



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE INGENIERÍA

**MÉTODOS DE MEDICIÓN DE HEMOGLOBINA GLUCOSILADA. EL
ESTADO DEL ARTE.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERO ELÉCTRICO ELECTRÓNICO**

P R E S E N T A :

VEYTIA PÉREZ MARCO ANTONIO

DIRECTOR DE TESIS:

ING. FRANCISCO RODRÍGUEZ RAMÍREZ.



MÉXICO, D.F.

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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;

- MARCO ANTONIO VEYTIA VIDAÑA.
- ROSAURA PÉREZ CABALLERO.

POR SU AMOR, TRABAJO Y SACRIFICIOS EN TODOS. ESTOS AÑOS, GRACIAS A USTEDES HE LOGRADO LLEGAR HASTA AQUÍ Y CONVERTIRME EN LO QUE SOY.

A MIS HERMANOS;

- NORMA PATRICIA VEYTIA PÉREZ.
- MARIO FRANCISCO VEYTIA PÉREZ.

POR EL APOYO INCONDICIONAL, LA COMPAÑÍA Y EL CARIÑO QUE ME BRINDAN DIARIAMENTE.

A MI ESPOSA;

- ARELIA EDITH AVILA CARRASCO.

POR TU APOYO, COMPRESIÓN Y AMOR QUE ME PERMITE SENTIR PODER LOGRAR LO QUE ME PROPONGA. GRACIAS POR ESCUCHARME Y POR TUS CONSEJOS. GRACIAS POR SER PARTE DE MI VIDA; ERES LO MEJOR QUE ME HA PASADO. ¡TE AMO! FLAQUITA.

A mis amigos (LA BANDA BORRACHA Y LA COCO-RON);

- ANA, ARTURO, NOÉ, FABIOLA, GERARDO, RAFAEL, FRANCISO, DANIEL, JESSICA, RAUL, OSCAR, ISRAEL, MAURICIO, VICTOR, HUGO.

QUE ESTUVIERON CONMIGO Y COMPARTIMOS TANTAS AVENTURAS, EXPERIENCIAS, DESVELADAS Y PARRANDAS. GRACIAS A CADA UNO POR HACER QUE MI ESTANCIA EN EL FÍ FUERA SUPER DIVERTIDA.

A MIS PROFESORES;

QUE PARTICIPARON EN MI DESARROLLO PROFESIONAL DURANTE MI CARRERA, SIN SU AYUDA Y CONOCIMIENTOS NO ESTARÍA EN DONDE ME ENCUENTRO AHORA.

AL ING. FRANCISCO RODRÍGUEZ RAMÍREZ.

POR SU AYUDA Y ASESORÍA QUE HIZO POSIBLE LA CULMINACIÓN DE ESTE TRABAJO.

AL DR. RAFAEL MARTÍNEZ LUÑO.

POR SU APOYO, ENSEÑANZAS, Y POR HABER PERMITIDO REALIZARME PROFESIONALMENTE E INTEGRARME A SU GRUPO DE TRABAJO.

INDICE

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES | 1 |
| 1.1 Introducción..... | 1 |
| 1.2 Antecedentes..... | 2 |
| 2. HEMOGLOBINA GLICOSILADA | 3 |
| 2.1 Introducción..... | 3 |
| 2.2 Denominación..... | 4 |
| 2.3 Valores de referencia de hemoglobina glicosilada (HbA1c)..... | 4 |
| 2.4 Cronología de los métodos..... | 4 |
| 2.4.1 Electroforesis..... | 5 |
| 2.4.2 Cromatografía..... | 6 |
| 2.5 Principios de operación de los instrumentos utilizados..... | 8 |
| 2.5.1 Electroforésis..... | 8 |
| 2.5.2 Cromatografía en Columna..... | 11 |
| 2.5.3 Cromatografía intercambio iónico..... | 12 |
| 2.5.4 Cromatografía de Filtración en Gel..... | 16 |
| 2.5.5 Cromatografía de afinidad al Boronato..... | 17 |
| 2.5.6 Cromatografía Líquida de alta presión (HPLC)..... | 19 |
| 3. INSTRUMENTACIÓN DE LA CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA PRESIÓN (HPLC) | 23 |
| 3.1 Introducción..... | 23 |
| 3.2 Componentes del sistema HPLC..... | 23 |
| 3.2.1 Sistema dispensador de solvente..... | 24 |
| 3.2.2 Bombas..... | 24 |
| 3.2.2.1 Clasificación de acuerdo al intervalo de flujo de la bomba..... | 25 |
| 3.2.2.2 Clasificación de las bombas de acuerdo a los materiales de construcción..... | 25 |
| 3.2.2.3 Clasificación de las bombas de acuerdo al mecanismo de desplazamiento del eluyente..... | 26 |
| a. Bombas tipo jeringa..... | 27 |

| | |
|--|-----------|
| b. Bombas con pistón oscilante..... | 27 |
| 3.2.2.4 Minimización de las pulsaciones de la bomba..... | 28 |
| a. Diseño de la leva..... | 28 |
| b. Reguladores de pulso..... | 30 |
| 3.2.3 Inyección de la muestra..... | 30 |
| 3.2.4 Columnas..... | 32 |
| 3.2.4.1 Fase estacionaria..... | 33 |
| 3.2.4.2 Tamaño del poro..... | 33 |
| 3.2.4.3 Tamaño de las partículas..... | 34 |
| 3.2.4.4 Diámetro interno de la columna..... | 34 |
| 3.2.4.5 Longitud de la columna..... | 35 |
| 3.2.4.6 Material de construcción de las columnas..... | 35 |
| 3.2.5 Detector..... | 35 |
| 3.2.5.1 Propiedades de los detectores..... | 36 |
| 4. SISTEMA DE ADQUISICIÓN DE DATOS..... | 38 |
| 4.1 Introducción..... | 38 |
| 4.2 Identificación de los picos..... | 38 |
| 4.2.1 Retención de datos..... | 39 |
| 4.2.2 Adición estándar o spiking..... | 39 |
| 4.2.3 Estándares internos..... | 40 |
| 4.2.4 Desplazamiento del pico enzimático..... | 40 |
| 4.2.5 Uso de bibliotecas de espectrometría de masas y ultravioleta (UV)..... | 41 |
| 4.3 Cuantificación..... | 41 |
| 4.3.1 Integración..... | 42 |
| 4.3.1.1 Métodos manuales..... | 43 |
| a. Picos máximos..... | 43 |
| b. Área del pico..... | 44 |
| 4.3.1.2 Dispositivos Electrónicos..... | 48 |
| 4.4 Cálculos..... | 50 |
| 4.4.1 Normalización..... | 50 |
| 4.4.2 Método de estándar externo..... | 51 |
| 4.4.3 Método de estándar interno..... | 53 |

| | |
|--|-----------|
| 4.4.4 Método de adición de estándares..... | 54 |
| 4.5 Manejo de datos estadísticos..... | 55 |
| 5. MANTENIMIENTO A EQUIPOS HPLC..... | 60 |
| 5.1 Introducción..... | 60 |
| 5.2 Cromatografía líquida de alta presión (HPLC)..... | 61 |
| 5.2.1 Bomba..... | 61 |
| 5.2.2 Columnas..... | 62 |
| 5.2.3 Detectores..... | 63 |
| 5.2.4 Fase móvil..... | 63 |
| 5.3 Rendimiento y calibración de los instrumentos..... | 64 |
| 5.3.1 Columnas..... | 64 |
| 5.3.2 Detectores..... | 65 |
| 6. CONCLUSIONES..... | 66 |
| Glosario..... | 68 |
| Bibliografía..... | 70 |

1.1. Introducción.

La Hemoglobina Glicosilada (HbA1c), fue descubierta por Allen en 1958, pero fue Huisman en 1966 quien observó que había unas subfracciones elevadas en las personas diabéticas y en 1975 Tattersal descubrió la correlación entre la HbA1c y las variaciones de los niveles de glucemia.

Sabemos que tanto el pronóstico como la calidad de vida de las personas con diabetes van a depender en gran parte de las complicaciones crónicas que se asocian a esta enfermedad metabólica. Las buenas noticias del Diabetes Control and Complications Trial (DCCT) y otros estudios es que el curso y la severidad de estas complicaciones pueden mejorar si se logra un buen control metabólico.

La hemoglobina glicosilada es una herramienta fundamental muy eficaz para valorar el grado de control.

En razón de que en 1998 la diabetes fue la séptima causa de morbilidad, con 336 mil 967 casos diagnosticados en México (98 por ciento con diabetes tipo 2 y 2 por ciento con diabetes tipo I), para 1999 se notificaron cerca de 239 mil casos en control y alrededor de 3 mil 500 casos acumulados únicamente en la Secretaría de Salud, así mismo de que la diabetes es una de las principales causas de demanda de consulta en el primer nivel de atención; por estas razones la Secretaría de Salud promovió con el consenso interinstitucional la actualización de la Norma Oficial Mexicana NOM-015-55A2-1994, para la Prevención, Tratamiento y Control de la Diabetes, que fue publicada en el Diario Oficial de la Federación el 7 de abril del año 2001, con el propósito de asegurar la aplicación de los procedimientos y detección, diagnóstico y control del enfermo diabético con base en los criterios científicos y tecnológicos más avanzados y factibles en el país. Junto con la norma oficial se ha buscado reforzar las acciones de detección, diagnóstico y tratamiento, se han iniciado esfuerzos para profundizar en el conocimiento de la diabetes a fin de identificar

con precisión las complicaciones que genera, así como los principales motivos de internamiento de la población afectada.

Por otra parte, la medición de hemoglobina glicosilada se ha establecido como una prueba de rutina de reconocido valor en el control del paciente diabético; por lo que existen una gran cantidad de métodos y técnicas basadas en diferentes principios donde es posible destacar como los más utilizados: la afinidad al boronató, la separación por cromatografía de intercambio iónico y los inmunoensayos. Una serie de estudios han abordado el tema buscando la relación existente entre la presencia de hemoglobinas variantes y su influencia sobre los diferentes métodos para la determinación de la hemoglobina glicosilada.

1.2. Antecedentes.

El objetivo principal en el tratamiento de la diabetes, consiste, en lograr un riguroso control glucémico. Cuando ésta alteración no se controla, con el tiempo, constituye una de las principales responsables de las complicaciones más graves que sufren las personas con diabetes. En este sentido, los niveles de hemoglobina glicosilada A1c (HbA1c) representa hasta el momento la mejor prueba de laboratorio que determina si la diabetes se tiene bajo control. Mantener la HbA1c, por debajo del 7%, representa actualmente, uno de los principales objetivos de lograr y sostener por toda persona con diabetes.

2. HEMOGLOBINA GLICOSILADA.

2.1. INTRODUCCIÓN.

En este capítulo se presenta un resumen básico sobre la hemoglobina Glicosilada sobre la cual se basa la técnica analítica objeto de este trabajo.

La hemoglobina es una proteína que se encuentra en los glóbulos rojos de la sangre (hematíes) y sirve para proveer de oxígeno al resto de nuestras células y tejidos. Esta proteína se une a la glucosa circulante por el torrente sanguíneo.

El porcentaje de proteína unida a glucosa es lo que se denomina hemoglobina glicosilada (HbA1). Esto sucede en las personas sanas y con alguna alteración.

Cuanto mayor es la cantidad de glucosa en sangre más se une a las proteínas y su porcentaje de unión indica cual ha sido la cantidad media de glucosa circulante durante el tiempo de vida de la proteína en cuestión; es decir el análisis de la hemoglobina glicosilada muestra entonces el nivel promedio de azúcar (glucosa) en la sangre en las últimas seis a ocho semanas.

La hemoglobina glicosilada tiene varias fracciones (HbA1a, HbA1b, y Hb1Ac) y, de ellas, la más estable, la que tiene unión mas específica con la glucosa, es la fracción HbA1c.

La HbA1c no se ve alterada por cambios agudos o recientes de las glucemias¹ y depende de la concentración de glucosa del entorno y de la vida media de los glóbulos rojos en el organismo. Como la vida media de estos hematíes² es aproximadamente de 90-120 días, es importante conocer como están “marcados” por la glucosa que circula junto con ellos lo cual indica como ha sido el control metabólico durante ese periodo de tiempo.

¹ La glucemia es la medida de concentración de glucosa en el plasma sanguíneo.

² Los hematíes (glóbulos rojos) son las células sanguíneas que contienen en su interior la hemoglobina.

2.2. DENOMINACIÓN

- Hemoglobina A1,
- Glucohemoglobina,
- Hemoglobina glucosilada,
- Índice de control de la diabetes,
- HbA1c.

2.3. VALORES DE REFERENCIA DE HEMOGLOBINA GLICOSILADA (HbA1c)

Los siguientes valores discriminantes han sido establecidos por el Diabetes Control and Complications Trial Research Group (DCCT) y han sido aceptados en varios países para la población no diabética y para la evaluación del grado de control de la glucosa en sangre en pacientes diabéticos.

| Grado de control | International Federation of Clinical Chemistry (IFCC) | DCCT / NGSP |
|-----------------------------------|---|-------------|
| Adultos normales | 2.0 – 4.2 | 4.0 – 6.0 |
| Diabéticos bien controlados | 4.2 – 4.8 | 6.0 – 6.5 |
| Diabéticos con control suficiente | 4.8 – 6.4 | 6.5 – 8.0 |
| Diabéticos mal controlados | > 6.4 | > 8.0 |

En estos valores puede haber ciertas diferencias por la técnica o por criterios de normalidad propios de laboratorios específicos, a veces en el rango de valores y otras veces por las unidades a las que se hace referencia.

2.4. CRONOLOGÍA DE LOS MÉTODOS.

La hemoglobina A1c (debe descartarse la fase lábil³) es el patrón universal de evaluación del control de la diabetes.

³ Fase lábil proteínas que no son durables.

La prueba se determina en sangre y tiene la ventaja de que la muestra se puede extraer en cualquier momento, ya que su resultado no es afectado por variaciones a corto plazo (Por ejemplo: ingesta de alimento, ejercicio, estrés).

La determinación de Hemoglobina Glicosilada en los pacientes con Diabetes Mellitus se ha transformado en un examen que ofrece información relevante del nivel glicémico mantenido por el paciente durante las 8 semanas previas al control médico.

Existen varios métodos para su determinación, a manera informativa se encuentran, la técnica inmunoquímica, cromatografía, electroforésis y otras.

Las técnicas inmunoquímicas se usaban hace mucho tiempo y no conlleva ningún procedimiento electrónico, sino mas bien, es una técnica manual la cual consiste en la unión de la hemoglobina con la glucosa en un proceso no enzimático irreversible, dependiente de las concentraciones crónicas de glucosa. Dado que la vida media de los glóbulos rojos es de, aproximadamente, 120 días, permite evaluar el grado de control glucémico de un período previo largo.

Actualmente, la hemoglobina glicosilada es medida generalmente por 4 métodos: electroforésis, cromatografía de intercambio iónico, inmunoensayo, cromatografía de afinidad al boronato y la cromatografía líquida de alta presión (HPLC) que representa el método de mayor precisión.

2.4.1 Electroforésis

La electroforésis, es otro método usado para la determinación de Hb glicosilada que se basa en la diferencia de carga de las moléculas para su separación.

La hemoglobina A representa 95-98% del hemolizado del adulto y de éste el componente A1 representa, aproximadamente el 9%.

La hemoglobina glicosilada A1c es el componente mayoritario de la hemoglobina A1.

La hemoglobina A1 está compuesta por tres fracciones que pueden ser separadas por electroforesis en A1a, A1b y A1c.

La electroforesis es un método analítico – semipreparativo, en el que se separan biomoléculas, en dependencia entre otros factores de su carga y bajo la acción de un campo eléctrico, fue empleado por primera vez por Tiselius en el año 1937 (Premio Nobel de Química en 1946).

Itano sugiere en 1948, un método mediante el cual se podía realizar la determinación de hemoglobina: la electroforesis.

Raymond y Weintraub en 1959 emplearon como soporte para la electroforesis un gel de poliacrilamida (PAGE), posteriormente el método fue perfeccionado por varios investigadores como Davis y Ornstein.

Su importancia vino a incrementarse cuando en los años cincuenta E. L. Durrum y Arne W.K. Tiselius, impulsaron la electroforesis de zona, nombre que se asignó a la separación de materiales en un campo eléctrico en presencia de algún tipo de soporte; aunque este término se limitó originalmente al análisis de coloides y partículas submicroscópicas, se ha convertido en estos últimos años en una metodología aplicada a sustancias de bajo peso molecular.

La popularidad de ésta creció rápidamente y se logró un aumento de la resolución. El dodecil sulfato de sodio (SDS) se introduce en esta técnica en 1970, y ya en 1972 se emplean agentes reductores y SDS en la determinación del peso molecular de proteínas en lo que se denominó electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE).

2.4.2 Cromatografía.

En 1848 Way y Thompson reconocieron el fenómeno de intercambio iónico en sólidos. Tiempo después en 1906 Tswett inventó la cromatografía en columna con el uso de solventes puros para desarrollar un cromatograma, usó

adsorbentes suaves para resolver una mezcla de pigmentos. En 1935 Holmes y Adams sintetizó resinas orgánicas para intercambio iónico.

El botánico ruso Mikhail Tswett (Mikhail Semenovich Tswett, 1872-1919) empleó por primera vez en 1906 el término cromatografía⁴, estableció las ventajas de la técnica de cromatografía de afinidad y definió los procedimientos experimentales básicos para esta técnica, se considera que es el Padre de la Cromatografía.

A comienzos del año 1903, Mikhail Tswett usó columnas de adsorción de líquidos para separar pigmentos vegetales (por ejemplo, clorofilas). Las disoluciones se hacían pasar a través de una columna de vidrio rellena de carbonato de calcio, que finamente dividido da un material poroso que interacciona de forma diferente con los componentes de la mezcla, de forma que éstos se separaban en distintas bandas a lo largo de la columna.

En 1938 Reichstein introdujo la cromatografía líquida o fluida, así extendió las aplicaciones de la cromatografía a sustancias sin color. En 1939 Brown fue el primero que usó la cromatografía circular en papel. Poco después en 1941 Martin y Synge introdujo la cromatografía por partición en columna.

En 1944 Consden, Gordon, y Martin fueron los primeros que describieron la cromatografía de partición en papel y en 1947 Boyd, Tompkins, Spedding, Rieman, y otros describieron la cromatografía de intercambio iónico aplicada a varios problemas analíticos.

En 1948 M. Lederer y Linstead utilizaron la cromatografía en papel aplicada a compuestos inorgánicos. En 1956 Sober y Peterson prepararon las primeras celulosas para intercambio iónico.

En 1964 J. C. Moore desarrolló la cromatografía de permeación en gel.

⁴ cromatografía (del griego chroma y graphein que significan respectivamente "color" y "escribir")

2.5. PRINCIPIOS DE OPERACIÓN DE LOS MÉTODOS UTILIZADOS.

2.5.1 *Electroforésis*

Cuando una mezcla de moléculas ionizadas y con carga neta son colocadas en un campo eléctrico, estas experimentan una fuerza de atracción hacia el polo que posee carga opuesta, dejando transcurrir cierto tiempo las moléculas cargadas positivamente se desplazarán hacia el cátodo (el polo negativo) y aquellas cargadas negativamente se desplazarán hacia el ánodo (el polo positivo).

El movimiento de las moléculas está gobernado también por dos fuerzas adicionales; inicialmente la fricción con el solvente dificultará este movimiento originando una fuerza que se opone, por otro lado las moléculas tienen que moverse en forma aleatoria o movimiento browniano debido a que poseen energía cinética propia denominado difusión. La energía cinética de las moléculas aumenta con la temperatura, por ello a mayor temperatura mayor difusión.

La suma de todas estas fuerzas provoca que las moléculas no migren de una manera homogénea, de tal manera que, si las moléculas son colocadas en un cierto lugar de solución, los iones comenzarán a moverse formando un frente cuya anchura aumentará con el tiempo.

Para reducir la anchura de este frente podemos reducir el movimiento de las moléculas empleando un medio que oponga más resistencia a dicho movimiento. Una forma común de hacer esto es formar un gel. El gel consiste de un polímero soluble de muy alto peso molecular que atrapa moléculas de agua y forma un tamiz que dificulta el movimiento de los solutos, consecuentemente, la migración electroforética de las moléculas será más lenta, pero el ensanchamiento del frente se verá reducido también.

Hay dos criterios de separación:

- Electroforésis analítica: orientada a la búsqueda de propiedades de un solo componente.
- Electroforésis preparativa: orientada a la separación entre gran cantidad de componentes.

La forma más sencilla de realizar una electroforésis consiste en un tubo en forma de “U” donde se introduce un electrolito, una fuente de voltaje y la muestra además por supuesto, de los dos electrodos. Al conectar el sistema las macromoléculas comenzarán a migrar por el tubo hacia el polo opuesto y así irán diferenciándose según su carga (figura 2.1). Uno de los inconvenientes que presenta esta técnica es la fluidez del medio, o sea, la facilidad con la que las partículas difunden, de modo que al cortar la corriente nos encontraríamos con la tendencia natural al equilibrio, con lo que no habríamos logrado nada.

A este tipo de electroforésis se la denomina electroforésis libre.

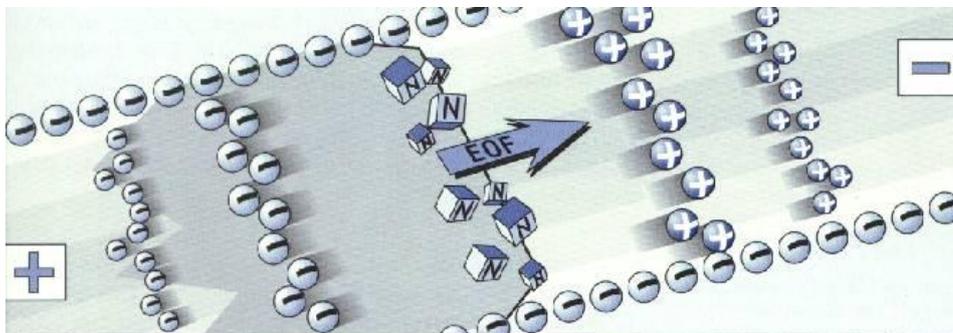


Figura 2.1

El siguiente paso por tanto es el idear un soporte que permita estabilizar las moléculas una vez desconectados los electrodos. De este modo se ideó la electroforésis en zona, que tiene como peculiaridad el realizarse en un plano y sobre un medio soporte estabilizante que impida la difusión de las moléculas al acabar, y por supuesto que no presente un impedimento al movimiento de las partículas (normalmente) en su superficie.

Existen varios tipos de electroforesis:

1. Electroforésis en gel de poliacrilamida.

2. Electroforésis en geles de gradientes.
3. Electroforésis Capilar.

Electroforésis en gel de poliacrilamida.

Los geles de poliacrilamida se forman por polimerización de la acrilamida por acción de un agente entrecruzador, es químicamente inerte, puede ser preparado de forma rápida y reproducible. Forma, además, geles transparentes con estabilidad mecánica, insolubles en agua, relativamente no iónicos y que permiten buena visualización de las bandas durante un tiempo prolongado. Además tiene la ventaja de que variando la concentración de polímeros, se puede modificar de manera controlada en el tamaño del poro, lamentablemente cada vez se emplea menos en diagnóstico debido a su neurotoxicidad.

Electroforésis en geles de gradientes.

El uso de geles de poliacrilamida que tienen un gradiente creciente de concentración de acrilamida + bisacrilamida, y en consecuencia un gradiente decreciente en el tamaño del poro, pueden tener ventajas sobre los geles de concentraciones uniformes de acrilamida. En un gel en gradiente la proteína migra hasta alcanzar una zona donde el tamaño de poro impida cualquier avance. Una vez se alcanza el límite del poro no se produce una migración apreciable aunque no se detiene completamente. Una de las ventajas de este tipo de geles es que resuelve mejor las bandas pues las concentra en regiones más estrechas, además de incrementar el rango de pesos moleculares que se pueden resolver en un mismo gel comparado con los de una concentración fija.

Electroforésis Capilar.

La electroforésis capilar se basa en los mismos principios de las técnicas electroforéticas convencionales, pero utiliza condiciones y tecnología distinta que nos permiten obtener una serie de ventajas.

En este caso la separación de péptidos es realizada sobre un capilar de silica fundida a potenciales elevados 20 a 30 kV en un campo de 400 a 500 v/cm refrigerados por aire.

La corriente electroendosmótica (FEO) generada por los grupos silanol de la superficie interna del capilar da como resultado una corriente plana del frente del líquido que contrasta con el frente parabólico de la cromatografía líquida de alta resolución. La ventaja de esta técnica es que el capilar de silica fundida que generalmente se cubre con una capa de polimina para darle mayor rigidez y resistencia, tiene una ventaja a través de ella que permite el pasaje de la luz UV de tal manera que la visualización es en línea. Con esta técnica descrita es posible separar cationes, aniones, proteínas, macromoléculas y sustancias no cargadas en forma simultánea.

Fuentes de error en la electroforésis:

La electroforésis es una técnica muy sensible y puede ser afectada por muchos errores experimentales, como la temperatura durante la polimerización y la corrida del gel⁵, velocidad de la polimerización, niveles de catalizador, pureza del reactivo, tiempo de corrida y preparación de las muestras.

2.5.2 Cromatografía en Columna

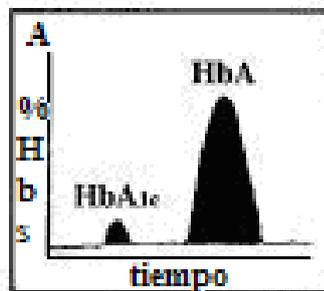
El principio de separación de la cromatografía es la aplicación de un criterio de separación a las proteínas que se desplazan a lo largo de una matriz sólida porosa. Este criterio de separación se basa en alguna propiedad que es diferente entre las proteínas que se quieren separar: peso molecular, carga eléctrica, afinidad de una de ellas por alguna otra, etc.

⁵ Corrida de gel aplicacion del campo electrico a las muestras embebidas en un gel de separación o en capilar, gracias al cual se van a separar de acuerdo a su carga neta peso molecular punto isoelectrico dependiedo del tipo de gel.

En función del criterio de separación que se aplique existen tres tipos de cromatografía en columna

2.5.3 Cromatografía intercambio iónico.

Este método logra la separación de las fracciones de hemoglobina con base en las diferencias en sus cargas eléctricas. Las fracciones eluyen a diferentes tiempos con la aplicación de buffer's⁶ adecuados que aumentan la fuerza iónica. Un espectrofotómetro mide la concentración de hemoglobina en cada fracción recogida, que se cuantifica por el cálculo del área bajo los picos de la curva en cada pico en general de acuerdo a la ecuación (figura 2.2):



$$\left(\frac{HbA1c}{HbA + HbA1c} \right) \times 100$$

Separacion de HbA de HbA1c

Figura 2.2

La separación en la cromatografía de intercambio iónico depende la adsorción reversible de moléculas de soluto cargadas, a una resina con grupos iónicos de carga opuesta. El mecanismo de separación se basa en un equilibrio de intercambio iónico de cinco etapas.

La primera etapa es un equilibrio en el cual el intercambiador iónico se encuentra en las condiciones apropiadas del potencial de hidrogeno (pH)⁷ y fuerza iónica, lo que permitirá la unión de las moléculas de soluto. En este estado inicial, los grupos que se intercambiaran están asociados con sus respectivos contra-iones (usualmente aniones o cationes simples, como cloruro o sodio).

⁶ Buffer es una o varias sustancias químicas que afectan la concentración de los iones de hidrógeno (o hidrogeniones) en el agua, un "buffer" (o "amortiguador") lo que hace es regular el pH.

⁷ pH es la concentración de hidrógenos presentes en determinada sustancia, es un indicador de la acidez de una sustancia.

En una segunda etapa se encuentra la aplicación de la muestra y su adsorción, en la cual las moléculas del soluto llevan a cabo el apropiado desplazamiento de carga de los contra-iones y se unen reversiblemente al gel. Las sustancias que no se unen son eluidas de la cama del intercambiador usando el buffer inicial.

En la tercera etapa, se lleva a cabo la desorción⁸ de la muestra cambiando las condiciones de elusión, al desfavorecer la formación del enlace iónico de las moléculas de la muestra y la cama el intercambiador. Esto normalmente se logra aumentando la fuerza iónica del buffer de elusión o cambiando su pH.

En la cuarta y la quinta etapa corresponden a la remoción de sustancias no eluidas bajo las condiciones experimentales previas y regresar al equilibrio de las condiciones iniciales para la siguiente purificación.

La separación de diferentes sustancias se lleva a cabo porque éstas tienen diferentes grados de interacción con el intercambiador iónico debido a diferencias en sus cargas (positivas o negativas), densidades de carga y distribuciones de carga en su superficie. Estas interacciones pueden ser controladas variando condiciones como la fuerza iónica y el pH. Las diferencias en propiedades de carga de compuestos biológicos son a menudo considerables y, tomando en cuenta que la cromatografía de intercambio iónico es capaz de separar especies con propiedades poco diferentes.

Se pueden llevar a cabo separaciones por intercambio iónico en una columna, mediante un procedimiento en lote o por adsorción en cama extendida⁹.

La cromatografía de intercambio iónico se realiza sobre matrices que tienen una carga neta, positiva. La carga de la matriz¹⁰ de la columna así como la carga de las proteínas dependerá del pH del solvente y de su fuerza iónica (proporcional a la concentración de iones).

⁸ La desorción es la eliminación de materia desde un medio adsorbente, usualmente para recuperar material.

⁹ Cama extendida es una capa ligera de material sobre una superficie plana.

¹⁰ La matriz es un soporte inerte al cual un ligando puede ser directa o indirectamente acoplado.

En condiciones determinadas se retendrán en la columna las proteínas que tengan una carga complementaria a la de la matriz del gel (las proteínas cargadas negativamente serán retenidas por una matriz cargada positivamente), siendo eluidas las restantes.

Para eluir las proteínas retenidas se puede variar la carga iónica del solvente o su pH de forma que se alcance el punto isoeléctrico de la proteína de interés o el de la matriz, neutralizando de este modo la fuerza que retiene a las proteínas en la columna (figura 2.3).

PRINCIPIO DE LA CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO

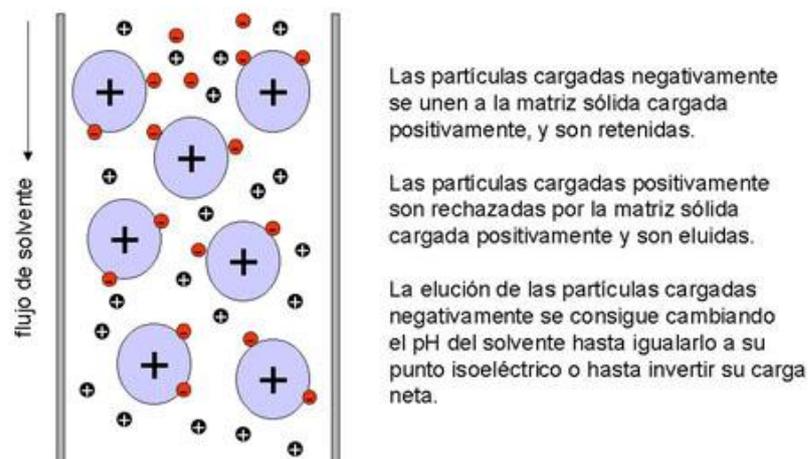


Figura 2.3

La Fase Estacionaria¹¹ es una resina de intercambio iónico que contiene grupos cargados, teniendo la propiedad de separar especies ionizadas (Cationes o Aniones); la Fase Móvil¹² es generalmente una solución amortiguadora de pH.

¹¹ La fase estacionaria puede ser un sólido o un líquido soportado en un sólido o en un gel (matriz). La fase estacionaria puede ser empaquetada en una columna, extendida en una capa, distribuida como una película, etc.

¹² La fase móvil puede ser un líquido o un gas que corre a través de una superficie y de la fase estacionaria.

En proteínas la cromatografía de intercambio iónico se basa en las diferencias en signo y magnitud de la carga eléctrica neta de las proteínas a un valor de pH determinado. La afinidad de cada proteína a los grupos cargados de la columna esta influenciada por el pH y por la concentración de iones en solución (concentración salina) que compiten con la proteína en la interacción con la matriz. La separación de la proteína de la matriz cargada puede obtenerse gradualmente cambiando el pH y/o la concentración salina de la fase móvil, de tal forma que se genere un gradiente de concentración.

La cromatografía de intercambio iónico se aplica a la separación de casi todos los tipos de moléculas cargadas, desde grandes proteínas a pequeños nucleótidos¹³ y aminoácidos¹⁴.

La molécula de interés, en general una proteína, es separada de otras proteínas en base a su diferencia de carga.

La separación se basa en la adsorción reversible de moléculas de soluto cargadas a grupos de intercambio iónicos de carga opuesta inmovilizados a una matriz.

El intercambio iónico al igual que cualquier proceso iónico es un equilibrio. La proteína cargada se une al intercambiador con carga opuesta mediante fuerzas electrostáticas (figura 2.4).

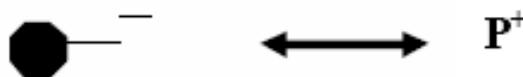


Figura 2.4

La molécula unida al intercambiador puede ser rápidamente reemplazada por otro ion (figura 2.5).

¹³ Compuesto orgánico constituido por una base nitrogenada, un azúcar y ácido fosfórico.

¹⁴ Compuestos orgánicos a partir de los cuales se construyen las proteínas.

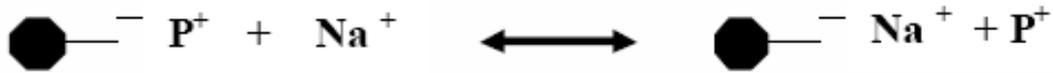


figura 2.5

La separación se alcanza cuando existen sustancias con diferente grado de interacción con el intercambiador debido a sus diferencias de carga y densidades de carga. Estas interacciones pueden controlarse variando condiciones como fuerza iónica y pH.

2.5.4 Cromatografía de Filtración en Gel.

La cromatografía de filtración en gel se realiza empleando matrices formadas por esferas porosas. El volumen de los poros es muy elevado y su diámetro está determinado en función del material a separar.

Cuando penetran en el lecho de la columna dos proteínas de tamaños tales que una penetra en los poros de las esferas de gel y la otra no, la primera se reparte entre el espacio entre las esferas y el interior de los poros, reduciéndose la concentración en la fase libre entre las esferas. La segunda proteína, por tamaño, sólo puede encontrarse entre las esferas. El flujo de la fase móvil es más elevado entre las esferas que en el interior de los poros de éstas, por lo que el efecto neto es el de acelerar el desplazamiento de las proteínas de mayor peso molecular respecto al de las de menor peso molecular. En esta cromatografía se eluyen primero las proteínas mayores, y en segundo lugar las menores, y tiene una gran influencia en el resultado la longitud de la columna y el volumen de la misma. Las columnas largas aseguran separaciones de mayor calidad. Empleando patrones de proteínas de peso molecular conocido se emplea para determinar el peso molecular de proteínas de tamaño desconocido (figura 2.6).

PRINCIPIO DE LA CROMATOGRFÍA DE FILTRACIÓN EN GEL

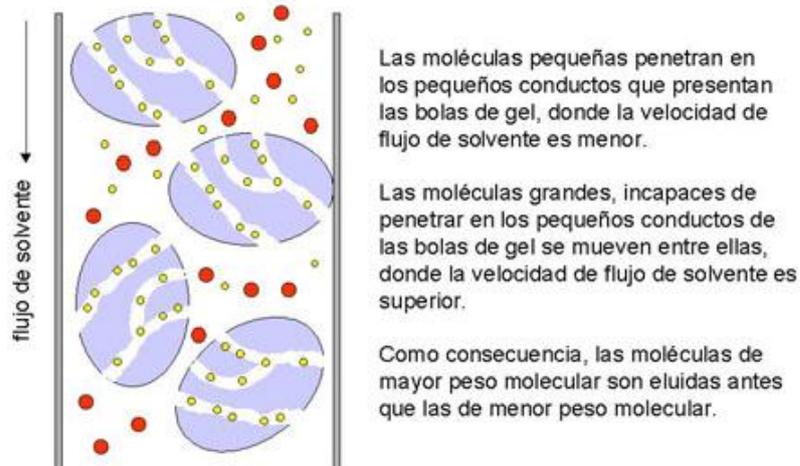


Figura 2.6

2.5.5 Cromatografía de afinidad al Boronato.

Este tipo de cromatografía utiliza interacciones altamente específicas entre un tipo de moléculas de soluto y una segunda molécula unida covalentemente (inmovilizada) a la fase estacionaria.

Por ejemplo, la molécula inmovilizada podría ser un anticuerpo específico para una proteína particular.

Cuando una mezcla cruda¹⁵ que contiene miles de proteínas se pasa a través de una columna, sólo una proteína reacciona con el anticuerpo que está unido a la columna. Después de lavar todos los otros solutos de la columna, la proteína deseada es desplazada del anticuerpo cambiando el pH, la fuerza iónica o la polaridad.

Las interacciones entre las moléculas del ligando¹⁶ y blanco pueden ser el resultado de interacciones hidrofóbicas o interacciones electrostáticas, fuerzas de Van Der Waals y/o puentes de hidrógeno.

¹⁵ Mezcla cruda o extracto total, se refiere a que todos los componentes de una muestra están presentes en el medio de separación y/o de extracción. En el caso de hemoglobina: sangre total.

¹⁶ Es la molécula que se une reversiblemente a moléculas específicas o grupo de moléculas, capacita la purificación por cromatografía de afinidad.

La purificación por afinidad requiere un ligando bioespecífico que puede ser unido covalentemente a una matriz cromatográfica. El ligando acoplado debe retener su afinidad específica de enlace hacia las moléculas blanco, y después de lavar el material no unido, la unión entre la molécula blanco y el ligando debe ser reversible y permitir que las moléculas blanco sean removidas en forma activa.

Cualquier componente puede ser usado como un ligando para purificar a su compañero respectivo.

Algunas interacciones biológicas típicas usadas frecuentemente en cromatografía de afinidad son:

- Enzima \Leftrightarrow sustrato análogo, inhibidor, cofactor.
- Anticuerpo \Leftrightarrow antígeno, virus, célula.
- Lecitina \Leftrightarrow polisacárido, glicoproteína, receptor de superficie celular, célula.
- Ác. nucleico \Leftrightarrow secuencia base complementaria, histonas, polimerasa de ácidos nucleicos, proteína de unión al DNA.
- Hormona, vitamina \Leftrightarrow receptor, proteína acarreadora.
- Glutación \Leftrightarrow glutación-S-transferasa o proteínas de fusión GST
- Iones metálicos \Leftrightarrow proteínas de fusión poli (his), proteínas nativas con histidina, residuos de cisteína y/o triptofano en sus superficies.

La matriz es un soporte inerte al cual un ligando puede ser directa o indirectamente acoplado.

Algunas características importantes para ésta son:

- Adsorción no específica extremadamente baja es esencial ya que el éxito de la cromatografía de afinidad depende de interacciones específicas.

- Los grupos hidroxilo en los residuos de azúcar pueden servir para unirse a un ligando.
- Proporcionando una plataforma ideal del desarrollo del medio de afinidad.
- La estructura de poro abierta asegura una capacidad de unión alta, aún para biomoléculas grandes porque el interior de la matriz estaría disponible para el ataque de ligandos.
- Propiedades de fluido buenas para la rápida separación, estabilidad bajo un rango de condiciones experimentales tales como pH alto y bajo detergentes y agentes disociadores.

La selección del ligando para cromatografía de afinidad está influenciado por dos factores: unión y grupos.

El ligando debe presentar una afinidad de unión específica y reversible para la sustancia blanco y debe tener grupos químicamente modificables que permitan ser unidos a la matriz sin destruir su capacidad de unión.

2.5.6 Cromatografía Líquida de alta presión (HPLC¹⁷).

En la actualidad HPLC ha llegado a ser una de las Técnicas del Laboratorio Moderno más importantes como herramienta analítica para separar y detectar compuestos químicos. Como en todas las técnicas analíticas, los pequeños problemas a la larga pueden llegar a tener un mayor impacto en la exactitud y durabilidad del sistema. Aun con la evolución de los cromatógrafos líquidos en la era de la computadora, hay aun problemas que ésta no puede resolver.

Hasta los Solventes para HPLC, todos filtrados cuidadosamente en la fábrica, pueden acumular partículas en suspensión que pueden ser perjudicial a los componentes del sistema HPLC. Estas partículas en suspensión pueden venir de varias fuentes, incluso de la exposición al polvo en el aire durante el

¹⁷ HPLC por sus siglas en ingles High pressure liquid chromatography

trasegado¹⁸ de solvente en el reservorio para solvente, la exposición a partículas del aire durante el almacenamiento del solvente en el reservorio del solvente, la degradación lenta del reservorio solvente, o de condensación y polimerización del solvente. Las partículas pueden ocasionar costosos daños a la bomba HPLC, al guarda columnas, y en general causar desgaste del sistema de HPLC. Los fabricantes de los instrumentos tienen en cuenta este problema y recomiendan que se filtre y desgasifique los solventes HPLC antes de usarlos.

En el instante que se abre una nueva botella de solvente para HPLC se expone el interior del solvente a la atmósfera y empieza a acumular humedad y gases disueltos que se encuentran en la atmósfera. El trasegado del solvente en el reservorio del solvente y su almacenamiento en estos depósitos más este fenómeno. El Oxígeno Disuelto que constituye el 21% de la atmósfera puede producir mayor interferencia en los detectores de fluorescencia y electroquímicos. El Nitrógeno Disuelto es el otro componente de la atmósfera que puede producir burbujas en la columna de HPLC y cuando el solvente entra al detector produce picos falsos y desviaciones de la línea base. El Dióxido de Carbono disuelto algunas veces puede ser la causa de los cambios de pH en el sistema de solvente.

Es una Cromatografía de alta presión que requiere de equipo sofisticado. Se pueden analizar muestras proteicas. La reducción de la presión es decir se aplica el flujo a presión entre 1500 a 2200 psi (10 MPa a 15 MPa). El tamaño de partícula es entre 3 y 10 micras, la longitud de la columna es entre 5 y 25 cm. y tiempo en que la sustancia se encuentra en el interior de la columna, limita el ensanchamiento por difusión de las bandas, aumentando por tanto la resolución.

El sistema HPLC requiere una mezcladora de solventes, un inyector, y una bomba que inyecte el líquido a la columna. Generalmente las columnas con base de sílice requieren alta presión para que el flujo de líquido sea adecuado, la mezcladora se requiere para variar la proporción de solvente en la fase móvil y el inyector permite la aplicación de la muestra.

¹⁸ Cambiar un líquido de un recipiente a otro.

A la salida de la columna se coloca un detector generalmente de absorción ultravioleta o de fluorescencia y si se desea recuperar las moléculas que eluyen de la columna, se requiere un colector (figura 2.7).

En los sistemas modernos el análisis de la información obtenida se realiza mediante una computadora acoplada al equipo; lo que permite estandarizar la cromatografía, identificar la naturaleza los picos eluidos y cuantificar su contenido. Los picos se relacionan según su "tiempo de retención" con estándares, que permiten identificar los aminoácidos presentes en la mezcla (figura 2.8).

La cantidad relativa de cada uno de ellos se determina calculando el área bajo la curva del pico correspondiente.

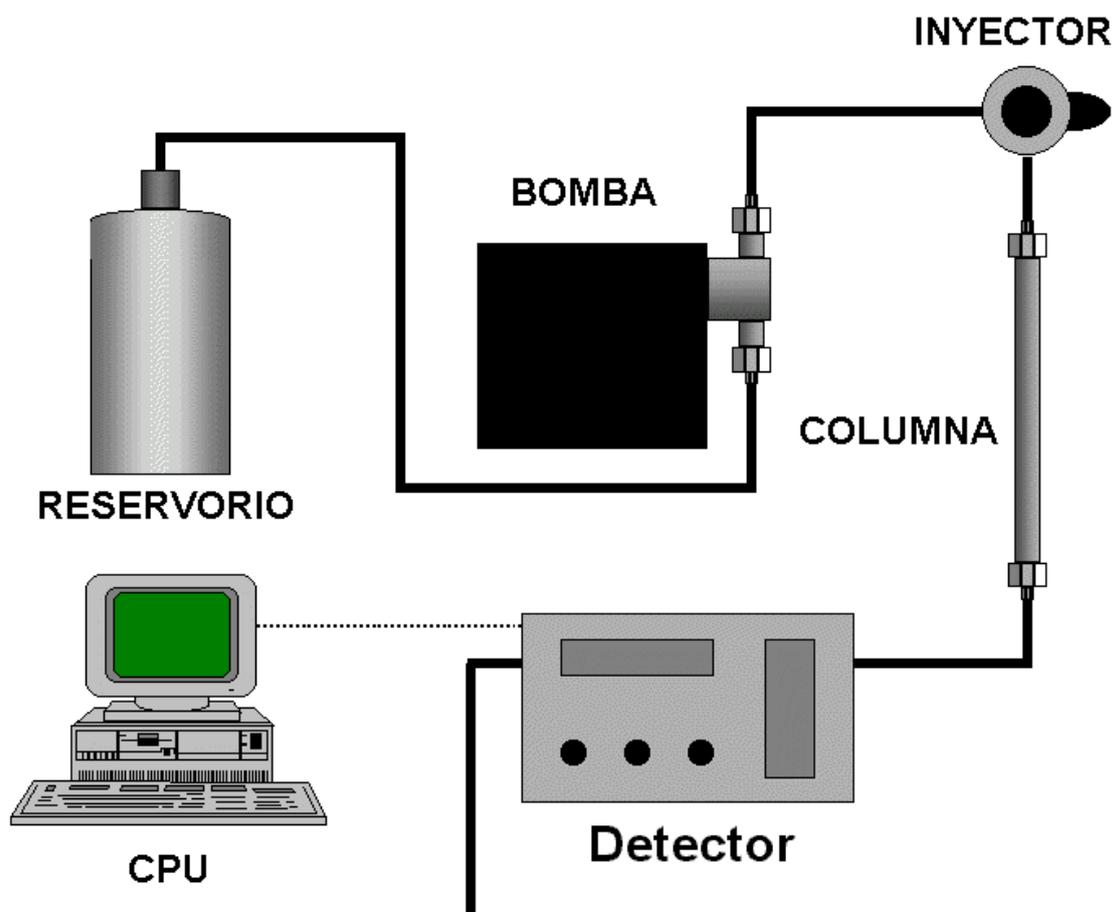


Figura 2.7



Figura 2.8

3. INSTRUMENTACIÓN DE LA CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA PRESIÓN (HPLC).

3.1. INTRODUCCIÓN.

En la actualidad el HPLC ha llegado a ser una de las técnicas del laboratorio moderno más importantes como herramienta analítica para separar y detectar compuestos químicos. Método que se describirá a continuación incluyendo las partes que lo conforman.

3.2. COMPONENTES DEL SISTEMA HPLC.

Los componentes básicos de la cromatografía líquida de alta presión son los siguientes (figura 3.1):

- (a) El eluente¹ contenedor de la fase móvil o sistema dispensador de solvente,
- (b) Una bomba para mover el eluente y la muestra a través del sistema,
- (c) Un dispositivo de inyección para introducir la muestra,
- (d) Una columna o columnas que provee la separación de los solutos²,
- (e) Un detector para visualizar los componentes separados,
- (f) Un contenedor de desechos para el disolvente³ usado y
- (g) Un dispositivo colector de datos para la interpretación y almacenaje de los resultados.

La bomba, el inyector, la columna y el detector son conectados con tubería de diámetro interno pequeño. El diámetro interno de los tubos que es usado entre el inyector y la columna y también entre la columna y el detector debe de ser tan pequeño como sea posible (2.54×10^{-4} metros o menos para trabajo analítico) para minimizar el ensanchamiento de banda. La elección del detector esta basado en las propiedades intrínsecas del soluto. Frecuentemente se usa

¹ Eluente es un disolvente o solución utilizada en el proceso de elución, como ocurre en una cromatografía en columna.

² Solutos es la sustancia minoritaria en una disolución o, en general, a la sustancia de interés.

³ Disolvente es un líquido en el cual se disuelve otra sustancia, en menor proporción.

más de un detector para maximizar la información de la muestra y confirmar identidad de picos.

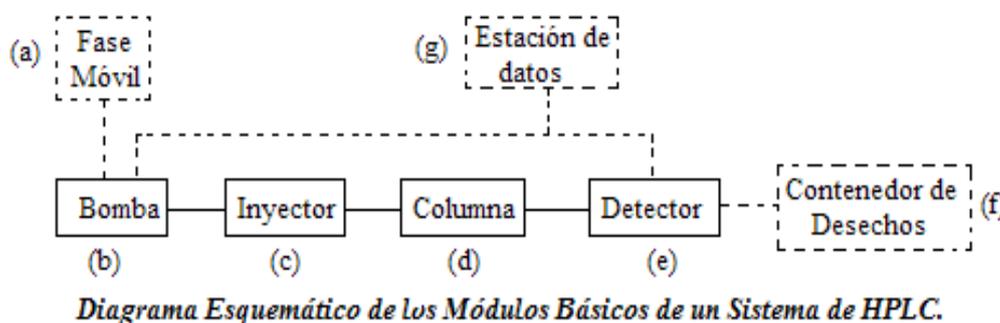


Figura 3.1

3.2.1. SISTEMA DISPENSADOR DE SOLVENTE.

La función del sistema dispensador de solvente es dispensar la fase móvil (eluyente) a través del cromatógrafo, con exactitud y reproducibilidad. El sistema dispensador de solvente comprende las bombas, válvulas “check” (válvulas de seguridad), controles de flujo, amortiguadores de pulso y transductores de presión, cada uno de los cuales necesita ser mantenido para asegurar que los rangos de flujo sean reproducibles. La bomba debe de ser fácil de cebar, confiable, y de fácil mantenimiento. Debe de ser resistente a la corrosión que produce los eluentes utilizados y capaz de dispensar los rangos de flujo requeridos con el mínimo retraso de volumen para cambios rápidos del solvente.

3.2.2. BOMBAS.

El sistema de bombeo usado en el HPLC esta clasificado de 3 formas: la primera clasificación es de acuerdo al rango de flujo de eluyente que la bomba es capaz de dispensar, la segunda clasificación es de acuerdo a los materiales de construcción y la tercera es de acuerdo al mecanismo por el cual la bomba dispensa el eluyente.

3.2.2.1. Clasificación de acuerdo al intervalo de flujo de la bomba.

Cuando se clasifica en términos de rango de flujo, las bombas pueden ser definidas como micro-perforado, perforado estándar o preparativo. Los sistemas de perforación estándar son los sistemas de bombeo comúnmente usados para HPLC analítico, porque proveen operación segura a rangos de flujo que van de 100 $\mu\text{l}/\text{min}$ ($1.67 \times 10^{-9} \text{ m}^3/\text{s}$) a 10 ml/min ($0.167 \times 10^{-9} \text{ m}^3/\text{s}$). Este sistema versátil es compatible con aplicaciones menos demandantes de trabajo semipreparativo (columnas de 12 mm) así como también con operación micro-perforado (columnas de 2 mm).

Los sistemas de micro-perforación están diseñados para uso con diámetros de columnas de rangos por abajo de 2 mm. La columna de diámetro reducido y tamaño pequeño del material empacado impone rangos de flujo lento para los sistemas de bombeo desde 1 hasta 250 $\mu\text{l}/\text{min}$ ($0.016 \times 10^{-9} \text{ m}^3/\text{s}$ hasta $4.16 \times 10^{-9} \text{ m}^3/\text{s}$). Como el tamaño mínimo de la cabeza de la bomba hace lo mismo, es de alrededor de 25 μl ($25 \times 10^{-9} \text{ m}^3$), la operación confiable a rangos de flujo menores de 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ ($0.167 \times 10^{-9} \text{ m}^3/\text{s}$) es difícil.

3.2.2.2. Clasificación de las bombas de acuerdo a los materiales de construcción.

Las bombas también pueden ser clasificadas de acuerdo a materiales de construcción primaria. Las bombas pueden ser clasificadas como metálicas o no metálicas, dependiendo del material usado para el paso de flujo del eluente. El material más comúnmente usado para los sistemas de bombas en HPLC es acero inoxidable 316⁴ debido a su fuerza mecánica, resistencia a la corrosión, buena estabilidad térmica y maleabilidad; porque solo algunos solventes de HPLC, como el ácido hidroclicóric, pueden causar daños al acero inoxidable 316.

Un material similar en propiedades mecánicas al acero inoxidable 316, es el titanio, que afirma tener mayor grado de resistencia a la corrosión y a la

⁴ El acero inoxidable 316 ofrece una resistencia a la corrosión ligeramente superior a la de los aceros 302 y 304. Asimismo, tiene mejores características magnéticas. Adecuado para aplicaciones navales, la industria de los alimentos y equipos médicos.

adsorción de la muestra. Como el acero, el titanio tiene una resistencia que exceden los 6000 psi (41 MPa). Sin embargo, el elevado costo y su tendencia a actuar como un intercambiador iónico bajo ciertas circunstancias son los mayores impedimentos para que sea utilizado este material.

Algunas aplicaciones requieren el uso de materiales que sean capaces de ser expuestos a la alta salinidad, fases móviles ácidas o básicas; así, que se evita el uso de metales en el flujo de eluyente. Además, muchos metales se degradan rápidamente al contacto con muestras biológicas. Por consiguiente las bombas son construidas con materiales no metálicos como el “PEEK” (polietil etil cetona), Teflón (politetrafluoroetileno), y cerámicos. El Teflón es usado mayormente en aplicaciones semipreparativas de HPLC a baja precio, con muestras biológicas, pero tiene una resistencia mecánica insuficiente para operaciones constantes por arriba de los 2000 psi (13 MPa). Por otro lado, el “PEEK” tiene mayor resistencia mecánica que el Teflón con un desempeño confiable para 5000 psi (34 MPa) y es inerte con los solventes que dañan al acero inoxidable. Sin embargo, el “PEEK” es incompatible con muchos de los solventes orgánicos que son usados comúnmente en la fase normal del HPLC.

Materiales cerámicos, incluidos el zafiro, han sido usados ampliamente por más de 20 años en las bombas de HPLC, en pistones y válvulas check. Estos materiales también han sido usados en la construcción de las cabezas por que tienen buena estabilidad química. Sin embargo, el uso de la cerámica es limitada por su alto costo y fragilidad. Aunque muchos sistemas lo utilizan como material primario de construcción, dado que las superficies húmedas de las bombas pueden contener muchos otros materiales.

3.2.2.3. Clasificación de bombas de acuerdo al mecanismo de desplazamiento del eluyente.

La tercera clasificación de las bombas es de acuerdo al mecanismo por el cual el líquido pasa a través del cromatógrafo. Aunque una amplia variedad de bombas han sido desarrolladas a través de los años, casi todas las bombas de cromatografía líquida (LC) desde 1980 están basadas en alguna variación del mecanismo de pistón oscilante.

Enseguida se presentan los tipos de bombas de acuerdo al mecanismo de desplazamiento.

a. Bombas tipo jeringa.

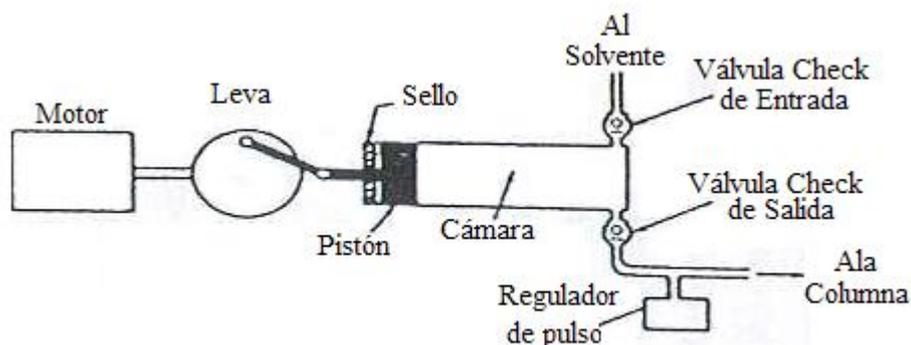
Las jeringas, ó desplazamiento positivo, siguen siendo populares para aplicaciones que requieren dispensado de solvente sin pulsos (continuo), como en capilares de LC donde el típico rango de flujo es menor de 100 $\mu\text{l}/\text{min}$ ($1.67 \times 10^{-9} \text{ m}^3/\text{s}$). Las bombas tipo jeringa son esencialmente un tubo largo de 10 – 50 ml ($167 \times 10^{-9} \text{ m}^3/\text{s} - 833 \times 10^{-9} \text{ m}^3/\text{s}$), con un émbolo conectado a un motor digital de pasos o un tornillo de precisión. Como el émbolo se mueve hacia delante, impulsa el eluente a través del cromatógrafo con un flujo sin pulsos. Sin embargo, al paso del tiempo es limitado por el volumen de la jeringa, y no hay flujo durante la recarga del eluente.

b. Bombas con pistón oscilante.

Las bombas con pistón oscilante es el diseño más común y moderno en HPLC (figura 3.2). La cabeza de la bomba consiste de dos partes móviles: las válvulas check y el sello del pistón. La leva y la biela transforman el movimiento rotacional del motor en movimiento lineal del pistón. Cada movimiento del pistón desplaza un pequeño volumen de líquido 40-400 μl ($40 \mu\text{m}^3 - 400 \mu\text{m}^3$) desde una cámara equipada con válvulas check. Durante el movimiento de carga el pistón es retirado de la cámara. La válvula check de entrada se eleva desde su base, por que el solvente entrante tiene una presión mayor que el líquido que está al interior de la cámara de la cabeza de la bomba. Al mismo tiempo, la válvula de salida desciende a su base, por que la presión al interior de la columna de la bomba es también mayor que la del interior de la cabeza de la bomba. Debido a las dos válvulas check, el solvente sólo es capaz de entrar a la cámara por el reservorio del solvente.

Durante el movimiento de dispensado, el pistón mueve el líquido dentro de la cámara y presuriza el líquido contenido en el. Como la presión dentro de la cámara es ahora mayor que la presión atmosférica, la válvula check de entrada es forzada a cerrarse. Cuando la presión dentro de la bomba excede la presión

en el lado de la columna de la bomba, la válvula check de salida se abre y la fase móvil fluye hacia la columna.



Pistón Oscilante de cabeza simple.

Figura 3.2

3.2.2.4. Minimización de las pulsaciones de la bomba.

Dado que en el sistema se necesita un flujo constante es necesario diseñar un sistema que minimicen estas pulsaciones, existen dos tipos de diseño para obtener un flujo constante: Diseño de la leva y reguladores de pulso.

a. Diseño de la leva.

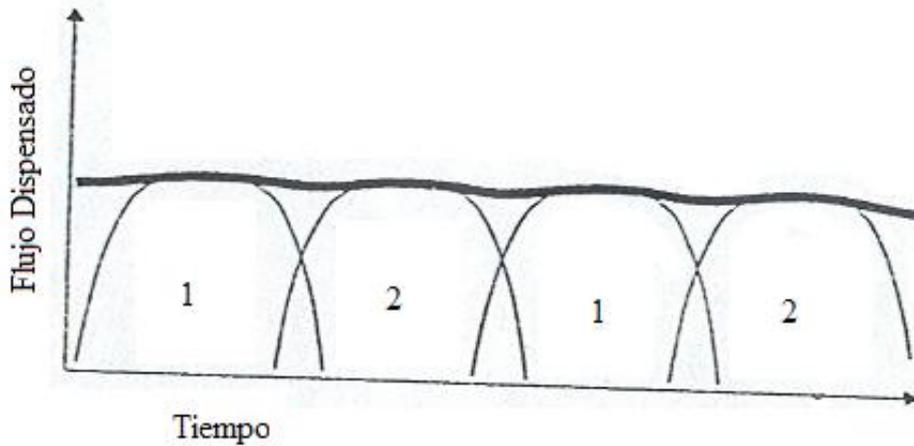
El flujo dispensado por una bomba oscilante es siempre pulsante en sincronía con el movimiento del pistón. Sin embargo, las bombas pulsantes tienen pequeños efectos adversos en la separación, en la detección de analitos⁵ a nivel de las trazas a menudo limitadas por el ruido en la línea base de las bombas pulsantes. El flujo dispensado por una sola bomba de pistón es relativamente pulsante, por lo que una sola bomba de pistón es ocasionalmente usada para dispensar el eluyente; en cambio, puede usarse sistemas isocráticos⁶ especializados (figura 3.3).

Para minimizar las pulsaciones de las bombas, los sistemas típicos de bombeo usan un diseño con una leva no circular para mover al pistón (figura 3.4). La

⁵ Analito es el componente (elemento, compuesto o ion) de interés analítico de una muestra, es decir, el que se desea analizar o determinar.

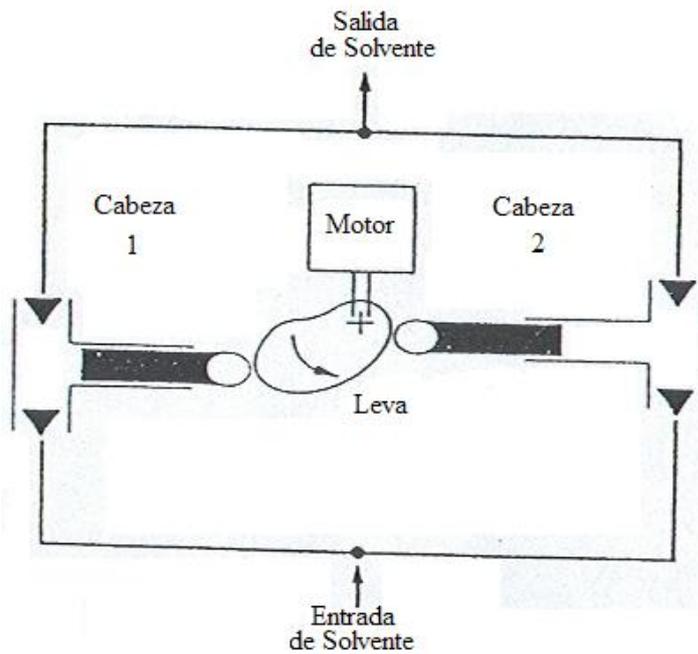
⁶ Sistemas isocráticos término utilizado en cromatografía para designar un disolvente o mezcla de disolventes que se utiliza a lo largo de la misma, a diferencia de la cromatografía con gradiente de disolventes.

leva no circular causa que el pistón aumente su velocidad durante el movimiento de recarga, de este modo se produce un dispensado uniforme durante la mayor parte del ciclo, sin considerar el rango de flujo. Generalmente, los dos pistones de las bombas oscilantes de pistón con doble cabeza son manejadas a través de un solo motor común, una leva no circular. Sin embargo hay diseños que usan motores individuales para cada cabeza. En cualquier caso los pistones están desfasados 180° .



Perfil del flujo dispensado.

Figura 3.3



Bomba de Pistón oscilante, de doble cabeza.

Capaz de dispensar un flujo constante con bajas pulsaciones.

Figura 3.4

b. Reguladores de pulso

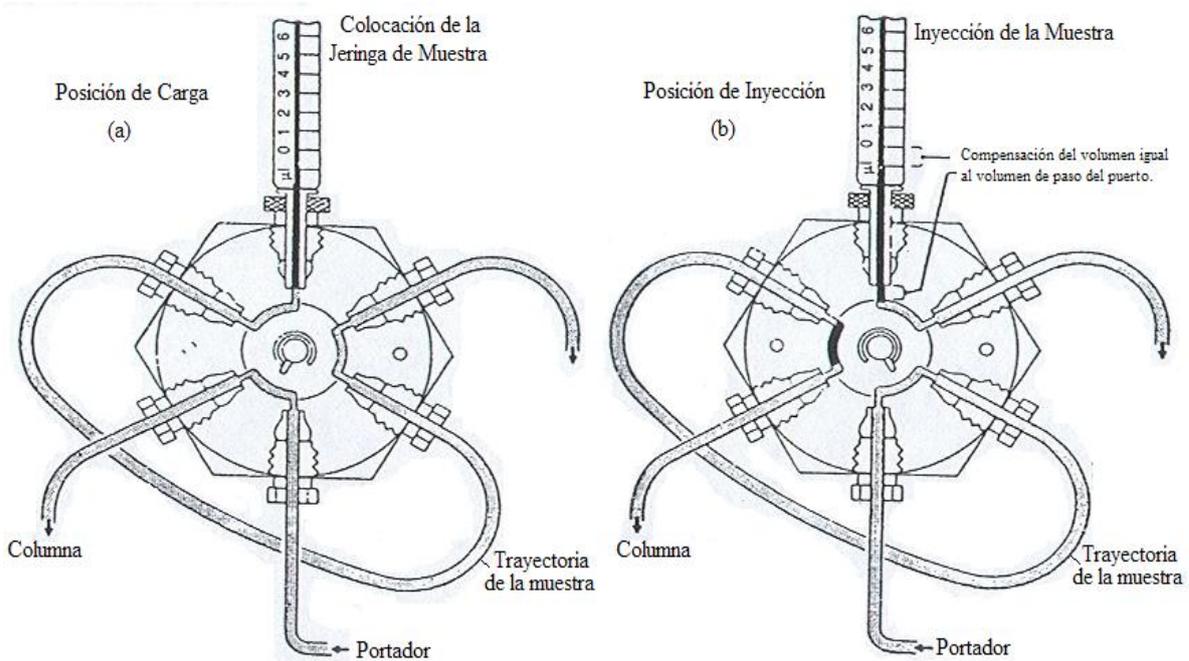
No obstante, las pulsaciones han sido minimizadas en las bombas de cabeza simple haciendo la recarga en el menor tiempo posible, y en bombas de cabeza doble o triple cubriendo parcialmente el movimiento del pistón, en la mayoría de las bombas con pistón oscilante usan reguladores de pulso ó filtros de ruido, entre la bomba y el inyector. Los reguladores de pulso son de longitudes largas y están enrolladas sobre si mismos varias veces. Este flujo a través de los equipos es a base de almacenar energía por el volumen que contiene durante el movimiento de dispensado del eluente y libera energía a través de un limitador durante el movimiento de recarga. De esta forma por acumulación y descarga de solvente, el flujo tiene menos fluctuaciones. Sin embargo, la instalación de los reguladores de pulso incrementa el tamaño del sistema entre la bomba y la columna y hace que el cambio de sistema no sea tan conveniente.

3.2.3. INYECCIÓN DE LA MUESTRA.

La muestra se introduce en el cromatograma por el inyector de muestra. Para minimizar la dispersión y ensanchar los picos, la muestra debe ser inyectada por un conector agudo. Las válvulas inyectoras son utilizadas generalmente en la instrumentación comercial, porque la muestra se introduce con la menor interrupción en el flujo. Los dispositivos de inyección son la base para la inyección manual y automática a causa de su fácil uso, certeza y facilidad para la automatización. Una válvula de inyección típica, la válvula de seis puertos (figura 3.5a).

La válvula de inyección tiene 2 posiciones: la de carga y la de inyección. Para introducir una muestra, la válvula es cambiada primero a la posición de carga. En esta posición, la fase móvil se desvía hacia la trayectoria de la muestra y fluye directo de la bomba a través de la válvula de la columna. Al mismo tiempo, la muestra puede ser cargada en la trayectoria de la muestra a través de la aguja sin interrupción del flujo del eluente. Para introducir la muestra dentro del cromatógrafo, la válvula se cambia a la posición de inyección, (figura

3.5b), y la fase móvil es usada para lavar la muestra por su trayectoria y en la columna.

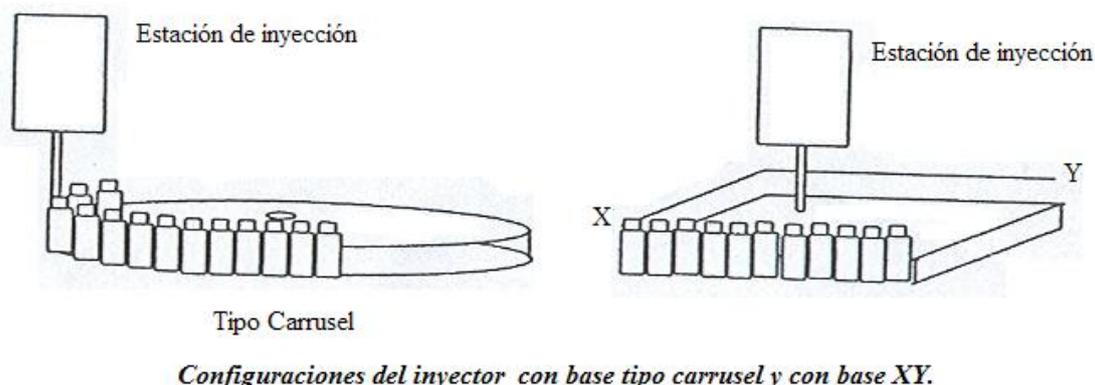


(a) Carga (b) posición de inyección de una válvula de seis puertos

Figura 3.5

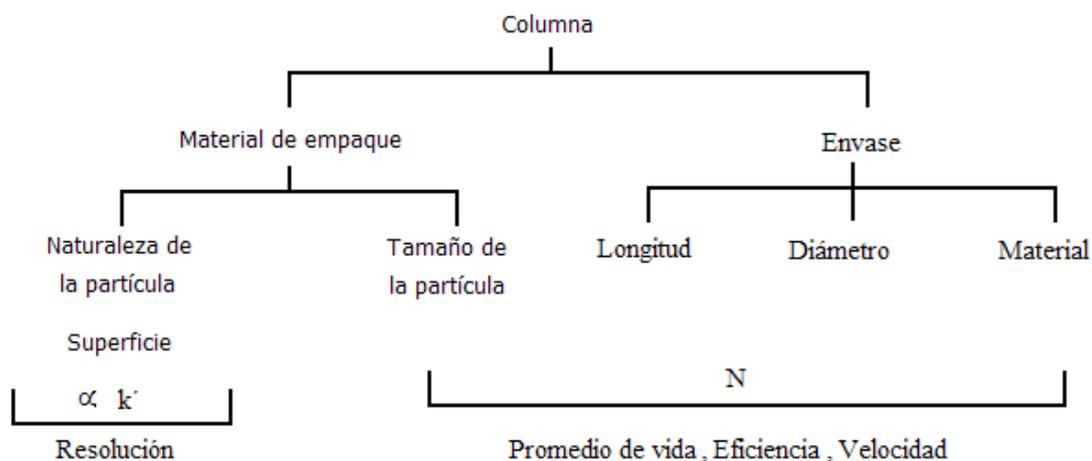
La necesidad de que la inyección de la muestra para HPLC sea precisa e independiente ha llevado al desarrollo de varios mecanismos automáticos de inyección de muestra. La inyección de la muestra dentro de la tubería puede ser de diferentes formas: el vial se puede presurizar para forzar a la muestra a salir, o una jeringa se puede usar para sacar la muestra. La jeringa es controlada por un motor a pasos, por lo que diferentes volúmenes de muestra pueden ser inyectados con reproducibilidad.

Su función es esencialmente igual a la inyección de muestra manual, excepto que las muestras son introducidas automáticamente de un vial de muestras dentro de un carrusel o en una gradilla X–Y. El tipo carrusel proporciona seguridad y medios rápidos de movimiento de las muestras más allá de la estación de inyección, mientras que la gradilla XY es eficaz para configuraciones de accesos aleatorios.



3.2.4. COLUMNAS.

La columna es la parte principal del cromatógrafo, provee el medio para la separación de una muestra en componentes. La selectividad, la capacidad y la eficiencia de la columna esta relacionada por la naturaleza del material de empaque o del material de construcción. El siguiente diagrama indica como los componentes de la columna contribuyen con el desempeño de la cromatografía.



Componentes de la columna y su contribución con el desempeño de la cromatografía.

3.2.4.1. Fase estacionaria

Los empaques para HPLC más modernos son de micro partículas de varios tamaños, diferente porosidad y varias formas. La superficie de las partículas puede ser modificada por diferentes medios (físicos o químicos) para producir el acceso para cualquiera de los modos de cromatografía. La principal fase estacionaria para la cromatografía de adsorción es el gel de sílice, aunque el uso de otros óxidos de metal, como la alúmina y el circonio, así como el carbón han sido utilizados.

Los empaques de sílice son populares por que pueden resistir altas presiones generados cuando se usan columnas de 0.1 m a 0.3 m con empaques de partículas de 3 a 10 μm . El sílice es abundante, económico y disponible en una diversidad de figuras, tamaños y grados de porosidad. La mayor desventaja del sílice es la inestabilidad a bajos y altos niveles de pH (por debajo de 2 y por arriba de 8), limitando el uso de algunos eluentes.

Se ha estado incrementando el uso de los empaques a base de resina como el poliestireno-divinilbenzeno y polímeros a base de acrílicos para las columnas de HPLC. Se utiliza preferentemente en la cromatografía por intercambio iónico y por exclusión de tamaño. Aunque las columnas a base de resinas se pueden usar en un amplio intervalo de pH (pH 1 – 13), están limitadas en términos de presión que las columnas a base de sílice.

3.2.4.2. Tamaño del poro.

Las micropartículas porosas son las más comunes en la fase estacionaria de los modernos sistemas de HPLC. El tamaño de los poros es crítico, dado que el poro provee la superficie con que la muestra interactúa. Las partículas con pequeños poros tienen un área de superficie grande y por lo tanto tienen una mayor retención. Las moléculas grandes como las proteínas, podrían ser excluidas por los poros pequeños y para esas moléculas un empaque con poros grandes es preferible. Aunque el tamaño de los poros es usualmente representado por solo número, el empaque de los materiales no tienen un continuo tamaño de los poros. El empaque tiene una distribución estadística de

tamaño y forma de los poros. Esta distribución puede ser grande o pequeña dependiendo del tratamiento que sea sometido el sílice. Para la mayoría de las cromatografías, una distribución pequeña es requerida, pero para la exclusión por tamaño es la excepción.

Las micropartículas porosas están llenas de material poroso que pueden tener formas esféricas o irregulares. Debido a las muchas ventajas de las micropartículas esféricas, como mejor estabilidad a alta presión, capacidad a volúmenes de muestra grandes y mejor detección de sensibilidad; las micropartículas irregulares se usan en raras ocasiones. Las micropartículas porosas son generalmente seleccionadas para una mayor eficiencia y rapidez, cuando se requiere separar a los picos para identificarlos, para análisis de señal o para mezclas complejas que requieren capacidad para picos grandes.

3.2.4.3. Tamaño de las partículas.

El tamaño de las partículas del material de empaque determina el número teórico de las placas por unidad de longitud que se pueden generar. Con pequeños tamaños de partículas da como resultado alta eficiencia, sin embargo, incrementa la posibilidad de que ocurra una presión inversa debido al decremento de la permeabilidad. Si pequeñas partículas son empacadas dentro de columnas cortas la velocidad del análisis se incrementara con la misma eficiencia.

3.2.4.4. Diámetro interno de la columna.

El diámetro interno de la columna afectará la carga de la muestra, la dilución del pico y el intervalo de flujo. Con un diámetro interno grande, mayor es la capacidad de carga y superior es el rango de flujo. Sin embargo, la dilución del pico incrementa con el diámetro interno y por lo tanto la sensibilidad se reduce. Para columnas más analíticas el rango del diámetro es de 0.002 a 0.005 m. Columnas con diámetro de 0.002 m ó menos son usadas para aplicaciones donde se requiere alta sensibilidad, el aumento de la muestra es limitada.

3.2.4.5. Longitud de la columna.

La longitud de la columna afecta la eficiencia y la velocidad de la separación. Para columnas muy largas, el análisis toma mucho tiempo. Sin embargo, la eficiencia de la columna tiende a incrementarse con la longitud. En general, las columnas cortas son usadas para separaciones simples. Para columnas analíticas pueden tener una longitud desde 0.03 a 0.3 m.

3.2.4.6. Material de construcción de las columnas.

Las columnas deben construirse con material que resista la presión usada en HPLC y también deben de ser resistente químicamente a la fase móvil. La mayoría de las columnas son construidas con acero inoxidable 316 por la rigidez y resistencia mecánica a alta presión. Las columnas de vidrio, teflón y PEEK son también utilizables con fases móviles más agresivas, como el ácido, o con solutos como las proteínas que podría adsorber el acero inoxidable. Las columnas de polímero son comúnmente usadas para empaques de intercambio iónico, mientras que el vidrio es comúnmente usado para la separación de proteínas.

3.2.5. DETECTOR.

El detector convierte el cambio ocurrido en la columna en una señal eléctrica que es registrada en el sistema de datos. Los detectores se clasifican en selectivos o universales dependiendo de la propiedad de medición. Detectores selectivos, como los detectores fluorescentes, miden propiedades químicas o físicas que es característico en las mezclas con solutos; sólo estos componentes que poseen esta características serán detectadas. Los detectores universales miden propiedades físicas del eluente, como los detectores de índice de refracción (RI), todos los solutos que posean índices de refracción diferentes del el eluente serán detectados. Los detectores selectivos tienden a ser más sensibles que los detectores universales, por lo que son más usados los detectores selectivos. Los detectores universales son comúnmente

usados en las cromatografías preparativas, donde una respuesta universal es deseada en muestras de gran tamaño.

Los detectores también pueden ser clasificados en destructivos o no destructivos. Los detectores no destructivos es cuando durante el proceso de detección la muestra no sufre alteraciones. Los detectores no destructivos son usados a menudo para obtener información cualitativa adicional. Los detectores destructivos incluidos los detectores de espectrometría de masa y el electroquímico en los cuales al menos una parte de la muestra es alterada por el mismo detector.

3.2.5.1 Propiedades de los detectores.

Los detectores en línea ideales tienen versatilidad, alta sensibilidad, capacidad de un monitoreo continuo del flujo de la columna, bajo nivel de ruido, respuesta lineal, son estables en su línea base, estables a los cambios de temperatura y con respuesta a todos los compuestos. Son resistentes, baratos y son capaces de medir con exactitud pequeños picos sin tener que incrementar el volumen de soluto. Los términos ruido⁷, sensibilidad⁸ y linealidad⁹ son términos usados para describir el desempeño de los detectores.

El ruido se define como la variación de la señal de salida que no se puede atribuir al soluto que pasa a través de la celda. Esto es ocasionado por varias razones, ruido instrumental, variaciones de temperatura, fluctuaciones en la línea de alimentación y cambios en los rangos de flujo. Hay tres formas de ruido en los detectores. Ruido de corta duración, larga duración y de arrastre. El ruido de corta duración ensancha el trazo y aparecen rizados en la línea base, considerando que con el ruido de larga duración la variación en la línea base aparece en los valles y picos. El movimiento constante de la línea base hacia arriba o hacia abajo se refiere al arrastre.

⁷ Ruido se refiere a todas las perturbaciones que interfieren sobre las señales transmitidas o procesadas.

⁸ La sensibilidad de un dispositivo electrónico, es la mínima magnitud en la señal de entrada requerida para producir una determinada respuesta en la señal de salida.

⁹ Linealidad es cuando la magnitud de la salida del sistema es proporcional a la magnitud de la entrada del sistema.

La sensibilidad es la proporción de la respuesta del detector (pico máximo) de la concentración de la muestra. A mayor sensibilidad del detector, mayor es el pico en la concentración. Más importante que el tamaño de la señal, es la proporción señal a ruido (S/N), que mide la cantidad de señal medible sobre el ruido de la línea base. Si un detector en particular produce una señal grande, pero con ruido, la sensibilidad estará comprometida.

La exactitud es la medición más próxima al valor real. La precisión es la capacidad de realizar medidas similares. Para muchos detectores, la exactitud es mantenida por la calibración del usuario. Para algunos detectores, como los detectores con arreglo de foto-diodos, la exactitud se basa en la calibración interna.

4. SISTEMA DE ADQUISICIÓN DE DATOS.

4.1. INTRODUCCIÓN.

Se tienen dos fines para usar el HPLC: determinar la naturaleza de los analitos en una muestra y determinar la concentración de cada analito. El primero es conocido como análisis cualitativo y el segundo como análisis cuantitativo. La muestra pasa a través del instrumento y se genera una señal que se registra en una estación de datos. La señal debe de convertirse en información cualitativa o cuantitativa. La adquisición de datos es el procedimiento final del análisis.

4.2. IDENTIFICACIÓN DE LOS PICOS.

Una característica del HPLC. Para un sistema definido con condiciones invariantes, un analito tendrá una retención constante de volumen y así pueda ser identificado en base a tiempos de retención. Sin embargo, dado los numerosos compuestos existentes no es posible asignar, inequívocamente, una identidad a cualquier pico solo en base a retención de tiempo. Excepto, a los componentes individuales de una mezcla de la muestra conocidos antes del análisis.

Existen diversas técnicas que ayudan a identificar los componentes de las muestras. La mayoría de las técnicas, tales como el muestreo puntual o dosificación “spiking” y el método desplazamiento del pico enzimático, son usadas para confirmar la identidad de los componentes. Sin embargo, si la identidad de la muestra es verdaderamente desconocida una combinación de técnicas son requeridas para proveer una única identificación.

4.2.1. Retención de Datos.

Como una primera aproximación, el método de identificación de picos más comúnmente utilizado es el de tiempos de retención, u ocasionalmente de los factores de capacidad de los componentes de la muestra con los de compuestos de estándares de referencia. Para minimizar los efectos de la matriz de la muestra en los tiempos de retención, la muestra debe ser analizada bajo las mismas condiciones que se usaron con los estándares.

La retención relativa de la mezcla en dos diferentes sistemas se pueden usar para identificaciones tentativas de los picos. Este método está basado en la premisa que diferentes mezclas muestren un idéntico comportamiento bajo diferentes condiciones es relativamente pequeño. Así que el uso de diferentes detectores, por ejemplo detección por fluorescencia y detección UV u otra diferente técnica como la cromatografía y la electroforesis, ayudaran para confirmar para identificar los picos en la muestra.

4.2.2. Adición Estándar o Spiking.

En el método de adición estándar, la muestra se analiza primero. Una pequeña cantidad conocida de un compuesto conocido, que se piensa que está en la muestra, se agrega a la muestra y la mezcla es reanalizada. Si se obtiene un incremento cuantitativo en el pico del compuesto correspondiente al estándar, el compuesto representante del pico es tentativamente identificado. La técnica del "Spiking" es aplicable siempre y cuando se conozcan ciertos componentes contenidos en la muestra, por lo que estándares apropiados pueden ser agregados para la identificación de los picos. Si la identidad de los componentes de la muestra es totalmente desconocidos, esta técnica es inapropiada y se deberán realizar técnicas analíticas o comparativas para su identificación.

4.2.3. Estándares Internos

El método de los estándares internos de análisis cualitativo, se usa como ayuda para la identificación de los componentes en la mezcla cuando la reproducibilidad de los componentes de la muestra de los tiempos de retención contra el estándar ha sido insuficiente en la identificación de los picos. El cambio en los tiempos de retención de la mezcla del estándar con respecto a la mezcla de la muestra es normalmente debido a que los efectos de la muestra son difíciles de imitar en la mezcla estándar. Así, un pequeño aumento de un compuesto que se sabe que está ausente de la mezcla se agrega al estándar y a la muestra antes del análisis.

Si los tiempos de retención de los picos se mueven en la muestra en relación al estándar, hay dos métodos para identificar el componente de interés dependiendo del número de picos en la muestra. Si solo hay unos picos con buena resolución y si, por ejemplo, el tiempo de retención del estándar interno incrementa en la muestra relativo al estándar, la diferencia en los tiempos de retención del estándar interno en el estándar y la muestra se calcula. La diferencia es entonces restada de los tiempos de retención de cada uno de los otros picos antes de comparar el cromatograma con el cromatograma estándar.

4.2.4. Desplazamiento del Pico Enzimático.

Un método de gran valor en bioquímica para la verificación de la identificación de los picos es la técnica de desplazamiento del pico enzimático. Con el método de desplazamiento del pico enzimático, una alícuota de la muestra es analizada mientras que una segunda alícuota es incubada con un exceso de una enzima que cataliza una reacción específica que involucra el compuesto de interés. Después de que se desactive la enzima, la segunda alícuota es analizada.

La identificación está basada en la desaparición del pico reactante o del aspecto del pico correspondiente en los tiempos de retención del producto conocido. La

reacción en el desplazamiento del pico enzimático también es útil para clarificar un cromatograma. Por lo tanto, si una enzima es agregada que convierta un pico grande en un pico con aspecto diferente en los tiempos de retención, se vuelve posible mostrar picos que estaban ocultos.

4.2.5. *Uso de Bibliotecas de Espectrometría de Masa y Ultravioleta (UV).*

Los detectores con arreglo de fotodiodos (PDA) se están volviendo más populares por su capacidad de usar ambos métodos, tiempos de retención y UV, para ayudar en la identificación de los picos se reconoce más ampliamente. Con la mayoría del software de PDA, el analista puede crear bibliotecas de compuestos estándar. Cuando las muestras son procesadas, el espectro y/o los tiempos de proceso de los picos en la muestra pueden ser comparados con las bibliotecas almacenadas. Por que la forma del espectro UV es dependiente en las condiciones experimentales bajo las cuales fueron obtenidas, sin embargo, es poco probable que bibliotecas de estándares estén disponibles comercialmente.

Otra característica del PDA es la capacidad para determinar la homogeneidad en los picos. Para determinar la homogeneidad en los picos se usa el algoritmo del software para comparar el espectro del compuesto en el punto máximo del pico con el espectro obtenido con otros puntos del pico. En general, la homogeneidad del pico da lugar a la pureza en el pico.

4.3. *CUANTIFICACIÓN.*

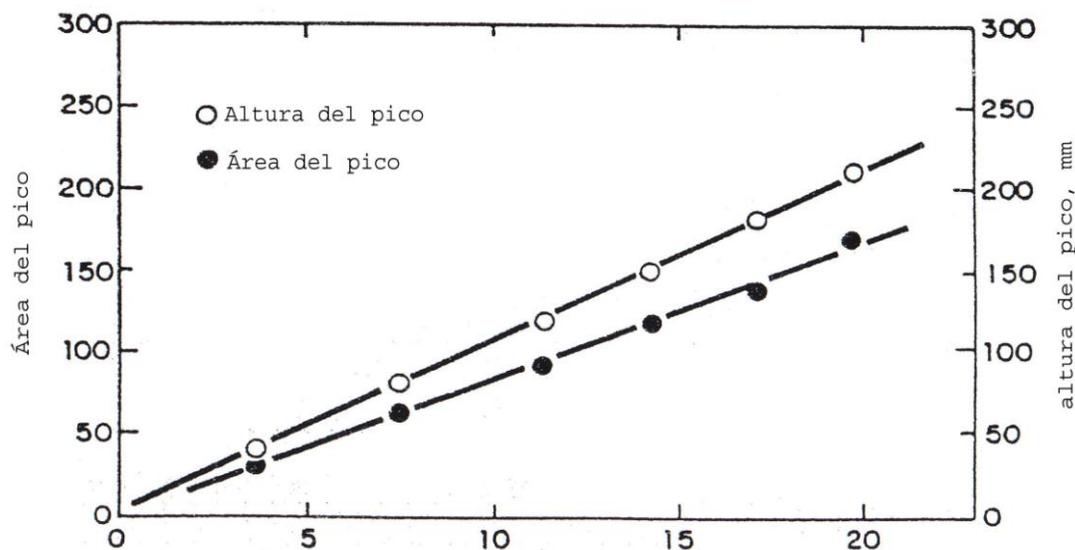
El otro propósito de la medición de los picos es determinar la cantidad de soluto. Aunque la técnica analítica del HPLC es altamente precisa, el resultado cuantitativo depende completamente del proceso de análisis, desde la preparación de la muestra, por el proceso de separación y de detección de la señal, y de la interpretación de los resultados. Hay muchas fuentes de error en la técnica de la cuantificación usando la cromatografía.

4.3.1. Integración.

Los pasos de la integración consisten en convertir la señal del detector en datos numéricos. Debido a que la señal del detector está en la forma de un cromatograma de un registrador de papel continuo, un integrador o una computadora, es necesario convertir el área del pico, el punto máximo, en números de manera manual o de forma electrónica.

La medida del punto máximo del pico, aunque sea una aproximación, puede ser realizada con una buena exactitud y es más simple que realizar la medida del área del pico. Se prefiere a menudo la reducción manual de datos por que es simple y rápida. Además, se necesita menos resolución de los componentes para cálculos precisos. Sin embargo, los puntos máximos de los picos son más susceptibles a variaciones en las condiciones de separación, como la temperatura y envejecimiento de la columna, que las áreas de los picos y los resultados no son tan precisos como los obtenidos por la medición de las áreas de los picos.

Existe una gran variedad de factores que influyen en la exactitud del análisis cuantitativo. Ruido en forma de alteraciones en la línea base y arrastres en la línea base, que afecta más al área que a la altura del pico, puede causar pérdida en el área al final de los perfiles de subida y bajada de los picos donde son más anchos. La asimetría de los picos y la saturación del detector o la no linealidad, sin embargo, se tienen más efectos perjudiciales en los picos máximos. En la siguiente figura se muestra una curva de calibración comparando la medición de la altura del pico máximo con la medición del área del pico (figura 4.1).



Calibraciones de la altura y del área del pico para una muestra de un antioxidante.

Figura 4.1

4.3.1.1. Métodos manuales.

La mayor desventaja de los métodos manuales es que la exactitud de cada medición depende del desarrollo individual de los cálculos y en donde las tangentes y líneas bases fueron dibujadas, que pueden diferir de un pico con el próximo dentro del análisis. Si se usa un registrador de papel continuo, todos los picos estarán contenidos en el papel. Esto limita severamente los rangos dinámicos de la composición del soluto que puede ser analizada.

a. Picos máximos.

Los picos máximos son medidos desde la línea base a la cúspide del pico. Cuando la línea base es muy inestable, la línea base debe de ser interpolada desde el principio hasta el fin del pico. Los picos máximos no deben de usarse en picos deformes (figura 4.2).

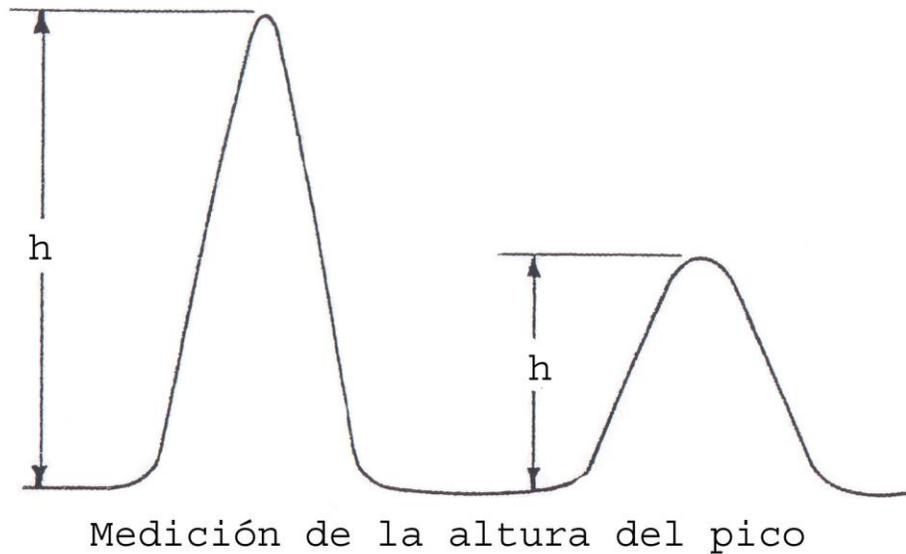


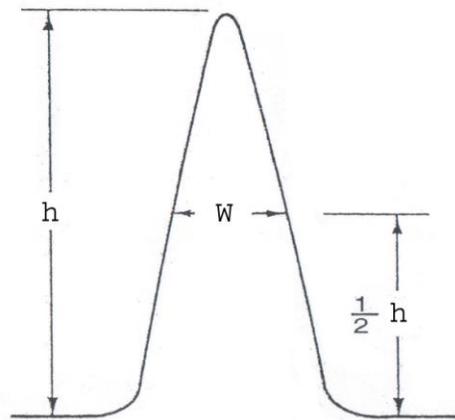
Figura 4.2

b. Área del pico.

Los métodos manuales para convertir el área de la señal del detector en datos numéricos han incluido históricamente (1) la planimetría¹, (2) tomando el producto de la altura y del ancho del pico en la mitad de la altura y (3) triangulación. De estos métodos el segundo es el más utilizado.

El producto de la altura y del ancho del pico en la mitad de la altura solo debe de usarse para picos simétricos. En este método el área se aproxima por la multiplicación de la altura por el ancho del pico en la mitad del pico. El ancho en la mitad del pico se utiliza en vez del ancho en la base del pico para reducir errores, resultado de sesgos en el pico o irregularidades en la línea base. La exactitud de este método está afectada por la medición del ancho del pico y al contrario con un pico estrecho puede afectar la precisión. El valor numérico obtenido por esta aproximación solo representa el 93.9% del área real (figura 4.3).

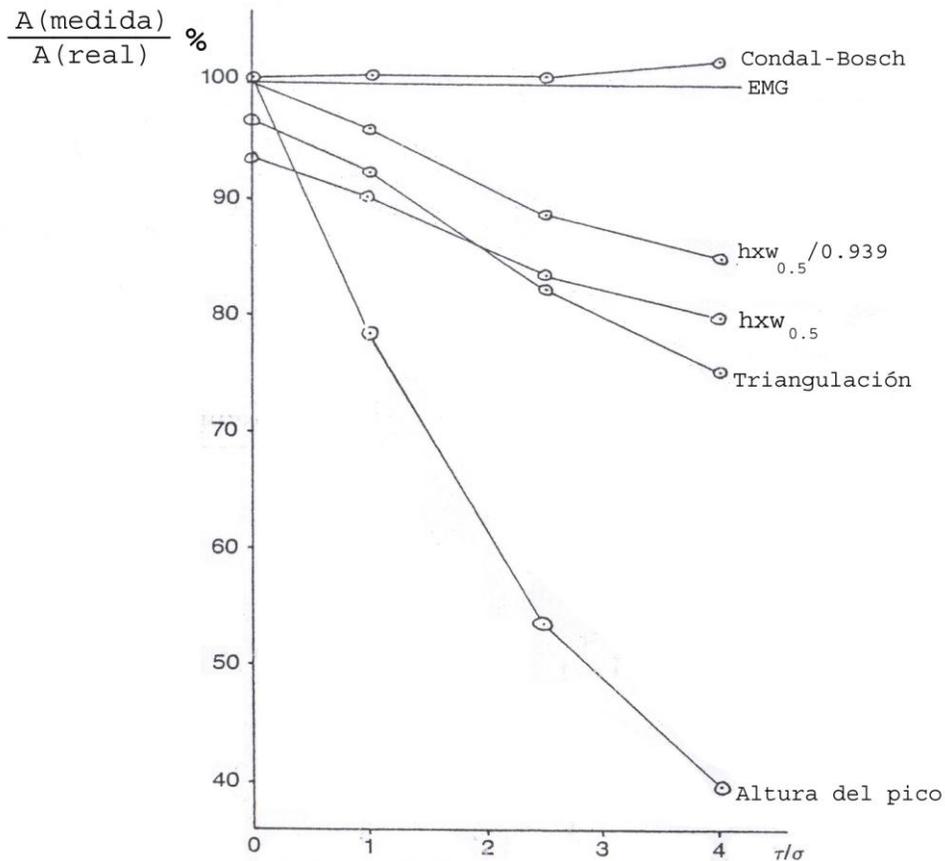
¹ Planimetría es la medición de superficies planas.



Medición del área usando la altura total y la altura media del pico

Figura 4.3

Para determinar manualmente las áreas de los picos hay dos métodos más modernos y exactos que son el método de Condal-Bosch y la ecuación de Foley para la medición manual de picos asimétricos. De acuerdo a la figura 4.4 con los picos máximos demuestran mayor sensibilidad a la forma del pico, que llega ser progresivamente más inexacta con el aumento de la asimetría. El método de triangulación es más exacto que la medición del ancho en la mitad de la altura para picos con formas simétricas, pero se vuelve el método menos exacto cuando incrementa la asimetría en el pico.



Efectos de los picos asimétricos con mediciones manuales

Figura 4.4

La medición del área por Condal-Bosch usa el promedio de los anchos de los picos al 15% y 85% de la altura del pico, en lugar del ancho en la mitad de la altura, produciendo un resultado que es 100.4% del área real (figura 4.5). El uso de este método requiere más mediciones manuales que otros métodos. Después de que han sido medidos el ancho del pico al 15% y 85%, así como la altura del pico, el área del pico se calcula de la siguiente forma:

$$A = h \frac{(w_{0.15} + w_{0.85})}{2}$$

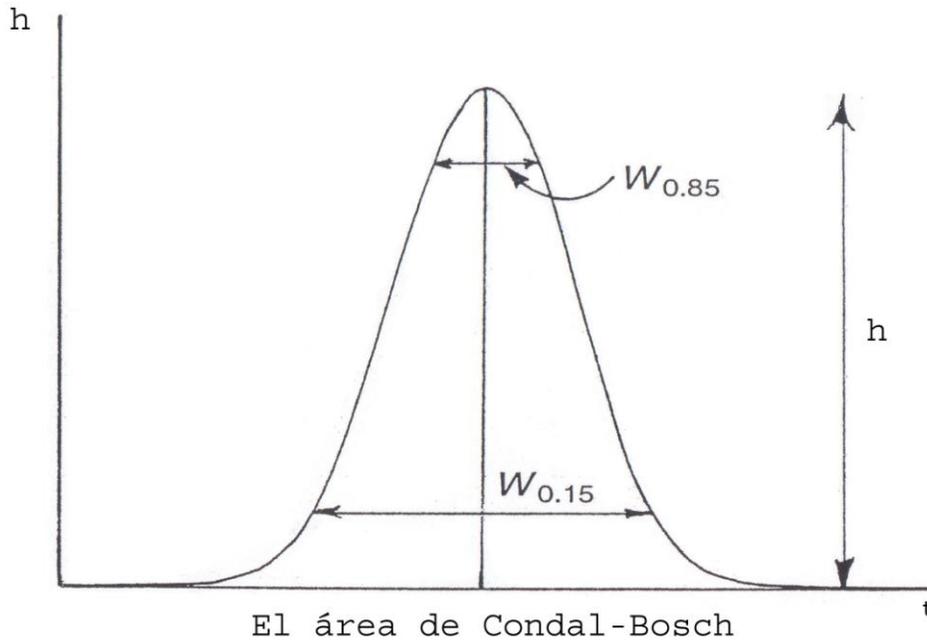


Figura 4.5

La ecuación de Foley para la medición del área de picos asimétricos definidos no requiere medición de asimetría y también es aplicable para picos simétricos. Requiere menos mediciones que en el cálculo de Condal-Bosch y es más exacto para las mediciones de picos simétricos. Con la aproximación de Foley, el ancho es medido al 25% de la altura del pico (figura 4.6) y el valor de la medición es usado para calcular el área del pico de acuerdo a la ecuación de Foley:

$$A = 0.753(h \cdot w_{0.25})$$

El área calculada por este método es el 100.3% del área teórica real para picos simétricos.

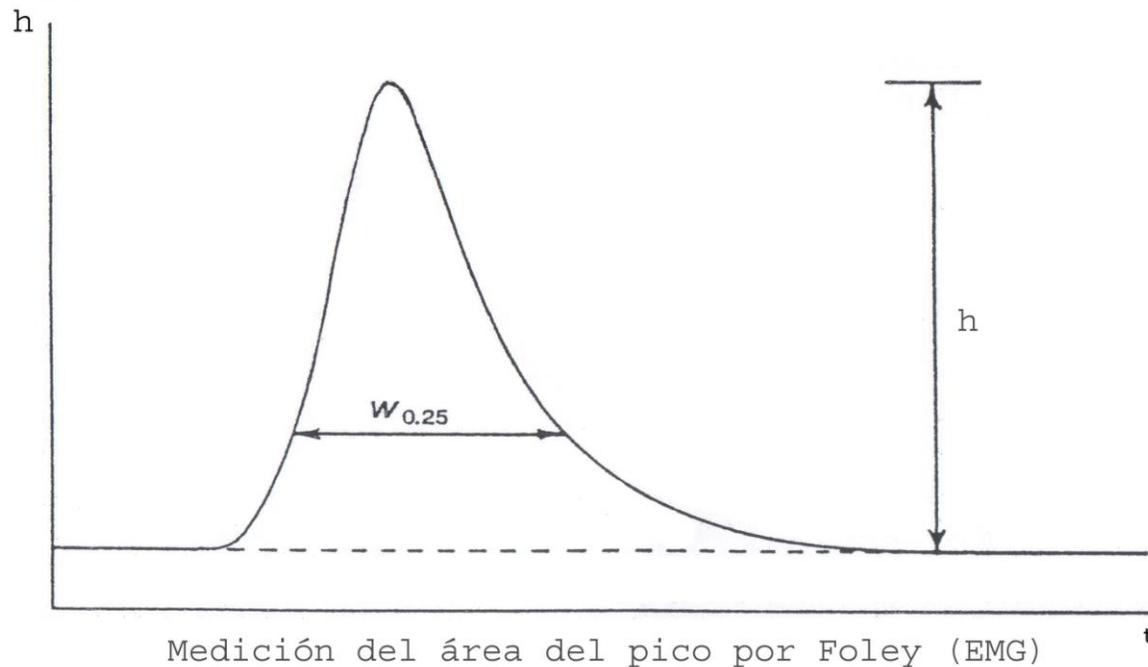


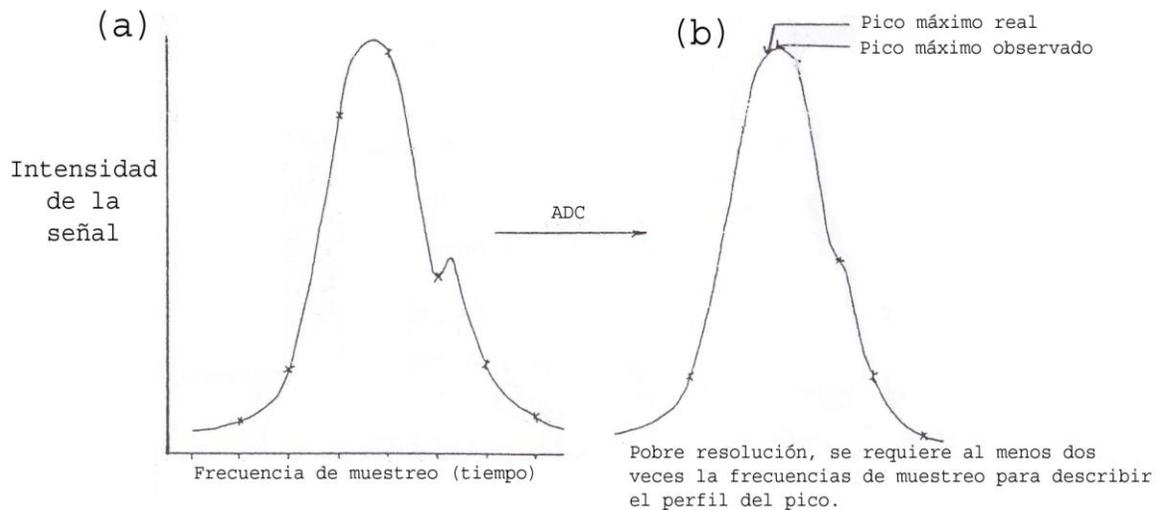
Figura 4.6

4.3.1.2. Dispositivos Electrónicos.

Las mediciones más exactas de las áreas de los picos son aquéllos obtenidos por medio de la reducción de datos electrónicos con computadoras. La inmensa mayoría de laboratorios utilizan métodos electrónicos para determinar las áreas de los picos. Se requieren dos características principales para el proceso electrónico de los datos cromatográficos: digitalización exacta de la señal analógica y el software. El software es requerido para las siguientes aplicaciones: detección de picos, corrección de la línea base, el cálculo del área del pico, retención de tiempos y concentraciones de componentes en la muestra y para la realización del reporte final.

La señal analógica del detector es convertida en datos binarios requeridos para la interfaz de la computadora, la cual incluye amplificación y atenuación de la señal y un convertidor analógico-digital (ADC). Un ADC analiza la señal analógica a una frecuencia fija lo suficientemente grande para que el pico se describa con exactitud. Por lo menos 10 puntos por segundo son aceptables

para la mayoría de los procesos de cromatografía y más si tiene doble pico, de lo contrario el detalle se perderá (figura 4.7).



Efecto en la resolución del convertidor analógico digital en la frecuencia de muestreo. (a) Gráfica analógica (b) Representación digital

Figura 4.7

La mayoría de los integradores y sistemas de adquisición de datos tienen software programado para los cálculos de rutinas estándar. Antes el área podía ser calculada, sin embargo, el software debe reconocer la presencia de un pico, así el algoritmo de detección de picos se escribe para supervisar un umbral predeterminado encima de la línea base. Una vez el umbral es superado, la supervisión del pico comienza.

Durante algunas separaciones cromatográficas, la línea base puede fluctuar en dirección positiva o negativa y exceder el umbral. La corrección de algoritmos son incorporados en el software para ajustar la fluctuación de la línea base y asegurar cálculos óptimos del área del pico. La susceptibilidad de la pendiente puede ponerse para distinguir entre el comienzo del pico y el comienzo de la inclinación de la línea base. La medición apropiada de las áreas de los picos requiere de atención especial para estas opciones de medición, pero cuando se hacen correctamente, el error asociado con la medición debe de ser de menos del 1%. Habiendo puesto los parámetros en el software para la detección del

pico, el pico puede ser integrado y el área del pico determinada. El área entre los límites es integrada usando un algoritmo de sumas que pueden ser basadas en cualquier número de algoritmos, como la integración trapezoidal.

4.4. CÁLCULOS.

La integración de un pico es simplemente el primer paso en la manipulación de los datos para la determinación de concentraciones de componentes en una muestra. La realización de la integración del pico es para convertir la señal del detector en datos numéricos. Hay cuatro técnicas principales para determinar la información de la composición relativa acerca de la muestra, todas estas técnicas se basan en la construcción de curvas de calibración. Estos métodos son normalización, el método de los estándares internos, el método de estándares externos y el método de adición de estándares.

Una curva de calibración es un modelo usado para predecir el valor de una variable independiente, la concentración del analito, cuando solo la respuesta analítica de la variable dependiente es conocida. El procedimiento normal usado para establecer una curva de calibración esta basada en ajuste lineal por mínimos cuadrados.

$$Y = mX + b$$

La regresión esta definida como la relación entre dos o más variables correlacionadas y la lineal indica la relación entre dos variables lineales. La mayoría de los analistas químicos prefieren curvas de calibración lineal, por que los datos son mas fáciles de interpretar que las curvas no lineales.

4.4.1. Normalización.

En el método de normalización, es supuesto que todos los componentes de la muestra han sido eluidos y detectados. Sin embargo, incluso cuando esta suposición es invalida, el método de normalización siempre lleva al total que

representa el 100%. En esta técnica, el área de cada pico es medida y sumada. El área de un pico individual, X, se expresa en porcentaje el total del área del pico.

$$X\% = \frac{A_x}{(A_x + A_y + A_z)} \times 100$$

Donde A_x , A_y , y A_z representan la absorbancia de los analitos X, Y, y Z respectivamente. La aproximación de la normalización puede ser útil cuando se analizan mezclas complejas. Sin embargo, debido a que la respuesta del detector no es la misma para todos los componentes de la muestra, las áreas relativas de los picos no necesariamente representa la verdadera composición de la muestra. Por lo tanto, un factor de respuesta para cada componente es necesario para la normalización. Los factores de respuesta se calculan con respecto a los compuestos a usar.

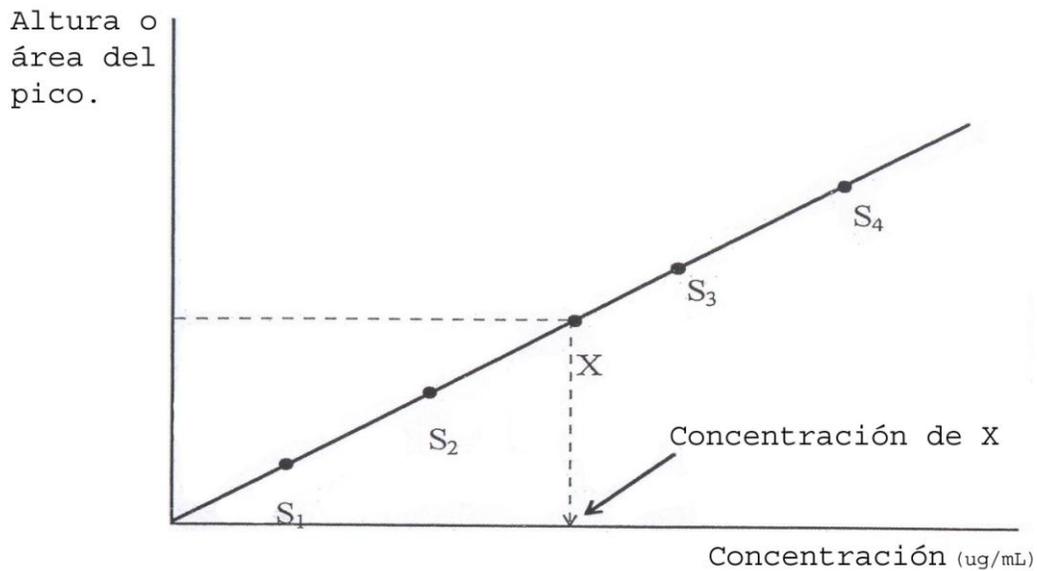
$$F_x = \frac{F_r A_r W_x}{A_x W_r}$$

Donde A_x es el área del soluto, A_r son las referencias de los picos, W_x es la concentración del soluto, W_r son las referencias de los picos y F_r es el factor de respuesta asignada al compuesto de referencia. La corrección del área se obtiene de multiplicar el área del pico A_x , por el factor de respuesta relativo del pico F_x . Aunque los factores de respuesta se pueden calcular de una sola medición, es aconsejable usar un método de calibración. Con el método de calibración, un mínimo de tres diferentes concentraciones de soluto es graficado contra la respuesta del detector y la mejor línea recta se dibuja entre ellas. La pendiente de la grafica es el factor de respuesta.

4.4.2. Método de Estándar Externo.

El método de estándar externo puede aplicarse de varias maneras. El método opera bajo el mismo principio pero varía en la cantidad de trabajo requerido y

por consiguiente en la exactitud de los resultados. En todos los casos, las soluciones estándares contienen preparado el soluto de interés, preferentemente con tres diferentes concentraciones conocidas. Las soluciones estándar son entonces analizadas y el área de grafica como puntos de calibración contra concentración es construida para cada soluto, como se muestra en la figura 4.8. De las curvas de calibración, las concentraciones desconocidas de solutos en las muestras pueden ser determinadas.



Curva de calibración para uso de estándar externo

Figura 4.8

En un caso simple, los estándares son corridos una sola vez antes de la corrida de las muestras, en orden para la construcción de la curva de calibración. Todas las muestras son entonces corridas consecutivamente, y son calculadas las concentraciones de los solutos de interés. Esta aproximación se utiliza para investigaciones y desarrollos de laboratorio, donde las identificaciones de los solutos en las muestras cambian regularmente.

4.4.3. Método de Estándar Interno.

Los estándares internos son usados para corregir errores en la preparación de la muestra o en la introducción de la muestra y ayudar en la recuperación de un soluto determinado.

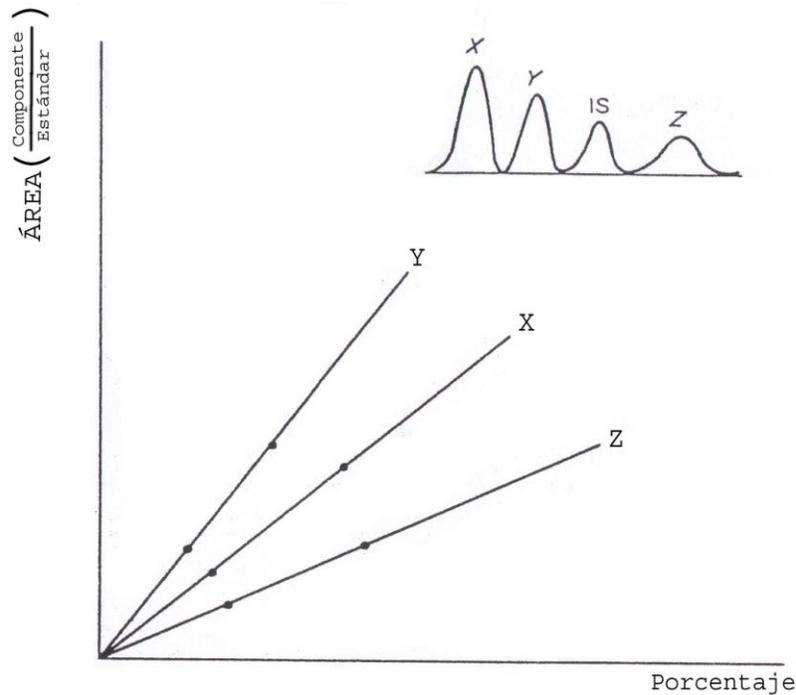
Son adicionados a la muestra en un punto de introducción fácilmente determinable en el proceso de análisis. Las soluciones estándar que contienen los solutos de interés son preparadas, preferentemente a dos o tres diferentes concentraciones conocidas pero con una constante de concentración del estándar interno. La misma concentración del estándar interno es también adicionada a cada muestra. Todos los estándares y muestras reciben el mismo tratamiento de preparación, también de introducción, proceso de separación y detección de la muestra.

La selección del estándar interno para su uso en un procedimiento analítico es importante y debe ser hecho cuidadosamente para evitar la introducción de más errores. Los requerimientos para el estándar interno son los siguientes:

- (1) No debe ser un constituyente normal de la muestra.
- (2) Debe ser completamente resuelto de todos los solutos en la muestra.
- (3) Debe eluir muy cerca del soluto de interés.
- (4) Debe ser adicionado a una concentración que de un área de pico similar al soluto de interés.
- (5) Las propiedades físicas y químicas del estándar interno deben parecerse a aquellos del soluto de interés.
- (6) No debe reaccionar con ninguno de los componentes de la muestra.
- (7) Debe comportarse de manera similar a los otros solutos de interés durante la preparación de la muestra.
- (8) Finamente, debe ser de alta pureza.

Las curvas de calibración son construidas usando soluciones estándar, como se muestra en la figura 4.9, para graficar la relación de la respuesta del detector (el área del pico o la altura del pico) para cada soluto relativo del estándar interno

contra la concentración del soluto. La relación del área del pico para cada componente en la muestra puede ahora calcularse, y de esta relación la cantidad de cada componente en la muestra puede determinarse.



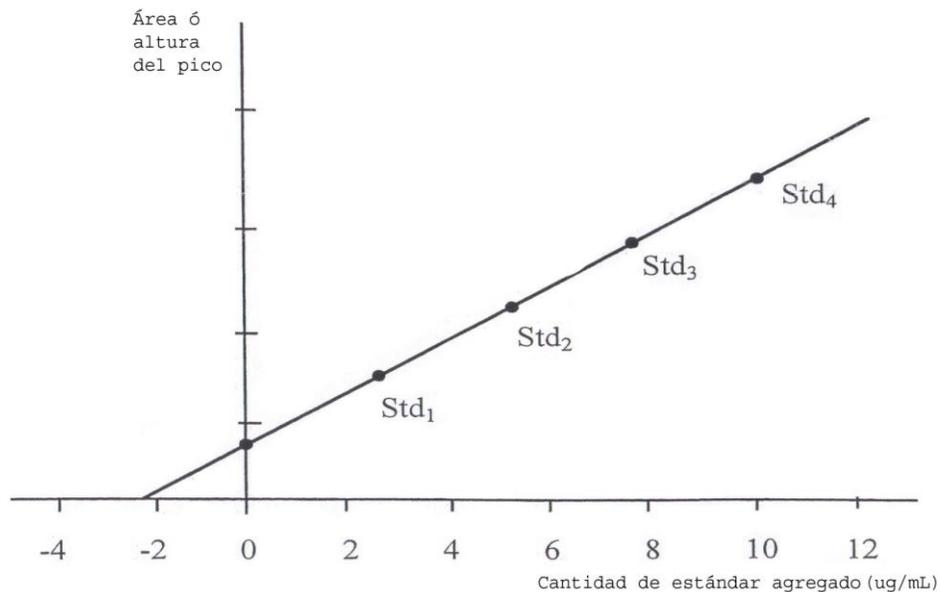
Curva de calibración para uso de estándar

Figura 4.9

4.4.4. Método de Adición de Estándares.

El método de adición de estándar es el menos usado para la cuantificación, pero es usado para asegurar que los estándares de calibración experimentan los mismos efectos que los componentes de la muestra. En este método, la muestra es analizada primero para estimar la concentración del soluto o solutos de interés. Diferentes concentraciones del soluto de interés son agregados a la muestra, para proporcionar incrementos en la respuesta del detector. Cada porción de la muestra se vuelve a analizar. El principio del método es que la señal extra producida por la adición de los estándares es proporcional a la señal original. Este método solo es aplicable cuando ha sido establecida la relación entre la respuesta del instrumento y la concentración del analito. Para determinar la concentración de la muestra original, la respuesta del detector se

gráfica contra la concentración de las adiciones estándares, como se ilustra en la figura 4.10. De la gráfica, la señal está presente cuando no se ha agregado ningún estándar; representando la concentración original de la muestra, que debe ser determinada. Para encontrar la concentración original, la línea recta se extrapola a la abscisa (eje de X); el valor absoluto en la abscisa es la concentración original. Actualmente el uso de la adición de estándar no es tan simple, puesto que la introducción de estándares aumentará el volumen de la muestra. Aunque esta aproximación se enfoca al problema de la matriz de muestra, su desventaja principal es que la concentración de los componentes de la muestra es determinada por extrapolación, en lugar de por interpolación, haciendo este método menos preciso que otros métodos de la calibración.



Curva de calibración para uso de adición de estándar.

Figura 4.10

4.5. MANEJO DE DATOS ESTADÍSTICOS.

En todas las mediciones hay errores que pueden ser determinados o indeterminados. Los errores indeterminados son errores del azar que no pueden eliminarse y es inherente en la técnica analítica. Cuando se minimizan errores

indeterminados (estandarizando la técnica), es posible obtener una precisión alta. Los errores de determinados son errores cuya causa y magnitud puede determinarse. Si los errores determinados se minimizan, es posible obtener una exactitud alta. Los errores de determinados incluyen:

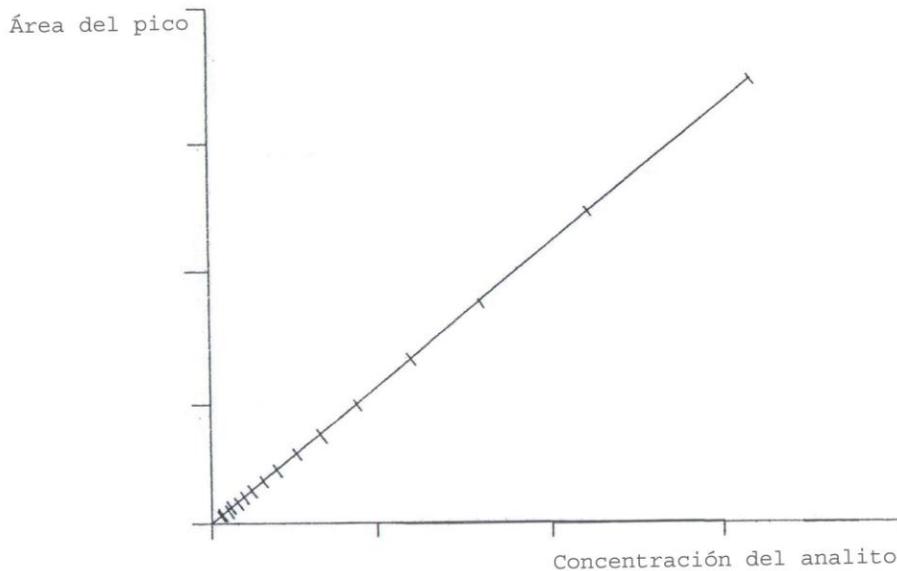
- (1) Pobres técnicas de muestro.
- (2) Descomposición de la columna.
- (3) Cambios en la respuesta del detector.
- (4) Bajo desempeño del registrador de datos.
- (5) Errores de cálculo.
- (6) Prejuicios o errores del operador.

Con el uso creciente de medios electrónicos para la reducción de los datos y el uso de computadoras para generar curvas de calibración, muchas de las consideraciones del proceso han sido eliminadas del manejo estadístico de datos de la cromatografía.

La última posible fuente de errores determinados es en las gráficas y en la interpretación de la curva de calibración. La inspección visual es a menudo el primer método para determinar la linealidad. Además, la mayoría del software que realiza el cálculo de los mínimos cuadrados también calcula el valor del coeficiente de correlación. El coeficiente de correlación no es una medición del cambio cuantitativo en una variable con respecto a otra, sino una medición de la intensidad de asociación entre las dos variables. Como tal, el coeficiente de correlación puede dar un grado alto de relación entre las variables, pero el modelo puede dar un ajuste inadecuado. Así, un coeficiente de la correlación de +1 necesariamente no debe interpretarse como una correlación absolutamente lineal.

Mientras que los límites de detección disminuyen y las curvas de calibración se generan para los rangos de concentración más anchos, se debe tener cuidado durante la evaluación de las curvas para la linealidad. Cuando se generan

curvas de calibración sobre un rango de concentración muy amplio, es común que para la mayoría de los puntos se sitúen en la parte más baja de la curva de la calibración, como se ilustra en la figura 4.11. Así, aunque la curva puede parecer ser lineal, es difícil de determinar linealidad visualmente al extremo más bajo de la escala de la concentración.

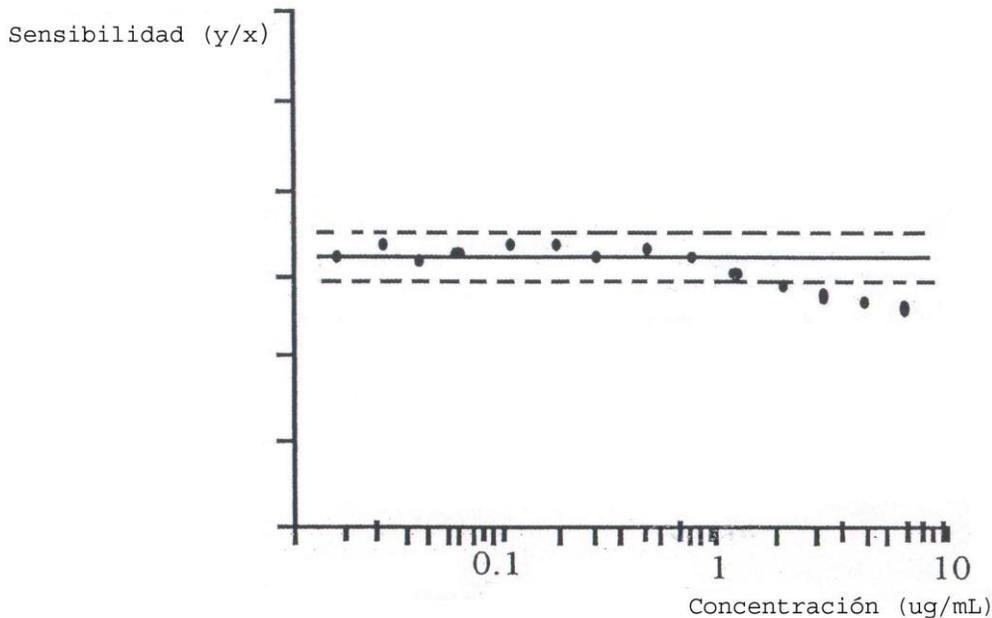


Curva de calibración que cubre una amplio rango de la concentración.

Figura 4.11

Como una aproximación adicional para determinar la linealidad de las curvas de calibración que miden un amplio rango de la concentración, es volver a graficar las curvas en una escala logarítmica. Aunque esta aproximación hace que los puntos en la parte mas baja de la escala de la concentración sean fáciles de observar, los datos son desplegados en un sistema no lineal el cual distorsiona los patrones que existen en la escala lineal. La tendencia, sin embargo, es interpretar la curva que usa una escala lineal; así que las curvas logarítmicas son mal interpretadas.

Hay varias aproximaciones disponibles para probar la linealidad de una curva de calibración, pero probablemente el más eficaz es la gráfica de linealidad. Una gráfica de linealidad es un procedimiento simple por determinar el rango del funcionamiento lineal de una curva de calibración que es obtenida trazando la "sensibilidad" a cada gráfica de calibración contra la concentración normal como se ilustra en la figura 4.12.



Gráfica de linealidad para determinar el rango de trabajo de una curva de calibración

Figura 4.12

La sensibilidad es calculada dividiendo la respuesta analítica de cada punto en la curva por la concentración. Se traza una línea recta a través de los puntos. Las dos líneas punteadas paralelas en la figura que pasan sobre y por debajo de la línea representan los límites superior e inferior de los errores aceptables para el análisis, y estos límites se ponen en la gráfica para ilustrar el rango aceptable del funcionamiento lineal. Si todos los puntos quedan dentro de los límites, todos los datos son considerados lineales dentro de los límites aceptables.

En la figura, la curva sería considerada lineal cerca de dos órdenes de la magnitud. Incluso con este acercamiento, sin embargo, sigue habiendo errores potenciales. Si la curva de calibración para los datos tiene un valor significativo en el intercepto en Y, los puntos de referencias deben de estar fuera de los límites de la curva de linealidad puede caer dentro de límites aceptables. Este error puede ser tratado restando el valor del intercepto en Y de cada uno de los puntos de referencias antes de calcular la sensibilidad.

La tentación de permitir que los sistemas de datos determinen las linealidades de las curvas de calibración sobre la base del valor del coeficiente de correlación solamente tiene el potencial de introducir errores determinados en la cuantificación cromatográfica.

5. MANTENIMIENTO A EQUIPOS HPLC.

5.1. INTRODUCCIÓN.

Como sucede con todo instrumento, para asegurar la fiabilidad de un sistema de HPLC es necesario prestar atención a diversos aspectos del equipo y a su modo de empleo. La negligencia de cualquier parte del sistema puede invalidar los resultados del análisis. Para conseguir que un instrumento dé resultados fiables es imprescindible evitar que la contaminación se concentre en los componentes principales, lo cual depende a su vez de la naturaleza de los materiales de ensayo que se analizan, y en el caso de algunas aplicaciones puede ser el factor más importante para la calidad analítica. Además, la experiencia en este tipo de instrumentación como sistema total es insustituible. Una parte importante del procedimiento de comprobación consiste en la vigilancia continua, especialmente de los cromatogramas y parámetros instrumentales, por parte de especialistas en cromatografía experimentados.

Por tanto hay que reconocer que el mantenimiento ha de ser una tarea compartida entre el personal del servicio técnico de la empresa fabricante de todo el sistema instrumental y los usuarios de los componentes expuestos a los materiales de ensayo, que sufren un deterioro como consecuencia del uso y necesitan frecuentes cuidados entre las visitas del servicio técnico. El personal de este servicio, que dispone de información sobre el producto y de herramientas, es el más capacitado para mantener y reparar eficientemente los componentes electrónicos. Sin embargo, los usuarios se ven obligados con frecuencia a reparar fallos cuando es imposible conseguir los servicios del personal de mantenimiento o cuando estos fallos se repiten y los usuarios se familiarizan con el modo de resolverlos. Es preciso que los usuarios elaboren su propio programa de mantenimiento para los componentes del sistema que entran en contacto con materiales de ensayo o que están sujetos a deterioro.

5.2. CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTA PRESIÓN (HPLC).

La HPLC es una técnica que exige atención constante para mantener una sensibilidad y separación óptimas. Las bombas pueden dañarse, las columnas bloquearse y deteriorarse y los detectores contaminarse, lo que redundará en un flujo bajo, una presión inversa alta, absorbencia de fondo e interferencias. Durante el proceso de cierre hay que tener cuidado para que no entre en el sistema ninguna materia extraña.

Los componentes del sistema de HPLC a los que hay que prestar atención sistemáticamente son la bomba, la columna del sistema de inyección, los detectores y los disolventes.

5.2.1. Bomba.

La función principal de la bomba de HPLC es proporcionar un flujo continuo de fase móvil a la columna de separación a una presión constante. Las piezas principales de la bomba aspirante e impelente son los pistones, los cierres de los pistones y las válvulas de retención, el motor y las levas de la barra impulsora. Antes de su uso diario, hay que comprobar si el flujo de la bomba es constante. Si se observa que el flujo es débil o intermitente, hay que introducir en el sistema disolvente desgasificado para eliminar el aire atrapado, limpiar a fondo las válvulas de retención y, si está ajustado, comprobar el correcto funcionamiento del regulador de impulsos. Cuando se sustituyen los cierres y las válvulas de retención, hay que actuar con cuidado para no dañarlos apretando excesivamente las piezas. El valor de la columna bombeada deberá ser preciso. Sin embargo, sólo ha de ser exacto cuando el analista instala y valida un sistema analítico. Una vez validado el sistema, lo único que importa es la precisión del flujo. Se comprobará la columna bombeada a intervalos periódicos fijando la bomba en un volumen dado y pasando el disolvente bombeado a un cilindro u otro aparato de medición.

5.2.2. Columnas.

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

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

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

5.2.3. Detectores.

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

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

5.2.4. Fase móvil.

Lo ideal sería preparar las fases móviles cuando fueran necesarias a partir de un tipo conocido de disolventes de calidad HPLC y filtrarlas con un filtro de 0,45 micras para eliminar cualquier materia sin disolver. A continuación se desgasifica la fase móvil utilizando helio o técnicas ultrasónicas y se evalúan las impurezas haciendo pasar el nuevo disolvente por el sistema de HPLC y midiendo cualquier interferencia de fondo a las longitudes de onda de la detección. Esto puede resultar problemático cuando se utiliza acrilonitrilo con detección UV.

Todos los disolventes se conservarán de modo que se evite la contaminación con partículas transportadas por el aire y la contaminación atmosférica con

contaminantes como dióxido de carbono, cloruro de hidrógeno, cloro y compuestos volátiles de azufre. También debe evitarse cuidadosamente la formación de productos inestables de reacción (por ejemplo peróxidos en el tetrahidrofürano una vez eliminados los estabilizadores durante la redestilación).

5.3. RENDIMIENTO Y CALIBRACIÓN DE LOS INSTRUMENTOS.

A continuación se indican las técnicas de evaluación del rendimiento y calibración para algunos instrumentos analíticos utilizados:

5.3.1. Columnas.

El rendimiento y la calibración de las columnas varían según con los componentes que se separan y miden. Sin embargo, de ordinario la calibración puede realizarse utilizando compuestos puros y midiendo distintos parámetros, como el tiempo de elución, la desviación de la resolución y el número de platos teóricos.

El tiempo de elución¹ se calcula como el tiempo transcurrido entre el punto medio del pico eludido y el frente del disolvente. Si no se observa ningún frente de disolvente, el tiempo de elución puede calcularse como el tiempo transcurrido entre el punto medio del pico eludido y el punto de inyección. Las columnas deben mantenerse a temperatura constante si se quiere evitar que varíen los tiempos de elución.

La asimetría del pico eludido proporciona información sobre las condiciones de la columna y el estado del filtro en la cabeza de ésta. Un pico asimétrico puede deberse al excesivo número de sitios activos, a la desactivación de la columna, a la formación de un túnel dentro de ésta, a un flujo demasiado rápido o a la

¹ Elución es el proceso cromatográfico basado en un solvente para extraer una sustancia adsorbida en un medio sólido adsorbente.

utilización de un disolvente inadecuado. La asimetría del pico eludido se calcula midiendo las distancias entre el punto medio del pico y la posición de la traza a cada lado del punto medio a mitad de la altura del pico. En el caso de una configuración gaussiana del pico, las distancias serán idénticas.

5.3.2. Detectores.

En los detectores UV/visible, el fabricante suele preestablecer las longitudes de onda en 254 nm y 360 nm, pero se puede utilizar la absorción en esas longitudes de onda para comprobar el deterioro de la lámpara UV. Cuando se utilicen detectores de longitud de onda variable, se comprobará que el cambio de lámparas de deuterio a lámparas de tungsteno (habitualmente a unos 320 nm) se realiza sin problemas.

Los detectores del índice de refracción pueden comprobarse con una disolución de una sustancia adecuada, como por ejemplo un 0,1 por ciento de glucosa para el análisis de azúcares.

Los ingenieros del mundo, médicos y científicos, están uniendo fuerzas para conceptualizar, desarrollar y hacer realidad las herramientas y tratamientos del futuro en los cuidados de salud del siglo XXI a través de la integración de los conocimientos de sus distintos campos de acción y conocimiento; ejemplos como: bombas de nanopartículas para eliminar células cancerosas, puentes del tamaño de moléculas para reparar corazones, y técnicas de cirugía sin cicatrices, son ahora la frontera de innovaciones médicas que gracias a la ingeniería se pueden realizar.

La finalidad de esta unión de esfuerzos encaminada a una investigación organizada, es el de mejorar los cuidados de salud por medio de nuevas herramientas, tecnologías y medicinas. En el caso de este trabajo de tesis se trata de la integración de dos disciplinas académicas profesionales que cada vez más comparten metas comunes como el de traducir ideas creativas en productos en medicina clínica que transformarán el cuidado de pacientes.

Dado que un problema de salud como lo es el de la diabetes se ha ido incrementando año tras año, su detección y tratamiento se han vuelto de vital importancia. Si bien los tratamientos que se tienen que llevar al cabo deben ser indicados por médicos especialistas, la manera o métodos a seguir, empleando la tecnología moderna con la que se cuenta, son, en la mayoría de los casos, vigilados o supervisados por ingenieros interesados en los problemas de salud. El método de la medición de la hemoglobina glicosilada es sólo un ejemplo de la aplicación de ésta nueva filosofía de trabajo para beneficio de la salud del ser humano; si bien la parte médica queda perfectamente definida, es nuestra obligación como ingenieros interesados en la salud, el mantener en condiciones óptimas de funcionamiento el equipo de medición (bombas, columnas, detectores, ...), así como poner atención en el rendimiento y calibración de los instrumentos sin olvidar en ningún momento el respeto y seguimiento que se tiene que hacer de las normas establecidas, que en ésta materia, se tienen vigentes y que no tienen otro objetivo que el de asegurar la aplicación de los procedimientos y detección, diagnóstico y control del enfermo diabético con base en los criterios científicos y tecnológicos más avanzados y factibles en el país.

Si bien el objetivo de este trabajo de tesis es el de dar una descripción detallada de uno de los métodos que se tienen disponibles para detección y control de la diabetes, se obtiene como un valor adicional una muestra de unión de dos ramas del conocimiento que en campos distintos tiene el mismo objetivo, el bien común, en este caso la salud.

1. GLOSARIO:

Diabetes. Enfermedad metabólica producida por deficiencias en la cantidad o en la utilización de la insulina, lo que produce un exceso de glucosa en la sangre.

Hemoglobina glicosilada. Muestra el nivel promedio de azúcar (glucosa) en su sangre en las últimas seis a ocho semanas.

Glucemia. Es la medida de concentración de glucosa en el plasma sanguíneo.

Hematies. Glóbulos rojos, son las células sanguíneas que contienen en su interior la hemoglobina.

Fase lábil. Proteínas que no son durables.

Cromatografía. Método de análisis químico para la separación de los componentes de una mezcla por distribución entre dos fases, una estacionaria y otra móvil, que en un principio se utilizó para separar sustancias coloreadas.

Adsorción. Es un proceso por el cual átomos, iones o moléculas son atrapados o retenidos en la superficie de un material.

Corrida de gel. Aplicación del campo eléctrico a las muestras embebidas en un gel de separación o en capilar, gracias al cual se van a separar de acuerdo a su carga neta peso molecular punto isoeléctrico dependiendo del tipo de gel.

Buffer. Es una o varias sustancias químicas que afectan la concentración de los iones de hidrógeno (o hidrogeniones) en el agua, un "buffer" (o "amortiguador") lo que hace es regular el pH.

pH. Es la concentración de hidrógenos presentes en determinada sustancia, es un indicador de la acidez de una sustancia.

Desorción. Es la eliminación de materia desde un medio adsorbente, usualmente para recuperar material.

Cama extendida. Es una capa ligera de material sobre una superficie plana.

Matriz. Es un soporte inerte al cual un ligando puede ser directa o indirectamente acoplado.

Fase estacionaria. Puede ser un sólido o un líquido soportado en un sólido o en un gel (matriz). La fase estacionaria puede ser empaquetada en una columna, extendida en una capa, distribuida como una película, etc.

Fase móvil. Puede ser un líquido o un gas que corre a través de una superficie y de la fase estacionaria.

Elución, eluir, eluidas, eluyen. Quitar una sustancia de otra, generalmente un material fijado por adsorción de una superficie adsorbente, eliminándolo con un solvente.

Nucleótidos. Compuesto orgánico constituido por una base nitrogenada, un azúcar y ácido fosfórico.

Aminoácidos. Compuestos orgánicos a partir de los cuales se construyen las proteínas.

Mezcla cruda. O extracto total, se refiere a que todos los componentes de una muestra están presentes en el medio de separación y/o de extracción. En el caso de hemoglobina: sangre total.

Ligando. Es la molécula que se une reversiblemente a moléculas específicas o grupo de moléculas, capacita la purificación por cromatografía de afinidad.

HPLC. Por sus siglas en inglés High pressure liquid chromatography, Cromatografía Líquida de alta presión.

Trasegado. Cambiar un líquido de un recipiente a otro.

Eluente. Es un disolvente o solución utilizada en el proceso de elución, como ocurre en una cromatografía en columna.

Soluto. Es la sustancia minoritaria en una disolución o, en general, a la sustancia de interés.

Disolvente. Es un líquido en el cual se disuelve otra sustancia, en menor proporción.

Acero inoxidable 316. Ofrece una resistencia a la corrosión ligeramente superior a la de los aceros 302 y 304. Asimismo, tiene mejores características magnéticas. Adecuado para aplicaciones navales, la industria de los alimentos y equipos médicos.

Analito. Es el componente (elemento, compuesto o ion) de interés analítico de una muestra, es decir, el que se desea analizar o determinar.

Sistemas isocráticos. Término utilizado en cromatografía para designar un disolvente o mezcla de disolventes que se utiliza a lo largo de la misma, a diferencia de la cromatografía con gradiente de disolventes.

Ruido. Se refiere a todas las perturbaciones que interfieren sobre las señales transmitidas o procesadas.

Sensibilidad. En un dispositivo electrónico, es la mínima magnitud en la señal de entrada requerida para producir una determinada respuesta en la señal de salida.

Linealidad. Es cuando la magnitud de la salida del sistema es proporcional a la magnitud de la entrada del sistema.

Planimetría. Es la medición de superficies planas.

Bibliografía

1. HAMILTON, R.J. Introduction to High Performance Liquid Chromatography. Chapman & Hall. England. 1977.
2. ANDREA, WESTON. HPLC and CE: Principles and Practice. Academic Press. 1ª Edición. 1997.
3. Stanley, M. Walas. Chemical Process Equipment: Selection and Design. Butterworth-Heinemann. 1ª Edición. 1990.
4. BROWN, Phyllis R. High Pressure Liquid Chromatography: Biochemical and Biomedical Applications. Academic Press. U.S.A. 1973.
5. Schoeff, M.S. Principles of Laboratory Instruments, Mosby: St. Louis, 1993.
6. Willard, H. Instrumental Methods of Analysis, 7th ed., Wadsworth Publishing Co, 1988.
7. M. Stallings, HPLC separation and quantitation of glycosylated hemoglobin A2 as an alternate index of glycemic control.
8. http://www.imss.gob.mx/diabetes/que_es_diabetes.htm.
9. <http://www.diabetes.org.mx>.