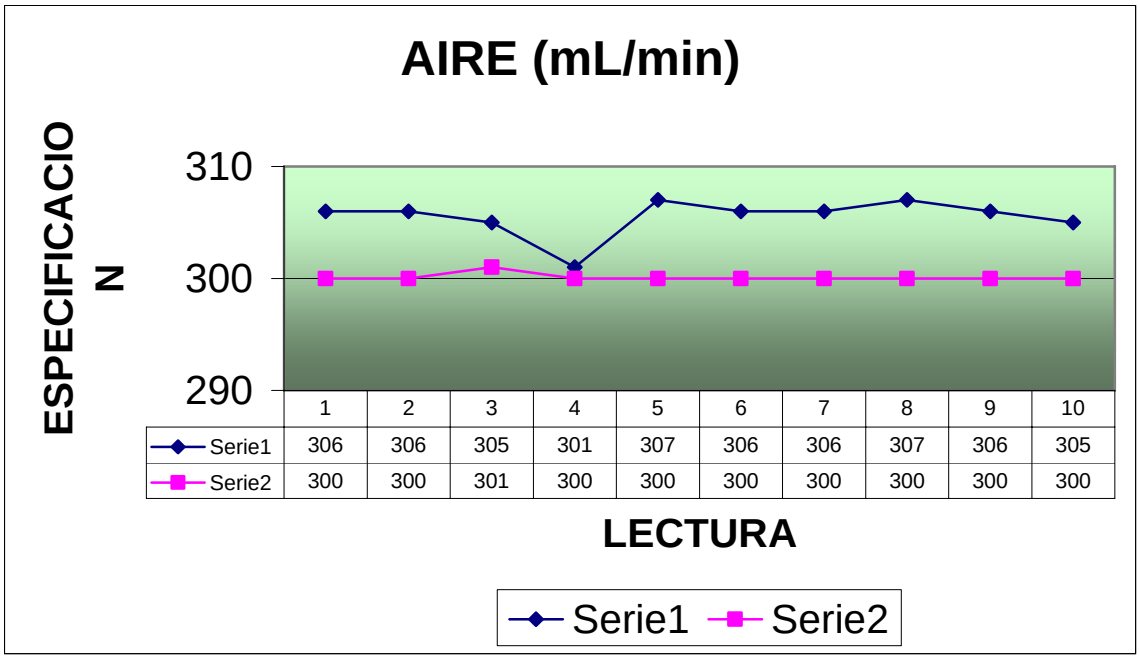
Si observamos la grafica 4 las 10 lecturas internas están muy próximas al valor medio de la especificación a diferencia de las lecturas del proveedor se encuentran por arriba del valor medio e incluso los puntos 3,6 su desviación es muy marcada a consecuencia se observan como lo dos puntos deforman la grafica.

Como el hidrogeno es uno de los gases de combustión del detector, el ruido a largo plazo obtenido del proveedor deberá ser mas alto que el obtenido internamente.

Auque existan dos puntos fuera de especificación del proveedor se espera que la prueba de ruido a largo y corto plazo cumpla con las especificaciones.

AJUSTE DE GASES EN LAS LINEAS DE TRANFERENCIA

GRAFICA 5



Serie 2 resultados proveedor Serie 1 resultados internos

De 10 lecturas tomadas consecutivamente con un flujometro tanto del proveedor varian y lecturas de la calibración internan.
Sobre el eje x correspondiente al numero de lecturas y sobre el eje y representa el flujo del gas Aire en mL/min.

Resultados

Parámetros	**S**	$\bar{X}$	**DER**	%	**CV**	**Especificación**	**Resultados internos**
Aire	0.32	300.1	0.11	0.04	0.001	300(+/-)10	**Proveedor**
Aire	0.56	305.5	1.72	1.8	0.002	300(+/-)10	**Interno**

Análisis

Para las determinaciones de Aire los resultados del proveedor son muy próximos al valor medio de aceptación, teniendo una reproducibilidad alta a consecuencia un coeficiente de variación bajo 0.001.

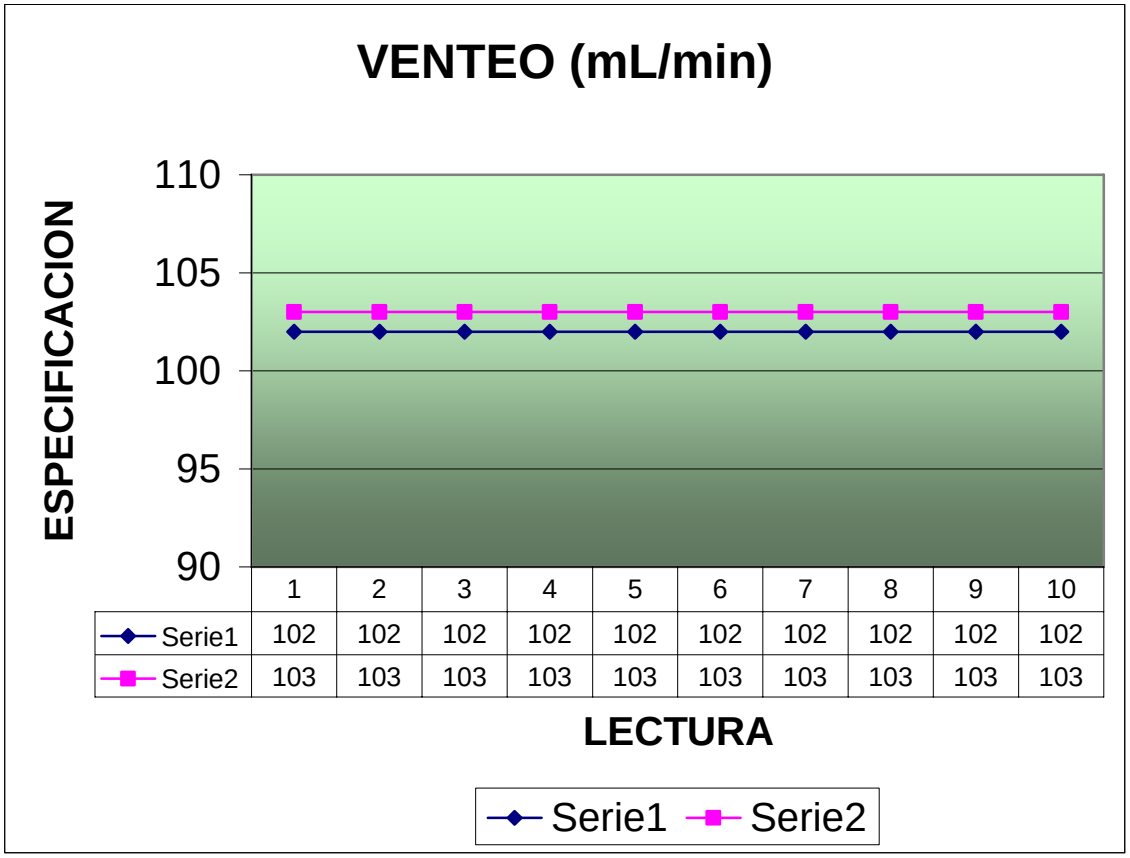
Sin embargo los resultados que se obtienen internamente, la precisión y exactitud es mucho menor en comparación con los del proveedor ya que la desviación estándar es de 0.56 y su % de error de 1.8 ver tabla de resultados. Auque los valores son aceptables por estar dentro del rango de aceptación 300+/- 10.

Como se observa en la grafica 5 los resultados internos y externos se localizan muy cerca del la media del limite de aceptación. Ningún punto se encuentra fuera de los límites de aceptación.

El Aire es uno de los elemento que origina la flama para el funcionamiento del detector como los resultados están dentro de especificación se obtiene una flama constante y estable lo que permite un sistema cromatografico estable.

AJUSTE DE GASES EN LAS LINEAS DE TRANSFERENCIA

GRAFICA 6



Serie 2 resultados proveedor Serie 1 resultados internos

Resultados de 10 lecturas tomadas consecutivamente con un flujometro tanto del proveedor varian y lecturas de la calibración interna.
Sobre el eje x correspondiente al numero de lecturas y sobre el eje y representa el flujo del gas aire en mL/min.

Resultados

Parámetros	**S**	$\bar{X}$	**DER**	%	**CV**	**Especificación**	**Resultados**
Venteo	0.0	103	0.0	3.0	0.0	100(+/-)10	**Proveedor**
Venteo	0.0	103	0.0	3.0	0.0	100(+/-)10	**Internos**

Análisis

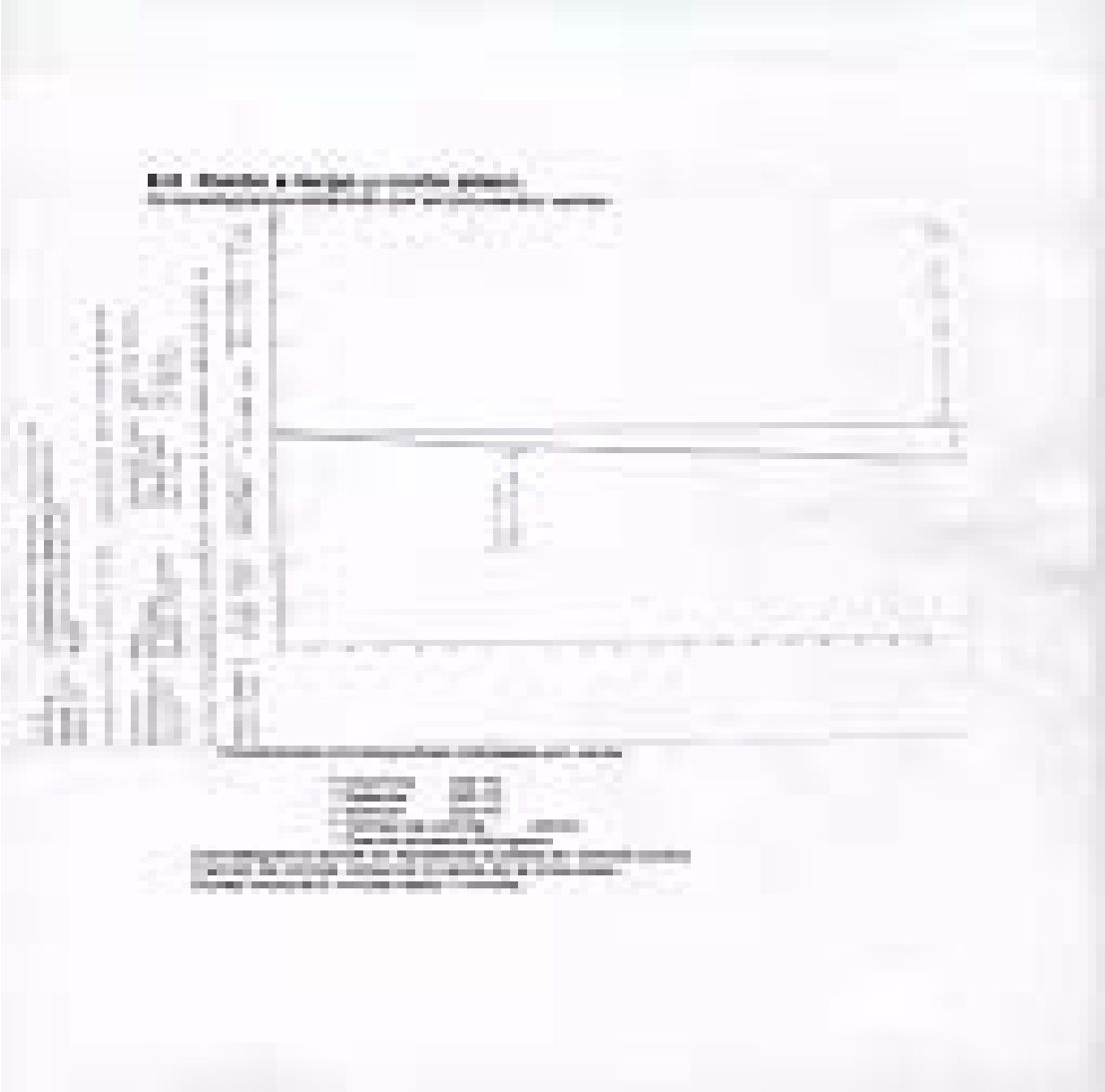
Para la medición de venteo tanto los resultados del proveedor como los internos son muy parecidos y sus desviaciones son mínimas ver grafica 6 de resultados.

Como se puede observar en la tabla. La comparación de resultados del proveedor como los resultados obtenidos en la calibración interna está dentro de los rangos de aceptación emitidos por el proveedor. Con esto se verifica un flujo constante en las líneas de transferencia por donde fluyen los gases quedando listo el cromatógrafo de gases para las siguientes pruebas que verificaran la reproducibilidad en sus resultados.

Las primeras determinaciones que se realizaron fueron las de ruido a largo y corto plazo. Con estas pruebas se tienen la evidencia analítica para la limpieza del cromatógrafo de gases.
Si estas pruebas cumplen el cromatógrafo de gases estará listo para seguir realizando la calibración del equipo.

9.6 Ruido a largo y corto plazo

Cromatógrama obtenido por el proveedor varian .



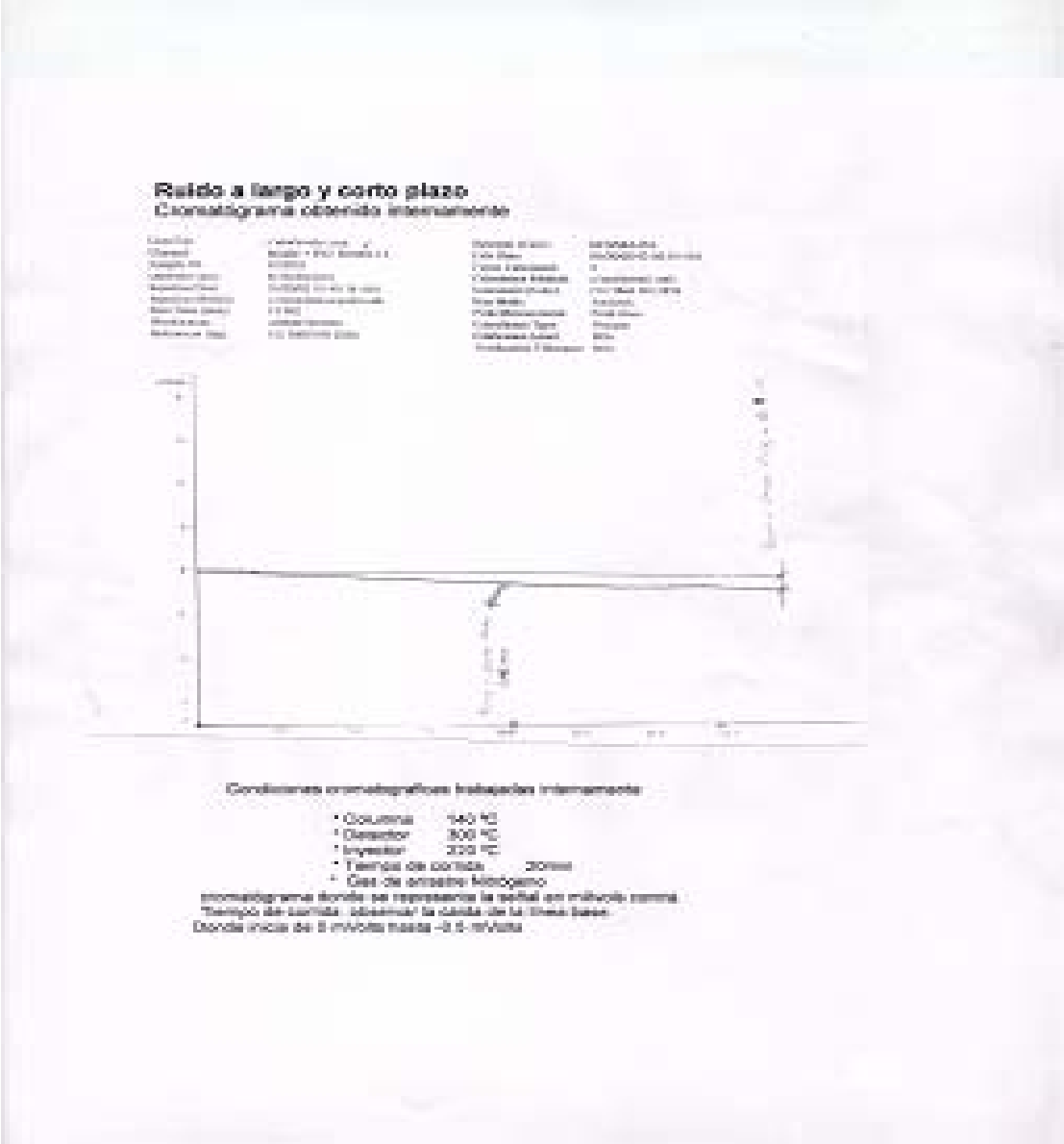
Condiciones cromatograficas trabajadas por varian

* Columna 140 ºC
* Detector 300 ºC
* Inyector 220 ºC
* Tiempo de corrida 20min
* Gas de arrastre Nitrógeno

cromatógrama donde se representa la señal en milivols contra.
Tiempo de corrida .observar la caída de la línea base.
Donde inicia de 0 mVolts hasta -1 mVolts.

Ruido a largo y corto plazo

Cromatógrama obtenido internamente



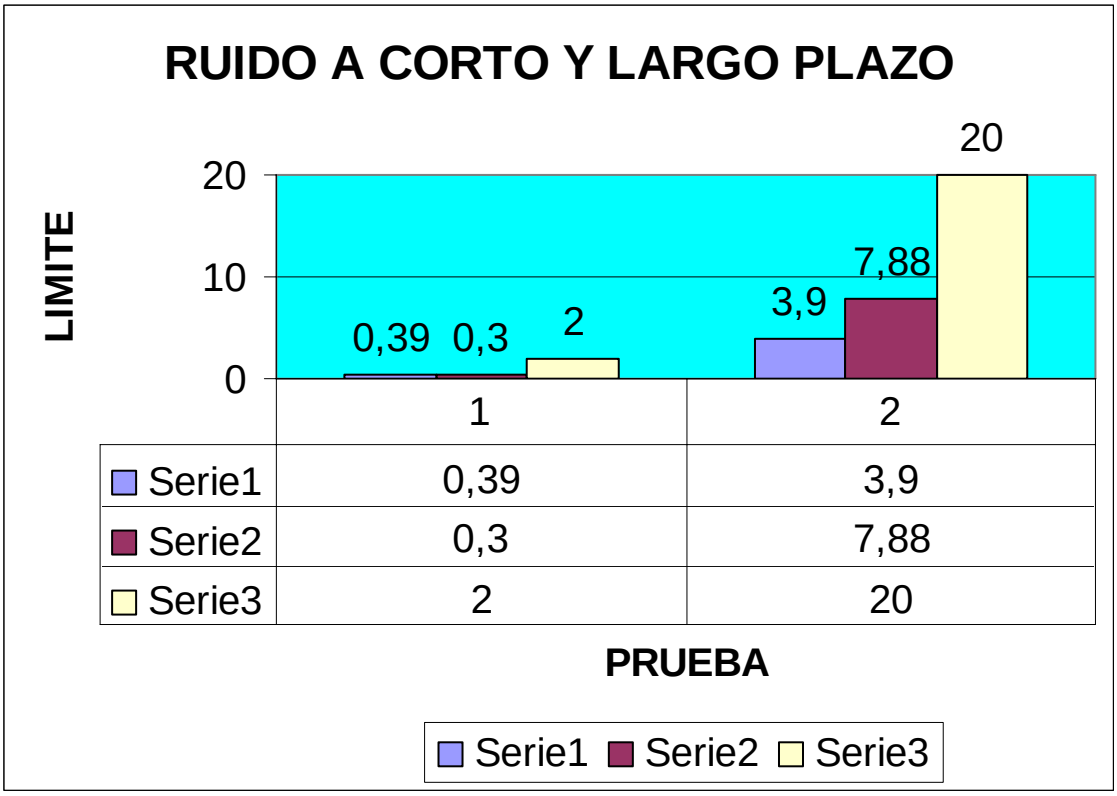
Condiciones cromatograficas trabajadas internamente

* Columna 140 ºC
* Detector 300 ºC
* Inyector 220 ºC
* Tiempo de corrida 20min
* Gas de arrastre Nitrógeno

cromatógrama donde se representa la señal en milivols contra.
Tiempo de corrida .observar la caída de la línea base.
Donde inicia de 0 mVolts hasta -0.5 mVolts

PRUEBAS DE CALIBRACION

GRAFICA 7



Serie 1 ruido a corto plazo serie 2 ruido a largo plazo serie 3 límites de aceptación

Resultados

Especificación	Proveedor	Resultados internos	Especificación
Ruido a corto plazo	0.30%	0.39%	< 2.0 %
Ruido a largo plazo	7.88%	3.9%	< 20 %

Análisis

En cromatografía de gases se determinan trazas de solventes en concentraciones de hasta ppm para estas determinaciones es necesario mantener una línea base estable.
Para lograr esto se determinan las pruebas de ruido a largo y corto plazo entre menor sea el resultado de las pruebas mayor estabilidad cromatografica.

Los resultados del proveedor y los resultados obtenidos internamente entran dentro de rango de aceptación menores a 2.0 y 20 % respectivamente si observamos los cromatógramas la línea que cruza el cromatógrama se ve limpia libre de picos tanto el cromatógrama de proveedor como el interno esto indica una limpieza del sistema cromatografico (columna, detector. inyector).

Con esto se puede cuantificar sin ningún problema trazas de analitos a concentraciones de ppm.

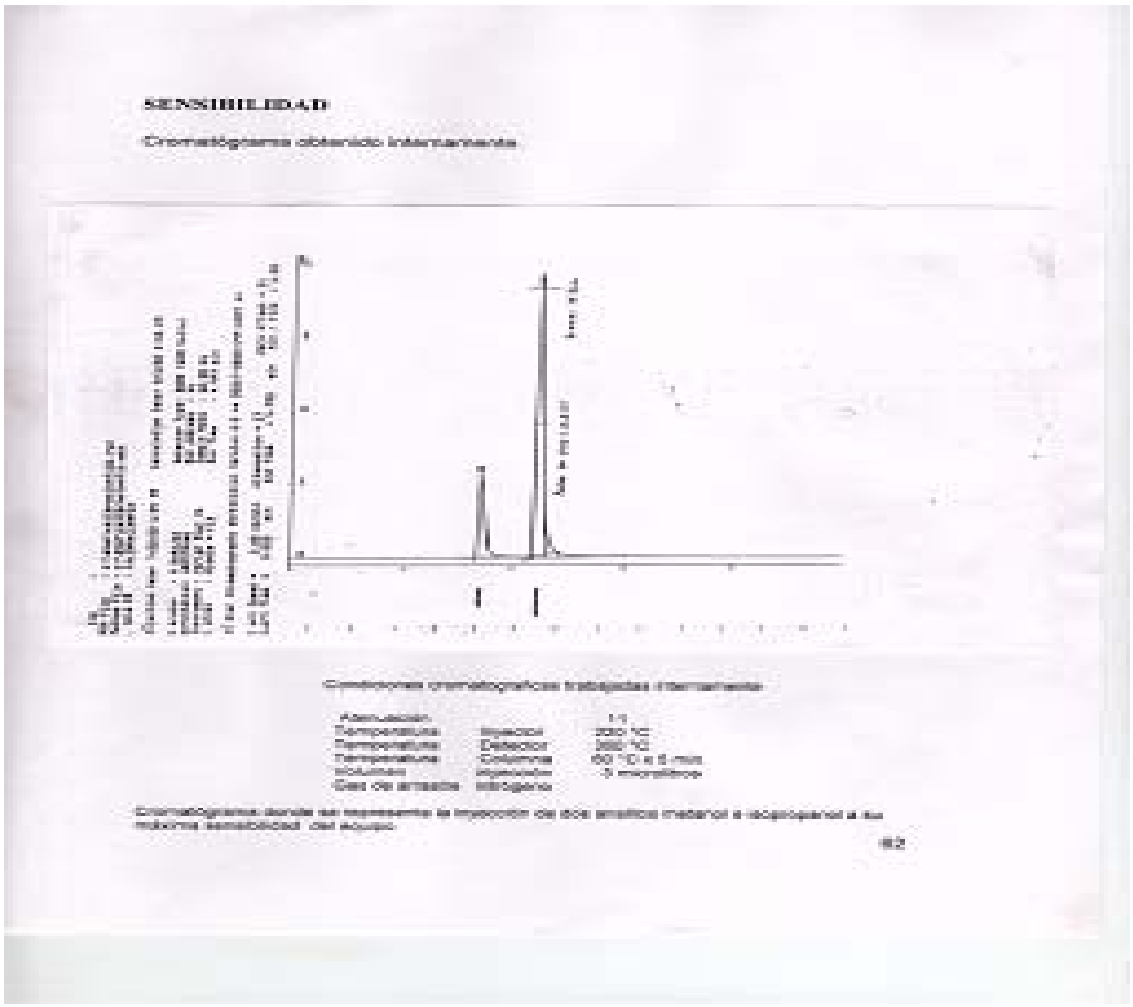
Estos resultados confirman la variación en las mediciones que se observaron en el ajuste del gas hidrogeno ver grafica 4.

Otro punto de importancia a observar es el comportamiento de la línea base, esta se mantiene constante lo que demuestra una respuesta adecuada del detector indicando que este no sufrió daño durante su mantenimiento. Ver cromatógramas anexados a las pruebas antes mencionadas.

Con estas pruebas dentro de especificación se procedió a realizar las pruebas restantes para la calibración del cromatógrafo de gases varian 3800.

9.7 SENSIBILIDAD

Cromatógrama obtenido por el proveedor varian .



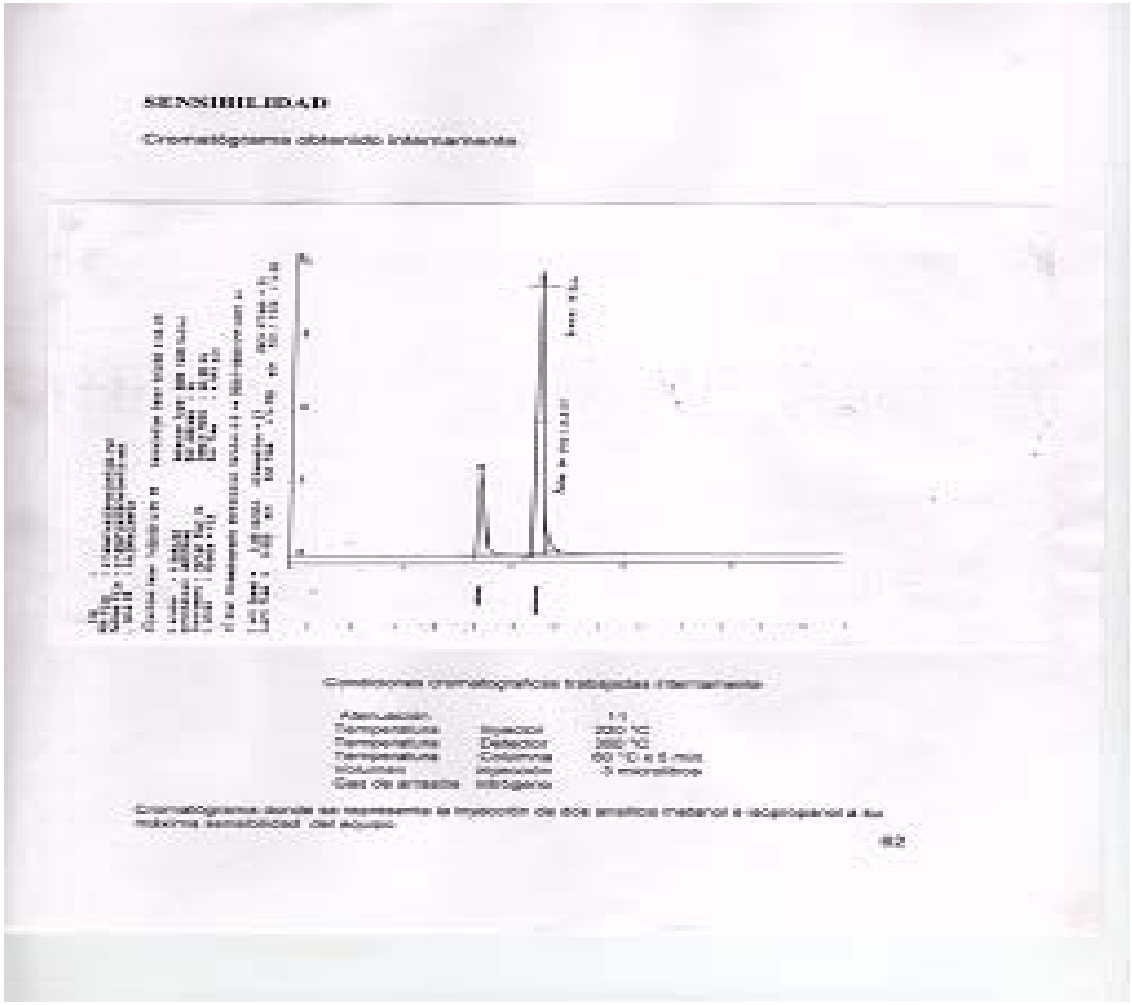
Condiciones cromatograficas trabajadas por varian

Atenuación		11
Temperatura	Inyector	220 °C
Temperatura	Detector	300 °C
Temperatura	Columna	60 °C x 5 min.
Volumen	inyección	3 microlitros
Gas de arrastre	Nitrógeno.	

Cromatógrama donde se representa la inyección de dos analitos metanol e isopropanol a su máxima sensibilidad del equipo.

SENSIBILIDAD

Cromatógrama obtenido internamente.



Condiciones cromatograficas trabajadas internamente

Atenuación		11
Temperatura	Inyector	220 °C
Temperatura	Detector	300 °C
Temperatura	Columna	60 °C x 5 min.
Volumen	inyección	3 microlitros
Gas de arrastre	Nitrógeno	

Cromatógrama donde se representa la inyección de dos analitos metanol e isopropanol a su máxima sensibilidad del equipo.

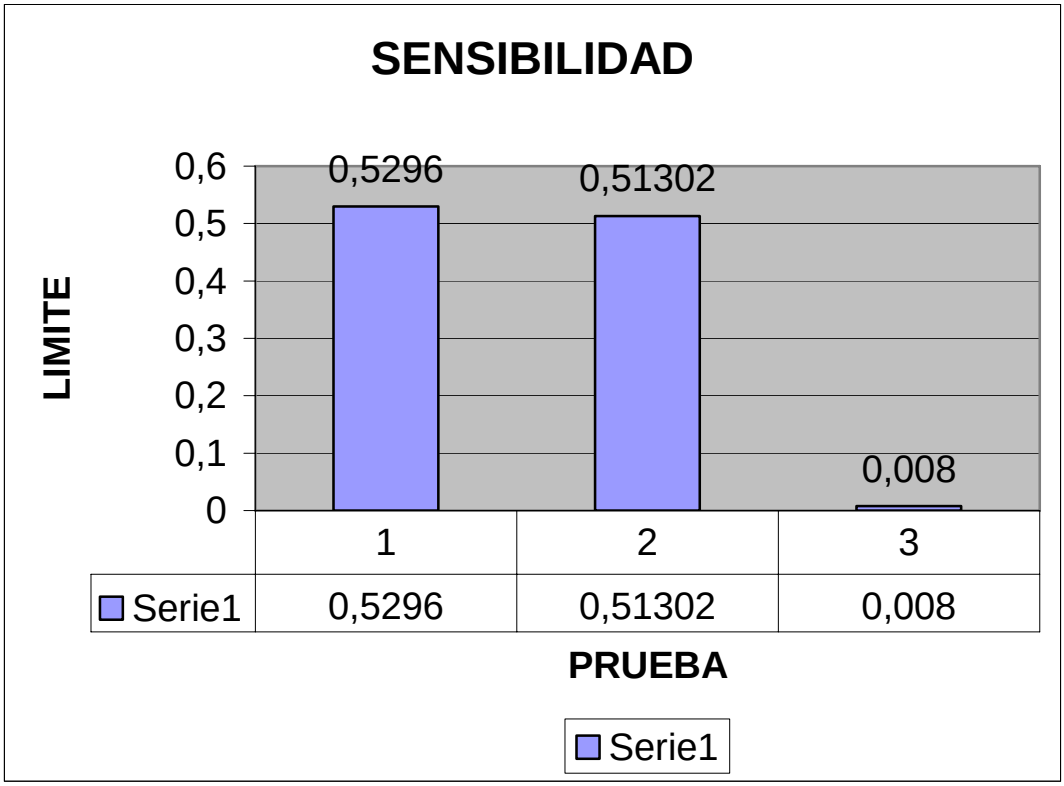
Análisis

Se observa en el cromatógrama proporcionado por el proveedor dos picos correspondientes a metanol con tiempos de retención de 1.654 e isopropanol con tiempo de retención de 1.824. Ambos simétricos, se toma como referencia el pico de isopropanol por ser el de mayor respuesta, a este se le determina la altura y el ancho de pico de la parte media para tener un pico más simétrico y evitar el error en la caída de la línea base.

En comparación con los resultados internos, los dos picos que se observa en los cromatógramas metanol tiempo de retencion1.706 e isopropanol tiempo de retención 2.236. Al llegar a la línea base se observa un coleo mayor en relación a los picos obtenidos del proveedor, como se menciono para evitar esto se toma la parte media del cromatógrama obteniendo un pico mas simétrico. Esto origino que los resultados entraran dentro del límite de aceptación sin ningún problema.

PRUEBAS DE CALIBRACION

GRAFICA 8



2 =resultados proveedor 1= resultado interno 3= especificación

Resultados

Especificación	Proveedor	Resultados internos	Especificación
Sensibilidad	0.51302	0.5296	➢ 0.008 Coul/gr

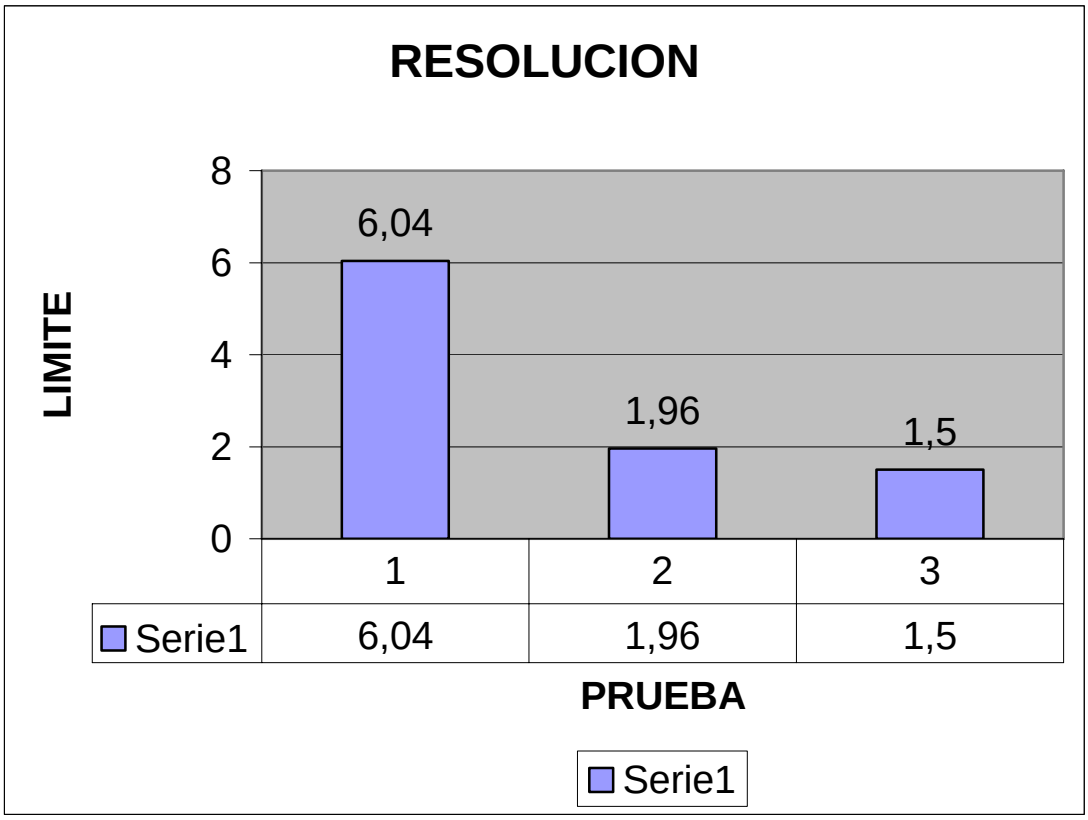
Análisis

En La prueba de sensibilidad se obtienen resultados mucho mayores que los indicados en los rangos de aceptación interno 0.51302 y proveedor 0.5292 limite >0.008 esto indica que el equipo no tiene ningún problema para detectar trazas de analitos ya que los valores de sensibilidad son mucho mayores que la referencia. Ver grafica 8.

PRUEBAS DE CALIBRACION

9.8 RESOLUCION

GRAFICA 9



2 =resultados proveedor 1= resultado interno 3= especificación

Condiciones cromatograficas del proveedor e internas.

Atenuación		11
Temperatura	Inyector	220°C
Temperatura	Detector	300°C
Temperatura	Columna	60°C x 5 min.
Volumen	inyección	3 microlitos
Gas de arrastre	Nitrógeno	

Resultados

Especificación	Proveedor	Resultados internos	Especificación
Resolución	1.96	6.04	> 1.5 %

Análisis

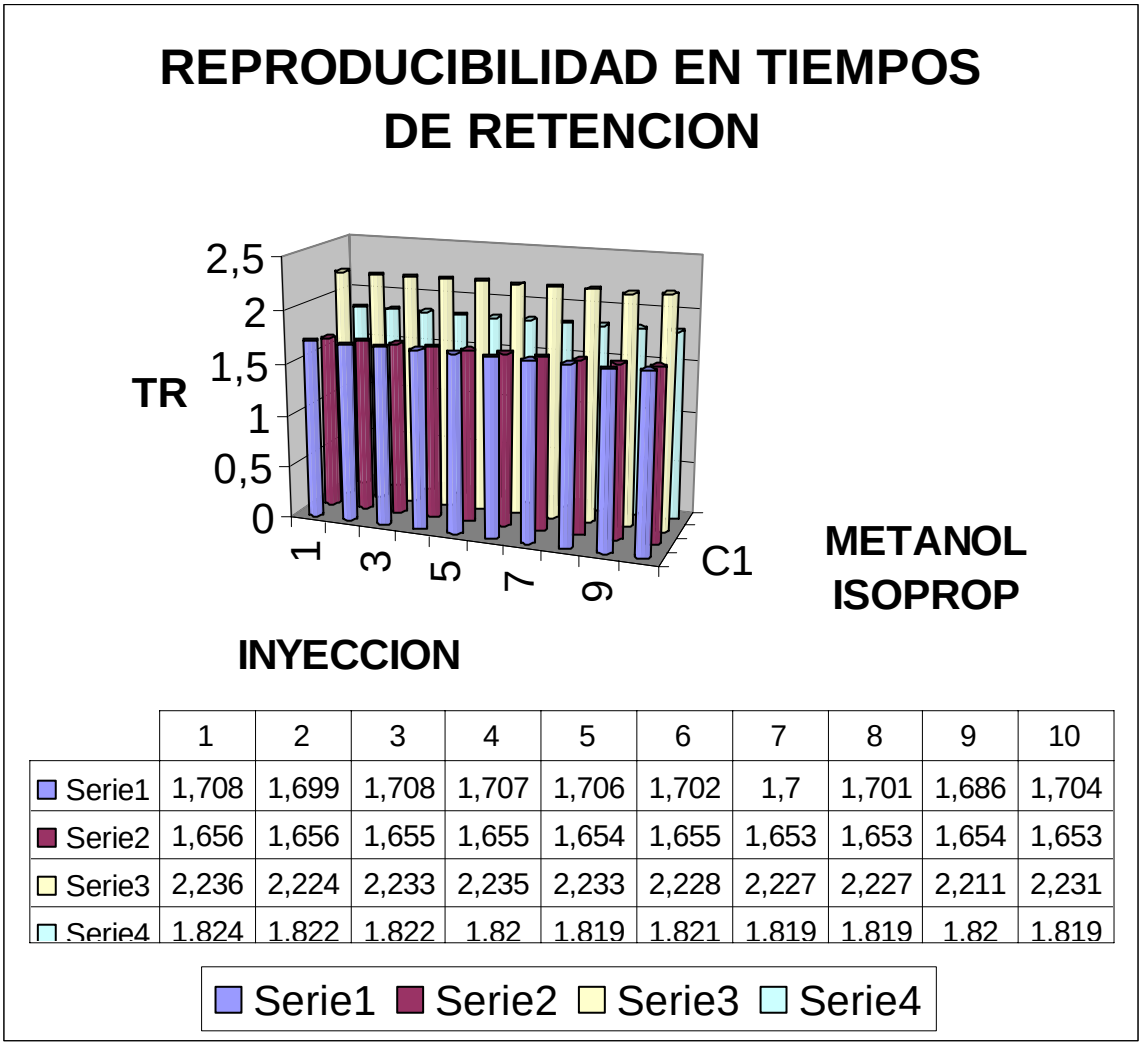
La resolución es uno de los parámetros mas importantes en la cromatografía entre mas resolución mejor será la separación de los analitos a cuantificar.

Analizando los resultados obtenidos ver tabla de resultados, la resolución obtenida internamente es mucho mayor a la del proveedor esta variación de resultados se debe a la columna empleada, esta es nueva no a sufrido desgaste y su longitud es de 30 mts.

Caso contrario a la columna que utilizo el proveedor esta tiene un desgaste por el constante uso y su longitud ya no representa los 30 mts . ver grafica 9.

PRUEBAS DE CALIBRACION
9.9 REPRODUCIBILIDAD EN TIEMPOS DE RETENCION

GRAFICA 10



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Serie1	1,708	1,699	1,708	1,707	1,706	1,702	1,7	1,701	1,686	1,704
Serie2	1,656	1,656	1,655	1,655	1,654	1,655	1,653	1,653	1,654	1,653
Serie3	2,236	2,224	2,233	2,235	2,233	2,228	2,227	2,227	2,211	2,231
Serie4	1,824	1,822	1,822	1,82	1,819	1,821	1,819	1,819	1,82	1,819

Serie 2 metanol proveedor serie 1 metanol interno
Serie 4 isopropanol proveedor serie 3 isopropanol interno

Condiciones cromatograficas del proveedor e internas.

Atenuación		11
Temperatura	Inyector	220°C
Temperatura	Detector	300°C
Temperatura	Columna	60°C x 5 min.
Volumen	inyección	3 microlitos
Gas de arrastre	Nitrógeno.	

Resultados:

Especificación	Proveedor	Resultados internos	Especificación
Repetibilidad por std/stddint	DER =1.43	0.77%	< 2.0 %

Análisis

La variación de los tiempos de retención del proveedor con respecto a los resultados internos, es debido a las características antes mencionadas de la columna. Los tiempos de retención del metanol son similares en ambos resultados, pero para el isopropanol existe una gran variación ver grafica 10. Esto no afecta la calibración del equipo debido a que los resultados obtenidos internamente entran dentro del rango de aceptación.

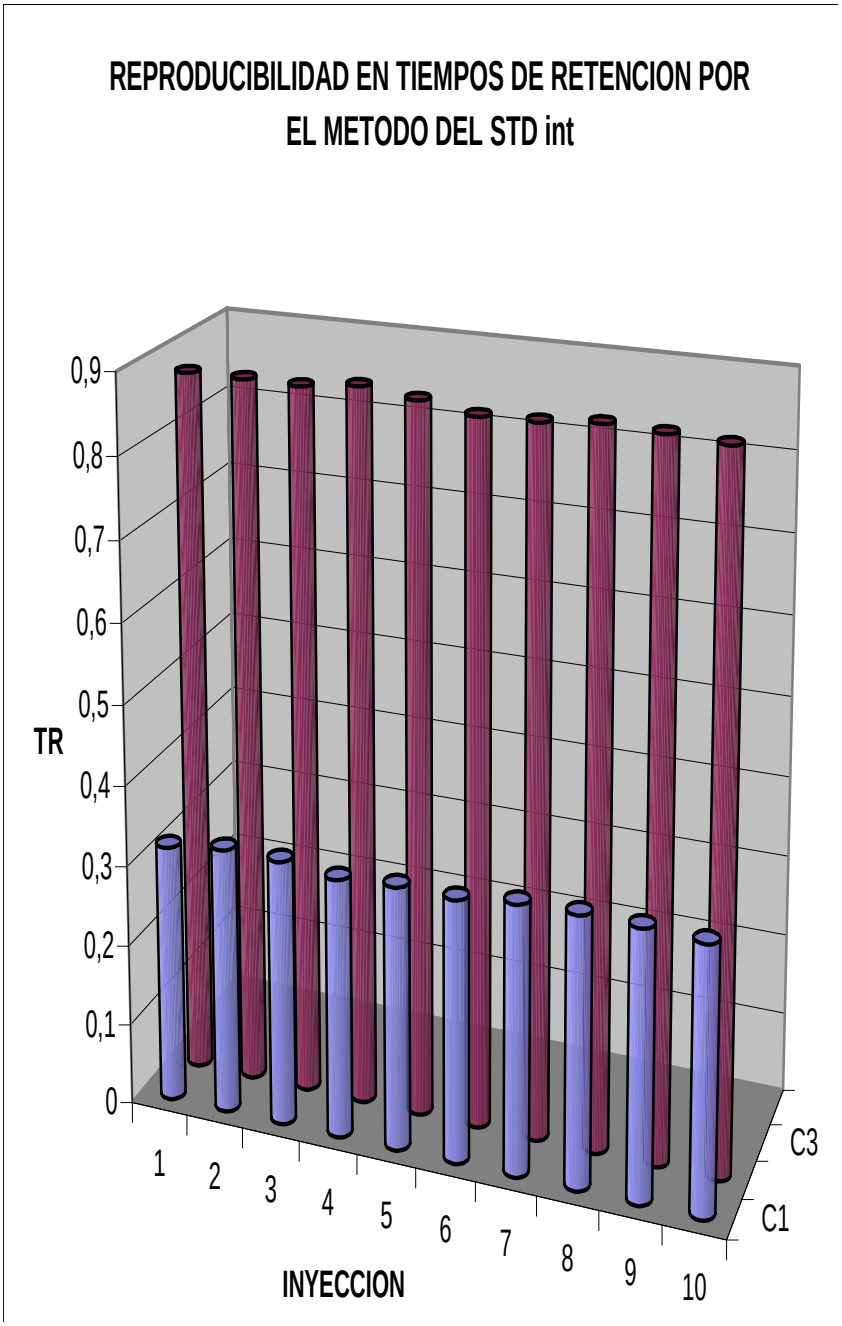
Se puede apreciar en la grafica el primer analito (metanol) tiene aproximadamente la misma altura que el del proveedor, lo que asegura la reproducibilidad del método proporcionado por el proveedor. Pero el analito correspondiente al isopropanol se aprecia de diferente tamaño, debido a que tiene un tiempo de retención diferente. Esto es por las características de la columna antes mencionadas a consecuencia se puede apreciar que la columna que se emplea en la calibración interna es mucho mejor que la que utilizo el proveedor.

Los resultados obtenidos en la calibración interna entran dentro de las especificaciones proporcionadas por el proveedor con esto el equipo esta listo para su uso.

PRUEBAS DE CALIBRACION

9.10 REPRODUCIBILIDAD POR EL METODO DEL ESTANDAR INTERNO

GRAFICA 11



Serie 1 proveedor serie 2 internos

Condiciones cromatograficas del proveedor.

Atenuación		11
Temperatura	Inyector	220°C
Temperatura	Detector	300°C
Temperatura	Columna	60°C x 5 min.
Volumen	inyección	3 microlitros
Gas de arrastre	Nitrógeno	

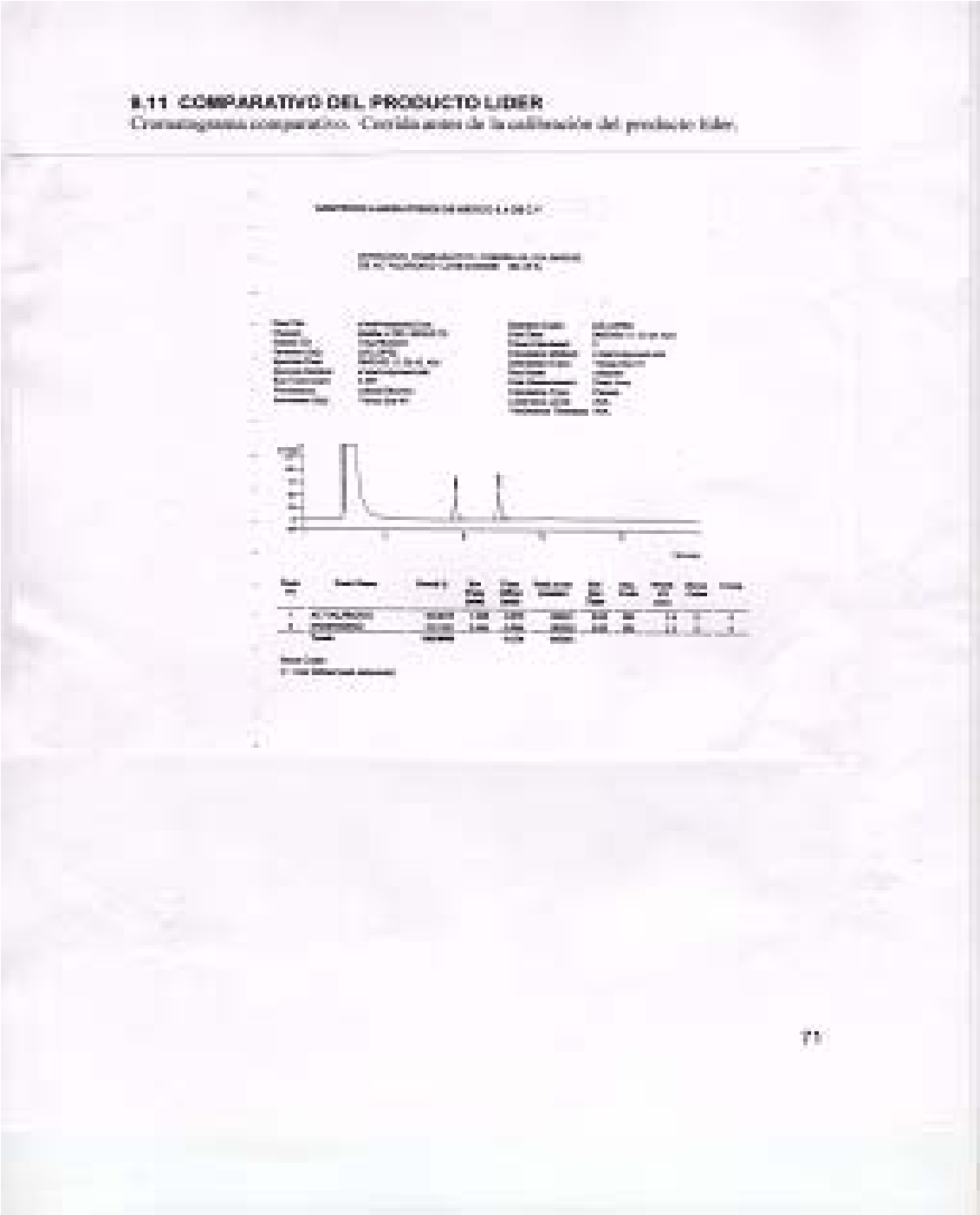
NOTA Las condiciones cromatograficas internas no se registran por seguridad de la información ya que son resultados de un producto líder.

Resultados

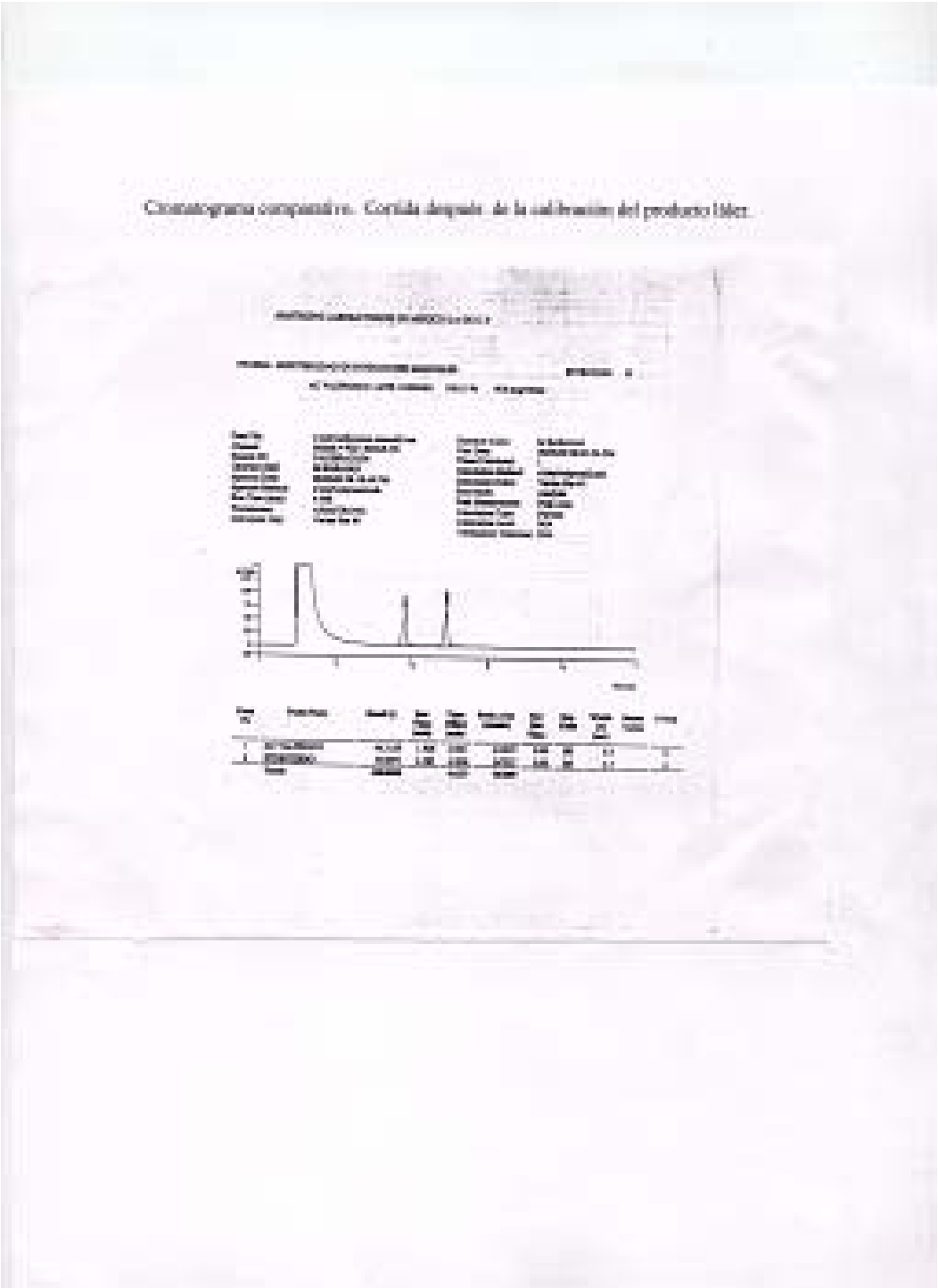
Especificación	Proveedor	Resultados internos	Especificación
Tiempo de retención	DER= 0.0709	DER=0.38	< 2.0 %

9.11 COMPARATIVO DEL PRODUCTO LIDER

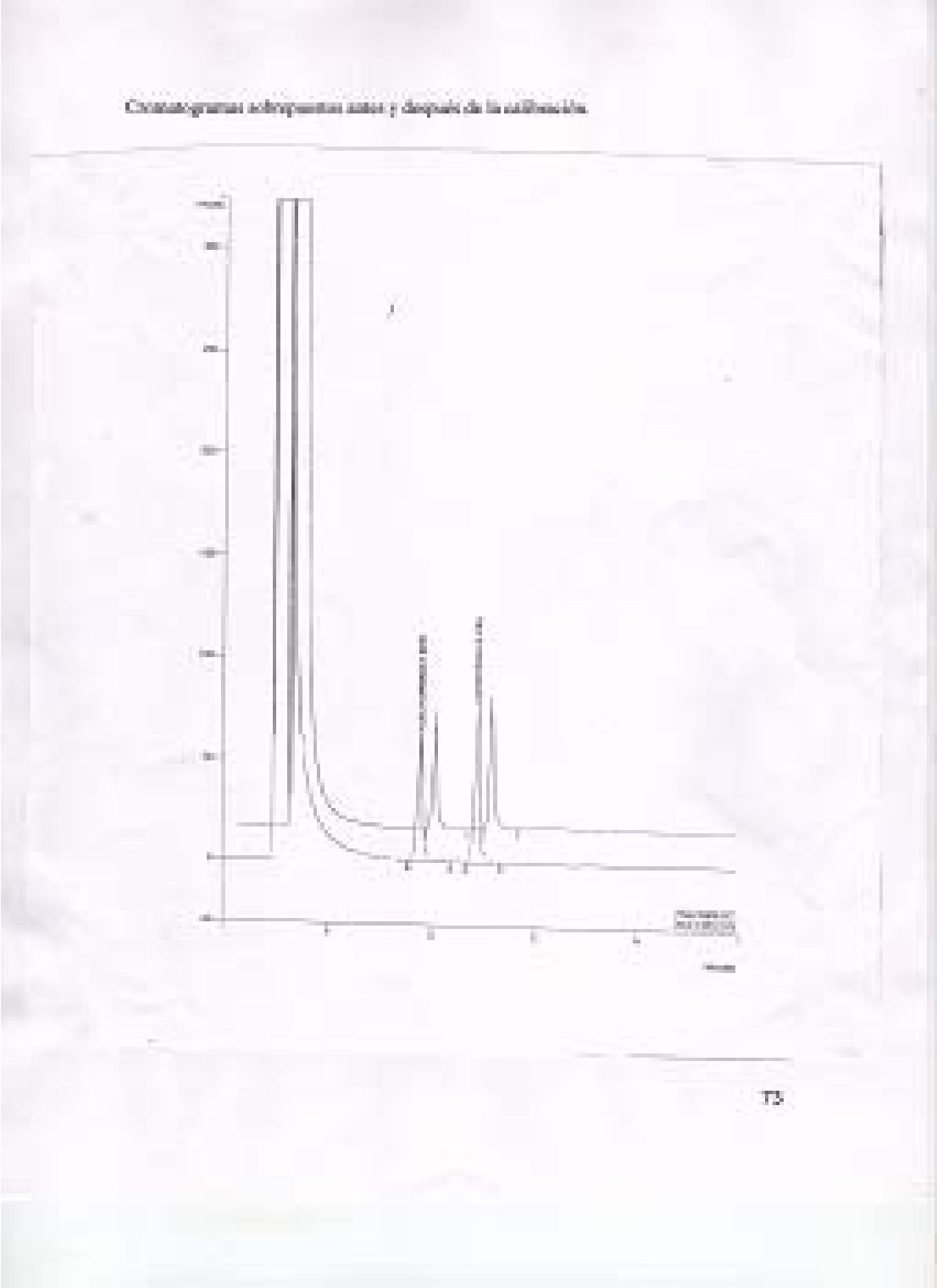
Cromatógrama comparativo. Corrida antes de la calibración del producto líder.



Cromatógrama comparativo. Corrida después de la calibración del producto líder.



Cromatógramas sobrepuestos antes y después de la calibración.



Análisis

Como se observa en la grafica 10. Los resultados obtenidos internamente y del proveedor son menores a una desviación relativa del 2 %, auque las inyecciones realizadas por el proveedor son de los analitos metanol e isopropanol y las internas de ácido valproico ambas cumplen y no tiene problemas en la reproducibilidad de resultados.

Una forma de verificar la calibración es realizando un comparativo con una muestra que anteriormente se analizaba y esperar se obtengan resultados reproducibles.

Se realizaron 10 inyecciones consecutivas de un producto (valproato de magnesio) cuyo historial es conocido.

Obteniéndose los siguientes resultados la media de las 10 inyecciones en sus tiempo de retención es de 1.9294 y sus relaciones de áreas std /std int es de 0.87089, si comparamos los resultados con una inyección del mismo producto inyectada por un químico diferente al que realizo la calibración. Se tiene un valor para el tiempo de retención 1.920 un área std/std int 0.87550 los resultados son muy próximos y reproducibles ver cromatógramas anexados a la prueba.

Con esto se confirma la aproximación y exactitud del cromatógrafo de gases debido a una calibración que cumple con los criterios de aceptación del proveedor.

10. CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos, un método analítico se puede hacer reproducible si se cuenta con material, reactivos, equipos y especificaciones de proveedores certificados.

El mantenimiento realizado al cromatógrafo de gases varian 3800 fue el adecuado ya que durante la calibración del equipo no se presento ningún problema.

La limpieza y montaje del detector se realizo adecuadamente, los solventes utilizados para su limpieza fueron los adecuados así como los cuidados para armar y desarmar sus componentes. Ninguna pieza se daño lo que origino una respuesta favorable en las pruebas de calibración.

La columna empleada fue la correcta su mantenimiento y limpieza ayudaron a obtener resultados reproducibles.

En base a los resultados de la resolución obtenidos se puede concluir que la columna empleada es mejor para la calibración que la empleada por el proveedor.

Las pruebas que se realizaron para la calibración (ruido a corto plazo y largo plazo, sensibilidad, reproducibilidad en los tiempos de retención y Resolución).
Fueron las necesarias para que el cromatógrafo de gases pueda reproducir con exactitud y precisión un resultado. Los resultados se mantuvieron dentro del rangos de aceptación con esto el cromatógrafo de gases varian 3800 cumple con los requisitos de calibración establecidos por el proveedor varian de México.

Las graficas dieron un panorama amplio del comportamiento de los resultados obtenidos internamente y del proveedor.

Como prueba adicional se realizo la reproducibilidad en tiempos de retención y áreas, con un analito que frecuentemente se analiza en el laboratorio y se tiene registrado sus tiempos de retención y áreas. Como los resultados fueron muy similares se concluye que el cromatógrafo de gases fue calibrado y su limpieza fue adecuada con esta prueba el comparativo de resultados resulta como guía para asegurar la reproducibilidad del equipo.

Como sugerencia es validar del método y respaldar con un análisis estadístico los parámetros y resultados obtenidos.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Manual de instalación y mantenimiento (Varían 3800) 1998

2. Manual de operaciones (Varían 3800) 1998

3. Jane, V, Leland, gas chromatography – olfactometria.
American chemical society Washington DC pag 76,78,80 (2001).

4. Robert, l ,Grob . Modern practice of gas chromatography
a wyley – interscience , publication, pag 381,382,225,265, 466 al 503.

5. Frank, A Settle. Hand book of instrumental techniques
for analytical**,** chemistry prentice hall, pag 125 al 146, 625, 616 (1997).

6. Takayaki, Shibamoto. Chromatography analysis of environmental and food
toxicants Marcel Decker pag, 196 al 256 (1998).

7. Raymond, P .W Scott , chromatography theory Marcel Decker new York
pag, 1 al 25, 42 al 65, 165 al 179, (2002).

8. Dennis, J. Runse **.** Maintaining and troubleshooting
edited john Wiley y son, pag 6 al12, 115 al 21 (1981).

9. Ray, E, Clement Gas chromatography vol lll editer
awiley - intercience, publication, pag 1 al 45, 181 al 195 (1990**).**

10. Walter, Jennings , Eric, Hittelfehldt . Philip, Stremple
Analytical gas chromatography, second edition sandiego boston London nee
York , pag 1 al 28 ,30 al 35 114 a 136,250 (1997).

11. Harold , F. Walton, análisis químico e instrumental **-** Moderno**,** boulder
colorado, editorial reverte s.a, Pag, 270 a 277, 348 a 370.

12. D.r, Ckwood and B,d Hames ,Gas chromatography a Practical
edited by P , Jbauch pag 1 al 45 71 al 78 98 al 120 (1993).

13. Joseph Sherma , Densitometry in thin layer Chromatography practice and
applications. Edited Joseph c touchtone university of- Penssylvania, Awiley
publication pag 48 al 60 (1979).

14. Gary D, Christian. Instrumental analysis university of Washington, allyn and bacon Inc pag 728al 745 (1986).

15. John Wiley y son chromatography concepts and contrasts, a Wiley – interscience publication Madison New yérsey, pag 258 a 260 (1988).

16. Productos para análisis y purificación por Cromatografía , sigma – aldrich química , pag 36,57,70,81,(2001).

17. M en C Edgar Villaruel Rivas. Chomatography research Supplies leacsa s.a de c.v pag 3al37.56al61 (2002).

18. Chromatography products guide restek international pag 1al 126 (1999).

19. M en C Edgar Villaruel Rivas. Precisión Fluid measurig products ,Leacsa SA DE C .V .Pag 45 AL 60 (2000).

20. W R . Supina la columna de empaque en la cromatografia de gases supelco inc 1974 .

21. Littlewood cromatografía de gases segunda edición. Academia press pag 1al 89 (1970).

22. Robert L Grob. Chromatographic analysis of the environ Ment , Marcel Dekker Inc. 1a. ED. New York, pag 105 al 165 (1975).

23. Henry S. kroman, ph. D. And Sheldon R. Bender M.D. Theory And Application of gas chromatography In. Industry. And Medicine. Grune Stratton, 1a ED.New York, pag 23, 25, 78, (1968).

24. Gunter, Zweig, ph. D. Handbook of Chromatography Vol.1 y 2, crc Press, 1a.ed. pag 23 al 59 U.S.A. (1972).

25. Karl , Blaw ,Graham. King, Handbook of Derivatives For Chromatography, Heyden,1a. ed London pag 85 al 89 ,103 al 134 (1977) .

26. R. Alan, Jones,An Introduction to gas liquid Chromatography. Academic Press, 1a ed.London and New York pag 23,24,56,68 (1970).

27. H.M Mc Nair E.J. Bonelli,Basic gas Chromatography, Varian Aerograph, 1a. ed. U.S.A., 1965.