



4  
2ej.

# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN

LA MEMORIA DE DESEMPEÑO PROFESIONAL:  
"BUENAS PRACTICAS DE LABORATORIO EN  
CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA  
RESOLUCION"

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA  
P R E S E N T A :  
**M A R I A N A   A R C E   O S U N A**

ASESOR: M. EN C. RENE MIRANDA RUVALCABA

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1997.

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



INSTITUTO NACIONAL  
DE ESTADÍSTICA Y  
CENSO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUITLAN  
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUITLAN



Departamento de  
Exámenes Profesionales

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JAIME KELLER TORRES  
DIRECTOR DE LA FES-CUAUITLAN  
P R E S E N T E .

AT: N: Ing. Rafael Rodríguez Coballos  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

La Memoria de Desempeño Profesional: "Buenas Prácticas de Laboratorio en Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución"

que presenta la pasante: Mariana Arco Osuna  
con número de cuenta: 27541733-3 para obtener el TÍTULO de:  
Química Farmacéutica Biológica

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cuautitlan Izcalli, Edo. de Méx., a 26 de Mayo de 1997

PRESIDENTE	J. Cecilia González Ibarra	
VOCAL	M. en C. Rene Miranda Ruvalcaba	
SECRETARIO	J.F.B. Elia Granados Manriquez	
PRIMER SUPLENTE	M. en C. Efrén Hernández Baltazar	
SEGUNDO SUPLENTE	Q.F.B. Julio C. Botello Pozos	

---

*A tí, Hugo, porque creas ese mundo especial entre nosotros.*

*A tí, papá, mamá, por la persona que supieron formar en mí.*

*A tí, Anicia, Queta, Irma, Horalba, Nico, Rafa y Arcelia, por cada momento juntos trascendiendo distancias.*

---

---

*A quienes han depositado su confianza en mí y no me han permitido defraudarles,  
a aquellos que han invertido su tiempo en mostrarme las maravillas de este mundo y tenido la paciencia de  
enseñarme a explorarlo y disfrutarlo, mis maestros.*

*A esos seres incondicionales que me han regalado la vida a través del tiempo en una mezcla de identidad,  
comprensión, coincidencia e igualdad, mis amigos.*

---

---

**Reconocimientos.**

**Al Área de Metrología de Materiales del Centro Nacional de Metrología, por la autorización para utilizar resultados trascendentes desarrollados en sus instalaciones.**

**Al Profesor M. en C. Rene Miranda Ruvalcaba, por su calidad y visión como maestro y asesor de este trabajo.**

**A mi respetable Jurado: Q. Cecilia González Ibarra,  
Q.F.B. Elia Granados Manriquez,  
M. en C. Efrén Hernández Baltazar,  
Q.F.B. Julio C. Botello Pozos**  
por sus aportaciones y respaldo.

**Al Dr. José Luis Jurado, por su calidad humana y profundas aportaciones durante la revisión de este conocimiento.**

**Al Dr. Yoshito Mitani Nakanishi, por su ingenio, apoyo y paciencia a lo largo de este proceso.**

**Al M. en C. Alejandro Pérez Castorena, por su comprensión.**

**Al Q.F.B. María Inés Nicolás Vásquez, por cubrir los múltiples imprevistos de logística debidos a mi itinerario.**

---

## CONTENIDO

- i.* **Objetivo general.**
- ii.* **Objetivos particulares.**
- iii.* **Abreviaturas.**
- iv.* **Glosario.**

### **1. Introducción.**

#### **2. Sistema Instrumental.**

- 2.1 Generalidades del sistema cromatográfico.
- 2.2 Entrega de disolventes (bombas).
- 2.3 Introducción de muestras (inyectores).
- 2.4 Columnas.
- 2.5 Detectores.

#### **3. Curvas de Calibración.**

- 3.1 Materiales de referencia y reactivos.
- 3.2 Curva de calibración por estándar interno.
- 3.3 Importancia del estándar interno.
- 3.4 Características del estándar interno.
- 3.5 Curva de calibración con estándar externo.
- 3.6 Preparación de las soluciones de calibración.

#### **4. Preparación de Muestras.**

- 4.1 Material y equipo.
- 4.2 Extracción.
- 4.3 Almacenamiento y manejo.
- 4.4 Contaminación de muestras.

#### **5. Conclusiones y Recomendaciones.**

#### **Bibliografía.**

#### **Apéndice.**

## *Buenas Prácticas de Laboratorio en Cromatografía de Líquidos*

### **i. Objetivo general.**

El objetivo de este documento es proponer y documentar una serie de puntos críticos en forma de tablas que pueden ser considerados como una herramienta de apoyo en el desarrollo de procedimientos de buenas prácticas de laboratorio en los sistemas y procesos de medición de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR, o HPLC de sus siglas en inglés) para con éstos formar el Manual de Buenas Prácticas de Laboratorio de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.

### **ii. Objetivos particulares.**

- 1) Dar a conocer y documentar puntos críticos de los sistemas y métodos de medición por cromatografía de líquidos que han surgido de la experiencia en los laboratorios de CENAM y en la de otros grupos o instituciones, así como de revisión bibliográfica [1,2,3,4,5,6,7,10,11,12,21,22].
- 2) Proporcionar la información básica sobre cromatografía de líquidos junto con tablas de puntos críticos que puedan emplearse de apoyo en el desarrollo de el Manual de Buenas Prácticas de Laboratorio en los Laboratorios de Cromatografía de Líquidos.
- 3) Anexar como ejemplos de contenido, algunas partes del Manual de BPL en el Laboratorio de Cromatografía de Líquidos del Centro Nacional de Metrología (CENAM).



**iii. Abreviaturas.**

ABS	Absorbancia.
AEPT	Altura Equivalente a un Plato Teórico.
$W_b$	Ancho de base del pico b.
BPL	Buenas Prácticas de Laboratorio.
CDB	Calorímetro Diferencial de Barrido.
cm	Centímetro.
CENAM	Centro Nacional de Metrología.
K	Coefficiente de distribución o de reparto.
CG	Cromatógrafo de Gases.
CL	Cromatógrafo de Líquidos.
CLAR	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.
EM	Espectrómetro de Masas.
EE	Estándar Externo.
EI	Estándar Interno.
$^{\circ}\text{C}$	Grados Celsius.
g	Gramo.
h	Hora.
=	Igual.
kg	Kilogramo.
L	Litro.
pH	Logaritmo negativo de la actividad del ión hidrógeno.
$\lambda$	Longitud de onda.
+	Más.
$\pm$	Más-menos.
MR	Material de Referencia.
MRC	Material de Referencia Certificado.
MRS	Material de Referencia Secundario.
-	Menos.
m	Metro.
$\mu\text{g}$	Microgramos.
$\mu\text{L}$	Microlitros
$\mu\text{S}$	Microsicismens.
mg	Miligramo.
mL	Mililitro.
min.	Minuto.
nm	Nanómetro.
N	Normal; después de un número, expresa concentración en Normalidad .
N	Número de platos teóricos.
x	Por.
%	Por ciento.
R	Resolución.
k'	Retención o factor de capacidad.
$\alpha$	Selectividad.
PCB	Siglas del idioma inglés de Bifenilos Policlorados.
HPLC	Siglas del idioma inglés de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.

## Buenas Prácticas de Laboratorio en Cromatografía de Líquidos

PAH	Siglas del idioma inglés de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos.
$t_r$	Tiempo de retención.
$t_r'$	Tiempo de retención ajustado.
$t_0$	Tiempo muerto.
UV	Ultra-Violeta.
UV-VIS	Ultra Violeta-Visible.

### ví. Glosario.

**Análito.**- Isótopo (s), elemento (s) o compuesto(s) químicos a ser caracterizados y cuantificados en una muestra.

**Calibración analítica.**- Procedimiento empleado para determinar la relación entre la respuesta de un instrumento y una cantidad de referencia a ser medida, donde dicha referencia es una cantidad conocida de un analito específico en una matriz específica. La respuesta del instrumento es medida en muestras de calibración con un contenido de analito conocido, que cubren el intervalo de medición. Para la comparación entre la respuesta medida y los valores de referencia del contenido de analito, se derivan los parámetros de la curva de respuesta o curva de calibración (ej. pendiente e intercepción de una línea recta), incluyendo la incertidumbre de estos parámetros. El contenido del analito en una muestra desconocida puede ser predicho de la medición de su respuesta y de la incertidumbre puede ser calculada de la incertidumbre de la medición de su respuesta y de la incertidumbre de los parámetros de la curva de respuesta.

**Calibración metrológica.**- Procedimiento empleado para determinar la incertidumbre de un candidato a método analítico, en donde el método es aplicado a muestras apropiadas de referencia. Los resultados son comparados con el valor de referencia atribuido a las muestras de referencia. De una manera alternativa el método candidato y un método de referencia son aplicados en paralelo a muestras apropiadas. Los resultados del método candidato son comparados con los del método de referencia. Primero, se comparan los resultados y los valores de referencia correspondientes, tomando en cuenta las incertidumbres relevantes. Segundo, si la desviación encontrada es significativa, se deriva una corrección de desviación para el intervalo específico de medición. Tercero, la incertidumbre de los resultados de futuras mediciones, incluyendo la corrección de desviación, se calcula por combinación de dos contribuciones: la incertidumbre de los resultados de mediciones sin corregir y la incertidumbre de la corrección

**Corrosión.**- Reacción química o electroquímica entre un metal y su medio ambiente.

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

**Deriva de línea base** (del idioma inglés Drift).-Desviación gradual de la línea base en un período de tiempo determinado, debida al ruido electrónico del equipo, condiciones ambientales y condiciones de análisis.

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

componentes que se encuentran en menor proporción se llaman solutos (ver referencia 8).

**Disolvente de alta o más alta fuerza de elusión.**- Se refiere al disolvente con que la columna se puede lavar para eliminar los posibles analitos retenidos con el tiempo y liberar los sitios activos que ellos ocupan, que la fase móvil en uso no tiene la "fuerza" (afinidad) para hacerlo. Así, el disolvente de alta fuerza de elusión se elige de acuerdo a las características de la columna y debe de tener mayor afinidad por los analitos que la propia columna.

**Estándar interno.**- Un material (generalmente compuesto químico puro) presente en o adicionado a muestras en cantidad conocida que sirve como referencia de medición.

**Intercambio iónico.**- Tipo de separación cromatográfica en donde la fase estacionaria es un intercambiador iónico.

**Intercambiador iónico.**- Material capaz de cambiar reversiblemente iones cargados.

**Línea base.**- Gráfica obtenida de la señal que emite un detector cuando se le hace pasar por un periodo de tiempo determinado sólo la fase móvil bajo las condiciones de análisis.

**Matriz.**- Se refiere a todos los componentes de la muestra excepto el analito o los analitos de interés.

**Partición.**- En cromatografía, es la separación de componentes de una muestra por afinidad química o física en dos fases (fase móvil y fase estacionaria).

**Polaridad de la fase móvil.**- Característica fisicoquímica del disolvente empleado como fase móvil, dada por la concentración de moléculas disociadas en iones con carga eléctrica y la electronegatividad de los mismos.

**Puntos críticos.**- Aspectos que afectan directa o indirectamente los resultados analíticos del laboratorio.

**Ruido.**- Señal eléctrica adicional que afecta la línea base.

**Sistema isocrático.**- Es aquel equipo de cromatografía de líquidos, donde la bomba mantiene constante la composición de la fase móvil durante el análisis.

**Sistema de gradiente.**- Es aquel equipo de cromatografía de líquidos, donde la bomba permite variar la composición de la fase móvil durante el análisis.

**Spike.**- Cantidad conocida de analito que se adiciona a una muestra como referencia de medición.

**Verificación.**- Proceso que tiene como objetivo examinar si un resultado de medición es consistente con el valor de referencia correspondiente, a la diferencia observada se le realiza una prueba de significancia contra la incertidumbre relevante, típicamente corresponde una combinación de las incertidumbres en los resultados de la medición y con el valor de referencia. Usando pruebas estadísticas apropiadas, esta prueba de significancia puede ser organizada como de un solo nivel o multiniveles.

## **1. Introducción.**

Las buenas prácticas de laboratorio (BPL) cubren aspectos del trabajo diario en el laboratorio que deben documentarse y habilitarse formalmente ya que en múltiples ocasiones son determinantes en los resultados finales del análisis. El contenido de las BPL debe elaborarse por el propio personal y esta información deberá optimizarse, especificarse y detallarse en las operaciones críticas. Un comité interdisciplinario puede identificar las operaciones que afecten directa o indirectamente la exactitud y su influencia en la desviación de los resultados del trabajo hecho en el laboratorio y desarrollar los documentos de las BPL. Tales factores pueden ser clasificados como aquellos inherentes a la metodología y aquellos resultantes de como se aplica ésta. Los inherentes a la metodología solo pueden mejorarse por medio de la investigación y el desarrollo, en cambio los resultantes de cómo se aplica se pueden mejorar y controlar paso a paso mejorando las prácticas de laboratorio. Las BPL son independientes de las técnicas usadas y conducen aspectos tales como mantenimiento de la infraestructura, registros, manejo y disposición de muestras, control de reactivos y limpieza del material de vidrio del laboratorio. Es importante señalar que las BPL deben examinarse periódicamente para mantener su credibilidad [14,15].

La documentación y ejecución de las BPL se consideran como parte del Sistema de Calidad del laboratorio, su desarrollo y aplicación depende de la experiencia del analista, su contenido puede variar de manera significativa de acuerdo al tema a tratar y los puntos que se sugiere deben contener son:

**BPL N<sup>o</sup>.**

*Título*

*Objetivo*

*Campo de aplicación*

*Alcance y uso*

*Procedimiento*

*Referencias*

## 2. Sistema Instrumental.

### 2.1 Generalidades del sistema cromatográfico.

La cromatografía es un método físico de separación en el que los componentes se distribuyen entre dos fases; una de ellas es un lecho estacionario (fase estacionaria) y la otra se mueve por percolación a través del lecho estacionario (fase móvil) [1,14].

Los procesos cromatográficos se pueden clasificar en función de la naturaleza de la fase estacionaria, figura 1.1 y de una manera global como se muestra en la figura 1.2 [9].

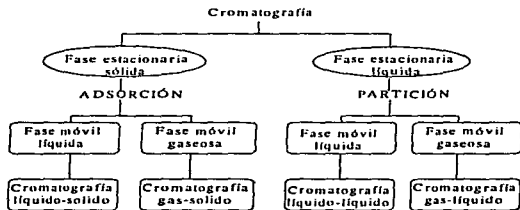


Figura 1.1 Clasificación de la cromatografía en función a la naturaleza de la fase estacionaria

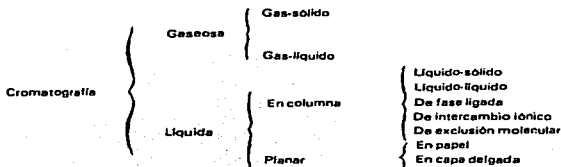


Figura 1.2 Clasificación global

Los sistemas de cromatografía de líquidos se considera como un conjunto de partes o módulos y su instalación generalmente sigue un diagrama como el que se representa en la figura 2, existen sistemas ensamblados así desde su fabricación. Una vez conformado e instalado un sistema, éste se debe de caracterizar, optimizar y estabilizar antes de realizar un análisis o también cuando se cambia uno o mas módulos del sistema, se da mantenimiento al equipo, se monta un nuevo método cromatográfico o si el equipo dejó de trabajar por más de dos semanas [5].

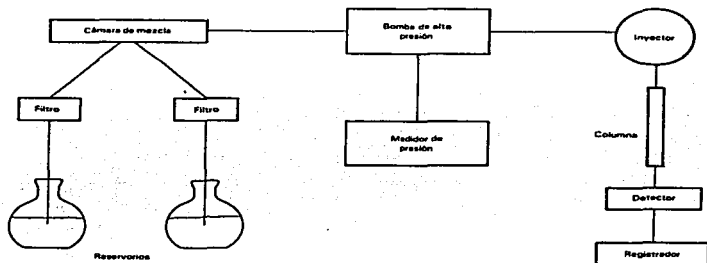


Figura. 2 Esquema del Sistema de Cromatografía de Líquidos.

Considerando así el cromatógrafo, como un sistema compuesto por diferentes módulos, se puede ver que hay aspectos que pueden afectar al sistema como un total o a cualquiera de sus componentes, por lo que se debe considerar esto como base para elaborar las BPL. En primer lugar los aspectos que aplican para el sistema HPLC en su conjunto y posteriormente los casos en los que un factor solo altera una parte del sistema, entonces, éstos últimos solo se deben tomar en cuenta para elaborar las BPL para ese módulo en específico. Por esta razón en éste manual en primer instancia se tratarán los aspectos (puntos críticos) que aplican para el sistema en general, posteriormente los que afectan cada módulo por separado y finalmente los relacionados con el análisis, que corresponde a aspectos relacionados con la preparación de curvas de calibración y preparación de muestras. Estos aspectos o puntos críticos se identifican y relacionan a manera de tablas para cada tema, para que a partir de ellos se elabore la BPL que permitirá prevenir o evitar los problemas previstos en dichas tablas y mejorar o asegurar la calidad de los resultados analíticos. Por cada punto crítico se puede documentar una BPL, aunque existen casos que dependiendo del criterio del analista se podrán abarcar dos o más puntos críticos en una misma BPL. Para efectos didácticos en este documento se da un ejemplo (ANEXOS 1 al 14) en cada sección de la redacción de una BPL.

**2.1.1 Puntos críticos del sistema cromatográfico.**

La tabla 1 contiene los puntos críticos correspondientes a aspectos que afectan al sistema de manera general y se toma como referencia para realizar las BPL referentes al Sistema Cromatográfico

**Tabla 1. Puntos críticos de un sistema cromatográfico.**

<b>Punto Crítico</b>	<b>Problema(s)</b>	<b>Posible BPL que previene o evita que se presente el o los problema(s)</b>
1.Limpieza.	-Aumento paulatino de presión debido a obstrucción total o parcial del sistema.	-Lavado general del sistema cromatográfico.
2.Funcionamiento.	-Fallas técnicas.	-Programa y ejecución del mantenimiento preventivo del equipo.  -Verificar que la fuente de poder esté dentro del intervalo de trabajo del equipo.  -Registrar el funcionamiento, en forma de cartas de operación del equipo en general y de los módulos por separados, o una bitácora para el sistema en general con divisiones por módulo. Los registros se deben revisar, antes de usar el equipo, cuando existen más de un operador; si es un solo operador lo debe hacer, dependiendo de la carga de trabajo, periódicamente(diario, cada tercer día, semanal o mensual). Adicionalmente en ambos casos cada vez que se requiera por causas fortuitas. En casos de sospechar de alguna posible anomalía, atenderla, solicitando el mantenimiento de inmediato en los casos en que el operador no lo puede hacer.

*Buenas Prácticas de Laboratorio en Cromatografía de Líquidos*

Del punto crítico "Limpieza" se elabora la BPL correspondiente (ANEXO 1), que aplica específicamente al equipo de HPLC con que cuenta CENAM. El formato que se emplea, solo es un ejemplo, la empresa o institución es responsable de diseñar su propio formato, los puntos siguientes son los que básicamente debe contener [15].

1. Nombre de la empresa o institución.
2. Area, departamento o división.
3. Clave de identificación y número consecutivo, proporcionado por el Sistema de Aseguramiento de Calidad de la empresa o institución, quien debe controlar el número de copias de cada documento.
4. Título general.
5. Subtítulos.
6. Objetivo o introducción.
7. Campo de aplicación o alcance.
8. Notaciones y definiciones.
9. Desarrollo o procedimientos.
10. Referencias.



## **2.2 Entrega de disolventes (bombas).**

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

- la interacción entre los disolventes y contenedores,
- de los disolventes por sí solos,
- y la bomba que los provee [5,6].

### **2.2.1 Puntos críticos en la interacción entre disolventes y contenedores.**

En la tabla 2, se listan los puntos críticos más sobresalientes que se deben considerar en la selección de disolventes (fase móvil) y los contenedores adecuados. Esta se refiere a las características y condiciones que tanto en los disolventes como en los contenedores para un análisis específico se pueden cuidar para aumentar la reproducibilidad, precisión y exactitud de los resultados [1,3,5,14,17].

**Tabla 2. Puntos críticos en la interacción entre los disolventes y contenedores.**

<b>Puntos críticos</b>	<b>Problema(s)</b>	<b>Posible BPL que previene o evita que se presente el o los problema(s)</b>
1.Fases móviles.	-Cambio de concentración de disolventes para el caso de mezclas, cuando la volatilidad de alguno de ellos es mayor que la de los otros. -Si existen impurezas, se concentran y pueden dar interferencias mayores.	-Boca del contenedor del menor diámetro posible. -Emplear tapones de los contenedores diseñados para que el orificio donde se inserta la tubería selle a la misma.
2.Heterogeneidad de los disolventes.	-Cambios en los tiempos de retención cuando la fase móvil se renueva.	-Si es un análisis rutinario se puede emplear como contenedor el envase original del disolvente. -En caso de ser necesario, tratar de emplear el mismo lote, hasta donde sea posible.
3. Contenedor.	-Contaminación de la fase móvil por el material de fabricación del contenedor.	-Análisis de polímeros-No usar contenedores de plástico. -Análisis de iones metálicos-No usar contenedores de vidrio.

4. Disolventes sensibles a la luz.	-Degradación del disolvente, cambios en la concentración en el caso de mezclas.	-Para todos los disolventes que vienen protegidos de la luz, usar su propio contenedor si es posible o en su defecto proteger el contenedor; se puede emplear un plástico oscuro o papel aluminio.
------------------------------------	---	--

**2.2.2 Puntos críticos de los disolventes por sí solos.**

Los puntos críticos que se deben considerar en los disolventes por sí solos, se refiere a que el solvente que se emplee en el análisis debe cumplir ciertas características para obtener mejores resultados y los puntos que se deben de considerar corresponden a la tabla 3[1,2,4,13].

**Tabla 3. Puntos críticos de los disolventes.**

Puntos críticos	Problema(s)	Posibles BPL que previene o evita que se presente el o los problema(s)
1. Los disolventes usados como fase móvil.	-Daños a columnas.	<ul style="list-style-type: none"> <li>-La pureza debe ser grado HPLC o no menor del 99%.</li> <li>-Inyectar el disolvente puro para verificar que no interfiera.</li> <li>-Filtrar y degasificar los disolventes antes de usarse y usar filtros en línea.</li> <li>-Lavar los filtros de acero inoxidable o de teflón de la línea de entrada de los disolventes o cambiarlos frecuentemente si se tienen en línea.</li> </ul>
2. Solubilidad de la muestra en la fase móvil.	-Tuberías y/o columnas tapadas por precipitación de la muestra.	-Hacer pruebas de solubilidad de la muestra previas al análisis.
3. Diseño del método.	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Muestras no retenidas, por lo tanto hay separaciones pobres.</li> <li>-Muestras retenidas excesivamente, y en consecuencia tiempos de análisis muy largos.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Pruebas previas con disolventes puros.</li> <li>-Mezcla de disolventes para lograr separaciones con factor de capacidad entre 1 y 10.</li> <li>-Intentar gradientes de elusión.</li> </ul>

4.Desgasificación.	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Tiempos de retención modificados por cambios en la presión.</li> <li>-Señal de ruido proveniente del detector, señales confusas</li> <li>-Columnas sensibles al oxígeno, como NH<sub>2</sub> ó NH<sub>3</sub>.</li> </ul>	-Desgasificar con gas inerte a flujo y presión constante sobre todo en bombas reciprocantes.
5.Compatible con el detector.	-Problemas en la línea base debido a la señal la fase móvil, sobre todo en gradientes.	-Seleccionar disolventes que no den señal del 10 % de la escala a las condiciones de trabajo en el detector.
6.Viscosidad alta.	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Presión alta.</li> <li>-Picos coleados.</li> </ul>	-Aumentar la temperatura, provoca disminución de la viscosidad, de la presión y mayor solubilidad del analito en el solvente por lo que disminuyen los tiempos de retención.

Durante el proceso de optimización de un método, el analista debe preguntar para cada uno de los factores críticos, como esta éste interfiriendo en sus resultados, para responder la pregunta es posible evaluar el factor, diseñando un experimento específico por factor (ejemplo 1), para evitar que la variación de resultados esté dada por más de un factor crítico. En base al análisis de los datos ver como afecta el resultado, obtener el punto óptimo para cada factor y documentarlo para ese análisis en particular.

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

**Ejemplo número. 1:** Diseño de un experimento para evaluar si existen impurezas en la fase móvil que interfieran en el análisis y en base a los resultados decidir si se debe describir la BPL correspondiente

**Factor a evaluar:** Si existen impurezas que eluyan al mismo tiempo de retención que analito de interés.

*Suponiendo que las Condiciones de Análisis son:*

Gradiente:	Tiempo (min)	%A	%B
	0	70	30
	15	60	40
	17	20	80
	20	0	100
	30	70	100
	40	70	30

*Buenas Prácticas de Laboratorio en Cromatografía de Líquidos*

en donde :

%A = porcentaje del disolvente A

%B = porcentaje del disolvente B

Tiempo (min) = es el tiempo a que se mantendrá la mezcla

*Procedimiento.*

- a) Pureza del disolvente A: Inyectar 3 muestras independientes del disolvente A puro. Observar si existe algún pico que eluya al mismo tiempo de retención del analito de interés, si es así, medir el área y obtener la desviación estándar
- b) Pureza del disolvente B: Inyectar 3 muestras independientes del disolvente B puro. Observar si existe algún pico que eluya al mismo tiempo de retención del analito de interés, si es así, medir el área y obtener la desviación estándar
- c) Composición de la mezcla. Inyectar 3 muestras independientes de la mezcla 70/30. Inyectar 3 muestras independientes de la mezcla 20/80. Observar si existe algún pico que eluya al mismo tiempo de retención del analito de interés, si es así, medir el área y obtener la desviación estándar

En base a los resultados adquiridos proponer la solución y elaborar la correspondiente BPL para ese método en específico.

Suponiendo que existan picos provenientes de impurezas en cualquiera de los disolventes (A, B o mezclas), se debe proceder a:

-verificar que se esta cumpliendo con las BPL "Los disolventes usados como fase móvil.", que se debe elaborar a partir del punto crítico número uno de la Tabla 3, donde su contenido básicamente corresponde a la tercera columna de ese punto "Posibles BPL...".

### 2.2.3 Puntos críticos en bombas

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

-las de presión constante, basadas en el empuje constante que ejerce un gas sobre la fase móvil haciéndola pasar por la columna, por lo que el flujo de la fase móvil depende de la resistencia que a su paso opone la columna.

-las de flujo constante, varían su presión para alcanzar un flujo determinado (éstas son las más empleadas)

Ambas a su vez tienen modalidades que se mencionan en la Tabla 4 [7,15].


**Tabla 4. Tipos de bombas.**

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

Independientemente del tipo de bomba que se trate, las BPL para las bombas (tabla 5) deben de dirigirse a conocer el desempeño de la bomba y prevención de la corrosión del sistema de bombeo (cabezales, pistones y válvulas "check") [5,13,16,17].

A partir del punto crítico número uno de la tabla 5 "Reproducibilidad del flujo", se realizó la BPL que corresponde al ANEXO 2, la cual permite evaluar la reproducibilidad del flujo que proporciona la bomba, así como su buen funcionamiento. La importancia de esta BPL radica en que cuando se tienen problemas en la reproducibilidad de resultados, principalmente en tiempos de retención y áreas (en los casos que no se utilice estándar interno) se puede saber inmediatamente si la causa es el sistema de bombeo y también es un parámetro que indica estabilidad del equipo.

Tabla 5. Puntos críticos en bombas.

Puntos críticos	Problema	Posible BPL que previene o evita que se presente el o los problema(s)
1.Reproducibilidad del Flujo.	-Variaciones en los tiempos de retención.	-Se debe verificar la velocidad de flujo cuando se enciende la bomba o cuando se cambia el tipo de disolvente
2.Línea base.	-Línea base con fluctuaciones por pulsaciones: Línea base: normal _____  con fluctuaciones:  	-Purgar adecuadamente la bomba.. -Evitar que la bomba trabaje con los contenedores con poco disolvente o sin disolvente. -Evitar mezclar disolventes que no son miscibles tanto en el lavado como cuando se trabaja con sistema de gradiente. -Usar atenuadores de pulsos como: a) Colocar una sección larga de tubo (6 m de largo por 1 mm de diámetro) entre la bomba y la cámara de inyección; éste tubo capilar se deja flotar libremente y así absorbe las pulsaciones producidas por la bomba. b) Entubados de Bourdon. c) Columna rellena de pequeños cristales.
3.Cabezales.	-Sellos del pistón dañados. -Pistón dañado. -Válvulas "check" dañadas.	-Depende del diseño de cada equipo, en su mayoría estos problemas se pueden prevenir: -Con el proceso del lavado del sistema cromatográfico. -En los sistemas que cuentan con tubería especial para el lavado de cabezales, no olvidar colocarlos en el contenedor adecuado (generalmente agua).

### 2.3 Introducción de muestras (inyectores).

El objetivo de los inyectores es introducir la muestra en la columna sin pérdida de presión para no alterar el "flujo constante" y no dañar el empaque de la columna. Existen cuatro tipos de inyección básicamente:

En septum de alta presión.

Parando el flujo.

Por loop.

Por jeringa-loop.

La inyección por jeringa-loop o válvulas inyectoras (figura 3) es la que ha alcanzado mayor popularidad debido a su versatilidad, fácil operación y durabilidad. Estas válvulas se diseñan para resistir presiones altas y se fabrican solo de material inerte como acero inoxidable y de teflón.

Los inyectores automáticos utilizan loop-microjeringas que se pueden programar desde 0.5 hasta 500  $\mu$ L. de muestra [5,6,7,8].

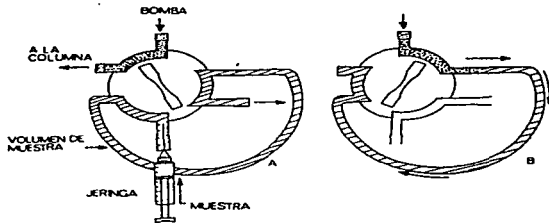


Figura 3. Válvula inyectora (jeringa-loop); A. Toma de la muestra, B. Inyección de la muestra.

**2.3.1 Punto críticos en la introducción de muestras (inyectores).**

La inyección es muy importante para obtener resultados veraces, esto es, que el volumen inyectado corresponda al que se esta tomando en cuenta en los cálculos, sobre todo cuando se trabaja con curvas de calibración con estándar externo. La reproducibilidad del volumen de inyección depende en gran medida del analista para el caso de inyectores manuales o de la calidad del autoinyector (que generalmente dan mejores resultados que la mano humana). Los puntos críticos más sobresalientes que se deben considerar se mencionan en la tabla 6 [2,3,16,17].

**Tabla 6. Puntos Críticos en Inyectores.**

Puntos críticos	Problemas(s)	Posible BPL que previene o evita que se presente el o los problema(s)
1.Volumen de inyección.	-Variaciones en el volumen inyectado.	-Verificar el volumen de inyección programado. -Colocar suficiente volumen de muestra en el vial. -No colocar muestras muy viscosas.
	-Variación evidente en el tamaño de los picos.	-Asegurarse de no crear vacíos en el vial.
	-Fugas de líquido.	-Verificar si la aguja de inyección tiene el diámetro apropiado y la punta esta en buen estado. -Verificar que el sello del puerto de inyección se encuentre en buen estado. -Verificar que el "loop" este bien conectado.
	-Agujas dobladas.	-No colocar septas rígidas en los viales. -Verificar que la tapa del vial esté colocada correctamente.



*Buenas Prácticas de Laboratorio en Cromatografía de Líquidos*

2. Inyector obstruido.	-Precipitación de muestras .	-Lavar el inyector diariamente con la fase móvil . cuando trabaje con disoluciones amortiguadoras lavarlo con abundante agua. -Verificar miscibilidad de muestras con la fase móvil o disoluciones de lavado (ANEXO 2).
	-Partículas en la muestra.	-Filtrar las muestras antes de inyectarlas.
3. Tiempo de retención.	-Variaciones en los tiempos de retención de los picos debido a variaciones en la señal de arranque o activación en el inyector.	-Cuando se da la señal de activación de manera manual, homogeneizar el tiempo que se toma en dar dicha señal.

En base a que la parte más importante de los inyectores es el volumen de inyección, en el ejemplo de BPL para éste módulo (ANEXO 3) se describen los cuidados que se deben de tener para asegurar que el volumen sea correcto.

## 2.4 Columnas.

En todo sistema cromatográfico, ya sea fase líquida o gaseosa, la columna es la base o "alma" del sistema, debido a que en ella se lleva a cabo la separación de los componentes de la muestra en estudio. Consisten en un segmento de tubo de algún material inerte, de diámetro uniforme y capaz de resistir presiones altas. El material más común es acero inoxidable. La capacidad de la columna depende de su longitud, diámetro y material de relleno. En general las columnas muy eficaces son de diámetro pequeño (3 mm) y efectúan análisis muy rápidos; su capacidad en cambio es limitada por lo que la muestra debe ser de tamaño reducido, lo que exige un detector muy sensible. El empaque debe también ser estable y resistente a altas presiones [1,3,6].

Existen 5 métodos o formas de realizar cromatografía líquida de alta resolución, cada uno basado en los diferentes mecanismos de separación de los componentes de la muestra, lo que se logra mediante un cambio de columna, por lo que es la columna quien define el tipo de cromatografía [6].

Tipos de Cromatografía:

- 1.- Adsorción.
- 2.- Partición.
- 3.- Intercambio iónico.
- 4.- Par iónico.
- 5.- Permeación en gel o exclusión estérica.

En todos los tipos de cromatografía, la exactitud y precisión de los resultados depende de la optimización del método de análisis, dentro del cual una parte primordial es la optimización de la separación de los componentes a analizar, para esto se utilizan parámetros que nos dan información sobre la eficiencia del funcionamiento de la columna. Las definiciones, el significado y la ecuación que describe estos parámetros se dan a continuación [7]:

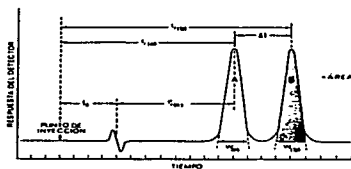


Figura. 4. Cromatograma

### Definiciones.

**Tiempo de retención ( $t_r$ ).**- Tiempo que la muestra permanece dentro de la columna, se mide desde que la muestra se introduce en el sistema hasta el momento en que se obtiene el punto máximo de la señal o pico (Fig. 4). El tiempo de retención es característico de la muestra, columna, fase móvil

y temperatura en su conjunto.

**Tiempo muerto ( $t_0$  o  $t_m$ ).**- Es el tiempo necesario para eluir un componente no retenido en la columna, y se determina midiendo el tiempo de retención de la fase móvil en uso.

**Tiempo de retención corregido o real ( $t_r$ ).**- Se define como el tiempo que la muestra permanece retenida en el material de relleno de la columna (fase estacionaria) y se obtiene de la diferencia entre el tiempo total de permanencia en la columna ( $t_r$ ) y el tiempo en que la muestra permanece en la fase móvil ( $t_0$ ). Es la medida del tiempo que la muestra permanece retenida en la fase estacionaria.

$$t_r = t_r - t_0$$

**Ancho de base de las señales ( $W_b$ ).**- Es la porción de línea base interceptada por tangentes trazadas a ambos lados de una señal cromatográfica (pico); asumiendo que la forma de la señal es gaussiana, este ancho es aproximadamente igual a cuatro veces el valor de  $\sigma$ , es decir la dispersión de una distribución gaussiana.

**Número de platos teóricos (N).**- Un plato teórico es el equilibrio de distribución de la muestra entre la fase móvil y la fase estacionaria; es una medida de la eficiencia de la columna y los sistemas asociados, entre mayor sea el valor de N, más eficiente será la columna.

$$N = 16 \left( \frac{t_r}{W_b} \right)^2$$

donde  $t_r$  y  $W_b$  se expresan en las mismas unidades (tiempo, volumen o distancia).

**Altura equivalente a un plato teórico (AEPT)** o de sus siglas en inglés (HETP).- Es la longitud de columna (L) requerida para obtener un equilibrio de la muestra entre la fase móvil y la fase estacionaria. si el valor de AEPT es pequeño, significa un mayor número de platos por unidad de longitud y, por lo tanto, la columna será más eficiente.

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

**Coefficiente de distribución o de reparto (K).**- Propiedad física fundamental de cada sustancia. Es característico de cada muestra, del sistema de fase móvil así como de la fase estacionaria y temperatura. Se expresa de la manera siguiente:

$$K = \frac{\text{(Cantidad-de-muestra) (mililitro-de-fase-estacionaria)}}{\text{(Cantidad-de-muestra) (mililitro-de-fase-móvil)}}$$

**Retención o factor de capacidad ( $k'$ ).**- Es una medición directa de que tan fuerte la muestra interactúa con la fase estacionaria.

$$k' = \frac{t_r'}{t_0} = \frac{\text{tiempo - en - la - fase - estacionaria}}{\text{tiempo - en - la - fase - móvil}}$$

Resolución (R).- La resolución es una función de la distancia de separación entre dos picos subsiguientes en relación a que tan anchos son.

$$R = \frac{t_r(b) - t_r(a)}{(W_a + W_b) / 2} = \frac{2(t_r(b) - t_r(a))}{W_a + W_b}$$

donde:  $t_{r(a)}$ ,  $t_{r(b)}$ ,  $W_a$ , y  $W_b$  deben ser expresados en las mismas unidades

Selectividad ( $\alpha$ ). - Es un número que describe que tan bien se pueden separar dos compuestos en un sistema cromatográfico. Valores elevados de  $\alpha$  significan mejores separaciones.

$$\alpha = \frac{k'_b}{k'_a} = \frac{t_r(b)}{t_r(a)}$$

#### 2.4.1 Puntos críticos en columnas y empaques

De lo anterior, es claro que la caracterización de la columna es fundamental, y como un punto crítico, se debe realizar para conocer una columna nueva, y contar con esos datos como punto de referencia en las subsiguientes caracterizaciones así como para el historial de la misma. La BPL correspondiente (ANEXO 4) se da como ejemplo. Otros aspectos también importantes son los cuidados de limpieza (ANEXO 2), almacenamiento adecuado, control de temperatura y pH que se mencionan en la tabla 7 [3,5,10,16,17].

Tabla 7. Puntos Críticos en Columnas.

Puntos críticos	Problema(s)	Posible IPL que previene o evita que se presente el o los problema(s)
1.Eficiencia	-Pérdida de eficiencia.	-Siempre que se adquiera una columna nueva se deben evaluar los parámetros $N$ , $k'$ , $R$ y $\alpha$ con los que se puede llevar un control de vida de la columna. -Es recomendable tener una carpeta de control o bitácora con el historial de cada columna. -Cuando se tenga pérdida en la eficiencia de la columna esta debe ser regeneradas, reemplazar los filtros y comprobar su eficiencia caracterizándola ( $N$ , $k'$ , $R$ y $\alpha$ ).
	-Columna dañada.	-Seleccionar adecuadamente las condiciones de trabajo, en base a las indicaciones del proveedor. -Evitar disminuir o aumentar bruscamente el flujo cuando la columna esté conectada para evitar cambios bruscos de presión. -Evitar disolventes que reaccionen con la columna (que sangren la columna).
2.Temperatura	-Variaciones en los tiempos de retención y afinidad entre analito y columna . -Formas de los picos.	-Controlar la temperatura con la mayor precisión posible dentro de los límites, puede ser con baño recirculador de agua u horno de resistencia eléctrica.
	-Disminución de la eficiencia de la columnas por altas temperaturas.	-Seguir las indicaciones del proveedor, por ejemplo: -columnas con base de sílica no se deben calentar por arriba de 60 °C así como algunas columnas de tamaños de partículas pequeños debido a que pierden eficiencia ( $N$ ) hasta en un 50 % cuando se calientan a temperaturas altas; para tamaños de partícula de 3 $\mu$ se degradan con temperatura por arriba de 40 °C.
3.Conexión	-Fugas.	-Verificar que las tuercas o ferrul no estén mal apretadas. -Verificar que el filtro sea el adecuado. -Verificar que la columna no este tapada por objetos extraños. Verificar que el diámetro de las tuberías sea el correcto.

*Buenas Prácticas de Laboratorio en Cromatografía de Líquidos*

4. Contaminación	<ul style="list-style-type: none"><li>-Columnas obstruidas.</li><li>-Presión alta.</li><li>-Picos fantasmas.</li><li>-Picos coleados.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>-Usar filtros y guarda columnas en línea.</li><li>-Filtrar y limpiar hasta donde sea posible muestras sucias.</li><li>-Cambiar los filtros frecuentemente.</li><li>-Lavar la columna frecuentemente con un disolvente fuerte.</li></ul>
5. Almacenamiento	-Crecimiento bacteriano	Almacenar las columnas después de lavarlas, en disolución de algún disolvente orgánico con agua en una proporción 2:8, como por ejemplo metanol, acetonitrilo, etc. excepto para columnas de permeación en gel que se deben de almacenar en disoluciones amortiguadoras con 0.1% de azida. -Ver las recomendaciones del fabricante. -Asegurarse de colocar bien los tapones en los extremos de la columnas antes de almacenarla.
6. pH	<ul style="list-style-type: none"><li>-Cambios en la forma de los picos.</li><li>-Degradación de columnas.</li><li>-Decrece el tiempo de retención en compuestos no básicos y aumenta el tiempo de retención para compuestos básicos</li></ul>	-Para empaques de fase unida, donde la base es sílica, usar fases móviles con pH entre 2.5 y 7. Usar precolumnas con el mismo empaque o de sílica.

## **2.5 Detectores**

El detector funciona como el "ojo" del sistema de cromatografía de líquidos, su función es traducir un cambio de la concentración de la muestra (que eluye de la columna) en una señal eléctrica que se registra por el procesador. Existen diferentes tipos, el nombre de los cuales proviene de la forma en que detectan la muestra. los mas conocidos son:

UV-Visible  
Fluorescencia  
Índice de refracción  
Conductividad  
Electroquímico

El UV-Visible, fluorescencia e índice de refracción, son detectores fotométricos, miden cambios en la absorbancia óptica, emisión de fluorescencia y cambios en el índice de refracción de la muestra respectivamente. El de conductividad y electroquímico miden cambios en las características eléctricas de la disolución. Los resultados se transforman a variaciones de voltaje que se registran gráficamente en un procesador (computadora) o en un integrador/graficador electrónico generando el cromatograma. Los más ampliamente usados son el UV-Visible y fluorescencia [7,9,10].

Los principales requerimientos para seleccionar un buen detector dependen en gran medida de la aplicación, pero lo que se requiere de él es buen nivel de detección (sensibilidad), bajo nivel de ruido y linealidad de la respuesta [6].

**2.5.1 Punto críticos en Detectores.**

Los problemas que suelen presentarse en los detectores dependen del tipo de detector, pero existen problemas comunes como los que se listan en la tabla 8. Los problemas particulares de cada detector generalmente se resuelven con el mantenimiento preventivo del mismo. El ruido en la línea base proveniente del detector es un problema frecuente, e interfiere de manera directa en el cálculo del área de los picos y en consecuencia en los resultados del análisis; la BPL del ANEXO 5 describe los cuidados que pueden ayudar a disminuir la señal de ruido del detector.

**Tabla 8. Puntos críticos en detectores.**

Puntos críticos	Problema	Posible BPL que previene o evita que se presente el o los problema(s)
1. Ruido.	-Problemas en la integración por presencia de señales de ruido, lo que disminuye el nivel de detección. -Picos fantasmas debido a ruido.	-Permitir que se caliente el detector por aproximadamente media hora, o una hora para que alcance su máxima sensibilidad. -Control del tiempo de uso de las lámparas. -Contar con una lámpara para repuesto. -Cambiar la lámpara cuando el tiempo de vida esta por terminar (2500 horas), limpiar la superficie de la lámpara con algodón con metanol, no dejar residuos de grasa, ni de algodón -Si se cambia la lámpara, calentar una hora. -Degasificar la fase móvil.
	-Problemas de carga estática.	-Conexión adecuada del detector a tierra. -Usar tapetes antiestáticos.
2. Linealidad de la respuesta.	-Deriva en la línea base causada por el detector, no por un gradiente: esto se traduce en problemas en la cuantificación.	-Control de temperatura del ambiente. -Verificar que la fuente de energía sea adecuada.



*Buenas Prácticas de Laboratorio en Cromatografía de Líquidos*

<p>3. Sensibilidad.</p>	<p>-Picos pequeños en soluciones con concentraciones altas.</p>	<p>-Seleccionar adecuadamente los parámetros de trabajo del detector, ejemplos:  <u>UV-VIS</u>, que la longitud de onda (<math>\lambda</math>) sea la adecuada para el o los analito(s), y que la fase móvil no de respuestas altas en esa <math>\lambda</math>.  <u>Electroquímico</u>, que el electrodo de trabajo sea el correcto.</p>
<p>4. Contaminación.</p>	<p>-Interferencias por contaminación en la celda.</p>	<p>-Lavar bien la celda y tuberías del detector después de cada jornada de trabajo con disolvente de alta fuerza de elusión, no olvidar que cuando se trabaja con soluciones amortiguadoras como fase móvil, se debe lavar con abundante agua y dejarse en una disolución de agua/disolvente orgánico 8:2.</p>
	<p>-Generación de presión alta debida a tuberías obstruidas del detector.</p>	<p>-Cuando no se utilicen los detectores se deben cerrar los puertos de entrada y salida, para evitar que la celda se seque y se contaminen las tuberías o la misma celda.</p>
<p>5. Fugas.</p>	<p>-Fugas en las conexiones.          -Fugas en la celda.</p>	<p>-Verificar que los tornillos de conexión estén bien colocados y apretados.</p>

### 3. Curvas de Calibración

Dentro de los métodos de cuantificación utilizados en cromatografía de líquidos los más comunes son [2,6,7,8,9,10,13]:

- a) Porcentajes de área o normalización simple de área.
- b) Normalización de porcentajes de área con factor de respuesta.
- c) Estándar externo.
- d) Estándar interno.

a) Porcentajes de área (% A) o normalización simple de área, se determina como sigue:

$$\%A = \frac{(\text{área} - \text{del} - \text{pico}) \times 100}{(\text{área} - \text{total})}$$

Consideraciones:

- Cada componente de la muestra origina un pico.
- Que el detector da una misma área para cada componente de la muestra si están presentes en la misma concentración, lo que implica que tengan el mismo factor de respuesta.
- Que todos los componentes de la muestra eluyen de la columna y deben ser detectados.

Ventajas:

- El volumen de inyección no necesita ser preciso.
- Comparación directa entre muestras sin tener que hacer una curva de calibración.

Tabla 9. Puntos críticos en la cuantificación por porcentajes de área o normalización simple de área.

Puntos críticos.	Problema(s).	Posible BPL que previene o evita que se presente el o los problema(s).
1. Consideraciones	-Las consideraciones generalmente no se cumplen, ya que no siempre eluyen todos los compuestos de la muestra sobre todo en muestras de matrices naturales y además, los detectores generalmente dan diferentes respuestas para compuestos diferentes.	-No emplear este método

b) Normalización de porcentajes de área (% A) con factor de respuesta, se calcula [2,7,13]:

$$\% A_x = \sum_{i=1}^n \frac{A_{xi} \cdot x F_{xi}}{A_{total}} \times 100$$

si se suponen 3 componentes, los factores de respuesta se calculan:

$$C_x = F_x A_x$$

si

$$C_{x1} = C_{x2} = C_{x3} \Rightarrow$$

$$F_{x1} / F_{x3} = A_{x1} / A_{x3}; F_{x2} / F_{x3} = A_{x2} / A_{x3}$$

$$F_{x1} = A_{x3} / A_{x1}$$

$$F_{x2} = A_{x3} / A_{x2}$$

donde:  $A_{ref}$  son las áreas obtenidas para el compuesto de referencia,  
 $C_{ref}$  son las concentraciones de cada uno de ellos,  
 $F_{ref}$  es el factor de respuesta asignado al compuesto de referencia,  
 $A_{total}$  es  $(A_{x1} \times F_{x1}) + (A_{x2} \times F_{x2}) + (A_{x3} \times F_{x3})$ .

Consideraciones:

- Se debe contar con disolución de referencia (mezcla patrón) que contenga todos los componentes a una misma concentración para calcular los factores de respuesta de cada uno de ellos.
- Se requiere contar con una disolución patrón de concentración conocida del analito.
- Se debe definir el factor de respuesta para cada componente.
- Se considera que la concentración varía en forma lineal, con pendiente de uno y ordenada al origen cero.

Ventajas:

- La precisión de la inyección no impacta los resultados.
- Es un método simple para obtener la composición de la muestra en porcentajes.

Tabla 10. Puntos críticos en la cuantificación por normalización de porcentajes de área con factor de respuesta.

Puntos críticos	Problema(s)	Posible BPL que previene o evita que se presente el o los problema(s).
Consideraciones	El factor respuesta puede variar de acuerdo a la concentración de manera lineal, pero no siempre con pendiente uno.	No emplear éste método

Los métodos por estándar interno y externo se ven en los puntos 3.2 y 3.5 respectivamente.

## *Buenas Prácticas de Laboratorio en Cromatografía de Líquidos*

### **3.1 Materiales de referencia y reactivos.**

#### **Tipos de reactivos:**

En cromatografía de líquidos una parte muy importante del análisis es la preparación de la muestra para lo cual se requiere el empleo de disolventes o reactivos de alta pureza, con la finalidad de evitar impurezas que puedan interferir con los resultados. A continuación se muestra la manera en que los reactivos químicos se clasifican de acuerdo a su pureza [4,15,18].

- ◆ **Grado USP:** Las sustancias grado USP, son lo suficientemente puras, para pasar las pruebas prescritas por la farmacopea de los Estados Unidos de Norteamérica, y son convenientes para su empleo en la producción de medicamentos. Pueden contener ciertas impurezas pero estas no son detectables por los métodos descritos en la farmacopea. Estos reactivos en general se consideran aceptables para los trabajos de rutina del laboratorio.
- ◆ **Grado Espectroscópico.** Son disolventes de pureza especial, adecuados para el trabajo de Espectrofotometría en la región ultravioleta, infrarrojo, o cercano infrarrojo, así como en Espectrofotometría de resonancia magnética nuclear, y fluorometría. Las especificaciones de estas sustancias son proporcionadas principalmente en términos de su absorbancia característica, contenido de agua, y residuos de evaporación. El principal requisito de un disolvente para este propósito, es que su absorción en la región de interés, sea lo más baja posible.
- ◆ **Grado Cromatográfico:** Estas sustancias presentan un nivel de pureza mínimo del 99 + mol %, determinado por cromatografía de gases. Cada sustancia es acompañada de su cromatograma, indicando el tipo de columna utilizada y los parámetros del análisis. El nivel de impurezas individuales no deberá exceder a 0.2 %.
- ◆ **Grado Técnico:** Este tipo de sustancias son utilizadas a nivel industrial, y generalmente son inadecuadas para el trabajo de laboratorio, debido a su gran contenido de impurezas.
- ◆ **Grado Práctico:** Estas sustancias también contienen impurezas, pero son lo suficientemente puros para la mayoría de las aplicaciones orgánicas. En general el tipo de impurezas que contienen se deben a los intermediarios de síntesis.
- ◆ **Grado QP:** QP, son las siglas de "Químico Puro". Su pureza se considera equiparable a las sustancias químicas de grado reactivo, y su uso dependerá de la aplicación.
- ◆ **Grado Reactivo:** En esta clasificación se incluyen aquellas sustancias que han sido certificadas para que su nivel de impurezas sea menor al especificado por el comité de Reactivos Analíticos de la Sociedad Americana de Química (American Chemical Society, ACS). Cada frasco se encuentra identificado con un número de lote.

*Buenas Prácticas de Laboratorio en Cromatografía de Líquidos*

El agua purificada también se clasifica de acuerdo al grado de pureza, en tipo I, tipo II y tipo III, sus usos se dan en la tabla 11 [4,15,18]:

Las diferencias en cuanto a los parámetros fisicoquímicos sugeridos por diversos organismos internacionales se proporcionan en la tabla 12.

**Tabla 11. Usos de los diferentes tipos de agua.**

TIPO DE AGUA	USOS
I	-Cromatografía líquida de alta resolución. -Determinaciones de ultra trazas
II	-Absorción atómica -Determinaciones a nivel trazas
III	-Trabajo analítico ordinario. -Destilaciones simples. -Deionizaciones u ósmosis inversa.

**Tabla 12. Características generales de los diferentes tipos de agua.**

PARÁMETRO	TIPO DE AGUA		
	I	II	III
pH a 25 °C	*	*	5,0-7,5
Conductividad eléctrica $\mu\text{S}/\text{m}$ a 25 °C	0,01	0,1	0,5
Materia oxidable (equivalente a $\text{mg O}_2/\text{L}$ )	+	0,08	0,4
Absorbancia a 204 nm, con celda de 1 cm	0,001	0,001	++
Contenido de $\text{SiO}_2$ , en $\text{mg}/\text{L}$	0,01	0,002	++
Residuos después de la evaporación contenido $\text{mg}/\text{kg}$	+	1,0	2,0

\*El pH en agua altamente purificada no está determinado.

+ No aplica.

++ No está especificado.

El agua es uno de los disolventes más utilizados en el laboratorio de cromatografía de líquidos, sus principales usos son como fase móvil, preparación de disoluciones (amortiguadoras, iónicas),

*Buenas Prácticas de Laboratorio en Cromatografía de Líquidos*

extracciones líquido-líquido, en la limpieza del material y lavado del equipo. En todos los casos se debe emplear agua tipo 1, excepto en las primeras etapas del lavado del material de vidrio (ANEXO 1) [4,5,6,15,18].

**3.1.1 Punto críticos en Reactivos.**

Los reactivos químicos es importante que se elijan de acuerdo a la información anterior y a las necesidades de acuerdo al tipo análisis y método en uso. Los puntos críticos a considerar se listan en la tabla 13, de los que se parte para realizar la BPL del ANEXO 6.

**Tabla 13. Puntos críticos en reactivos.**

<b>Puntos críticos.</b>	<b>Problema(s).</b>	<b>Posible BPL que previene o evita que se presente el o los problema(s).</b>
1.Pureza.	-Picos de impurezas en los cromatogramas provenientes de reactivos. -Columnas y/o tuberías obstruidas y/o contaminadas.	-Seleccionar los reactivos de la mayor pureza disponible, de preferencia que se especifique que es grado cromatográfico o grado HPLC.
2.Contaminación.	-Contaminación por mal manejo de reactivos.	-Respetar las condiciones de almacenamiento. -Tomar correctamente las porciones de reactivos.
3.Identificación.	-Problemas por uso de reactivos caducados.	-Etiquetar adecuadamente.

## *Buenas Prácticas de Laboratorio en Cromatografía de Líquidos*

### **3.1.2 Materiales de referencia**

#### **Tipos de Materiales de Referencia:**

**Material de referencia (MR):** Es un material o sustancia a la que se le determinan una o más propiedades con suficiente exactitud lo cual permite el uso de las mismas para la calibración de un aparato, asegurar un método de medición y/o la comparación con otros materiales [22].

**Material de referencia certificado (MRC):** Un material de referencia al que una o más de sus propiedades han sido certificadas por un procedimiento técnicamente válido, acompañado o trazable a un certificado u otra documentación la cual es avalada por un organismo certificador reconocido [22].

**Material de referencia Secundario(MRS):** Un material de referencia al que una o más de sus propiedades han sido determinadas por un procedimiento técnicamente válido, utilizando un material de referencia certificado para la comparación de valores [22].

Algunos de los usos de los materiales de referencia son [15,22]:

- Confirmar la capacidad de un analista para ejecutar el procedimiento.
- Evaluación de una nueva metodología de laboratorio (validación de métodos).
- Calibración de equipo. Cuyo procedimiento requiera del uso de estos MR.
- Validación de métodos para uso específico.
- Establecimiento de la trazabilidad de las mediciones.
- Desarrollo de un material de referencia secundario.
- Desarrollo de protocolos de trazabilidad.
- Aseguramiento de la calidad interna (Intralaboratorio).
- Aseguramiento de la calidad externa (Interlaboratorio).

#### **3.1.4 Puntos críticos para materiales de referencia.**

Por ser los MR, la base del cálculo de los resultados del análisis y la incertidumbre relacionada, su uso y manejo adecuado son de primordial importancia para obtener resultados confiables. Los principales puntos críticos con respecto a los MR se dan en la tabla 14 los cuales se documentan en la BPL del ANEXO 7.

*Buenas Prácticas de Laboratorio en Cromatografía de Líquidos*

**Tabla 14. Puntos críticos para Materiales de Referencia.**

<b>Puntos críticos.</b>	<b>Problema(s).</b>	<b>Posible BPL que previene o evita que se presente el o los problema(s).</b>
<b>1. Selección adecuada.</b>	<b>-Problemas para obtener la incertidumbre deseada.</b>	<b>-Elegir el material de referencia con una incertidumbre menor a la deseada en los resultados. -Elegir el tipo de material de referencia de acuerdo al nivel de incertidumbre deseado.</b>
	<b>-Interferencias por efecto de matriz</b>	<b>-Seleccionar el material de referencia de acuerdo al tipo de matriz con que se esta trabajando, hasta donde sea posible.</b>
<b>2. Uso y manejo</b>	<b>-Problemas en la preparación del material de referencia.</b>	<b>-En el caso de los MRC, ver la especificaciones para su uso, almacenamiento, cantidad mínima a usar así como la forma de tratar la muestra.</b>



### 3.2 Curva de calibración por estándar interno (EI).

#### Generalidades.

Este método es menos susceptible a errores técnicos, y si es bien elegido el estándar interno compensa, en algunos casos, errores producidos durante la preparación de la muestra. Consiste en adicionar a las muestras y a las disoluciones estándares de calibración un compuesto de concentración conocida (estándar interno). La respuesta de cada componente a diferentes concentraciones (en el caso de la curva de calibración) es comparada con la del estándar interno, figuras 5 y 6. Y en el análisis de muestras la respuesta de cada analito es comparada con la del estándar interno [1,3,11].

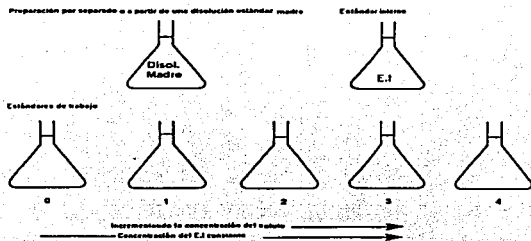


Figura 5. Curva de calibración por estándar interno (preparación de disoluciones estándares)

*Buenas Prácticas de Laboratorio en Cromatografía de Líquidos*

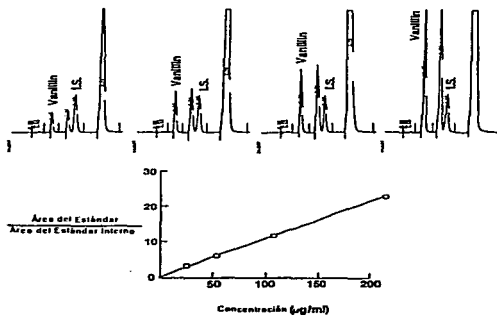


Figura 6. Curva de calibración por estándar interno

### **3.3 Importancia del estándar interno**

En la mayoría de los casos el uso de estándar interno permite [11]:

- Corrección de volumen, corregir las variaciones por volumen de inyección
- Corrección de la recuperación en extracciones directas líquido-líquido, corrige pérdidas por derrames, incompletas recuperaciones de la fase orgánica en extracciones, corrige por solubilidad parcial de la fase orgánica en la fase acuosa, evaporaciones del disolvente
- Corrección de la recuperación en extracciones por Soxhlet, pérdidas por derrames, evaporación de disolventes volátiles.
- Desempeño de la Columna, monitor de la forma de los picos, área y tiempo de retención en análisis rutinarios.
- Control de calidad, disminuye los errores relacionados con la metodología.
- Corrige variaciones instrumentales

### **3.4 Características del estándar interno.**

Un compuesto para poder ser usado como estándar interno debe tener la siguientes características [11]:

- Debe ser estable (a las condiciones de análisis), de alta pureza y disponible fácilmente.
- No debe de reaccionar con los componentes de la muestra.
- Debe dar una respuesta en el detector similar a los analitos.
- Debe cluir cerca de los analitos.
- Debe resolverse completamente de los componentes de la muestra.
- No lo debe de contener la muestra

*Buenas Prácticas de Laboratorio en Cromatografía de Líquidos*

**3.4.1 Punto críticos en la selección del estándar interno.**

En lo que se refiere a la selección de un estándar interno, lo principal es seleccionarlo adecuadamente en base a las características antes mencionadas, las que debe de cumplir para poder realizar una cuantificación exitosa, ésto depende de los conocimientos, experiencia y criterio del analista. Una vez seleccionado es importante tomar en cuenta los puntos que se marcan en la tabla 15, en base a la cual se documenta la BPL del ANEXO 8.

**Tabla 15. Puntos críticos del estándar interno (EI).**

<b>Puntos críticos.</b>	<b>Problema(s).</b>	<b>Posible BPL que previene o evita que se presente el o los problema(s).</b>
1. Estabilidad del EI.	<ul style="list-style-type: none"><li>-Concentraciones de la muestra altas por degradación del EI.</li><li>-Concentraciones de muestra bajas o desaparición de picos de analitos y aparición de nuevos picos por interacción del EI con la muestra.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>-Hacer pruebas de estabilidad del EI por separado a las condiciones de análisis y posteriormente con la muestra para observar su comportamiento, en caso de ser inestable o reaccionar con la muestra se debe de intentar otra sustancia.</li></ul>
2. Cantidad adicionada.	<ul style="list-style-type: none"><li>-Variabilidad de respuesta del estándar interno a diferentes concentraciones.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>-Adicionar siempre la misma cantidad de EI a los estándares de calibración, estándares de control de calidad y muestras, esto es importante también para anular el error por concentración del estándar interno cuando ésta no es bien conocida .</li></ul>
3. Tiempo de retención .	<ul style="list-style-type: none"><li>-Traslapamiento en el cromatograma con algún analito o impureza.</li><li>-Tiempo de retención muy alejada de los analitos.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>-Modificar las condiciones de análisis: gradiente, temperatura, disolventes, etc. o intentar otra sustancia.</li></ul>
4. Estructura.	<ul style="list-style-type: none"><li>-Respuesta en el detector menor a la de los analitos por sus características estructurales, que altere los resultados (generalmente altos).</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>Seleccionar el EI con una estructura lo mas similar posible a la de los analitos de interés, si esto no es posible, verificar que la intensidad de respuesta en el detector sea cercana a la de los analitos, es preferible intentar otra sustancia</li></ul>

### 3.5 Curva de calibración con estándar externo

#### Generalidades.

Se debe contar con un material de referencia o un reactivo de alta pureza del analito que se desea cuantificar. Consiste en la obtención de un factor de respuesta del detector realizando una curva de calibración en base a la relación respuesta-área del estándar a diferentes concentraciones. La curva de calibración se prepara como se muestra en las figuras 7 y 8. Se debe realizar una curva de calibración por analito [1,3,11].

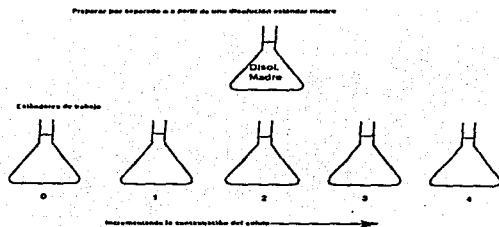


Figura 7. Curva de calibración por estándar externo (preparación de disoluciones estándares).

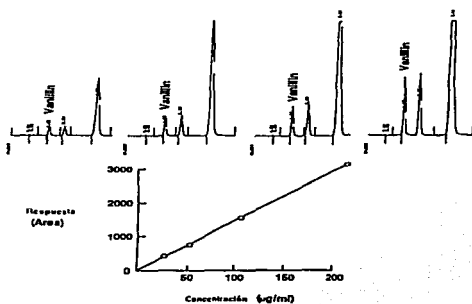


Figura 8. Curva de Calibración por estándar externo

*Buenas Prácticas de Laboratorio en Cromatografía de Líquidos*

**3.5.1 Punto críticos en la curva de calibración.**

La curva de calibración, realizada solo con estándar externo o adicionando estándar interno, es la herramienta de medición que proporciona resultados más confiables en la técnica analítica de cromatografía de líquidos, pero si dicha curva está mal calculada generará resultados erróneos, por esa razón se debe verificar que la exactitud de los resultados que la curva está proporcionando se encuentren dentro de la incertidumbre deseada. A esa verificación se le conoce como control de calidad de la curva de calibración y es un punto crítico para los resultados (Tabla 16) se realiza utilizando un material de referencia certificado (BPL descrita en ANEXO 9), o en su defecto se adiciona el analito (sustancia química de alta pureza) a una matriz similar a la de la muestra, y en los casos de muestras complejas, se puede dividir una muestra en dos submuestras, utilizar una submuestra como blanco y a la otra adicionar el analito en cantidad conocida (spike, del idioma inglés).

**Tabla 16. Puntos críticos en la curva de calibración.**

Puntos críticos.	Problema(s).	Posible BPL que previene o evita que se presente el o los problema(s).
1. Control de calidad.	-Resultados precisos pero no exactos.	-Inyectar de manera aleatoria un MRC, si se cuenta con él, a concentraciones baja, media y alta con respecto al intervalo de concentración en que se realizó la curva de calibración. Si las concentraciones esperadas no concuerdan, repetir la curva de calibración, tratando de localizar cual es el problema y corregirlo.

**3.6 Preparación de las disoluciones de calibración.**

La exactitud de los resultados depende en gran medida de que tan bien se prepare la curva de calibración y esta a su vez depende de como se preparen las disoluciones de calibración [11]. En la tabla 17 se muestran los puntos críticos respecto a la preparación y de estos se deriva la BPL del ANEXO 10.

**Tabla 17. Punto críticos en la preparación de las disoluciones de calibración.**

Puntos críticos.	Problema(s).	Posible BPL que previene o evita que se presente el o los problema(s).
1. Factor de correlación	-Factor de correlación bajo.	-Preparar las concentraciones de disoluciones de calibración por peso (peso/peso). -Verificar que la balanza que se esta utilizando este calibrada. -Cuando esto no sea posible usar solo matraces y pipetas calibrados. -Usar matraces de mayor volumen para realizar las disoluciones de calibración. -Cuando pipetee homogenice la forma de hacerlo, por ejemplo: si usa micro pipetas siempre pegue la pipeta al contenedor después de haberla cargado para evitar que quede o no la gota suspendida. -Evitar que se formen burbujas de aire. -Asegurarse que carga y libera adecuadamente. -Cuando prepare por peso, no pesar cantidades muy pequeñas en balanzas de gran escala, o en la última cifra significativa, por ejemplo no pese 0.0005 g en una balanza que en su rango de peso tiene como máximo 200 g, es preferible pesar 0.5 µg en una micro balanza, adicionarlos al matraz y aforar el matraz en la balanza de mayor capacidad. -Cuidar que el numero de cifras significativas sea igual en ambas balanzas -Cuando prepare las disoluciones de calibración a partir de una disolución madre donde el disolvente es volátil, pesar usando jeringa y sacar el peso de la cantidad adicionada por diferencia de peso. -Inyectar cada nivel de concentración por triplicado y aleatoriamente.
2. Pureza del estándar.	-Posibles impurezas en el estándar cuando se emplean sustancias que no certifican su pureza.	-Verificar la pureza del estándar, empleando todos los métodos que sea posible usar de acuerdo al tipo de estándar y que se tengan al alcance: CDB, CG, CL, EM, UV-VIS, humedad, etc. y hacer corrección por pureza en el cálculo de la concentración de las disoluciones de calibración.



#### **4. Preparación de muestras**

La preparación de muestra es primordial para obtener buenos resultados. En esta parte se revisarán los puntos en los que se tiene que prestar especial atención en lo que respecta a material y equipo empleados en el tratamiento de muestras; aspectos directamente relacionados con la muestra como su extracción, contaminación, almacenamiento y manejo [11].

##### **4.1 Material y equipo**

###### **4.1.1 Equipo**

Con lo respecta al equipo, este debe contar con un programa de mantenimiento preventivo en el que se debe de incluir también el programa de calibración cuando así lo requieran, generalmente el mantenimiento lo proporciona el proveedor o el departamento de mantenimiento y servicio de la propia empresa, cuando el personal es entrenado previamente.

La calibración, que se define en el vocabulario de metrología propuesto por la guía ISO como: "Calibración de un instrumento de medición, es la operación de fijar las posiciones de las marcas de un instrumento de medición (en algunos casos solamente las marcas principales) en función de los valores corrientes del mesurando", puede realizarse por personal del laboratorio al cual se le debe dar entrenamiento para ésto o en su defecto contar con un documento donde se explique la manera detallada de como realizar una calibración para un instrumento específico (método). En algunos casos la calibración solo se debe realizar por un organismo calificado para ofrecer éste servicio, tal como un laboratorio primario o secundario. Existen casos en los que se puede verificar su funcionamiento adecuado con materiales de referencia, ejemplo espectrómetro UV-visible [15].

El laboratorio debe programar las calibraciones en base a:

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

Los equipos utilizados frecuentemente requerirán de períodos menores entre cada calibración a diferencia de los que su uso es esporádico. Cuando se utilizan equipos en determinaciones en las que la incertidumbre permitida en los resultados es pequeña, los períodos de calibración son diferentes a los convencionales, generalmente menores. Las cartas de control dan información de como se encuentra el funcionamiento del equipo, en base a los resultados que éste está proporcionando, lo que permite decidir la frecuencia de la calibración del equipo [15].

*Buenas Prácticas de Laboratorio en Cromatografía de Líquidos*

Ejemplo de equipos accesorios en la preparación de muestras para HPLC:

Balanzas analíticas.  
 Potenciómetros.  
 Espectrómetro UV visible.  
 Calorímetro diferencial de barrido.  
 Baños para control de temperatura.  
 Evaporadores con control de temperatura y presión (rotavapores).  
 Termómetros.  
 Cronómetros.

Ejemplo:

EQUIPO	Frecuencia verificación	Parámetro a verificar	Materiales de referencia	Procedimiento general	
Espectrómetro UV-visible	Dos veces al mes	Exactitud y reproducibilidad de la longitud de onda	Filtros de Holmio y Didimio  Disolución acuosa de $60 \pm 0.25$ mg $K_2Cr_2O_7$ /Litro en $H_2SO_4$ 0.01N	Verificar la longitud de onda en el intervalo de UV-visible. La desviación máxima debe ser $\pm 1$ nm . Correr dos espectros	
				Correr un espectro de 240 a 450 nm o verificar la absorbancia a la siguiente longitud de onda:	
				$\lambda$ (nm)	ABS
				235	0.747
				257	0.869
				313	0.293
				350	0.6
		El máximo de desviación es $\pm 1\%$ de la escala completa , en todos los intervalos . Correr tres espectros.			

#### **4.1.2 Material de vidrio**

##### **4.1.2.1 Clasificación de material de vidrio**

En una determinación analítica donde se realicen determinaciones de volumen que requieran una precisión y exactitud bien definida se utiliza material volumétrico calibrado el cual deberá usarse correctamente. En general dichos materiales son: matraces volumétricos, buretas, pipetas volumétricas y pipetas graduadas [11].

Para efecto de la clasificación por forma y tamaño, el material de vidrio *con respecto al tipo de material con el que esta fabricado* se divide en:

**Tipo I** Material fabricado con vidrio borosilicato, que a su vez se subdivide en:  
Subtipo Ia.- Bajo coeficiente de expansión térmica  
Subtipo Ib.- Alto coeficiente de expansión térmica

**Tipo II** Material fabricado con vidrio calizo

**Tipo III** Material fabricado con vidrio de baja transmitancia luminosa

*Por su tolerancia* el material de vidrio se clasifica en:

**Tipo I** Material para medición de exactitud, que a su vez tiene dos clases

Clase A. Se consideran los artículos volumétricos de mayor exactitud

Clase B. Son artículos considerados de menor exactitud, ya que la tolerancia de éstos es el doble que la establecida para los de clase A

**Tipo II** Material para medición somera.

En general para los propósitos de las mediciones realizadas en química analítica los materiales de vidrio comúnmente involucrado son: matraces volumétricos, pipetas volumétricas, pipetas serológicas y buretas. Estos materiales son diseñados para entregar o para contener, esto se indica por las siglas PE o PC, según sea el caso grabada en el instrumento de medición, en algunos casos esta sigla se puede encontrar en inglés siendo TD "To Deliver" para entregar o TC "To Contain" para contener [15,21].

En general (a menos que se especifique otra cosa en el equipo) estos materiales se calibran a una

temperatura de 20 °C, por lo que se recomienda emplearlos a esta temperatura. Nunca se deberá de someter al material volumétrico al calor o al frío porque esto propiciará que el vidrio con el que se encuentran fabricados se expanda o se contraiga produciendo una alteración en el volumen que contendrá, y se necesitan horas para que el material recobre su volumen original, así mismo no se deberán de colocar en el líquidos con temperaturas diferentes a 20 °C porque esto producirá una alteración en el volumen real medido. El material de vidrio que sea diseñado para entregar deberá tener indicado el tiempo de vaciado, entendiéndose por tiempo de vaciado como el tiempo en segundos que tarda un artículo volumétrico calibrado para entregar (vaciar) su capacidad total [15, 21].

#### **4.1.2.2 Limpieza del Material de Vidrio.**

Otro factor importante sobre la limpieza del material vidrio es que el volumen contenido o entregado dependerá de la limpieza de la superficie interna del vidrio del recipiente. Un recipiente de vidrio se encontrará perfectamente limpio si éste se humedece de manera uniforme, un humedecimiento imperfecto causa errores debido a que la película del líquido sobre las paredes causa una distorsión del menisco [15].

##### *Método General de limpieza.*

Para lavar el material de vidrio se deberá de sumergir este en una disolución acuosa de detergente sin jabón, y se deberán tallar las paredes del material con un cepillo suave, posteriormente se enjuagará el recipiente con agua corriente repetidas veces hasta que el detergente haya sido eliminado por completo. Una vez que el detergente ha sido eliminado se deberá de enjuagar el recipiente con agua destilada repetidas veces, y entonces se observa la formación de una película uniforme de agua sobre el recipiente si este se encuentra limpio. Si no es así, se recomienda adicionar acetona al mismo y enjuagar repetidas veces con esta para eliminar cualquier residuo de grasa que pudiera contener el recipiente. Si la limpieza aún así no es perfecta, entonces se deberá de proceder a la limpieza con cualquiera de las siguientes mezclas:

a) Una mezcla de una disolución saturada de dicromato de potasio y ácido sulfúrico concentrado. La mezcla se prepara disolviendo y calentando 60 o 65 g de dicromato de potasio o sodio en 30 o 35 mL de agua. Después de enfriarse se agrega el ácido sulfúrico poco a poco, dejando que este oscurezca por las paredes del matraz hasta que se complete un litro de disolución. El recipiente que se va a lavar se llena con esta disolución y se deja reposar por varias horas. La mezcla se regresa al recipiente que contenga esta mezcla y se enjuaga el material que se está limpiando con agua corriente por lo menos seis veces y posteriormente con agua destilada.

**Precaución:** Debido a que esta disolución es altamente corrosiva se deberá de manipular con guantes, lentes de

## *Buenas Prácticas de Laboratorio en Cromatografía de Líquidos*

seguridad y bajo una campana de extracción. Los residuos que se provoquen se deberán de poner en un contenedor adecuado y se deberá de diseñar un procedimiento para su desecho.

b) Una mezcla de permanganato de potasio a una concentración de 30 g/L con una disolución de hidróxido de sodio 1 molar. La disolución se prepara mezclando partes iguales de ambas disoluciones, esta mezcla se vacía al material que se requiere limpiar dejando reposar la disolución dentro de éste por varias horas, después de las cuales se vacía la disolución en un contenedor adecuado y se enjuaga el material con agua de la llave varias veces y posteriormente con agua destilada varias veces [15].

Una vez que el material ha sido lavado se deberá de poner sobre papel absorbente y boca abajo para que se seque. Para el material de vidrio que no sea de exactitud se podrá usar una estufa para secarlo, nunca se deberá de secar material volumétrico como pipetas, buretas, probetas y matraces volumétricos en la estufa, ya que el calor causa expansión en el vidrio y este producirá un error en el volumen que con estos se mida (ANEXO 15).

El método de limpieza del material de vidrio para análisis de compuestos orgánicos que se utiliza en Cromatografía de Líquidos en CENAM corresponde al ANEXO 15.

### **4.1.2.3 Puntos críticos en material de vidrio.**

En cromatografía de líquidos, cuando se trabaja realizando curvas de calibración por volumen, la incertidumbre se verá afectada por la clase de material de vidrio volumétrico con que se realicen las mediciones, la exactitud e incertidumbre de las micropipetas empleadas, las condiciones ambientales de trabajo, incertidumbre de MRC utilizados, entre otras. Por lo anterior la selección del material de vidrio es un punto crítico así como su limpieza adecuada, esta última evita alteraciones en los resultados debida a residuos en el material (Tabla 18). En la BPL del ANEXO 11 menciona los cuidados que se deben de tener en la limpieza del material de vidrio.

**Tabla 18. Puntos Críticos en el Material de Vidrio.**

<b>Puntos críticos.</b>	<b>Problema(s).</b>	<b>Posible BPL que previene o evita que se presente el o los problema(s).</b>
1. Selección .	-Problemas de alta incertidumbre por mala selección del material de vidrio.	-De acuerdo al nivel de incertidumbre que se requiere, seleccionar la clase de material de vidrio a utilizar. -Si el método requiere de alta exactitud, usar únicamente material de vidrio clase A.  -Se puede usar material de vidrio clase B si la medición de volumen en el método no es un punto crítico. Se debe almacenar por separado del de clase A, para evitar confusiones.
2. Limpieza del material.	-Contaminación proveniente del material de vidrio.	-Contar con procedimientos de lavado de material dependiendo del tipo de análisis:  Lavado de material de vidrio para análisis de muestras orgánicas.  Lavado de material de vidrio para muestras inorgánicas.  Para análisis de fosfatos, usar detergente libre de éstos.

#### **4.2. Extracción .**

Existen diferentes métodos de extracción, dentro de los más conocidos están: líquido-líquido y Soxhlet. Cualquiera que sea el método empleado se deben hacer pruebas para ver si la extracción es adecuada, esto se puede hacer calculando el porcentaje de recuperación en las diferentes etapas, y si los resultados no son satisfactorios (porcentajes de recuperación no mayores del 80 % o mayores de 110, por ejemplo) se puede intentar optimizar el método o de lo contrario intentar otro [1,11,12].

##### **4.2.1 Punto críticos en la extracción de muestras.**

El objetivo de una extracción, es obtener todo el compuesto o compuestos de interés existentes en la muestra, sin que sufra alteraciones o cuando así sea que se mantenga en la forma detectable en el método de análisis. Cuando en un método cuantitativo de análisis se emplean extracciones de algún tipo, la exactitud del método se ve directamente afectada por la eficiencia de la extracción y esta a su vez depende de la afinidad del solvente por el analito, que durante el proceso de extracción no se degrade el analito, entre otros aspectos que se mencionan en las Tablas 19 y 20 [1]. En el ANEXO 12 se describen los aspectos que permiten mejorar los resultados en extracciones líquido-líquido.

*Buenas Prácticas de Laboratorio en Cromatografía de Líquidos*

**Tabla 19. Puntos críticos en la extracción por Soxhlet de muestras.**

Puntos críticos.	Problema(s).	Posible BPL que previene o evita que se presente el o los problema(s).
1. Aparición de interferencias en el blanco.	-Sulfato de sodio anhidro contaminado.	-Lavar el sulfato con el solvente utilizado y secar en la estufa antes de utilizarlo.
	-Sistema de extracción Soxhlet sucio.	-Someterlo al procedimiento de limpieza frecuentemente.
2. Cantidad de analito extraída.	-Selección inadecuada de solvente.	-Hacer pruebas de solubilidad para determinar el solvente más adecuado.
	-Tiempo de reflujo (para Soxhlet) inadecuado.	-Realizar una gráfica de % recuperado en función del tiempo de extracción, para determinar el tiempo óptimo. Verificar la relación de la cantidad de muestra a extraer con volumen de solvente utilizado.
	-Retención en la matriz.	-Evaluar otras posibles técnicas de separación.
3. Aparición de interferencias en las muestras.	-Proceso de limpieza inadecuado.	-Limpieza de la muestra: Puede ser necesaria la utilización de cromatografía en columna con diferentes solventes o un separación por cromatografía de líquidos con una fase móvil y una fase estacionaria adecuada dependiendo del tipo de interferencias que se sospeche que se encuentran en la matriz.
4. Degradación de analitos.	-Temperatura del solvente inadecuada.	-Seleccionar otro solvente cuya temperatura de ebullición sea menor, trabajar a temperaturas menores, siempre y cuando se asegure de que el solvente presenta un reflujo moderado.



**Tabla 20. Puntos críticos en la extracción líquido-líquido de muestras**

Puntos críticos.	Problema(s).	Posible BPL que previene o evita que se presente el o los problema(s).
1. Bajos porcentajes de recuperación.	-Miscibilidad parcial de la fase orgánica en la fase acuosa.	-Usar estándar interno. -Probar diferentes solventes orgánicos, hacer una relación solventes-porcentajes de recuperación, y elegir el más eficiente.
	-Cantidad insuficiente de fase extractante (en la que se encuentra el analito de interés).	-Aumentar paulatinamente la fase extractante y hacer una relación de porcentaje de recuperación-volumen y elegir el volumen óptimo.
	-Pérdidas por derrames de la fase extractante	-Lo más recomendable es usar estándar interno, de no ser posible, tener mucho cuidado en la medición exacta de volúmenes.
	-Compuestos sensibles a la luz	-Trabajar lo más rápidamente posible y con la luz apagada de la campana de extracción, procurar que no les de la luz directamente.
	-Compuestos sensibles a la temperatura	-Utilizar equipos accesorios con control de temperatura, y trabajar a las temperaturas a las que son más estables (generalmente 40 °C)
2. Altos porcentajes de recuperación	-Evaporación de solventes, durante la extracción.	-Lo más recomendable es usar estándar interno, si no es posible marcar el nivel cuando se adiciona el solvente volátil y al final de la extracción volver a marcar el nivel del solvente, inmediatamente recuperar la fase orgánica. Medir cuanto se evaporó y corregir el volumen. -Otra forma es colocar el solvente en el embudo de separación que se está usando y marcar cada 10 min. el nivel de solvente y calcular el volumen de solvente que se evapora por minuto, así se podrá corregir el volumen final de la fase acuosa.
	-Problemas de retención en columnas.	-Usar modificadores de fase móvil para hacerlas más eficientes. -Disminuir la cantidad de muestra.

#### **4.3 Almacenamiento y manejo de muestras.**

Lo ideal para obtener los resultados más exactos en referencia a las características reales de la muestra es realizar el análisis en el momento en que ésta se recibe, pero en la mayoría de los casos no es posible, aún cuando así fuera, existen analitos sensibles a los cambios de condiciones ambientales como temperatura, oxigenación, presión, luz, humedad entre otras. El manejo de muestras también es relevante en la veracidad de los resultados, puesto que un analito puede ser alterado en su composición o concentración en una muestra por mal manejo o contaminación cruzada de ésta [11].

##### **4.3.1 Puntos críticos en el almacenamiento y manejo de muestras.**

Los cuidados que se deben de tener en el almacenamiento y manejo de muestras puede variar dependiendo de la etapa del proceso, desde recepción hasta posterior al análisis, considerando que en el proceso de muestreo y traslado al laboratorio se tomaron las precauciones necesarios de acuerdo al tipo de muestra, que corresponden a la etapa previa al análisis. Una vez que la muestra se encuentra en el laboratorio, su manejo y almacenamiento debe ser enfocado a mantener la concentración y composición del o los analitos de interés, algunos de los aspectos importantes para lograrlo se consideran en la Tabla 21 y en el ANEXO 13.

**Tabla 21. Puntos críticos en el almacenamiento y manejo de muestras.**

Puntos críticos.	Problema(s).	Posible BPL que previene o evita que se presente el o los problema(s).
1. Homogeneidad de muestras.	-Resultados muy variables por muestras heterogéneas: a) Muestras sólidas con tamaño de partícula no homogéneo.	Muestras sólidas, moler la muestra y pasarla por un tamiz, para homogeneizar el tamaño de partícula. Nota: es importante el asegurar que en este paso no se introduce contaminación a la muestra.
	b) Muestras líquidas en suspensión o con analitos que tienden a sedimentar.	-Muestras líquidas, agitarlas siempre antes de analizarlas.
	c) Mezcla semisólidas, sólido en base agua o aceite (alimentos).	-Muestras semisólidas. mezclar antes de analizar.
2. Temperatura.	-Degradación debida a temperaturas altas.	-Mantener la muestra en el refrigerador antes y después de tomar la porción o porciones de análisis. (revisar bibliografía para ver si existen algunas recomendaciones. Ejemplo : -Los carotenoides es preferible almacenarlos a -80°C, son menos estables que el retinol y tocoferol. -Minimizar el congelamiento y descongelamiento.
3. Humedad.	-Degradación debida a la humedad.	-Colocar las muestras en un desecador a vacío en el cual el agente desecante se encuentre libre de humedad. -Cambiar la sílica del desecador Revisar que la llave que conecta al vacío no tenga fugas.
4. Sensibilidad a la luz.	-Degradación debida a la luz.	-Colocar la muestra en bolsas de muestreo opacas. -Colocar la muestra en frascos ámbar.
5. Evaporación.	-Muestras volátiles.	-Usar contenedores bien sellados y mantenerlas en refrigeración.
6. Toxicidad.	-Enfermedades laborales.	-Manejarlas siempre con guantes. -Trabajar sobre servilletas de papel para el laboratorio, al final recogerlas y desecharlas como residuos peligrosos (si es el caso). -Ver las recomendaciones en caso de accidente en bibliografía o si se cuenta con el material puro, revisar la hoja de seguridad.

*Buenas Prácticas de Laboratorio en Cromatografía de Líquidos*

**Tabla 22. Puntos críticos en el almacenamiento y manejo de muestras ya preparadas.**

Puntos críticos.	Problema(s).	Posible BPL que previene o evita que se presente el o los problema(s).
1. Concentraciones del analito.	-Variación en la concentración del analito por evaporación del disolvente o del mismo analito.	-Usar estándar interno. -Sellar correctamente los viales para evitar la evaporación del disolvente de la muestra o del analito.
	-Temperatura del laboratorio alta.	-Regular la temperatura del laboratorio a 20 °C o colocar las muestras en refrigeración y minimizar el tiempo que se mantienen a las condiciones ambientales del laboratorio.
	-Inestabilidad de las muestras con respecto al tiempo.	-Realizar una prueba de estabilidad a diferentes temperaturas y determinar el tiempo de vida media de las disoluciones en cada temperatura, almacenarla a la temperatura que es más estable.
2. Sensibilidad a la luz.	-Picos del analito que aparecen y/o desaparecen en el cromatograma (picos fantasmas), o disminuyen o aumentan de tamaño con el tiempo.	-Utilizar contenedores color ámbar para las muestras sensibles a la luz. Inyectarlas lo más rápido posible.
3. Ubicación de muestras.	-Resultados erróneos por asignación errónea de la posición de las muestras en el automuestreador.	-Etiquetar de manera correcta las muestras, corroborar que la etiqueta asignada corresponda a la concentración. -Si utiliza un procesador verifique que la manera en que asignó el orden de inyección de las muestras, fue el correcto.

#### **4.4 Contaminación de muestras.**

Para lograr que los resultados de análisis de una muestra proporcionen la información requerida, ésta debe mantener sus características hasta el momento de análisis y si es posible posterior a él. La presencia, de cualquier sustancia extraña en la muestra, ya sea adicionada o generada es posible que altere los resultados del análisis. La BPL del ANEXO 14 se indica algunos de los cuidados que permiten el manejo adecuado de éste tipo muestras [13].

##### **4.4.1 Buenas prácticas de laboratorio para evitar la contaminación de muestras.**

La contaminación de la muestra, es un punto crítico por sí solo. Algunos de los cuidados que se deben de tener para prevenir o evitar la contaminación de muestras y así ayudar a que la muestra mantenga sus características físicas originales son: no introducir nada en ella como sustancias químicas, espátulas contaminadas o de material que reaccione con la muestra, así como pipetas o jeringas contaminadas. Adicionalmente, cuando se somete la muestra a procesos de molienda, tamizado, filtrado, etc durante la preparación de muestra, debe evitarse introducir contaminación por dichas vías (ANEXO 14) [2].

**5. Conclusiones y Recomendaciones.**

- a) Es responsabilidad del analista dar un resultado exacto cuando procesa una muestra para cuantificar uno o más analitos, por lo que también es su responsabilidad conocer, monitorear y perfeccionar todos los aspectos que afecten la exactitud de los resultados de un método analítico.
- b) En Cromatografía de líquidos de Alta Resolución por ser una técnica analítica instrumental, una forma de perfeccionar el desempeño y optimizar los resultados proporcionados por esta técnica es la identificación de fuentes de error y documentarlos. Este manual proporciona una forma de hacerlo, sugiriendo una guía de cómo realizar un Manual de Buenas Prácticas de Laboratorio específico para Cromatografía de Líquidos.
- c) Un Manual Buenas Prácticas de Laboratorio será de mayor utilidad si esta adaptado para un Sistema Cromatográfico en particular, por que se debe elaborar por el personal que opera el instrumento.
- d) El Manual de Buenas Prácticas de Laboratorio en Cromatografía de Líquidos para que cumpla su función, siempre se deberá encontrar en el laboratorio para que sea consultado en el momento requerido.
- e) En las Buenas Prácticas de Laboratorio en Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución que se sugieren en este documento, se puede ver que algunas de ellas son prácticas que normalmente se tienen en un laboratorio de Cromatografía de Líquidos y puede parecer un proceso engorroso el estarlas consultando. No lo es, ya que solo se requiere conocerlas y familiarizarse con ellas cuando una persona se inicia en esta técnica y posteriormente sirven como documento de consulta cuando se tienen dudas. Cabe mencionar que existen algunas como "Verificación del flujo de la bomba y su reproducibilidad" y "Caracterización de columnas y recomendaciones" que requieren ser consultadas y aplicadas con mayor frecuencia. Por otro lado es muy importante que los detalles de una técnica o sistema analítico se encuentren documentados, puesto que el personal operativo puede cambiar en cualquier momento.

*Buenas Prácticas de Laboratorio en Cromatografía de Líquidos*

**Bibliografía.**

- 1.-Field Manual/Chemical Methods, EPA, Method number 8000B; "Determinative Chromatographic Separation"; Vol. II, SW-846; Edition Third, Washington, DC; November de 1986.
- 2.-Annual Book of ASTM Standards; Method number E200; "Practice for Preparations, Standardizations, and Storage of Standard Solutions for Chemical Analysis"; Vol. 15.05; Philadelphia, PA; 1992.
- 3.-Annual Book of ASTM Standards; Method number E682; "Practice for Liquid Chromatography Terms and Relationships"; Vol. 14.01; Philadelphia, PA; 1992.
- 4.-Annual Book of ASTM Standards; Method number D1193-91; "Standard Specification for Reagent Water"; Vol. 11.01; Philadelphia, PA; 1992.
- 5.-Dolan Jonh W. and Snyder Lloyd R.; "Troubleshooting LC Systems"; Humana Press; LC Resources Inc., Walnut Creek, California, 1989.
- 6.-Lawrence James F.; "Organic Trace Analysis by Liquid Chromatography"; Academic Press; Orlando Florida, USA, 1981.
- 7.-McNair Harold M. and Esquivel H. Benjamin; "Cromatografía Líquida de Alta Presión"; Segunda Edición; Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos; Washington, D.C, USA, 1980.
- 8.-Johnson Edward L. and Stevenson Robert; "Basic Liquid Chromatography"; Varian; Palo Alto California, USA, 1978.
- 9.-García de Marina Adrian, Del Castillo Benito; "Cromatografía Líquida de Alta Resolución"; Ed. Limusa; México D.F, 1988.
- 10.-Poole Colin F. and Poole Salwa K.; "Chromatography Today"; Elsevier, Detroit, MI, USA, 1991.
- 11.-Brown Thomas Jeanice and Sharpless Katherine; "The Fat-Soluble Vitamin and Carotenoid Analysis Tutorial". (course memories); NIST; Gaithersburg, MD, USA, 1995.
- 8.-Parris Reenic M. "Buenas Prácticas de Laboratorio en Cromatografía de Gases", (Memorias del curso); NIST-CENAM; Querétaro, México, 1995.
- 13.-Arellin Octavio y Martínez G. Ricardo.; "Curso de Cromatografía de Líquidos de Alta

*Buenas Prácticas de Laboratorio en Cromatografía de Líquidos*

- Resolución", (Memorias del Curso); Waters S. A. de C.V., México D.F, 1994.
- 14.-Godina G. Susana, Lora S. Ana Ma., Pérez U. Melina y Carbujal A. Carlos E.; "Buenas Prácticas del Laboratorio". (Memorias del Curso); CENAM, Edo. de México, 1996.
- 15.-Sánchez G. Mónica, Castro G. Esther, Sáinz U. Judith G., González R. Norma, Arvizu T. Rocío, Lora S, Ana Ma., Lara M. Velina J. y Ramírez M. Estela; "Manual de Buenas Prácticas de Laboratorio"; Publicación CNM-MRD-PT008. CENAM; México 1995.
- 16.-Espectrofotometría de Absorción Infrarroja, Cromatografía de Gases y de Líquidos", (Memorias del Curso); Tópicos de Instrumentación , iai.; México,1995.
- 17.-"Calibración y Verificación del Funcionamiento de Equipos Varios del Laboratorio", (Memorias del Curso) ; Tópicos de Instrumentación iai.; México,1995.
- 18.-Torres L. Maritza; "Selección y Producción de Agua para Uso en Laboratorios Analíticos"; Publicación CNM-MRD-PT-017, Borrador (Draft), CENAM, México, 1996.
- 19.-Arce O. Mariana y Godina G. Susana; "Procedimiento del Manejo del Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución del Sistema de Gradiente 600s (Cromatógrafo 1)"; CENAM-Lab.C014, QRO. México, 1995.
- 20.-Arce O. Mariana; "Procedimiento del Manejo del Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución del Sistema Isocrático 600 (Cromatógrafo 2)"; CENAM-Lab.C014, QRO. México, 1995.
- 21.-Norma Oficial Mexicana, NOM-BB-86-1982; "Especificaciones de utensilios y recipientes volumétricos de vidrio para laboratorio".
- 22.-Alvarez R. Laura, Mitani N. Yoshito y Quintana, Z. Delia; Traducción No Oficial de: "Términos y Definiciones en relación a Materiales de Referencia (ISO GUIA 30), Contenido de los Certificados de los Materiales de Referencia (ISO GUIA 31), Lineamientos del Sistema de Calidad para la producción de Materiales de Referencia (Draft ISO GUIA 34)"; Publicación CNM-MRD-PT015, CENAM; México 1995.
- 23.-Parker P. Sybil (Editor in chief); "Dictionary of Scientific and Technical Terms"; McGraw-Hill; Edition 4th; USA. 1989.
- 24.- Parkany Michael. , "The Use of Recovery Factors in Trace Analysis, The proceeding of the Seventh International Harmonization Symposium on a Protocol for Recovery Factor held in Orlando, Florida on 4-5 September 1996"; The Royal Society of Chemistry; Special Publication No. 184.; UK



*Buenas Prácticas de Laboratorio en Cromatografía de Líquidos*

1996.

25.- Hasselbarth W-BAM Germany; "Practical Traceability Procedures in Chemical Analysis"; CITAC (Co-Operation on International Traceability in Analytical Chemistry)NEWS, february, 1997.

FALTA PAGINA

No. 60

**Lista de figuras:**

- Figura 1.1. "Clasificación de la cromatografía en función a la naturaleza de la fase estacionaria".
- Figura 1.2. "Clasificación global".
- Figura 2. "Esquema del Sistema de Cromatografía de Líquidos".
- Figura 3. "Válvula inyectora (jeringa-loop); A. Toma de la muestra, B. Inyección de la muestra".
- Figura 4. "Cromatograma".
- Figura 5. "Curva de calibración por estándar interno (preparación de disoluciones estándares)".
- Figura 6. "Curva de calibración por estándar interno".
- Figura 7. "Curva de calibración por estándar externo (preparación de disoluciones estándares)".
- Figura 8. "Curva de calibración por estándar externo".



ANEXO 1  
**CENTRO NACIONAL DE METROLOGÍA**  
*METROLOGÍA DE MATERIALES, DIVISIÓN POLÍMEROS*

BUENAS PRÁCTICAS DE LABORATORIO EN CROMATOGRFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN	N°
	Rev. NÚM. 0
SISTEMA CROMATOGRÁFICO HPLC "Lavado del Sistema de Cromatografía de Líquidos"	Fecha: 1997/03/03
	Página: 1 de 5

**1. OBJETIVO Y ALCANCE.**

**1.1 Objetivo.**

Describir las BPL referentes al proceso de lavado del sistema cromatográfico (ver referencias 1,2), el cual tiene como finalidad prevenir corrosión, abrasión y bloqueo, evitando así, el subsecuente daño a los componentes que lo integran e interferencias en los resultados de análisis.

**1.2 Alcance.**

Esta BPL proporciona información requerida en los Sistemas de Cromatografía de Líquidos: cromatógrafo 1 y 2, del Laboratorio CO14 ubicado en el edificio C del CENAM (ver referencias 1,2).

**2. USO.**

Esta BPL se usará siempre que se termine una jornada de trabajo, se cambie del sistema la columna, tuberías o disolventes, o bien cuando se requiera por circunstancias particulares de trabajo.

**3. NOTACIONES Y DEFINICIONES.**

**3.1 Notaciones.**

*Disolvente de alta o más alta fuerza de elusión.*- Se refiere al disolvente con que la columna se puede lavar para eliminar los posibles analitos retenidos con el tiempo y liberar los sitios activos que ellos ocupan, que la fase móvil en uso no tiene la "fuerza" (afinidad) para hacerlo. Así, el disolvente de alta fuerza de elusión se elige de acuerdo a las características de la columna y debe de tener mayor afinidad por los analitos que la propia columna.

*Cromatógrafo 1.*- Corresponde al sistema de gradiente con inyector automático, integrado por los módulos 600s, 616 y 717, columna y cualquiera de los detectores (470, 490E 996, 431,

<b>Elaboró:</b> Mariana Arce Osuna
<b>Revisó:</b> Mónica Sánchez Gómez
<b>Aprobó:</b> Dr. Yoshito Mitani N.



**CENTRO NACIONAL DE METROLOGÍA**  
**METROLOGÍA DE MATERIALES, DIVISIÓN POLÍMEROS**

BUENAS PRÁCTICAS DE LABORATORIO EN CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN	N°
	Rev. NÚM. 0
SISTEMA CROMATOGRÁFICO HPLC "Lavado del Sistema de Cromatografía de Líquidos"	Fecha: 1997/03/03
	Página: 2 de 5

464 ó 410).

**Cromatógrafo 2.-** Corresponde al sistema isocrático con inyector manual, integrado por los módulos 600 y 610, inyector Rheodyne, unidad degasificadora y conectado a cualquiera de los detectores.

### 3.2 Definiciones.

**Sistema isocrático.-** Será aquel equipo, donde la bomba mantiene constantes la composición de la fase móvil durante el análisis.

**Sistema de gradiente.-** Será aquel equipo, donde la bomba permite variar la composición de la fase móvil durante el análisis.

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

### 3.3 Abreviaturas.

Las siglas anotadas en esta BPL significan:

HPLC	Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución.
600s	Controlador del sistema de bombeo.
600	Controlador del sistema de bombeo.
616	Bomba de inyección cuaternaria.
610	Bomba de inyección isocrática.
717	Automuestreador plus.
470	Detector de fluorescencia.
490E	Detector ultravioleta-visible.
995	Detector de arreglo de diodos (UV).
431	Detector de índice de refracción.

Elaboró: Mariana Arce Osuna

Revisó: Mónica Sánchez Gómez

Aprobó: Dr. Yoshito Mitani N.



**CENTRO NACIONAL DE METROLOGÍA**  
**METROLOGÍA DE MATERIALES. DIVISIÓN POLÍMEROS**

BUENAS PRÁCTICAS DE LABORATORIO EN CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN	N°
	Rev. NÚM. 0
SISTEMA CROMATOGRÁFICO HPLC "Lavado del Sistema de Cromatografía de Líquidos"	Fecha: 1997/03/03
	Página: 3 de 5

464            Detector de conductividad.  
410            Detector electroquímico.  
loop          Palabra del idioma inglés, que describe la tubería de volumen fijo empleada en los inyectores para medir el volumen inyectado de muestra

#### 4. BUENAS PRÁCTICAS DE LABORATORIO EN EL LAVADO DE LOS SISTEMAS HPLC.

##### 4.1 DISOLVENTES.

Cuando se trabaje con el sistema cromatográfico de gradiente (cromatógrafo 1) desgasificar el disolvente de lavado durante 10 min con helio grado cromatográfico, antes de usarlo y para el caso del sistema cromatográfico isocrático (cromatógrafo 2) permitir a la unidad degasificadora que lo haga por 5 min.

No olvide mantener cerradas las terminales de tuberías al final del lavado para evitar contaminación o que se seque el sistema.

##### 4.2 Bombas.

Cuando se trabaje con disoluciones amortiguadoras, o fases móviles que ataquen el material de los cabezales (ácidos, bases y sales) asegurar que las mangueras de lavado de cabezales estén en el contenedor de agua (ver referencia 1).

##### 4.3 Inyector.

Para el sistema isocrático enjuagar el "loop" de muestra cada vez que lo use, para remover residuos.

Para el sistema de gradiente con inyector automático, permitir que realice el autolavado por 3 minutos.

No deje las tuberías del inyector en fases móviles que contengan disoluciones amortiguadoras.

Elaboró: Mariana Arce Osuna
Revisó: Mónica Sánchez Gómez
Aprobó: Dr. Yoshito Mitani N.



**CENTRO NACIONAL DE METROLOGÍA**  
**METROLOGÍA DE MATERIALES, DIVISIÓN POLÍMEROS**

<b>BUENAS PRÁCTICAS DE LABORATORIO EN CROMATOLOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN</b>	<b>N°</b>
	<b>Rev. NÚM. O</b>
	<b>Fecha: 1997/03/03</b>
<b>SISTEMA CROMATOGRÁFICO HPLC</b> <b>"Lavado del Sistema de Cromatografía de Líquidos"</b>	<b>Página: 4 de 5</b>

#### 4.4 Líneas del sistema.

Verificar la miscibilidad entre el disolvente que se utilizó para el análisis con el agua.

Por ejemplo:

- cuando cambie de heptano (disolvente de trabajo) a una disolución acuosa, metanol al 10% (disolución de lavado), primero pase al sistema hexano, después acetona o isopropanol y finalmente metanol al 10% en agua.
- al final del lavado deje el sistema en una disolución acuosa conteniendo 10% de metanol u otro disolvente miscible en agua y que tenga características antimicrobianas.

#### 4.5 Columna.

Generalmente cada columna tiene un manual del fabricante, revise las indicaciones de limpieza y almacenamiento del fabricante.

Elimine cualquier disolución amortiguadora de las columnas para evitar crecimiento microbiano. Al finalizar una jornada de trabajo enjuáguela con un disolvente de alta fuerza de elusión, el cual elegirá dependiendo de la columna.

Deje la columna en una disolución acuosa conteniendo del 10% al 20 % de metanol, acetonitrilo u otro disolvente miscible en agua y que tenga características antimicrobianas. No olvide colocar los tapones en ambos lados de la columna, para evitar que se seque.

#### 4.6 Detector.

Para cualquier tipo de detector, lavar lo y dejarlo en disolución acuosa de metanol al 10% al final de la jornada de trabajo para evitar crecimiento microbiano.

Colocar tapones a la salida del detector, para evitar que la celda se seque.

### 6. REFERENCIAS.

- 1.-Arce O. Mariana y Godina G. Susana; "Procedimiento del Manejo del Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución del Sistema de Gradiente 600s (Cromatógrafo 1)"; CENAM-Lab. CO14, Querétaro. México, 1995.

<b>Elaboró: Mariana Arce Osuna</b>
<b>Revisó: Mónica Sánchez Gómez</b>
<b>Aprobó: Dr. Yoshito Mitani N.</b>



**CENTRO NACIONAL DE METROLOGÍA**  
**METROLOGÍA DE MATERIALES, DIVISIÓN POLÍMEROS**

<b>BUENAS PRÁCTICAS DE LABORATORIO EN CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN</b>	<b>N°</b>
	<b>Rev. NÚM. O</b>
<b>SISTEMA CROMATOGRÁFICO HPLC</b> <b>"Lavado del Sistema de Cromatografía de Líquidos"</b>	<b>Fecha: 1997/03/03</b>
	<b>Página: 5 de 5</b>

2.-Arce O. Mariana; "Procedimiento del Manejo del Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución del Sistema Isocrático 600 (Cromatógrafo 2)"; CENAM-Lab. C014, Querétaro, México, 1995.

3.-Dolan Jonh W. and Snyder Lloyd R.; "Troubleshooting LC Systems"; Humana Press; LC Resources Inc., Walnut Creek, California, 1989.

4.-Lawrence James F.; "Organic Trace Analysis by Liquid Chromatography"; Academic Press; Orlando Florida, USA, 1981.

5.-Godina G. Susana, Lora S. Ana Ma., Pérez U. Melina y Carbajal A. Carlos E.; "Buenas Prácticas del Laboratorio", (Memorias del Curso); CENAM, Edo. de México, 1996.

6.-Espectrofotometría de Absorción Infrarroja, Cromatografía de Gases y de Líquidos", (Memorias del Curso); Tópicos de Instrumentación Ial.; México. D.F., 1995.

7.-"Calibración y Verificación del Funcionamiento de Equipos Varios del Laboratorio", (Memorias del Curso) ; Tópicos de Instrumentación Ial.; México D. F., 1995.

8.-Garriz Andoni y Chamizo José A.; "Química"; Addison-Wesley Iberoamericana; Wilmington, Delaware, E.U; 1994.

**Elaboró: Mariana Arce Osuna**

**Revisó: Mónica Sánchez Gómez**

**Aprobó: Dr. Yoshito Mitani N.**





ANEXO 2  
CENTRO NACIONAL DE METROLOGÍA  
METROLOGÍA DE MATERIALES, DIVISIÓN POLÍMEROS

BUENAS PRÁCTICAS DE LABORATORIO EN CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN	N°
	Rev. NÚM. O
BOMBAS "Verificación del flujo de la bomba y su reproducibilidad"	Fecha: 1997/03/11
	Página: 1 de 6

## 1. OBJETIVO Y ALCANCE.

### 1.1 Objetivo.

Describir las BPL para conocer la reproducibilidad de la velocidad de flujo que entrega la bomba de trabajo.

Contar con registros periódicos de la velocidad de flujo para cada método, que sirven de referencia cuando: a) se esté optimizando nuevos métodos donde se empleen similares disolventes y se pueda reproducir éste procedimiento bajo las mismas condiciones, esto es composición de fase móvil, columna, temperatura del sistema y medio ambiente; b) en casos de fallas de la bomba.

### 1.2 Alcance.

Esta BPL proporciona información requerida en los Sistemas de Cromatografía de líquidos: cromatógrafo 1 y 2, del Laboratorio CO14 ubicado en el edificio C del CENAM (referencias 1,2) para evaluar el funcionamiento general del sistema y en particular de la bomba. Permite detectar cuando los problemas de reproducibilidad de los tiempos de retención de los picos, se deben a la falta de reproducibilidad del flujo, causado por la bomba.

## 2. USO.

Se deben verificar el flujo (pasos del 4.1.2.1 al 4.1.2.7) cada vez que se encienda el sistema o cuando se cambie el tipo de disolventes

Se deben determinar la reproducibilidad (pasos del 4.1.2.1 al 4.1.2.7 y 4.1.3.1) como mínimo cada seis meses.

Para ambos casos, cuando se requiera por circunstancias particulares de trabajo.

Elaboró: Mariana Arce Osuna.

Revisó: Mónica Sánchez Gómez.

Aprobó: Dr. Yoshito Mitani Nakanishi.



**CENTRO NACIONAL DE METROLOGÍA**  
**METROLOGÍA DE MATERIALES, DIVISIÓN POLÍMEROS**

BUENAS PRÁCTICAS DE LABORATORIO EN CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN	N°
	Rev. NÚM. O
BOMBAS "Verificación del flujo de la bomba y su reproducibilidad"	Fecha: 1997/03/11
	Página: 2 de 6

### 3. NOTACIONES y DEFINICIONES.

#### 3.1 Notaciones.

*Cromatógrafo 1.*- corresponde al sistema de gradiente con inyector automático, integrado por los módulos 600s, 616 y 717, columna y cualquiera de los detectores (470, 490E, 996, 431, 464 ó 410).

*Cromatógrafo 2.*- corresponde al sistema isocrático con inyector manual, integrado por los módulos 600 y 610, inyector Rheodyne, unidad degasificadora y conectado a cualquiera de los detectores.

#### 3.2 Definiciones.

*Sistema isocrático.*- Es cuando la bomba del equipo mantiene constantes la composición de la fase móvil durante el análisis.

*Sistema de gradiente.*- Es cuando la bomba del equipo permite variar la composición de la fase móvil durante el análisis.

*Disolución.*- Mezcla homogénea de partículas en una fase dispersa, formada por diferentes componentes, que pueden separarse de ella por métodos físicos pero su apariencia es totalmente uniforme. El componente que está en exceso se conoce como disolvente. El componente o los componentes que se encuentran en menor proporción se llaman solutos (ver referencia 7).

#### 3.3 Abreviaturas.

Las siglas anotadas en esta BPL significan:

HPLC            Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución.

Elaboró: Mariana Arce Osuna.

Revisó: Mónica Sánchez Gómez.

Aprobó: Dr. Yoshito Mitani Nakanishi.



**CENTRO NACIONAL DE METROLOGÍA**  
**METROLOGÍA DE MATERIALES, DIVISIÓN POLÍMEROS**

<b>BUENAS PRÁCTICAS DE LABORATORIO EN CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN</b>	<b>N°</b>
	<b>Rev. NÚM. 0</b>
<b>BOMBAS</b> <b>"Verificación del flujo de la bomba y su reproducibilidad"</b>	<b>Fecha: 1997/03/11</b>
	<b>Página: 3 de 6</b>

600s	Controlador del sistema de bombeo.
600	Controlador del sistema de bombeo.
616	Bomba de inyección cuaternaria.
610	Bomba de inyección isocrática.
717	Automuestreador plus.
470	Detector de fluorescencia.
490E	Detector de ultravioleta.
996	Detector de arreglo de diodos (UV).
431	Detector de índice de refracción.
464	Detector de conductividad.
410	Detector electroquímico.
DS	Desviación estándar.
%SDR	Desviación estándar relativa en porcentaje.

**4. BUENAS PRÁCTICAS DE LABORATORIO PARA VERIFICAR EL FLUJO Y LA REPRODUCIBILIDAD DE LA BOMBA.**

**4.1 PROCEDIMIENTOS.**

**4.1.1 Material.**

Matraz volumétrico calibrado.  
Cronómetro polibrado.

**4.1.2 Flujo.**

- 4.1.2.1.- Programar la velocidad de flujo de la bomba a 1 mL/min.
- 4.1.2.2.- Ajustar el cronómetro (calibrado) a la posición cero.
- 4.1.2.3.- Preparar un matraz volumétrico calibrado de 10 mL.
- 4.1.2.4.- Colocar el matraz volumétrico calibrado a la salida de la columna y de manera

<b>Elaboró: Mariana Arce Osuna.</b>
<b>Revisó: Mónica Sánchez Gómez.</b>
<b>Aprobó: Dr. Yoshito Mitani Nakanishi.</b>



**CENTRO NACIONAL DE METROLOGÍA**  
METROLOGÍA DE MATERIALES, DIVISIÓN POLÍMEROS

BUENAS PRÁCTICAS DE LABORATORIO EN CROMATOLOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN	N°
	Rev. NÚM. O
BOMBAS "Verificación del flujo de la bomba y su reproducibilidad"	Fecha: 1997/03/11
	Página: 4 de 6

simultanea activar el cronómetro.

4.1.2.5.- Parar el cronómetro cuando el volumen de fase móvil en el matraz volumétrico alcance la marca de aforo.

4.1.2.6.- Calcular el flujo (f).

$$f = \frac{V_{fm}}{t}$$

donde,

$$f = \text{flujo} \left( \frac{mL}{\text{min}} \right)$$

$V_{fm}$  = volumen - de - fase - móvil (mL)

t = tiempo (min)

4.1.2.7.- Reportar el flujo obtenido y las condiciones de trabajo del método (disolventes, columna, temperatura de la columna y temperatura del medio ambiente).

4.1.3.- Reproducibilidad del flujo.

4.1.3.1.- Repetir el procedimiento (pasos del 4.1.2.1 al 4.1.2.7) tres veces por día por seis días consecutivos, reportar los resultados, obtener la desviación estándar de los resultados y el análisis de varianza como en la tabla 1.

Elaboró: Mariana Arce Osuna.
Revisó: Mónica Sánchez Gómez.
Aprobó: Dr. Yoshito Mitani Nakanishi.



*Buenas Prácticas de Laboratorio en Cromatografía de Líquidos*



**CENTRO NACIONAL DE METROLOGÍA**  
**METROLOGÍA DE MATERIALES, DIVISIÓN POLÍMEROS**

<b>BUENAS PRÁCTICAS DE LABORATORIO EN CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN</b>	<b>N°</b>
	<b>Rev. NÚM. 0</b>
<b>BOMBAS</b> <b>"Verificación del flujo de la bomba y su reproducibilidad"</b>	<b>Fecha: 1997/03/11</b>
	<b>Página: 6 de 6</b>

Resolución del Sistema Isocrático 600 (Cromatógrafo 2); CENAM-Lab. CO14, Querétaro. México, 1995.

3.-Dolan Jonh W. and Snyder Lloyd R.; "Troubleshooting LC Systems"; Humana Press; LC Resources Inc., Walnut Creek, California, 1989.

4.-Lawrence James F.; "Organic Trace Analysis by Liquid Chromatography"; Academic Press; Orlando Florida, USA, 1981.

5.-Godina G. Susana, Lora S. Ana Ma., Pérez U. Melina y Carbajal A. Carlos E.; "Buenas Prácticas del Laboratorio", (Memorias del Curso); CENAM, Edo. de México, 1996.

6.-Espectrofotometría de Absorción Infrarroja, Cromatografía de Gases y de Líquidos", (Memorias del Curso); Tópicos de Instrumentación , Iai., México. D.F., 1995.

7.-"Calibración y Verificación del Funcionamiento de Equipos Varios del Laboratorio", (Memorias del Curso) ; Tópicos de Instrumentación Iai.; México D. F., 1995.

8.-Garritz Andoni y Chamizo José A.; "Química"; Addison-Wesley Iberoamericana; Wilmington, Delaware, E.U; 1994.

**Elaboró: Mariana Arce Osuna.**

**Revisó: Mónica Sánchez Gómez.**

**Aprobó: Dr. Yoshito Mitani Nakanishi.**

FAC-01

ANEXO 3



**CENTRO NACIONAL DE METROLOGÍA**  
**METROLOGÍA DE MATERIALES. DIVISIÓN POLÍMEROS**

<b>BUENAS PRÁCTICAS DE LABORATORIO EN CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN</b>	N°
	Rev. NÚM. O
	Fecha: 1997/03/19
	Página: 1 de 3

**1. OBJETIVO Y ALCANCE.**

**1.1 Objetivo.**

Describir las BPL que permitan asegurar que el volumen de inyección en el sistema sea correcto y minimizar las variaciones entre inyección e inyección, así como entre programaciones de conjuntos de muestras (inyectores automáticos).

**1.2 Alcance.**

Esta BPL proporciona información requerida en los Sistemas de Cromatografía de Líquidos: cromatógrafo 1 y 2 (ver referencias 1,2), del Laboratorio CO14 ubicado en el edificio C del CENAM

**2. USO.**

- En inyectores manuales, cada vez que se utiliza.
- En inyectores automáticos, cada vez que se programe una o varias inyecciones.
- Cuando se requiera por circunstancias particulares de trabajo.

**3. NOTACIONES Y DEFINICIONES.**

**3.1 Notaciones.**

*Cromatógrafo 1.-* corresponde al sistema de gradiente con inyector automático, integrado por los módulos 600s, 616 y 717, columna y cualquiera de los detectores (470, 490E, 996, 431, 464 ó 410).

*Cromatógrafo 2.-* corresponde al sistema isocrático con inyector manual, integrado por los módulos 600 y 610, inyector Rheodyne, unidad degasificadora y conectado a cualquiera de los detectores.

**3.2 Definiciones.**

*Sistema isocrático.-* Es cuando la bomba del equipo mantiene constantes la composición de la fase móvil durante el análisis.

*Sistema de gradiente.-* Es cuando la bomba del equipo permite variar la composición de la fase

Elaboró: Mariana Arce Osuna.

Revisó: Mónica Sánchez Gómez.

Aprobó: Dr. Yoshito Mitani Nanakanishi.



**CENTRO NACIONAL DE METROLOGÍA**  
**METROLOGÍA DE MATERIALES, DIVISIÓN POLÍMEROS**

<b>BUENAS PRÁCTICAS DE LABORATORIO EN CROMATOLOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN</b>	<b>N°</b>
	<b>Rev. NÚM. 0</b>
<b>INYECTORES "Volumen de Inyección"</b>	<b>Fecha: 1997/03/19</b>
	<b>Página: 2 de 3</b>

móvil durante el análisis.

### 3.3 Abreviaturas.

Las siglas anotadas en esta BPL significan:

HPLC	Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución.
600s	Controlador del sistema de bombeo.
600	Controlador del sistema de bombeo.
616	Bomba de inyección cuaternaria.
610	Bomba de inyección isocrática.
717	Automuestreador plus.
470	Detector de fluorescencia.
490E	Detector ultravioleta-visible.
996	Detector de arreglo de diodos (UV).
431	Detector de índice de refracción.
464	Detector de conductividad.
410	Detector electroquímico.
loop	Palabra del idioma inglés, que describe la tubería de volumen fijo empleada en los inyectores para medir el volumen inyectado de muestra.

## 4. BUENAS PRÁCTICAS DE LABORATORIO PARA MEJORAR LA PRECISIÓN Y REPRODUCIBILIDAD DEL VOLUMEN DE INYECCIÓN.

### 4.1 PROCEDIMIENTOS.

#### 4.1.1 Para inyectores manuales:

- 4.1.1.1.-Asegúrese que el volumen del "loop" usado corresponde al volumen que se desea inyectar.
- 4.1.1.2.-Llenar la jeringa con tres veces el volumen a inyectar y cargarlos en el loop.
- 4.1.1.3.-No inyectar muestras muy viscosas.
- 4.1.1.4.-Si se presenta alguna fuga, verificar si la aguja de inyección tiene el diámetro apropiado y la punta en buen estado, si es así, verificar entonces que el sello del rotor y el sello del puerto de inyección se encuentren en buen estado.
- 4.1.1.5.-No inyectar volúmenes muy grandes en muestras muy concentradas.

**Elaboró:** Mariana Arce Osuna.

**Revisó:** Mónica Sánchez Gómez.

**Aprobó:** Dr. Yoshito Mitani Nanakanishi.





**CENTRO NACIONAL DE METROLOGÍA**  
METROLOGÍA DE MATERIALES, DIVISIÓN POLÍMEROS

<b>BUENAS PRÁCTICAS DE LABORATORIO EN CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN</b>	<b>N°</b>
	<b>Rev. NÚM. O</b>
	<b>Fecha: 1997/03/19</b>
<b>INYECTORES</b> <b>"Volumen de Inyección"</b>	<b>Página: 3 de 3</b>

**4.1.2 Para inyectores automáticos:**

- 4.1.2.1.-Asegúrese que el volumen programado, corresponde al volumen que se desea inyectar.
- 4.1.2.2.-Asegúrese que los viales estén colocados en las posiciones programadas de manera correcta.
- 4.1.2.3.-Colocar suficiente volumen de muestra en el vial, no colocar viales vacíos o dejar espacios del carrusel vacíos.
- 4.1.2.4.-No colocar muestras muy viscosas
- 4.1.2.5.-Asegurarse de no crear vacíos en el vial al momento de llenarlo.
- 4.1.2.6.-Verificar que el automuestreador esté muestreando correctamente lo que se programa.
- 4.1.2.7.-No inyectar volúmenes muy grandes de muestras muy concentradas.
- 4.1.2.8.-Asegúrese que la tapa del vial esté colocada correctamente.
- 4.1.2.9.-No colocar septas rígidas en los viales (que doblen la aguja).
- 4.1.2.10.-En septas con cubiertas con teflón solo por un lado, colocar la cara del teflón hacia la muestra.

**5. REFERENCIAS.**

- 1.-Arce O. Mariana y Godina G. Susana; "Procedimiento del Manejo del Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución del Sistema de Gradiente 600s (Cromatógrafo 1)"; CENAM-Lab. C014, Querétaro. México, 1995.
- 2.-Arce O. Mariana; "Procedimiento del Manejo del Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución del Sistema Isocrático 600 (Cromatógrafo 2)"; CENAM-Lab. C014, Querétaro. México, 1995.
- 3.-Dolan Jonh W. and Snyder Lloyd R.; "Troubleshooting LC Systems"; Humana Press; LC Resources Inc., Walnut Creek, California, 1989.
- 4.-Lawrence James F.; "Organic Trace Analysis by Liquid Chromatography"; Academic Press; Orlando Florida, USA, 1981.
- 5.-Godina G. Susana, Lora S. Ana Ma., Pérez U. Malina y Carbajal A. Carlos E.; "Buenas Prácticas del Laboratorio", (Memorias del Curso); CENAM, Edo. de México, 1996.

<b>Elaboró:</b> Mariana Arce Osuna.
<b>Revisó:</b> Mónica Sánchez Gómez.
<b>Aprobó:</b> Dr. Yoshito Mitani Nanakanishi.



**CENTRO NACIONAL DE METROLOGÍA**  
**METROLOGÍA DE MATERIALES, DIVISIÓN POLÍMEROS**

BUENAS PRÁCTICAS DE LABORATORIO EN CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN	N°
	Rev. NÚM. O
COLUMNAS "Caracterización de columnas y recomendaciones"	Fecha: 1997/03/19
	Página: 1 de 5

## 1. OBJETIVO Y ALCANCE.

### 1.1 Objetivo.

Describir las BPL necesarias para conocer la eficiencia de las columnas nuevas o usadas que van a ser empleadas por primera vez en el laboratorio, así como para posteriores evaluaciones de monitoreo de su tiempo de vida o en los casos que se prevea que puedan estar dañadas: así en base a los resultados realizar acciones correctivas cuando sea posible o en su defecto reemplazarla.

### 1.2 Alcance.

Esta BPL proporciona información requerida en los Sistemas de Cromatografía de Líquidos: cromatógrafo 1 y 2 (ver referencias 1,2), del Laboratorio CO14 ubicado en el edificio C del CENAM

## 2. USO.

Se usará siempre que:

- se adquiera una columna nueva.
- para monitoreo de cada columna, aproximadamente cada 100 inyecciones
- por razones particulares de trabajo.

## 3. NOTACIONES Y DEFINICIONES.

### 3.1 Notaciones.

**Cromatógrafo 1.**- corresponde al sistema de gradiente con inyector automático, integrado por los módulos 600s, 616 y 717, columna y cualquiera de los detectores (470, 490E, 996, 431, 464 ó 410).

**Cromatógrafo 2.**- corresponde al sistema isocrático con inyector manual, integrado por los módulos 600 y 610, inyector Rheodyne, unidad degasificadora y conectado a cualquiera

Elaboró: Mariana Arce Osuna.

Revisó: Mónica Sánchez Gómez.

Aprobó: Dr. Yoshito Mitani Nakanishi.



**CENTRO NACIONAL DE METROLOGÍA**  
METROLOGÍA DE MATERIALES, DIVISIÓN POLÍMEROS

BUENAS PRÁCTICAS DE LABORATORIO EN CROMATOLOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN	N°
	Rev. NÚM. O
COLUMNAS "Caracterización de columnas y recomendaciones"	Fecha: 1997/03/19
	Página: 2 de 5

de los detectores.

### 3.2 Definiciones.

**Sistema isocrático.**- Es cuando la bomba del equipo mantiene constantes la composición de la fase móvil durante el análisis.

**Sistema de gradiente.**- Es cuando la bomba del equipo permite variar la composición de la fase móvil durante el análisis.

### 3.3 Abreviaturas.

Las siglas anotadas en esta BPL significan:

HPLC	Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución.
600s	Controlador del sistema de bombeo.
600	Controlador del sistema de bombeo.
616	Bomba de inyección cuaternaria.
610	Bomba de inyección isocrática.
717	Automuestreador plus.
470	Detector de fluorescencia.
490E	Detector ultravioleta-visible.
996	Detector de arreglo de diodos (UV).
431	Detector de índice de refracción.
464	Detector de conductividad.
410	Detector electroquímico.
$t_r$	Tiempo muerto.
$t_{r_a}$	Tiempo de retención del pico "a".
$t'_{r_a}$	Tiempo de retención ajustado del pico "a".
$t_{r_b}$	Tiempo de retención del pico "b".
$t'_{r_b}$	Tiempo de retención ajustado del pico "b".

Elaboró: Mariana Arce Osuna.

Revisó: Mónica Sánchez Gómez.

Aprobó: Dr. Yoshito Mitani Nakanishi.



**CENTRO NACIONAL DE METROLOGÍA**  
**METROLOGÍA DE MATERIALES, DIVISIÓN POLÍMEROS**

BUENAS PRÁCTICAS DE LABORATORIO EN CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN	N°
	Rev. NÚM. 0
COLUMNAS "Caracterización de columnas y recomendaciones "	Fecha: 1997/03/19
	Página: 3 de 5

$W_b$	Ancho de base del pico "a".
$W_a$	Ancho de base del pico "b".
L	Longitud de la columna.
N	Número de platos teóricos.
AEPT	Altura equivalente a un plato teórico.
$k'$	Factor de capacidad.
R	Resolución.
$\alpha$	Selectividad.

#### 4. BUENAS PRÁCTICAS DE LABORATORIO EN COLUMNAS.

##### 4.1 Caracterización:

##### 4.1.1 Disoluciones de referencia.

Material de Referencia o Disolución Patrón.- Debe contener los analitos (o por lo menos dos de ellos) que se analizarán con la columna a caracterizar.

##### 4.1.2 Pasos.

4.1.2.1.-Estabilizar el sistema con la columna a caracterizar, bajo las condiciones cromatográficas en las que se realizará el análisis (ver el método de análisis).

4.1.2.2.- Inyectar 6 veces la disolución patrón.

4.1.2.3.-En cada cromatograma seleccionar dos picos subsiguientes, designarlos como pico "a" y "b" respectivamente, determinar los valores de  $t_{ra}$ ,  $t_{rb}$ ,  $t'_{ra}$ ,  $t'_{rb}$ ,  $W_a$ ,  $W_b$  y L, capturar los datos de cada inyección en la tabla 1 (disco 1, "caracterización de columnas"), la cual permite calcular y obtener la desviación estándar de N, AEPT,  $k'$ , R y  $\alpha$  para cada caso.

4.1.2.4.-Registrar los resultados las hojas de control de la columna.

4.1.2.5.-En base a los resultados decidir si la columna es apta para el análisis a realizar.

4.1.2.6.-En el caso que se trate de monitoreo de columnas en uso, comparar los resultados con los de el historial de la columna y decidir si requiere ser reconstituida.

Elaboró: Mariana Arce Osuna.

Revisó: Mónica Sánchez Gómez.

Aprobó: Dr. Yoshito Mitani Nakanishi.





**CENTRO NACIONAL DE METROLOGÍA**  
METROLOGÍA DE MATERIALES, DIVISIÓN POLÍMEROS

BUENAS PRÁCTICAS DE LABORATORIO EN CROMATOGRFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN	N°
	Rev. NÚM. 0
COLUMNAS	Fecha: 1997/03/19
"Caracterización de columnas y recomendaciones "	Página: 5 de 5

- 4.1.3.3.-Filtrar las muestras y revisar que sean compatibles con la fase móvil.  
4.1.3.4.-Evitar disminuir o aumentar bruscamente al flujo cuando la columna este conectada.

**5. REFERENCIAS.**

- 1.-Arce O. Mariana y Godina G. Susana; "Procedimiento del Manejo del Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución del Sistema de Gradiente 600s (Cromatógrafo 1)"; CENAM-Lab. C014, Querétaro, México, 1995.
- 2.-Arce O. Mariana; "Procedimiento del Manejo del Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución del Sistema Isocrático 600 (Cromatógrafo 2)"; CENAM-Lab. C014, Querétaro, México, 1995.
- 3.-Dolan John W. and Snyder Lloyd R.; "Troubleshooting LC Systems"; Humana Press; LC Resources Inc., Walnut Creek, California, 1989.
- 4.-McNair Harold M. and Esquivel H. Benjamin; "Cromatografía Líquida de Alta Presión"; Segunda Edición; Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos; Washington, D.C. USA, 1980.
- 5.-Espectrofotometría de Absorción Infrarroja, Cromatografía de Gases y de Líquidos", (Memorias del Curso); Tópicos de Instrumentación, iai.; México. D.F., 1995.
- 6.-"Calibración y Verificación del Funcionamiento de Equipos Varios del Laboratorio", (Memorias del Curso) ; Tópicos de Instrumentación iai.; México D. F., 1995.

Elaboró: Mariana Arce Osuna.

Revisó: Mónica Sánchez Gómez.

Aprobó: Dr. Yoshito Mitani Nakanishi.

ANEXO 5



**CENTRO NACIONAL DE METROLOGÍA**  
METROLOGÍA DE MATERIALES, DIVISIÓN POLÍMEROS

BUENAS PRÁCTICAS DE LABORATORIO EN CROMATOLOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN	N°
	Rev. NÚM. O
DETECTORES "Recomendaciones para disminuir el ruido debido al detector"	Fecha: 1997/03/19
	Página: 1 de 3

**1. OBJETIVO Y ALCANCE.**

**1.1 Objetivo.**

Describir las BPL que permiten optimizar el detector con el objeto de tener una línea base con el menor ruido posible.

**1.2 Alcance.**

Esta BPL proporciona información requerida para mejorar la respuesta de los detectores en los Sistemas de Cromatografía de Líquidos: cromatógrafo 1 y 2 (ver referencias 1,2), del Laboratorio CO14 ubicado en el edificio C del CENAM

**2. USO.**

Se usará cuando se conecte uno o más detectores a cualquiera de los cromatógrafos 1 o 2, cada vez que se encienda alguno de los equipos donde se encuentre previamente conectado, al final de la jornada de trabajo o cuando se detecten problemas específicos como "lámpara ineficiente".

**3. NOTACIONES y DEFINICIONES.**

**3.1 Notaciones.**

*Cromatógrafo 1.-* corresponde al sistema de gradiente con inyector automático, integrado por los módulos 600s, 616 y 717, columna y cualquiera de los detectores (470, 490E, 996, 431, 464 ó 410).

*Cromatógrafo 2.-* corresponde al sistema isocrático con inyector manual, integrado por los módulos 600 y 610, inyector Rheodyne, unidad degasificadora y conectado a cualquiera de los detectores.

**3.2 Definiciones.**

*Sistema isocrático.-* Es cuando la bomba del equipo mantiene constantes la composición de la fase móvil durante el análisis.

Elaboró: Mariana Arce Osuna
Revisó: Mónica Sánchez Gómez
Aprobó: Dr. Yoshito Mitani N.



**CENTRO NACIONAL DE METROLOGÍA**  
**METROLOGÍA DE MATERIALES, DIVISIÓN POLÍMEROS**

BUENAS PRÁCTICAS DE LABORATORIO EN CROMATOGRFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN	N°
	Rev. NÚM. O
DETECTORES "Recomendaciones para disminuir el ruido debido al detector"	Fecha: 1997/03/19
	Página: 2 de 3

**Sistema de gradiente.-** Es cuando la bomba del equipo permite variar la composición de la fase móvil durante el análisis.

### 3.3 Abreviaturas.

Las siglas anotadas en esta BPL significan:

HPLC	Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución.
600s	Controlador del sistema de bombeo.
600	Controlador del sistema de bombeo.
616	Bomba de inyección cuaternaria.
610	Bomba de inyección isocrática.
717	Automuestreador plus.
470	Detector de fluorescencia.
490E	Detector ultravioleta-visible(UV-VIS).
996	Detector de arreglo de diodos (UV).
431	Detector de índice de refracción.
464	Detector de conductividad.
410	Detector electroquímico.

## 4. BUENAS PRÁCTICAS DE LABORATORIO PARA DETECTORES.

### 4.1 Detector de arreglo de diodos, UV-VIS, fluorescencia e índice de refracción.

- 4.1.1.-Permitir que se caliente el detector antes de utilizarlo por aproximadamente media hora, y para alcanzar su máxima sensibilidad una hora.
- 4.1.2.-Conectar adecuadamente el detector a tierra o si ya esta conectado, verificar que este conectado a tierra.
- 4.1.3.-Usar tapetes antiestáticos.
- 4.1.4.-Controlar el tiempo de uso de las lámparas en el cuaderno de registro correspondiente.
- 4.1.5.-Contar con una lámpara para repuesto.
- 4.1.6.-Cambiar la lámpara cuando el tiempo de vida esta por terminar (2500 horas), puede ser 50 horas antes, limpiar la superficie de la lámpara con algodón y metanol, no dejar residuos de grasa, ni de algodón y registrar el cambio en la bitácora correspondiente.
- 4.1.7.-Si se cambia la lámpara, calentar el equipo por una hora.

Elaboró: Mariana Arce Osuna
Revisó: Mónica Sánchez Gómez
Aprobó: Dr. Yoshito Mitani N.





**CENTRO NACIONAL DE METROLOGÍA**  
**METROLOGÍA DE MATERIALES, DIVISIÓN POLÍMEROS**

BUENAS PRÁCTICAS DE LABORATORIO EN CROMATOLOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN	N°
	Rev. NÚM. O
DETECTORES	Fecha: 1997/03/19
"Recomendaciones para disminuir el ruido debido al detector"	Página: 3 de 3

- 4.1.8.-Degasificar la fase móvil 10 min. antes de iniciar.
- 4.1.9.-Lavarlo y dejarlo en disolución acuosa de metanol al 10% al final de la jornada de trabajo.
- 4.1.10.-Colocar tapones a la salida del detector, para evitar que la celda se seque.
- 4.2 Detector electroquímico y de conductividad..
- 4.2.1.-Permitir que se caliente el detector por aproximadamente una hora.
- 4.2.2.-Conectar adecuadamente el detector a tierra o cuando ya esta conectado, verificar que este conectado a tierra.
- 4.2.3.-Usar tapetes antiestáticos.
- 4.2.4.-Para el caso del detector electroquímico realizar la limpieza y mantenimiento de los electrodos periódicamente, dependiendo de la carga de trabajo, por ejemplo cada 100 inyecciones; cuando se deja de usar por más de un mes y se desea volver a utilizar.
- 4.2.5.-Desgasificar la fase móvil 10 min. antes de iniciar.
- 4.2.6.-Lavarlo y dejarlo en disolución acuosa de metanol al 10% al final de la jornada de trabajo.
- 4.2.7.-Colocar tapones a la salida del detector, para evitar que la celda se seque.

**5. REFERENCIAS.**

- 1.-Arce O. Mariana y Godina G. Susana: "Procedimiento del Manejo del Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución del Sistema de Gradiente 600s (Cromatógrafo 1)"; CENAM-Lab. CO14, QRO. México, 1995.
- 2.-Arce O. Mariana: "Procedimiento del Manejo del Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución del Sistema Isocrático 600 (Cromatógrafo 2)"; CENAM-Lab. CO14, QRO. México, 1995.
- 3.-Dolan Jonh W., Snyder Lloyd R.: "Troubleshooting LC Systems"; Humana Press; LC Resources Inc., Walnut Creek, CA, 1989.

Elaboró: Mariana Arce Osuna
Revisó: Mónica Sánchez Gómez
Aprobó: Dr. Yoshito Mitani N.



ANEXO 6

**CENTRO NACIONAL DE METROLOGÍA**  
METROLOGÍA DE MATERIALES. DIVISIÓN POLÍMEROS

BUENAS PRÁCTICAS DE LABORATORIO EN CROMATOGRFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN	N°
	Rev. NÚM. 0
REACTIVOS "Uso y Manejo de Reactivos"	Fecha: 1997/03/19
	Página: 1 de 5

**1. OBJETIVO Y ALCANCE.**

**1.1 Objetivo.**

Describir las BPL necesarias para optimizar la calidad de los resultados analíticos y evitar contaminaciones cruzadas por mal manejo de reactivos.

**1.2 Alcance.**

Esta BPL proporciona información requerida en los Sistemas de Cromatografía de Líquidos: cromatógrafo 1 y 2 (ver referencias 1,2), del Laboratorio CO14 ubicado en el edificio C del CENAM.

**2. USO.**

Se usará siempre que se seleccionen y utilicen reactivos analíticos, según sea el caso.

**3. NOTACIONES Y DEFINICIONES.**

**3.1 Notaciones.**

*Cromatógrafo 1.-* corresponde al sistema de gradiente con inyector automático, integrado por los módulos 600s, 816 y 717, columna y cualquiera de los detectores (470, 490E 996, 431, 464 ó 410).

*Cromatógrafo 2.-* corresponde al sistema isocrático con inyector manual, integrado por los módulos 600 y 610, inyector Rheodyne, unidad degasificadora y conectado a cualquiera de los detectores.

**3.2 Definiciones.**

*Sistema isocrático.-* Es cuando la bomba del equipo mantiene constantes la composición

Elaboró: Mariana Arce Osuna.

Revisó: Mónica Sánchez Gómez.

Aprobó: Dr. Yoshito Mitani Nakanishi.



**CENTRO NACIONAL DE METROLOGÍA**  
**METROLOGÍA DE MATERIALES, DIVISIÓN POLÍMEROS**

BUENAS PRÁCTICAS DE LABORATORIO EN CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN	N°
	Rev. NÚM. 0
REACTIVOS "Uso y Manejo de Reactivos"	Fecha: 1997/03/19
	Página: 2 de 5

de la fase móvil durante el análisis.

*Sistema de gradiente.*- Es cuando la bomba del equipo permite variar la composición de la fase móvil durante el análisis.

### 3.3 Abreviaturas.

Las siglas anotadas en esta BPL significan:

HPLC	Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución.
600s	Controlador del sistema de bombeo.
600	Controlador del sistema de bombeo.
618	Bomba de inyección cuaternaria.
610	Bomba de inyección isocrática.
717	Automuestreador plus.
470	Detector de fluorescencia.
490E	Detector de ultravioleta-visible.
996	Detector de arreglo de diodos (UV).
431	Detector de Índice de refracción.
464	Detector de conductividad.
410	Detector electroquímico.

## 4. BUENAS PRÁCTICAS DE LABORATORIO EN EL USO Y MANEJO DE REACTIVOS PARA HPLC.

- 4.1.- Seleccionar reactivos de pureza cromatográfica o grado HPLC.
- 4.2.- Solo emplear agua tipo I.
- 4.3.- Evitar contaminación de reactivos:

Elaboró: Mariana Arce Osuna.
Revisó: Mónica Sánchez Gómez.
Aprobó: Dr. Yoshito Mitani Nakanishi.



**CENTRO NACIONAL DE METROLOGÍA**  
**METROLOGÍA DE MATERIALES, DIVISIÓN POLÍMEROS**

BUENAS PRÁCTICAS DE LABORATORIO EN CROMATOGRFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN	N°
	Rev. NÚM. 0
REACTIVOS "Uso y Manejo de Reactivos"	Fecha: 1997/03/19
	Página: 3 de 5

4.3.1.-Respetando las condiciones de almacenamiento.

4.3.2.-Cuando es necesario tomar cierta cantidad de reactivo se deberá de vaciar una pequeña porción de éste en un contenedor apropiado y de ahí se deberá de tomar la muestra que se va a pesar, los residuos nunca se deberán de regresar al frasco original ya que estos podrían contaminar completamente el contenido del frasco de reactivo o disolvente.

4.3.3.-Nunca se deberán de tomar alcuotas directamente del frasco de disolvente, ya que esto produciría una contaminación al introducir la pipeta; se deberá de vaciar en un vaso de precipitados una porción del disolvente o líquido y de ahí se deberá de tomar la alcuota.

4.4.-Identificar adecuadamente.

4.4.1.-Respetar los tiempos de vida útil establecidos, cuando se abra un reactivo identifiqúelo con nombre del usuario, la fecha de apertura y de recepción del mismo. Adhiere una etiqueta que contenga el formato para dicha información como la que se muestra en la figura 1 y llénela.

4.4.2.-Cuando se toman porciones del contenedor y se colocan en contenedores más pequeños, a éstos también se le debe adherir una etiqueta, tal que, además de la información anterior los identifique plenamente.

Elaboró: Mariana Arce Osuna.

Revisó: Mónica Sánchez Gómez.

Aprobó: Dr. Yoshito Mitani Nakanishi.



**CENTRO NACIONAL DE METROLOGÍA**  
**METROLOGÍA DE MATERIALES, DIVISIÓN POLÍMEROS**

<b>BUENAS PRÁCTICAS DE LABORATORIO EN CROMATOLOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN</b>	<b>N°</b>
	<b>Rev. NÚM. 0</b>
	<b>Fecha: 1997/03/19</b>
	<b>Página: 4 de 5</b>

\_\_\_\_\_

SUSTANCIA PELIGROSA \_\_\_\_\_ TIPO DE USO \_\_\_\_\_  
CONTENIDO \_\_\_\_\_ HOJA DE SEGURIDAD: SI o NO \_\_\_\_\_

TIPO DE PELIGRO \_\_\_\_\_  
Flamable \_\_\_\_\_  
Reactivo \_\_\_\_\_  
Corrosivo \_\_\_\_\_  
Dañoso a la salud (Indique las vías) \_\_\_\_\_  
Otro riesgo \_\_\_\_\_

RESPONSABLE: \_\_\_\_\_ FECHA: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Figura 1. Ejemplo de etiqueta

4.5.- Respetar las disposiciones de seguridad indicadas para el manejo de reactivos.

4.6.- Colocar los desechos en los contenedores correspondientes de acuerdo a la clasificación indicada por el comité de seguridad e higiene.

## 5. REFERENCIAS.

1.-Arce O. Mariana y Godina G. Susana; "Procedimiento del Manejo del Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución del Sistema de Gradiente 800s (Cromatógrafo 1)"; CENAM-Lab.CO14, Querétaro. México, 1995.

2.-Arce O. Mariana; "Procedimiento del Manejo del Cromatógrafo de Líquidos de Alta

Elaboró: Mariana Arce Osuna.

Revisó: Mónica Sánchez Gómez.

Aprobó: Dr. Yoshito Mitani Nakanishi.



**CENTRO NACIONAL DE METROLOGÍA**  
METROLOGÍA DE MATERIALES, DIVISIÓN POLÍMEROS

BUENAS PRÁCTICAS DE LABORATORIO EN CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN	N°
	Rev. NÚM. 0
REACTIVOS "Uso y Manejo de Reactivos"	Fecha: 1997/03/19
	Página: 5 de 5

Resolución del Sistema Isocrático 600 (Cromatógrafo 2<sup>o</sup>); CENAM-Lab.CO14, Querétaro, México, 1995.

3.-Dolan Jonh W. and SnyderLloyd R.r; "Troubleshooting LC Systems"; Humana Press; LC Resources Inc., Walnut Creek, California, 1989.

4.-Sánchez G. Mónica, Castro G. Esther, Sáinz U. Judith G., González R, Norma, Arvizu T. Rocío, Lora S, Ana Ma., Lara M. Velina J. y Ramírez M. Estela; "Manual de Buenas Prácticas de Laboratorio"; Publicación CNM-MRD-PT008, CENAM; México 1995.

Elaboró: Mariana Arce Osuna.

Revisó: Mónica Sánchez Gómez.

Aprobó: Dr. Yoshito Mitani Nakanishi.

ANEXO 7

**CENTRO NACIONAL DE METROLOGÍA**  
**METROLOGÍA DE MATERIALES. DIVISIÓN POLÍMEROS**



BUENAS PRÁCTICAS DE LABORATORIO EN CROMATOLOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN	N°
MATERIALES DE REFERENCIA "Elección y uso de Materiales de Referencia"	Rev. NÚM. 0
	Fecha: 1997/03/19
	Página: 1 de 4

**1. OBJETIVO Y ALCANCE.**

**1.1 Objetivo.**

Describir las BPL necesarias para optimizar el análisis mediante la selección del material de referencia más adecuado a la muestra a analizar en cuanto a las características de matriz del material como a la incertidumbre asociada.

**1.2 Alcance.**

Esta BPL proporciona información requerida en los Sistemas de Cromatografía de Líquidos: cromatógrafo 1 y 2 (ver referencias 1,2), del Laboratorio CO14 ubicado en el edificio C del CENAM.

**2. USO.**

Cada vez que se requiera de materiales de referencia para realizar un análisis, curva de calibración y/o verificación del equipo.

**3. NOTACIONES y DEFINICIONES.**

**3.1 Notaciones.**

**Cromatógrafo 1.-** corresponde al sistema de gradiente con inyector automático, integrado por los módulos 600s, 616 y 717, columna y cualquiera de los detectores (470, 490E 996, 431, 464 ó 410).

**Cromatógrafo 2.-** corresponde al sistema isocrático con inyector manual, integrado por los módulos 600 y 610, inyector Rheodyne, unidad degasificadora y conectado a cualquiera de

Elaboró: Mariana Arce Osuna.
Revisó: Mónica Sánchez Gómez.
Aprobó: Dr. Yoshito Mitani Nakanishi.



**CENTRO NACIONAL DE METROLOGÍA**  
**METROLOGÍA DE MATERIALES, DIVISIÓN POLÍMEROS**

BUENAS PRÁCTICAS DE LABORATORIO EN CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN	N°
	Rev. NÚM. 0
MATERIALES DE REFERENCIA "Elección y uso de Materiales de Referencia"	Fecha: 1997/03/19
	Página: 2 de 4

los detectores.

### 3.2 Definiciones.

**Sistema isocrático.-** Es cuando la bomba del equipo mantiene constantes la composición de la fase móvil durante el análisis.

**Sistema de gradiente.-** Es cuando la bomba del equipo permite variar la composición de la fase móvil durante el análisis.

**Matriz.-** Son todos los componentes de la muestra excepto el analito o los analitos de interés.

### 3.3 Abreviaturas.

Las siglas anotadas en esta BPL significan:

HPLC	Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución.
600s	Controlador del sistema de bombeo.
600	Controlador del sistema de bombeo.
616	Bomba de inyección cuaternaria.
610	Bomba de inyección isocrática.
717	Automuestreador plus.
470	Detector de fluorescencia.
490E	Detector de ultravioleta-visible.
996	Detector de arreglo de diodos (UV).
431	Detector de índice de refracción.
464	Detector de conductividad.

Elaboró: Mariana Arco Osuna.

Revisó: Mónica Sánchez Gómez.

Aprobó: Dr. Yoshito Mitani Nakanishi.





**CENTRO NACIONAL DE METROLOGÍA**  
**METROLOGÍA DE MATERIALES, DIVISIÓN POLÍMEROS**

<b>BUENAS PRÁCTICAS DE LABORATORIO EN CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN</b>	<b>N°</b>
	<b>Rev. NÚM. 0</b>
<b>MATERIALES DE REFERENCIA</b> <b>"Elección y uso de Materiales de Referencia"</b>	<b>Fecha: 1997/03/19</b>
	<b>Página: 3 de 4</b>

410            Detector electroquímico.  
MRC            Material de referencia certificado.

**4. BUENAS PRÁCTICAS DE LABORATORIO EN LA ELECCIÓN Y USO DE MATERIALES DE REFERENCIA**

- 4.1.- Verifique que exista similitud entre la matriz del MRC con la de la muestra .  
Nota: Debido a que es prácticamente imposible encontrar un material de referencia que se ajuste exactamente a la composición de las muestras del laboratorio, salvo casos especiales, el juicio profesional y la experiencia del analista son necesarios en la selección del material de referencia apropiado. A pesar de estas limitaciones, se considera que el uso de materiales de referencia es una de las mejores opciones para conferir exactitud a las mediciones.
- 4.2.-Que la concentración del material de referencia sea la adecuada para el análisis.
- 4.3.-Que el MRC tenga menor incertidumbre que la requerida para el enfoque de su uso.
- 4.4.- Para evitar contaminación de materiales de referencia se debe de:
- 4.4.1.-Respetar las condiciones de almacenamiento (siguiendo las recomendaciones indicadas en el certificado).
- 4.4.2.-Cuando es necesario tomar cierta cantidad de material de referencia se deberá de vaciar una pequeña porción de este en un contenedor apropiado y de ahí se deberá de tomar la muestra que se va a pesar, los residuos nunca se deberán de regresar al contenedor original ya que estos podrían contaminar completamente el material de

Elaboró: Mariana Arce Osuna.

Revisó: Mónica Sánchez Gómez.

Aprobó: Dr. Yoshito Mitani Nakanishi.

FAC-01



**CENTRO NACIONAL DE METROLOGÍA**  
**METROLOGÍA DE MATERIALES, DIVISIÓN POLÍMEROS**

<b>BUENAS PRÁCTICAS DE LABORATORIO EN CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN</b>	<b>N°</b>
	<b>Rev. NÚM. O</b>
<b>MATERIALES DE REFERENCIA</b> <b>"Elección y uso de Materiales de Referencia"</b>	<b>Fecha: 1997/03/19</b>
	<b>Página: 4 de 4</b>

referencia.

4.4.3.-Se deben seguir las indicaciones del proveedor o certificado correspondiente, por ejemplo existen materiales de referencia que solo se pueden usar una vez, otros solo unos cuantos días después de abrirse, respetando las condiciones de almacenamiento.

4.4.4.-No tomar alicuotas directamente del contenedor.

**4.5.-Identificar adecuadamente.**

4.5.1.-Respetar los tiempos de vida útil establecidos, cuando se abra un material de referencia identifíquelo con nombre del usuario, la fecha de apertura y de recepción del mismo.

**4.6.-Manejo, uso y almacenamiento correcto.**

4.6.1.-En el certificado que se anexa al material de referencia se dan instrucciones específicas para su uso, almacenamiento, cantidad mínima a usar y forma de tratar la muestra. Si estas instrucciones no son seguidas correctamente, el desarrollo del análisis basado en las concentraciones certificadas del material de referencia pueden invalidarse.

**5. REFERENCIAS.**

1.-Arce O. Mariana y Godina G. Susana; "Procedimiento del Manejo del Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución del Sistema de Gradiente 600s (Cromatógrafo 1)"; CENAM-Lab. C014, Querétaro, México, 1995.

2.-Arce O. Mariana; "Procedimiento del Manejo del Cromatógrafo de Líquidos de Alta

<b>Elaboró: Mariana Arce Osuna.</b>
<b>Revisó: Mónica Sánchez Gómez.</b>
<b>Aprobó: Dr. Yoshito Mitani Nakanishi.</b>



**CENTRO NACIONAL DE METROLOGÍA**  
**METROLOGÍA DE MATERIALES, DIVISIÓN POLÍMEROS**

BUENAS PRÁCTICAS DE LABORATORIO EN CROMATOGRFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN	N°
	Rev. NÚM. 0
MATERIALES DE REFERENCIA "Elección y uso de Materiales de Referencia"	Fecha: 1997/03/19
	Página: 5 de 4

Resolución del Sistema Isocrático 600 (Cromatógrafo 2)"; CENAM-Lab. CO14, Querétaro, México, 1995.

3.-Dolan Jonh W. and Snyder Lloyd R.; "Troubleshooting LC Systems"; Humana Press; LC Resources Inc., Walnut Creek, California, 1989.

4.-Sánchez G. Mónica, Castro G. Esther, Sáinz U. Judith G., González R. Norma, Arvizu T. Rocío, Lora S. Ana Ma., Lara M. Velina J. y Ramírez M. Estela; "Manual de Buenas Prácticas de Laboratorio"; Publicación CNM-MRD-PT008, CENAM; Querétaro, México 1995.

Elaboró: Mariana Arce Osuna.
Revisó: Mónica Sánchez Gómez.
Aprobó: Dr. Yoshito Mitani Nakanishi.

ANEXO 8

**CENTRO NACIONAL DE METROLOGÍA**  
**METROLOGÍA DE MATERIALES. DIVISIÓN POLÍMEROS**



BUENAS PRÁCTICAS DE LABORATORIO EN CROMATOLOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN	N°
	Rev. NÚM. O
ESTÁNDAR INTERNO "Selección y Caracterización del Estándar Interno para un Análisis Específico "	Fecha: 1997/03/19
	Página: 1 de 5

**1. OBJETIVO Y ALCANCE.**

**1.1 Objetivo.**

Describir las BPL requeridas para seleccionar el estándar interno (EI) más adecuado para un análisis específico, una vez seleccionado, especificar las BPL necesarias para realizar pruebas de estabilidad al proceso de análisis, así como pruebas de interacción con la muestra. Lo anterior tiene como finalidad asegurarse que el estándar interno empleado funciona como tal, y permite mejorar la confiabilidad y exactitud de los resultados.

**1.2 Alcance.**

Esta BPL proporciona información requerida en los Sistemas de Cromatografía de líquidos: cromatógrafo 1 y 2 (ver referencias 4,5), del Laboratorio CO14 ubicado en el edificio C del CENAM

**2. USO.**

Cuando se desarrolle, modifique, optimice o valide un método de cuantificación por cromatografía de líquidos con estándar interno.

**3. NOTACIONES Y DEFINICIONES.**

**3.1 Notaciones.**

*Cromatógrafo 1.-* corresponde al sistema de gradiente con inyector automático, integrado por los módulos 600s 616 y 717, columna y cualquiera de los detectores (470, 490E, 996, 431, 464 ó 410).

Elaboró: Mariana Arce Osuna.
Revisó: Mónica Sánchez Gómez.
Aprobó: Dr. Yoshito Mitani Nakenishi.



**CENTRO NACIONAL DE METROLOGÍA**  
**METROLOGÍA DE MATERIALES, DIVISIÓN POLÍMEROS**

BUENAS PRÁCTICAS DE LABORATORIO EN CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN	N°
	Rev. NÚM. 0
ESTÁNDAR INTERNO "Selección y Caracterización del Estándar Interno para un Análisis Específico"	Fecha: 1997/03/19
	Página: 2 de 5

*Cromatógrafo 2.-* corresponde al sistema isocrático con inyector manual, integrado por los módulos 600 y 610, inyector Rheodyne, unidad degasificadora y conectado a cualquiera de los detectores.

### 3.2 Definiciones.

*Sistema isocrático.-* Es cuando la bomba del equipo mantiene constantes la composición de la fase móvil durante el análisis.

*Sistema de gradiente.-* Es cuando la bomba del equipo permite variar la composición de la fase móvil durante el análisis.

### 3.3 Abreviaturas.

Las siglas anotadas en esta BPL significan:

HPLC	Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución.
600s	Controlador del sistema de bombeo.
600	Controlador del sistema de bombeo.
616	Bomba de inyección cuaternaria.
610	Bomba de inyección isocrática.
717	Automuestreador plus.
470	Detector de fluorescencia.
490E	Detector ultravioleta-visible.
996	Detector de arreglo de diodos (UV).
431	Detector de índice de refracción.

Elaboró: Mariana Arce Osuna.
Revisó: Mónica Sánchez Gómez.
Aprobó: Dr. Yoshito Mitani Nakanishi.



**CENTRO NACIONAL DE METROLOGÍA**  
**METROLOGÍA DE MATERIALES, DIVISIÓN POLÍMEROS**

<b>BUENAS PRÁCTICAS DE LABORATORIO EN CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN</b>	<b>N°</b>
	<b>Rev. NÚM. 0</b>
<b>"Selección y Caracterización del Estándar Interno para un Análisis Específico"</b>	<b>Fecha: 1997/03/19</b>
	<b>Página: 3 de 5</b>

464            Detector de conductividad.  
410            Detector electroquímico.  
El             Estándar Interno.

**4. BUENAS PRÁCTICAS DE LABORATORIO EN LA SELECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL ESTÁNDAR INTERNO PARA UN ANÁLISIS ESPECÍFICO.**

**4.1 Selección del candidato a ser usado como estándar interno.**

- 4.1.1.- Si existe un método con una propuesta de algún compuesto a ser usado como estándar interno y se cuenta con él o se puede obtener, usar éste.
- 4.1.2.- Cuando no existe ninguna propuesta en otros trabajos, en base a los análisis de interés revisar los compuestos con estructuras y características muy similares a éstos, éstos serán los principales candidatos.
- 4.1.3.- Buscar la información bibliográfica sobre sus características y en base a esto y las condiciones cromatográficas seleccionar como mínimo dos opciones disponibles o de fácil obtención.
- 4.1.4.- Preparar una disolución a una concentración cercana a la concentración máxima esperada de muestra e inyectarla, observar tiempo de retención.
- 4.1.5.- Inyectar una disolución estándar del analito o de una mezcla de analitos por cuantificar, según sea el caso.
- 4.1.6.- Mezclarlo con la disolución estándar del o los analito(s) e inyectarlo.
- 4.1.7.- Observar que no haya translapamiento de picos, que no se degraden (disminución brusca de áreas) tanto el El como los analitos y que sus tiempos de retención estén cercanos pero resueltos. Si esto no pasa, se puede intentar optimizar las condiciones cromatográficas hasta lograr los resultados satisfactorio, de no ser así intentar con otro candidato.

**Elaboró: Mariana Arce Osuna.**

**Revisó: Mónica Sánchez Gómez.**

**Aprobó: Dr. Yoshito Mitani Nakanishi.**



**CENTRO NACIONAL DE METROLOGÍA**  
**METROLOGÍA DE MATERIALES, DIVISIÓN POLÍMEROS**

<b>BUENAS PRÁCTICAS DE LABORATORIO EN CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN</b>	<b>N°</b>
	<b>Rev. NÚM. 0</b>
<b>ESTÁNDAR INTERNO</b> <b>"Selección y Caracterización del Estándar Interno para un Análisis Específico "</b>	<b>Fecha: 1997/03/19</b>
	<b>Página: 4 de 5</b>

#### 4.2 Pruebas de estabilidad a la preparación.

4.2.1.- Preparar una disolución de El a la concentración en la que se tendrá en las muestras de análisis y dividirla en dos.

4.2.2.- Una inyectarla a las condiciones de trabajo y determinar el área.

4.2.3.- La otra someterla a las condiciones de preparación de la muestra (extracción, evaporaciones, diluciones, según sea el caso), llevarla a la misma concentración e inyectarla, calcular el área.

4.2.4.- Repetir cinco veces los pasos del uno al tres, realizar una tabla comparativa de los resultados, sacar promedio, y hacer un análisis estadístico de los resultados para ver que no exista diferencia significativa entre los resultados.

#### 4.3 Prueba de interacción del Estándar Interno con la muestra.

4.3.1.- Una muestra dividirla en dos submuestras.

4.3.2.- A una de las submuestras adicionar un volumen de El tal que se obtenga a la concentración en la que se trabajará durante el análisis (ver punto 4.1). La otra submuestra no se adiciona nada (se utilizará como blanco).

4.3.3.- Ambas submuestras someterlas al proceso de preparación de muestra bajo las mismas condiciones, inyectarlas y calcular el área del pico de interés en ambas inyecciones (analito o analitos por cuantificar).

4.3.4.- Repetir cinco veces los pasos del uno al tres, realizar una tabla comparativa de los resultados, sacar promedio, y hacer un análisis estadístico de los resultados para ver que no exista diferencia significativa entre los resultados de ambas inyecciones.

#### 5. REFERENCIAS.

<b>Elaboró: Mariana Arco Osuna.</b>
<b>Revisó: Mónica Sánchez Gómez.</b>
<b>Aprobó: Dr. Yoshito Mitani Nakanishi.</b>



**CENTRO NACIONAL DE METROLOGÍA**  
**METROLOGÍA DE MATERIALES, DIVISIÓN POLÍMEROS**

<b>BUENAS PRÁCTICAS DE LABORATORIO EN CROMATOGRFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN</b>	<b>N°</b>
	<b>Rev. NÚM. O</b>
<b>ESTÁNDAR INTERNO</b> <b>"Selección y Caracterización del Estándar Interno para un Análisis Específico "</b>	<b>Fecha: 1997/03/19</b>
	<b>Página: 5 de 5</b>

1.-Field Manual/Chemical Methods, EPA, Method number 8000B; "Determinative Chromatographic Separation"; Vol. II, SW-846; Edition Third, Washington, DC; November de 1986.

2.-Annual Book of ASTM Standards; Method number E200; "Practice for Preparations, Standardizations, and Storage of Standard Solutions for Chemical Analysis"; Vol. 15.05; Philadelphia, PA; 1992.

3.-Annual Book of ASTM Standards; Method number E682; "Practice for Liquid Chromatography Terms and Relationships"; Vol. 14.01; Philadelphia, PA; 1992.

4.-Arce O. Mariana y Godina G. Susana; "Procedimiento del Manejo del Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución del Sistema de Gradiente 600s (Cromatógrafo 1)"; CENAM-Lab. CO14, Querétaro, México, 1995.

5.-Arce O. Mariana; "Procedimiento del Manejo del Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución del Sistema Isocrático 600 (Cromatógrafo 2)"; CENAM-Lab. CO14, Querétaro, México, 1995.

6.-Dolan Jonh W. and Snyder Lloyd R.; "Troubleshooting LC Systems"; Humana Press; LC Resources Inc., Walnut Creek, California, 1989.

7.-Lawrence James F.; "Organic Trace Analysis by Liquid Chromatography"; Academic Press; Orlando Florida, USA, 1981.

<b>Elaboró: Mariana Arce Osuna.</b>
<b>Revisó: Mónica Sánchez Gómez.</b>
<b>Aprobó: Dr. Yoshito Mitani Nakanishi.</b>



ANEXO 9

**CENTRO NACIONAL DE METROLOGÍA**  
**METROLOGÍA DE MATERIALES. DIVISIÓN POLÍMEROS**



BUENAS PRÁCTICAS DE LABORATORIO EN CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN	N°
	Rev. NÚM. O
CURVAS DE CALIBRACIÓN "Control de Calidad en la Curva de Calibración"	Fecha: 1997/03/19
	Página: 1 de 3

**1. OBJETIVO Y ALCANCE.**

**1.1 Objetivo.**

Describir las BPL necesarias para verificar que la curva de calibración sea correcta.

**1.2 Alcance.**

Esta BPL proporciona información requerida en los Sistemas de Cromatografía de líquidos: cromatógrafo 1 y 2 (ver referencias 1,2), del Laboratorio CO14 ubicado en el edificio C del CENAM

**2. USO.**

Se usará cada vez que se elabore una curva de calibración y durante el análisis de muestras.

**3. NOTACIONES Y DEFINICIONES.**

**3.1 Notaciones.**

*Cromatógrafo 1.* - corresponde al sistema de gradiente con inyector automático, integrado por los módulos 600s, 616 y 717, columna y cualquiera de los detectores (470, 490E, 996, 431, 464 ó 410).

*Cromatógrafo 2.* - corresponde al sistema isocrático con inyector manual, integrado por los módulos 600 y 610, inyector Rheodyne, unidad desgasificadora y conectado a cualquiera de los detectores.

**3.2 Definiciones.**

Elaboró: Mariana Arce Osuna.
Revisó: Mónica Sánchez Gómez.
Aprobó: Dr. Yoshito Mitani Nakanishi.



**CENTRO NACIONAL DE METROLOGÍA**  
**METROLOGÍA DE MATERIALES, DIVISIÓN POLÍMEROS**

<b>BUENAS PRÁCTICAS DE LABORATORIO EN CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN</b>	<b>N°</b>
	<b>Rev. NÚM. 0</b>
<b>CURVAS DE CALIBRACIÓN</b> <b>"Control de Calidad en la Curva de Calibración"</b>	<b>Fecha: 1997/03/19</b>
	<b>Página: 2 de 3</b>

**Sistema isocrático.**- Es cuando la bomba del equipo mantiene constantes la composición de la fase móvil durante el análisis.

**Sistema de gradiente.**- Es cuando la bomba del equipo permite variar la composición de la fase móvil durante el análisis.

### 3.3 Abreviaturas.

Las siglas anotadas en esta BPL significan:

HPLC	Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución.
600s	Controlador del sistema de bombeo.
600	Controlador del sistema de bombeo.
616	Bomba de inyección cuaternaria.
610	Bomba de inyección isocrática.
717	Automuestreador plus.
470	Detector de fluorescencia.
490E	Detector ultravioleta-visible.
986	Detector de arreglo de diodos (UV).
431	Detector de índice de refracción.
464	Detector de conductividad.
410	Detector electroquímico.

### 4. BUENAS PRÁCTICAS DE LABORATORIO PARA EL CONTROL DE CALIDAD DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN.

<b>Elaboró: Mariana Arce Osuna.</b>
<b>Revisó: Mónica Sánchez Gómez.</b>
<b>Aprobó: Dr. Yoshito Mitani Nakanishi.</b>



**CENTRO NACIONAL DE METROLOGÍA**  
**METROLOGÍA DE MATERIALES, DIVISIÓN POLÍMEROS**

<b>BUENAS PRÁCTICAS DE LABORATORIO EN CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN</b>	<b>N°</b>
	<b>Rev. NÚM. O</b>
<b>CURVAS DE CALIBRACIÓN</b> <b>"Control de Calidad en la Curva de Calibración"</b>	<b>Fecha: 1997/03/19</b>
	<b>Página: 3 de 3</b>

4.1.-A partir de un material de referencia certificado, preparar tres diluciones con niveles de concentración bajo, medio y alto respectivamente, con respecto al intervalo de concentración al que fue preparada la curva de calibración.

4.2.-Adicionar el El a la disolución de cada nivel de concentración.

4.3.-Colocar en el autoinyector las tres disoluciones de manera aleatoria. Si se trabaja con inyector manual, inyectarlas escogiendo un orden aleatorio.

4.4.-Calcular los resultados y verificar que concuerden con los esperados (los del certificado, si se trabajo con MRC), de no ser así , preparar de nuevo la curva de calibración

**5. REFERENCIAS.**

1.-Arce O. Mariana y Godina G. Susana; "Procedimiento del Manejo del Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución del Sistema de Gradiente 600s (Cromatógrafo 1)"; CENAM-Lab. CO14, Querétaro. México, 1995.

2.-Arce O. Mariana; "Procedimiento del Manejo del Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución del Sistema Isocrático 600 (Cromatógrafo 2)"; CENAM-Lab. CO14, Querétaro. México, 1995.

3.-Dolan Jonh W. and Snyder Lloyd R.; "Troubleshooting LC Systems"; Humana Press; LC Resources Inc., Walnut Creek, California, 1989.

4.-Lawrence James F.; "Organic Trace Analysis by Liquid Chromatography"; Academic Press; Orlando Florida, USA, 1981.

<b>Elaboró: Mariana Arce Osuna.</b>
<b>Revisó: Mónica Sánchez Gómez.</b>
<b>Aprobó: Dr. Yoshito Mitani Nakanishi.</b>

ANEXO 10



**CENTRO NACIONAL DE METROLOGÍA**  
**METROLOGÍA DE MATERIALES. DIVISIÓN POLÍMEROS**

BUENAS PRÁCTICAS DE LABORATORIO EN CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN	N°
	Rev. NÚM. 0
	Fecha: 1997/03/19
CURVAS DE CALIBRACIÓN "Preparación de Disoluciones de Calibración"	Página: 1 de 4

**1. OBJETIVO Y ALCANCE**

**1.1 Objetivo**

Describir las BPL que permiten aumentar la exactitud y precisión de los valores de concentración calculados para cada nivel de la curva de calibración (disoluciones de calibración) y por lo tanto la veracidad de la curva de calibración.

**1.2 Alcance**

Esta BPL proporciona información requerida en los Sistemas de Cromatografía de líquidos: cromatógrafo 1 y 2 (ver referencias 1,2), del Laboratorio CO14 ubicado en el edificio C del CENAM

**2. USO**

Se usará siempre que se elabore una curva de calibración y durante el análisis de muestras.

**3. NOTACIONES y DEFINICIONES.**

**3.1 Notaciones.**

**Cromatógrafo 1.-** corresponde al sistema de gradiente con inyector automático, integrado por los módulos 600S, 616 y 717, columna y cualquiera de los detectores (470, 490E, 996, 431, 464 o 410).

**Cromatógrafo 2.-** corresponde al sistema isocrático con inyector manual, integrado por los módulos 600 y 610, inyector Rheodyne, unidad degasificadora y conectado a cualquiera de los detectores.

**3.2 Definiciones.**

**Sistema isocrático.-** Es cuando la bomba del equipo mantiene constantes la composición de la fase móvil durante el análisis.

Elaboró: Mariana Arce Osuna	Firma:	Fecha: 1996/11/26
Revisó: Mónica Sánchez Gómez	Firma:	Fecha: 1997/01/23
Aprobó: Dr. Yoshito Mitani N.	Firma:	Fecha: 1997/03/19



**CENTRO NACIONAL DE METROLOGÍA**  
METROLOGÍA DE MATERIALES, DIVISIÓN POLÍMEROS

BUENAS PRÁCTICAS DE LABORATORIO EN CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN	N°
	Rev. NÚM. 0
CURVAS DE CALIBRACIÓN "Preparación de Disoluciones de Calibración"	Fecha: 1997/03/19
	Página: 2 de 4

**Sistema de gradiente.**- Es cuando la bomba del equipo permite variar la composición de la fase móvil durante el análisis.

### 3.3 Abreviaturas.

Las siglas anotadas en esta BPL significan:

HPLC	Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución.
800s	Controlador del sistema de bombeo.
600	Controlador del sistema de bombeo.
616	Bomba de inyección cuaternaria.
610	Bomba de inyección isocrática.
717	Automuestreador plus.
470	Detector de fluorescencia.
490E	Detector ultravioleta-visible.
996	Detector de arreglo de diodos (UV).
431	Detector de índice de refracción.
484	Detector de conductividad.
410	Detector electroquímico.
CDB	Calorímetro Diferencial de Barrido.
CG	Cromatografía de Gases.
CL	Cromatografía de Líquidos.
EM	Espectrometría de Masas.
UV-VIS	Espectrofotometría ultravioleta-visible.

## 4. BUENAS PRÁCTICAS DE LABORATORIO EN LA PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES DE CALIBRACIÓN.

4.1.-Preparar las concentraciones de disoluciones de calibración por peso (peso/peso). Verificar que la balanza que se esta utilizando este calibrada.

Elaboró: Mariana Arce Osuna	Firma:	Fecha: 1996/11/26
Revisó: Mónica Sánchez Gómez	Firma:	Fecha: 1997/01/23
Aprobó: Dr. Yoshito Mitani N.	Firma:	Fecha: 1997/03/19



**CENTRO NACIONAL DE METROLOGÍA**  
**METROLOGÍA DE MATERIALES. DIVISIÓN POLÍMEROS**

BUENAS PRÁCTICAS DE LABORATORIO EN CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN	N°
	Rev. NÚM. O
	Fecha: 1997/03/19
CURVAS DE CALIBRACIÓN "Preparación de Disoluciones de Calibración"	Página: 3 de 4

4.2.- Cuando no sea posible preparar por peso debido a la inestabilidad de los analitos (carotenoides y Vitaminas hidrosoluble) usar solo matraces y pipetas calibrados. Determinar la concentración de la disolución stock (madre) espectrométricamente e inyectarla en el cromatógrafo de líquidos para determinar la pureza bajo las condiciones de trabajo, para ambos casos se debe hacer en el momento de preparar las disoluciones de calibración y con los resultados obtenidos hacer corrección por concentración y pureza.

4.3.- Cuando se usan volúmenes pequeños, el error se incrementa por lo que es recomendable usar matraces de mayor volumen para realizar las disoluciones de calibración (10, 25 y 50 mL).

4.4.- Cuando tome volúmenes con pipetas, homogeneice la forma de hacerlo, por ejemplo: si usa micropipetas, siempre pegue la pipeta a contenedor después de haberla cargado para evitar que quede o no la gota suspendida.

4.5.- Evitar que se formen burbujas de aire en la punta de la micro pipeta.

4.6.- Asegurarse que la micro pipeta carga y libera adecuadamente.

4.7.- Cuando prepare por peso, no pesar cantidades muy pequeñas en balanzas de gran escala, o en la última cifra significativa, por ejemplo no pese 0.0005 g en una balanza que en su intervalo de peso tiene como máximo 200 g. Es preferible pesar 0.5 µg en una micro balanza, adicionarlos al matraz y aforar el matraz en la balanza de mayor capacidad. Cuidar que el número de cifras significativas sea igual en ambas balanzas.

4.8.- Cuando prepare las disoluciones de calibración a partir de una disolución patrón (también conocida como disolución "stock") donde el disolvente es volátil, pesar en jeringa y sacar el peso de la cantidad adicionada por diferencia de peso.

4.9.- Inyectar cada nivel de concentración por triplicado y aleatoriamente.

Elaboró: Mariana Arce Osuna	Firma:	Fecha: 1996/11/26
Revisó: Mónica Sánchez Gómez	Firma:	Fecha: 1997/01/23
Aprobó: Dr. Yoshito Mitani N.	Firma:	Fecha: 1997/03/19



**CENTRO NACIONAL DE METROLOGÍA**  
**METROLOGÍA DE MATERIALES, DIVISIÓN POLÍMEROS**

BUENAS PRÁCTICAS DE LABORATORIO EN CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN	N°
	Rev. NÚM. 0
CURVAS DE CALIBRACIÓN "Preparación de Disoluciones de Calibración"	Fecha: 1997/03/19
	Página: 4 de 4

4.10.-Verificar la pureza del estándar por todos los métodos que sea posible, usar de acuerdo al tipo de estándar y las técnicas instrumentales que se tengan al alcance: CDB, CG, CL, EM, UV-VIS, humedad, etc y hacer corrección por pureza en el cálculo de la concentración de las disoluciones de calibración.

**5. REFERENCIAS.**

1.-Arce O. Mariana y Godina G. Susana; "Procedimiento del Manejo del Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución del Sistema de Gradiente 600s (Cromatógrafo 1)"; CENAM-Lab.CO14, QRO. México, 1995.

2.-Arce O. Mariana; "Procedimiento del Manejo del Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución del Sistema Isocrático 600 (Cromatógrafo 2)"; CENAM-Lab.CO14, QRO. México, 1995.

3.-Jonh W. Dolan, Lloyd R. Snyder; "Troubleshooting LC Systems"; Humana Press; LC Resources Inc., Walnut Creek, CA, 1989.

4.-James F. Lawrence; "Organic Trace Analysis by Liquid Chromatography"; Academic Press; Orlando Florida,USA, 1981.

Elaboró: Mariana Arce Osuna	Firma:	Fecha: 1996/11/26
Revisó: Mónica Sánchez Gómez	Firma:	Fecha: 1997/01/23
Aprobó: Dr. Yoshito Mitani N.	Firma:	Fecha: 1997/03/19



ANEXO 11

**CENTRO NACIONAL DE METROLOGÍA**  
**METROLOGÍA DE MATERIALES, DIVISIÓN POLÍMEROS**

BUENAS PRÁCTICAS DE LABORATORIO EN CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN	N°
	Rev. NÚM. O
MATERIAL DE VIDRIO "Limpieza del Material de Vidrio"	Fecha: 1997/03/19
	Página: 1 de 3

**1. OBJETIVO Y ALCANCE.**

**1.1 Objetivo.**

Describir las BPL necesarias para evitar alterar los resultados por contaminación proveniente del material de vidrio

**1.2 Alcance.**

Esta BPL proporciona información requerida en los Sistemas de Cromatografía de Líquidos: cromatógrafo 1 y 2 (ver referencias 1,2), del Laboratorio CO14 ubicado en el edificio C del CENAM

**2. USO.**

Se usará cada vez que se desee verificar si existe contaminación proveniente del material de vidrio, ya sea nuevo o de uso común.

**3. NOTACIONES Y DEFINICIONES.**

**3.1 Notaciones.**

*Cromatógrafo 1.-* corresponde al sistema de gradiente con inyector automático, integrado por los módulos 600s, 616 y 717, columna y cualquiera de los detectores (470, 490E, 996, 431, 464 ó 410).

*Cromatógrafo 2.-* corresponde al sistema isocrático con inyector manual, integrado por los módulos 600 y 610, inyector Rheodyne, unidad desgasificadora y conectado a cualquiera de los detectores.

**3.2 Definiciones.**

Elaboró: Mariana Arce Osuna.
Revisó: Mónica Sánchez Gómez.
Aprobó: Dr. Yoshito Mitani Nakanishi.





**CENTRO NACIONAL DE METROLOGÍA**  
**METROLOGÍA DE MATERIALES, DIVISIÓN POLÍMEROS**

<b>BUENAS PRÁCTICAS DE LABORATORIO EN CROMATOLOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN</b>	<b>N°</b>
	<b>Rev. NÚM. 0</b>
<b>MATERIAL DE VIDRIO</b> <b>"Limpieza del Material de Vidrio"</b>	<b>Fecha: 1997/03/19</b>
	<b>Página: 2 de 3</b>

**Sistema isocrático.**- Es cuando la bomba del equipo mantiene constantes la composición de la fase móvil durante el análisis.

**Sistema de gradiente.**- Es cuando la bomba del equipo permite variar la composición de la fase móvil durante el análisis.

**3.3 Abreviaturas.**

Las siglas anotadas en esta BPL significan:

HPLC	Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución.
600s	Controlador del sistema de bombeo.
600	Controlador del sistema de bombeo.
616	Bomba de inyección cuaternaria.
610	Bomba de inyección isocrática.
717	Automuestreador plus.
470	Detector de fluorescencia.
490E	Detector ultravioleta-visible.
996	Detector de arreglo de diodos (UV).
431	Detector de índice de refracción.
464	Detector de conductividad.
410	Detector electroquímico.

**4. BUENAS PRÁCTICAS DE LABORATORIO PARA LA LIMPIEZA DEL MATERIAL DE VIDRIO.**

4.1.-Dependiendo del tipo de análisis que se este realizando seleccionar el método de limpieza del material de vidrio:

- a) Lavado de material de vidrio para análisis de muestras orgánicas.

<b>Elaboró: Mariana Arce Osuna.</b>
<b>Revisó: Mónica Sánchez Gómez.</b>
<b>Aprobó: Dr. Yoshito Mitani Nakanishi.</b>



**CENTRO NACIONAL DE METROLOGÍA**  
**METROLOGÍA DE MATERIALES, DIVISIÓN POLÍMEROS**

BUENAS PRÁCTICAS DE LABORATORIO EN CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN	N°
	Rev. NÚM. 0
MATERIAL DE VIDRIO "Limpieza del Material de Vidrio"	Fecha: 1997/03/19
	Página: 3 de 3

- b) Lavado de material de vidrio para análisis de muestras inorgánicas  
c) Lavado de material de vidrio para análisis de fosfatos.

4.2.-Después de seleccionar el método de lavado, verificar que sea eficiente para la aplicación específica que se desea, de la siguiente manera:

- a) Adicionar el analito o la muestra en mínimo tres recipientes de uso común y que se empleen en el análisis  
b) Someterlos al proceso de lavado seleccionado.  
c) Adicionar el solvente de trabajo, agitar tratando de disolver cualquier residuo, concentrar e inyectar en el equipo. Observar si da alguna respuesta a las condiciones de análisis.  
d) Si no la da, el procedimiento es adecuado, en el caso contrario, modificar el procedimiento de lavado hasta obtener resultados satisfactorios.

**5. REFERENCIAS.**

- 1.-Arce O. Mariana y Godina G. Susana; "Procedimiento del Manejo del Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución del Sistema de Gradiente 600s (Cromatógrafo 1)"; CENAM-Lab. C014, Querétaro. México, 1995.  
2.-Arce O. Mariana; "Procedimiento del Manejo del Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución del Sistema Isocrático 600 (Cromatógrafo 2)"; CENAM-Lab. C014, Querétaro. México, 1995.  
3.-Dolan Jonh W. and Snyder Lloyd R.; "Troubleshooting LC Systems"; Humana Press; LC Resources Inc., Walnut Creek, California, 1989.  
4.-Lawrence James F.; "Organic Trace Analysis by Liquid Chromatography"; Academic Press; Orlando Florida, USA, 1981.

Elaboró: Mariana Arce Osuna.
Revisó: Mónica Sánchez Gómez.
Aprobó: Dr. Yoshito Mitani Nakanishi.

ANEXO 12



**CENTRO NACIONAL DE METROLOGÍA**  
METROLOGÍA DE MATERIALES, DIVISIÓN POLÍMEROS

BUENAS PRÁCTICAS DE LABORATORIO EN CROMATOGRFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN	N°
	Rev. NÚM. 0
EXTRACCIONES "Extracción líquido-líquido"	Fecha: 1997/03/19
	Página: 1 de 4

**1. OBJETIVO Y ALCANCE.**

**1.1 Objetivo.**

Describir las BPL útiles para mejorar los resultados en métodos por extracción directa líquido-líquido.

**1.2 Alcance.**

Esta BPL proporciona información requerida en los Sistemas de Cromatografía de Líquidos: cromatógrafo 1 y 2 (ver referencias 1,2), del Laboratorio CO14 ubicado en el edificio C del CENAM

**2. USO.**

Se usará cuando se utilicen métodos de extracción directa líquido-líquido que no proporcionen resultados satisfactorios.  
En el desarrollo y validación de métodos de extracción directa líquido-líquido.

**3. NOTACIONES Y DEFINICIONES.**

**3.1 Notaciones.**

*Cromatógrafo 1.*- corresponde al sistema de gradiente con inyector automático, integrado por los módulos 600s, 616 y 717, columna y cualquiera de los detectores (470, 490E, 996, 431, 464 o 410).

*Cromatógrafo 2.*- corresponde al sistema isocrático con inyector manual, integrado por los módulos 600 y 610, inyector Rheodyne, unidad desgasificadora y conectado a cualquiera de los detectores.

Elaboró: Mariana Arce Osuna

Revisó: Mónica Sánchez Gómez

Aprobó: Dr. Yoshito Mitani N.



**CENTRO NACIONAL DE METROLOGÍA**  
METROLOGÍA DE MATERIALES, DIVISIÓN POLÍMEROS

BUENAS PRÁCTICAS DE LABORATORIO EN CROMATOLOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN	N°
	Rev. NÚM. O
EXTRACCIONES "Extracción líquido-líquido"	Fecha: 1997/03/19
	Página: 2 de 4

### 3.2 Definiciones.

**Sistema isocrático.**- Es cuando la bomba del equipo mantiene constantes la composición de la fase móvil durante el análisis.

**Sistema de gradiente.**- Es cuando la bomba del equipo permite variar la composición de la fase móvil durante el análisis.

### 3.3 Abreviaturas.

Las siglas anotadas en esta BPL significan:

HPLC	Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución.
600s	Controlador del sistema de bombeo.
600	Controlador del sistema de bombeo.
616	Bomba de inyección cuaternaria.
610	Bomba de inyección isocrática.
717	Automuestreador plus.
470	Detector de fluorescencia.
490E	Detector ultravioleta-visible.
996	Detector de arreglo de diodos (UV).
431	Detector de índice de refracción.
464	Detector de conductividad.
410	Detector electroquímico.

## 4. BUENAS PRÁCTICAS DE LABORATORIO PARA LA EXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO.

4.1.- Elección del solvente .- Si existen métodos publicados donde propongan algunos, serán los principales candidatos. De no ser así, hacer una lista de los varios candidatos de acuerdo a su polaridad y la de la muestra. Probar los diferentes disolventes orgánicos, calcular sus porcentajes de recuperación y hacer una relación disolventes-porcentajes de recuperación, y elegir el más eficiente.

Elaboró: Mariana Arce Osuna

Revisó: Mónica Sánchez Gómez

Aprobó: Dr. Yoshito Mitani N.



**CENTRO NACIONAL DE METROLOGÍA**  
**METROLOGÍA DE MATERIALES, DIVISIÓN POLÍMEROS**

BUENAS PRÁCTICAS DE LABORATORIO EN CROMATOLOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN	N°
	Rev. NÚM. O
EXTRACCIONES "Extracción líquido-líquido"	Fecha: 1997/03/19
	Página: 3 de 4

4.2.-Cantidad de disolvente de extracción, aumentar paulatinamente la fase extractante y hacer una relación de porcentaje de recuperación-volumen y elegir el volumen óptimo.

4.3.- Cuando cuantifica por estándar externo, medir cuidadosamente los volúmenes de adición y extracción del disolvente, usar material de vidrio calibrado si es posible. Si los disolventes son volátiles:

4.3.1.- Marcar el nivel (en el embudo de extracción o contenedor que se esté usando) cuando se adiciona el solvente volátil y al final de la extracción volver a marcar el nivel del solvente, inmediatamente recuperar la fase orgánica. Medir cuanto se evaporó y corregir el volumen.

4.3.2.-Otra forma es colocar el disolvente en el embudo de separación que se esta usando en la extracción y someterlo a las mismas condiciones de trabajo de la extracción, marcar cada 10 mfn.. el nivel de disolvente y calcular el volumen de disolvente que se evapora por minuto, así tomando el tiempo de la extracción se podrá calcular y corregir el volumen final de la fase acuosa.

4.4.-Compuestos sensibles a la luz, trabajar lo más rápidamente posible y con la luz apagada de la campana de extracción, procurar que no les de la luz directamente durante todo el proceso de análisis. Emplear material de vidrio ambar cuando sea posible y/o cubrir el material con papel aluminio.

4.5.-Compuestos sensibles a altas temperaturas, utilizar equipos accesorios con control de temperatura, y trabajar a las temperaturas a las que son más estables (generalmente 40°), esto aplica principalmente en evaporadores, baños de agua y/o ultrasónicos.

4.6.-Retención en columna, usar modificadores de fase móvil para hacerlas más eficientes y/o disminuir el volumen y/o la concentración de muestra. Observar la forma de los picos en el cromatograma (generalmente tienen un pequeño hombro en el lado derecho, que

Elaboró: Mariana Arce Osuna

Revisó: Mónica Sánchez Gómez

Aprobó: Dr. Yoshito Mitani N.

FAC-01



**CENTRO NACIONAL DE METROLOGÍA**  
**METROLOGÍA DE MATERIALES, DIVISIÓN POLÍMEROS**

BUENAS PRÁCTICAS DE LABORATORIO EN CROMATOGRFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN	N°
	Rev. NÚM. O
	Fecha: 1997/03/19
EXTRACCIONES "Extracción líquido-líquido"	Página: 4 de 4

puede variar en tamaño en la misma muestra).

**5. REFERENCIAS.**

- 1.-Arce O. Mariana y Godina G. Susana; "Procedimiento del Manejo del Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución del Sistema de Gradiente 600s (Cromatógrafo 1)"; CENAM-Lab. CO14, Querétaro. México, 1995.
- 2.-Arce O. Mariana; "Procedimiento del Manejo del Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución del Sistema Isocrático 600 (Cromatógrafo 2)"; CENAM-Lab. CO14, Querétaro. México, 1995.
- 3.-Dolan Jonh W. and Snyder Lloyd R.; "Troubleshooting LC Systems"; Humana Press; LC Resources Inc., Walnut Creek, California, 1989.
- 4.-Lawrence James F.; "Organic Trace Analysis by Liquid Chromatography"; Academic Press; Orlando Florida, USA, 1981.

Elaboró: Mariana Arce Osuna

Revisó: Mónica Sánchez Gómez

Aprobó: Dr. Yoshito Mitani N.

ANEXO 13



**CENTRO NACIONAL DE METROLOGÍA**  
**METROLOGÍA DE MATERIALES, DIVISIÓN POLÍMEROS**

BUENAS PRÁCTICAS DE LABORATORIO EN CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN	N°
	Rev. NÚM. 0
MUESTRAS "Almacenamiento y manejo de muestras"	Fecha: 1997/03/19
	Página: 1 de 5

**1. OBJETIVO Y ALCANCE.**

**1.1 Objetivo.**

Describir las BPL que permiten manejar y almacenar adecuadamente la(s) muestra(s), para evitar modificar sus características originales de concentración de los analitos por efectos ambientales o de mal manejo y almacenamiento de las mismas.

**1.2 Alcance.**

Esta BPL proporciona información requerida en los Sistemas de Cromatografía de Líquidos: cromatógrafo 1 y 2 (ver referencias 1,2), del Laboratorio CO14 ubicado en el edificio C del CENAM

**2. USO.**

Se usará cuando se reciban muestras para análisis o cuando se preparen de manera interna (Materiales de Referencia para certificar) y durante el análisis de la misma.

**3. NOTACIONES y DEFINICIONES.**

**3.1 Notaciones.**

*Cromatógrafo 1.* - corresponde al sistema de gradiente con inyector automático, integrado por los módulos 600s, 616 y 717, columna y cualquiera de los detectores (470, 490E, 996, 431, 464 o 410).

*Cromatógrafo 2.* - corresponde al sistema isocrático con inyector manual, integrado por los módulos 600 y 610, inyector Rheodyne, unidad desgasificadora y conectado a cualquiera de

Elaboró: Mariana Arce Osuna
Revisó: Mónica Sánchez Gómez
Aprobó: Dr. Yoshito Mitani N.



**CENTRO NACIONAL DE METROLOGÍA**  
**METROLOGÍA DE MATERIALES, DIVISIÓN POLÍMEROS**

BUENAS PRÁCTICAS DE LABORATORIO EN CROMATOLOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN	N°
	Rev. NÚM. 0
MUESTRAS "Almacenamiento y manejo de muestras"	Fecha: 1997/03/19
	Página: 2 de 5

los detectores.

### 3.2 Definiciones.

**Sistema isocrático.-** Es cuando la bomba del equipo mantiene constantes la composición de la fase móvil durante el análisis.

**Sistema de gradiente.-** Es cuando la bomba del equipo permite variar la composición de la fase móvil durante el análisis.

### 3.3 Abreviaturas.

Las siglas anotadas en esta BPL significan:

HPLC	Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución.
600s	Controlador del sistema de bombeo.
600	Controlador del sistema de bombeo.
616	Bomba de inyección cuaternaria.
610	Bomba de inyección isocrática.
717	Automuestreador plus.
470	Detector de fluorescencia.
490E	Detector ultravioleta-visible.
996	Detector de arreglo de diodos (UV).
431	Detector de índice de refracción.
464	Detector de conductividad.
410	Detector electroquímico.

Elaboró: Mariana Arco Osuna

Revisó: Mónica Sánchez Gómez

Aprobó: Dr. Yoshito Mitani N.





**CENTRO NACIONAL DE METROLOGÍA**  
**METROLOGÍA DE MATERIALES. DIVISIÓN POLÍMEROS**

BUENAS PRÁCTICAS DE LABORATORIO EN CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN	N°
	Rev. NÚM. 0
MUESTRAS "Almacenamiento y manejo de muestras"	Fecha: 1997/03/19
	Página: 3 de 5

**4. BUENAS PRÁCTICAS DE LABORATORIO EN EL ALMACENAMIENTO Y MANEJO DE MUESTRAS.**

**4.1 Almacenamiento y manejo de muestras. en general.**

4.1.1.- Cuando hay problemas de heterogeneidad en muestras sólidas, moler la muestra y pesarla por un tamiz, para homogeneizar el tamaño de partícula.

*Nota:* es importante el asegurar que en este paso no se introduce contaminación a la muestra.

4.1.2.- Homogeneizar la muestra antes de tomar la porción para analizar, las muestras líquidas agitarlas y mezclar las sólidas o semisólidas

4.1.3.- Las muestras se deben almacenar a una temperatura controlada, generalmente de 20°C, pero cuando se trata de muestras sensibles a la temperatura estas se deben de mantener en el refrigerador antes y después de tomar la porción o porciones de análisis. (revisar bibliografía para ver si existen algunas recomendaciones específicas).

4.1.4.- Cuando la muestra es higroscópica o se oxida con el aire, colocarla en un desecador a vacío en el cual el agente desecante se encuentre libre de humedad.

4.1.4.1.- No olvidar cambiar frecuentemente la sílica del desecador (cuando el color de la sílica cambie de azul intenso a azul claro) y revisar que la llave que conecta al vacío no tenga fugas.

4.1.5.- En el caso de muestras tóxicas ( PAH 's, PCB, etc), manejarlas siempre con guantes y trabajar sobre servilletas de papel para el laboratorio, al final recojerlas y desecharlas en el contenedor de residuos peligrosos, etiquetarlas como tal, aclarando el tipo de riesgo. Almacenarlas perfectamente selladas, si los contenedores son matracas, colocar alrededor teflón y después parafilm.

Elaboró: Mariana Arce Osuna
Revisó: Mónica Sánchez Gómez
Aprobó: Dr. Yoshito Mitani N.



**CENTRO NACIONAL DE METROLOGÍA**  
**METROLOGÍA DE MATERIALES. DIVISIÓN POLÍMEROS**

BUENAS PRÁCTICAS DE LABORATORIO EN CROMATOLOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN	N°
	Rev. NÚM. 0
MUESTRAS "Almacenamiento y manejo de muestras"	Fecha: 1997/03/19
	Página: 4 de 5

Destinar lugares de almacenamiento para éste tipo de muestras.  
Ver las recomendaciones en caso de accidente en bibliografía o si se cuenta con el material puro, revisar la hoja de seguridad.

4.1.6.- En el caso de muestras sensibles a la luz, colocar la muestra en bolsas de muestreo opacas o en frascos ámbar, según sea el caso

4.1.7.- Si se trabajan muestras volátiles, emplear contenedores que sellen bien y mantenerlas en refrigeración.  
Evitar abrir y cerrar frecuentemente o hacerlo lo más rápido posible.

#### 4.2 Almacenamiento y Manejo de muestras durante y después del tratamiento.

##### 4.2.1 Para muestras con analitos volátiles o extraídos en disolventes volátiles:

4.2.1.1. Usar estándar interno.

4.2.1.2.- Sellar correctamente los viales para evitar la evaporación del disolvente de la muestra o del analito.

4.2.1.3.- Regular la temperatura del laboratorio a 20 °C o colocar las muestras en refrigeración y minimizar el tiempo que se mantienen a las condiciones ambientales del laboratorio.

4.2.1.4.- Realizar una prueba de estabilidad a diferentes temperaturas y determinar el tiempo de vida media de las disoluciones en cada temperatura, almacenarlo a la temperatura que es más estable.

Elaboró: Mariana Arce Osuna
Revisó: Mónica Sánchez Gómez
Aprobó: Dr. Yoshito Mitani N.



**CENTRO NACIONAL DE METROLOGÍA**  
**METROLOGÍA DE MATERIALES, DIVISIÓN POLÍMEROS**

<b>BUENAS PRÁCTICAS DE LABORATORIO EN CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN</b>	<b>N°</b>
	<b>Rev. NÚM. 0</b>
<b>MUESTRAS</b> <b>"Almacenamiento y manejo de muestras"</b>	<b>Fecha: 1997/03/19</b>
	<b>Página: 5 de 5</b>

**4.2.2 Para muestras con analitos sensibles a la luz.**

4.2.2.1.-Utilizar contenedores color ámbar para las muestras sensibles a la luz. Inyectarlas lo más rápido posible.

**4.2.3 Generales.**

4.2.3.1.-Etiquetar de manera correcta las muestras, corroborar que la etiqueta asignada corresponda a la concentración. En la etiqueta se debe indicar: nombre de la muestra, concentración, fecha y usuario.

4.2.3.2.-Si utiliza un procesador verifique que la manera en que asignó el orden de inyección de las muestras, fue el correcto

**5. REFERENCIAS.**

1.-Arce O. Mariana y Godina G. Susana; "Procedimiento del Manejo del Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución del Sistema de Gradiente 600s (Cromatógrafo 1)"; CENAM-Lab. CO14, Querétaro. México, 1995.

2.-Arce O. Mariana; "Procedimiento del Manejo del Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución del Sistema Isocrático 600 (Cromatógrafo 2)"; CENAM-Lab. CO14, Querétaro. México, 1995.

3.-Dolan Jonh W. and Snyder Lloyd R.; "Troubleshooting LC Systems"; Humana Press; LC Resources Inc., Walnut Creek, California, 1989.

4.-Lawrence James F.; "Organic Trace Analysis by Liquid Chromatography"; Academic Press; Orlando Florida, USA, 1981.

<b>Elaboró: Mariana Arce Osuna</b>
<b>Revisó: Mónica Sánchez Gómez</b>
<b>Aprobó: Dr. Yoshito Mitani N.</b>

ANEXO 14



**CENTRO NACIONAL DE METROLOGÍA**  
**METROLOGÍA DE MATERIALES, DIVISIÓN POLÍMEROS**

BUENAS PRÁCTICAS DE LABORATORIO EN CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN	N°
	Rev. NÚM. O
	Fecha: 1997/03/19
MUESTRAS "Contaminación de muestras"	Página: 1 de 3

**1. OBJETIVO Y ALCANCE**

**1.1 Objetivo.**

Describir las BPL requeridas para evitar contaminar la muestra y así no alterar sus características físicas originales, tener interferencias durante el análisis y asegurar la veracidad de los resultados.

**1.2 Alcance.**

Esta BPL proporciona información requerida en los Sistemas de Cromatografía de líquidos: cromatógrafo 1 y 2 (ver referencias 1,2), del Laboratorio CO14 ubicado en el edificio C del CENAM.

**2. USO.**

Se usará cuando se manejen muestras: -para análisis externos  
-para análisis internos (Materiales de Referencia por certificar) o muestras de trabajo.

**3. NOTACIONES Y DEFINICIONES.**

**3.1 Notaciones.**

**Cromatógrafo 1.-** corresponde al sistema de gradiente con inyector automático, integrado por los módulos 600s, 618 y 717, columna y cualquiera de los detectores (470, 490E, 996, 431, 464 ó 410).

**Cromatógrafo 2.-** corresponde al sistema isocrático con inyector manual, integrado por los módulos 600 y 610, inyector Rheodyne, unidad desgasificadora y conectado a cualquiera de los detectores.

Elaboró: Mariana Arce Osuna.
Revisó: Mónica Sánchez Gómez.
Aprobó: Dr. Yoshito Mitani Nakanishi.



**CENTRO NACIONAL DE METROLOGÍA**  
**METROLOGÍA DE MATERIALES, DIVISIÓN POLÍMEROS**

BUENAS PRÁCTICAS DE LABORATORIO EN CROMATOLOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN	N°
	Rev. NÚM. 0
MUESTRAS "Contaminación de muestras"	Fecha: 1997/03/19
	Página: 2 de 3

**3.2 Definiciones.**

**Sistema isocrático.**- Es cuando la bomba del equipo mantiene constantes la composición de la fase móvil durante el análisis.

**Sistema de gradiente.**- Es cuando la bomba del equipo permite variar la composición de la fase móvil durante el análisis.

**3.3 Abreviaturas.**

Las siglas anotadas en esta BPL significan:

HPLC	Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución.
600s	Controlador del sistema de bombeo.
600	Controlador del sistema de bombeo.
616	Bomba de inyección cuaternaria.
610	Bomba de inyección isocrática.
717	Automuestreador plus.
470	Detector de fluorescencia.
490E	Detector ultravioleta-visible.
996	Detector de arreglo de diodos (UV).
431	Detector de índice de refracción.
464	Detector de conductividad.
410	Detector electroquímico.

**4. BUENAS PRÁCTICAS DE LABORATORIO PARA EVITAR LA CONTAMINACIÓN DE MUESTRAS.**

Elaboró: Mariana Arce Osuna.
Revisó: Mónica Sánchez Gómez.
Aprobó: Dr. Yoshito Mitani Nakanishi.



**CENTRO NACIONAL DE METROLOGÍA**  
**METROLOGÍA DE MATERIALES, DIVISIÓN POLÍMEROS**

<b>BUENAS PRÁCTICAS DE LABORATORIO EN CROMATOLOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN</b>	<b>N°</b>
	<b>Rev. NÚM. 0</b>
	<b>Fecha: 1997/03/19</b>
<b>MUESTRAS</b> <b>"Contaminación de muestras"</b>	<b>Página: 3 de 3</b>

4.1.-Muestras sólidas, no introducir espátulas, si es necesario hacerlo emplear siempre la misma, la cual debe lavarse con el disolvente de trabajo inmediatamente después de su uso y después lavarla con otros dos o tres disolventes de diferentes polaridades por ejemplo diclorometano, metanol y hexano.

4.2.-Taparlas y almacenarlas después de su uso.

4.3.-Cuando es necesario homogeneizar la muestra (muestras sólidas), limpiar perfectamente (de ser posible, utilizar el solvente de trabajo) el molino, divisores de muestra y contenedores para evitar contaminarla.

4.4.-En muestras líquidas, no introducir pipetas o jeringas, o asegurarse que estén perfectamente limpias, usarlas solo una vez y lavarlas con el disolvente de trabajo inmediatamente después de su uso y después lavarlas con dos o tres disolventes de diferentes polaridades.

**5. REFERENCIAS.**

1.-Arce O. Mariana y Godina G. Susana; "Procedimiento del Manejo del Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución del Sistema de Gradiente 600s (Cromatógrafo 1)"; CENAM-Lab. C014, Querétaro. México, 1995.

2.-Arce O. Mariana; "Procedimiento del Manejo del Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución del Sistema Isocrático 600 (Cromatógrafo 2)"; CENAM-Lab. C014, Querétaro. México, 1995.

3.-Dolan Jonh W. and Snyder Lloyd R.; "Troubleshooting LC Systems"; Humana Press; LC Resources Inc., Walnut Creek, California, 1989.

Elaboró: Mariana Arce Osuna.

Revisó: Mónica Sánchez Gómez.

Aprobó: Dr. Yoshito Mitani Nakanishi.



**CENAM CENTRO NACIONAL DE METROLOGÍA**

**ANEXO 15**

Área: División Polímeros	No.
	Rev. 0
Procedimiento: Lavado de Material de Vidrio para Análisis Orgánicos.	Fecha: 1997/03/19
	Página: 1 de 3

**1. OBJETIVO Y ALCANCE**

**1.1 Objetivo**

Describir el procedimiento para el lavado y limpieza del material de vidrio empleado para análisis orgánicos

**1.2 Alcance.**

En este procedimiento se proporciona la información requerida para realizar la limpieza del material de vidrio utilizado en el análisis de compuestos orgánicos, con la finalidad de evitar contaminación cruzada entre análisis, provocada por la retención de compuestos orgánicos en las paredes del material de vidrio.

**2. DESARROLLO.**

**2.1** Eliminar todo tipo de etiquetas y/o masking adheridos al material.

**2.2** Enjuague el material de vidrio tan pronto como sea posible con un solvente adecuado (generalmente es el de trabajo) para eliminar cualquier residuo visible que contenga.

**2.3.** Sumerja el material en una tarja que contenga una solución agua caliente/detergente empleando para esto un detergente neutro para laboratorio, realicelo de tal manera que el material quede totalmente sumergido y no tenga espacios con aire, esto permitirá que exista un mejor contacto de la solución y todas las superficies del material.

Elaboró: Mariana Arce Osuna.

Revisó: Mónica Sánchez Gómez.

Aprobó: Dr. Yoshito Mitani Nakanishi.



Área: División Polímeros	No.
	Rev. 0
Procedimiento: Lavado de Material de Vidrio para Análisis Orgánicos.	Fecha: 1997/03/19
	Página: 2 de 3

- 2.4. Dejar el material sumergido por 2 o 3 horas y si es posible durante la noche.
- 2.5. Retirar la solución donde se encuentra sumergido el material y tapan la salida de la tarja para preparar de nuevo la solución agua caliente/detergente.
- 2.6. Lave minuciosamente el material empleando el escobillón adecuado.
- 2.7. Enjuage el material con agua corriente.
- 2.8. Enjuagar el material con agua tipo I.
- 2.9. Dejar escurrir el material sobre papel absorbente hasta que se seque, si es posible bajo una campana de flujo laminar o cubierto para protegerlo del polvo.
- 2.10. Poner dos rayas por la parte externa con marcador de tinta indeleble, las cuales deben desaparecer después de someter el material al paso 2.11.
- 2.11. Colocarlo en un horno, también colocar en el horno el papel aluminio con el que se cubra el material por un tiempo de 18 horas como máximo y un mínimo de cuatro horas a una temperatura de 500 °C.
- 2.12. Pasado este tiempo dejar que baje la temperatura, sacarlo e inmediatamente tapanlo con el papel aluminio. Se debe verificar que la marca que se realizó con papel aluminio haya desaparecido, en el caso que no haya desaparecido es que el material no quedó completamente limpio, por lo que se debe de realizar otra vez el procedimiento desde el punto 2.10.

Elaboró: Mariana Arce Osuna.
Revisó: Mónica Sánchez Gómez.
Aprobó: Dr. Yoshito Mitani Nakanishi.





**CENAM CENTRO NACIONAL DE METROLOGÍA**

Área: División Polímeros	No.
	Rev. 0
Procedimiento: Lavado de Material de Vidrio para Análisis Orgánicos.	Fecha: 1997/03/19
	Página: 3 de 3

#### 4. REFERENCIAS.

1.-Sánchez G. Mónica, Castro G. Esther, Sáinz U. Judith G., González R. Norma, Arvizu T. Rocío, Lora S, Ana Ma., Lara M. Velina J. y Ramírez M. Estela; "Manual de Buenas Prácticas de Laboratorio"; Publicación CNM-MRD-PT008, CENAM; México 1995.

2.-Annual Book of ASTM Standards; Method number D1193-91; "Standard Specification for Reagent Water"; Vol. 11.01; Philadelphia, PA; 1992.

3.-Dolan Jonh W. and Snyder Lloyd R.; "Troubleshooting LC Systems"; Humana Press; LC Resources Inc., Walnut Creek, California, 1989.

Elaboró: Mariana Arce Osuna.

Revisó: Mónica Sánchez Gómez.

Aprobó: Dr. Yoshito Mitani Nakanishi.