

UNIVERSIDAD INTERNACIONAL DE LAS AMÉRICAS

VICERRECTORÍA ACADÉMICA

CARRERA DE FARMACIA

**“LINEAMIENTOS TEÓRICOS Y METODOLÓGICOS PARA LA
ELABORACIÓN DE UN MANUAL DE USO DEL
CROMATÓGRAFO LÍQUIDO DE ALTA EFICACIA (HPLC),
CON LOS ESTUDIANTES DE FARMACIA DE LA
UNIVERSIDAD INTERNACIONAL DE LAS AMÉRICAS (UIA)”**

MODALIDAD: TESIS PARA OPTAR POR EL GRADO DE LICENCIATURA EN FARMACIA

MARÍA ANGÉLICA QUESADA VARGAS

TUTOR: DR. CARLOS MORA RODRÍGUEZ

LECTOR: MSc. ISAAC ARELLANO

SEDE ARANJUEZ

ABRIL, 2019

Pensamiento

"Hay una fuerza motriz más poderosa que el vapor, la electricidad y la energía atómica: la voluntad."

Albert Einstein

Dedicatoria

Primeramente, dedicarle este trabajo a Dios, por ser mi fortaleza en los momentos de debilidad, y brindarme esa fuerza de voluntad para levantarme después de cada caída. Por bendecirme día a día y por haberme permitido llegar hasta este punto tan importante de mi formación académica y personal. Especialmente, por aprobarme una vida llena de aprendizajes y con su ayuda hacer realidad este sueño tan anhelado.

A mi madre, por enseñarme a luchar por mis metas y anhelos, y a nunca rendirme, a pesar de las adversidades que se presenten. A mi padre por sus enseñanzas. Sin ustedes no hubiera podido llegar hasta este momento.

A mi hermano Luis Diego, por ser un ejemplo de lucha para mí, por escucharme y aconsejarme siempre.

A mi cuñada Icel Martínez y a mi sobrina Sofía Quesada, por ser mi apoyo y motivación.

A mis amigas valiosas, Gabriela Calvo, Melissa Rodríguez, Vanessa Vásquez, Tatiana Jiménez, Nancy Mora y Melissa González.

A mi amigo de la vida, Melvin Vargas.

A todas las demás personas que han impulsado mis sueños de alguna manera.

A la Dra. Maricela Ledezma y a la Dra. Irelis Álvarez, por motivarme cada día durante mi carrera profesional y académica.

Agradecimientos

Primeramente, a Dios por darme tantas oportunidades a lo largo de estos años de vida, por estar siempre a mi lado y al de mi familia. Por todas las bendiciones y personas de gran corazón que ha puesto en mi camino.

A mi familia, especialmente a mi madre, mi hermano, mi cuñada y mi sobrina, por todo el amor y apoyo incondicional que me han brindado siempre, por confiar y creer en mí.

Seguidamente quiero dar gracias a todos mis mentores, quienes han aparecido en mi trayectoria laboral y en mi vida en general, ya que este trabajo lleva el sello de sus valiosas lecciones y del aporte de su conocimiento. Pero especialmente quiero agradecer profundamente a mi tutor, el Dr. Carlos Mora Rodríguez, por su apoyo, su guía, y brindarme sabios consejos y comentarios que iluminaron mi trabajo en esta tesis. De igual manera resalto el gran aporte de la profesora Zoilamérica Ortega, quien sin duda alguna fue parte fundamental en este trabajo.

Asimismo, deseo expresar mi agradecimiento y aprecio a la Directora de Carrera, Dra. Eva Diana Quirós Orozco, y a la asistente de la carrera, Natali Arias, por su guía y atención agradable durante este proceso.

Además, quiero agradecer a todos los profesores que me formaron a lo largo de esta carrera universitaria, especialmente al Dr. Edgar Hernández, a la Dra. Melissa Martínez y al Lic. Adam Amey.

A Davis, Raxel y Yendry por su excelente actitud personal y por ayudarme en el laboratorio y con el manejo inicial sobre el uso del Cromatógrafo.

A Calox de CR, especialmente a la Dra. Maricela Ledezma, a la Dra. Irelis Álvarez y a la Dra. Lucía Pupo, por su cariño y apoyo incondicional durante mi carrera profesional y académica.

¡Dios es misericordioso por la presencia de cada uno de ustedes en mi vida!

Contenido

Contenido	10
Tablas	13
Figuras	14
Resumen	17
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	18
Planteamiento del problema	18
Objetivos.....	19
Objetivo General.	19
Objetivos específicos.....	20
Justificación	20
Antecedentes.....	22
Necesidad de creación de capacidades en los estudiantes para el mercado laboral.	23
Enfoque poco constructivista para el aprendizaje y uso de equipos de laboratorio.	25
Falta de Innovación docente en temas de laboratorio.	26
Importancia de desarrollar la técnica de Cromatografía Líquida para los estudiantes de Farmacia.	27
Proyecciones	28
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO	29
Formación académica de los profesionales del área de la Salud.....	29
Docencia y técnicas de aprendizaje en educación superior.....	30
Importancia de la formación química en el farmacéutico	35
Características de los profesionales de Farmacia.....	36
Sistema de gestión de calidad.....	37
Lineamientos de la Organización Mundial de la Salud sobre los equipos de laboratorio. ...	40
Generalidades sobre Buenas Prácticas de Laboratorio.	42

	11
Áreas de la industria farmacéutica que utiliza el HPLC.....	56
Técnicas de análisis de medicamentos en la industria farmacéutica.....	58
Técnica de Cromatografía Líquida.....	59
Historia.....	59
Fundamentos de la técnica.....	61
Generalidades del HPLC.....	65
Requerimientos de la Farmacopeas para el HPLC.....	80
Funcionamiento del HPLC.....	84
Calificación del HPLC.....	84
Mantenimiento preventivo del HPLC.....	87
CAPÍTULO III: MARCO METODOLÓGICO.....	99
Enfoque de la investigación.....	99
Diseño metodológico.....	99
Variables.....	101
Instrumentos.....	102
Procedimiento de recolección y análisis de los datos.....	103
Fase 1: Caracterización del equipo.....	103
Fase 2: Observación del personal involucrado utilizando los equipos sin el instructivo....	103
Fase 3: Consideración de las deficiencias según la hoja de cotejo 1.....	103
Fase 4: Realización del instructivo.....	104
Fase 5: Evaluación del instructivo.....	104
Fase 6: Valoración de los resultados.....	104
CAPÍTULO IV: ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	105
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	109

CAPÍTULO VI: PROPUESTA DE GUÍA DE USO DEL CROMATÓGRAFO LÍQUIDO YL-CLARITY®.....	112
Equipo.....	112
Introducción.....	113
Objetivos Instrumentales	113
Instructivo de Uso.....	114
Instrucciones para verificar el uso adecuado del equipo con el personal involucrado.....	162
REFERENCIAS	163
Apéndices	168
Apéndice A. Reglamento para el uso del laboratorio de química de la U.I.A.	169
Apéndice B. Glosario	171
Apéndice C. Manual del HPLC de la U.I.A.	174
Apéndice D. Hoja de cotejo sobre el conocimiento y las habilidades requeridas por el personal que está involucrado en la manipulación y uso del HPLC	175
Apéndice E. Hoja de cotejo 2	176
Apéndice F. Proceso de limpieza del detector.....	177
Apéndice G. Mantenimiento mensual y rotación de canales.....	178
Apéndice H. Verificación del HPLC	179
Apéndice I. Cronograma de actividades	184

Tablas

Tabla 1. Perfil del cargo de un Farmacéutico como jefe de control de calidad	36
Tabla 2. Tipos de relleno de Cromatografía Líquida.	72
Tabla 3. Ajustes permitidos en los parámetros cromatográficos por HPLC	83
Tabla 4. Puntos críticos del sistema cromatográfico.....	88
Tabla 5. Puntos críticos en la interacción entre disolventes y contenedores.....	89
Tabla 6. Puntos críticos de los disolventes por sí solos	90
Tabla 7. Puntos críticos de las bombas	91
Tabla 8. Puntos críticos en la introducción de muestras (inyectores)	92
Tabla 9. Puntos críticos en columnas y empaques	93
Tabla 10. Puntos críticos en detectores	95
Tabla 11. Fallas típicas/causas/solución.....	96
Tabla 12. Variables de la investigación	101
Tabla 13. Matriz general para el diseño de instrumentos.....	102
Tabla 14. Encabezado del instructivo	114
Tabla 15. Verificación de Desempeño	179
Tabla 16. Gradiente de flujo.....	181

Figuras

Figura 1. Modelo de sistema de gestión de la calidad.....	38
Figura 2. Fases del Proceso de laboratorio.....	39
Figura 3. Habilitación y uso de equipos de Laboratorio	53
Figura 4. Partes del HPLC.....	66
Figura 5. Tipos de bombas de Líquidos	67
Figura 6. Esquema de una bomba de HPLC de pistón.....	68
Figura 7. Ruido (rizado) en la línea de base producido por la oscilación de los dos pistones.....	69
Figura 8. Esquema de una válvula de inyección de seis vías.....	70
Figura 9. La columna cromatográfica rellena de micropartículas.....	71
Figura 10. Columnas de HPLC (imagen cortesía de Agilent Technologies)	71
Figura 11. Flujo y diámetros internos de columna.....	77
Figura 12. Solventes en los que se guardan las columnas.....	78
Figura 13. Detectores de HPLC y Mínima Cantidad Detectable (MCD)	79
Figura 14. Separación cromatográfica de las dos sustancias	82
Figura 15. Pico cromatográfico asimétrico	82
Figura 16. Ruido y pico cromatográfico	83
Figura 17. Gráfico sobre conocimiento del HPLC y habilidades de los participantes.....	106
Figura 18. Gráfico sobre desempeño de los participantes posterior a la capacitación de Uso del HPLC.....	108
Figura 19. Fotografía del HPLC, marca: YL. modelo: YL 9100.....	112
Figura 20. Descripción del equipo	118
Figura 21. Desgasificador	120
Figura 22. Bomba.....	120
Figura 23. Detector.....	121
Figura 24. Compartimiento de columna.....	121
Figura 25. Automuestreador.....	122
Figura 26. Botón de encendido/apagado del automuestreador	123
Figura 27. Ícono del software Clarity®.....	124
Figura 28. Ventana equipo 1	124
Figura 29. Cuadro de diálogo de ingreso	125

Figura 30. Ventana principal del software Clarity®	125
Figura 31. Recolección de desechos de la purga.....	126
Figura 32. Movimiento adecuado de la válvula de la purga	127
Figura 33. Ventana principal del software Clarity®	127
Figura 34. Ventana principal del monitoreo del equipo.....	128
Figura 35. Ventana principal del monitoreo del equipo.....	129
Figura 36. Cuadro de diálogo del Automuestreador	130
Figura 37. Pantalla para abrir un método	131
Figura 38. Acceso a método desde barra de herramientas de ventana principal.....	132
Figura 39. Ventana de la configuración del método (Method Setup)	133
Figura 40. Automuestreador (AS)/MODE, TIME AND TEMP.....	134
Figura 41. Automuestreador (AS)/INPUTS AND OUTPUTS	135
Figura 42. Automuestreador (AS)/MIX METHODS.....	136
Figura 43. Automuestreador (AS)/SYSTEM SETTINGS	137
Figura 44. Automuestreador (AS)/TRAY	138
Figura 45. Tabla del Gradiente (LC GRADIENT)	139
Figura 46. Tabla del Gradiente (LC GRADIENT)/OPTIONS	139
Figura 47. Pantalla (LC).....	140
Figura 48. Pantalla de Mediciones (MEASUREMENT)	141
Figura 49. Pantalla ACQUISITION- SETUP	142
Figura 50. Pantalla ADQUISITION-TIME TABLE.....	143
Figura 51. Pantalla de configuración del horno (THERMOSTAT)-SETUP	144
Figura 52. Pantalla de configuración del horno (THERMOSTAT)-TIME TABLE.....	145
Figura 53. Pantalla de eventos de Integración (INTEGRATION).....	146
Figura 54. Pantalla Cálculos (CALCULATION)	147
Figura 55. Pantalla Avanzada (ADVANCED)	148
Figura 56. Cuadro de diálogo 1 de Método nuevo.....	149
Figura 57. Cuadro de diálogo 2 de Método nuevo.....	149
Figura 58. Pantalla para ejecutar una Prueba	150
Figura 59. Pantalla de la Secuencia para la prueba	151
Figura 60. Pantalla de la inyección en proceso	152

Figura 61. Pantalla del cromatograma-RESULT	152
Figura 62. Pantalla del cromatograma-PERFORMANCE.....	153
Figura 63. Pantalla del cromatograma- INTEGRATION	154
Figura 64. Pantalla del cromatograma-MEASUREMENT CONDITIONS	154
Figura 65. Pantalla de CALIBRATION.....	155
Figura 66. Pantalla del Cromatograma con el nombre del componente	156
Figura 67. Pantalla del Cromatograma-SUMMARY	156
Figura 68. Pantalla del Reporte	157
Figura 69. Vista previa del Reporte	157
Figura 70. Pantalla de la Secuencia Total	158
Figura 71. METHOD SETUP Lavado-LC GRADIENT	159
Figura 72. METHOD SETUP Lavado-ACQUISITION-TIME TABLE	159
Figura 73. Gráfica de medición de exactitud del gradiente.....	182

Resumen

Se realiza la evaluación de la implementación de una guía de uso para el Cromatógrafo Líquido de Alta Eficacia (HPLC), con los estudiantes de Farmacia de la Universidad Internacional de las Américas (UIA) mediante un enfoque cualitativo. El diseño metodológico de esta investigación es transversal, descriptivo y preexperimental.

El trabajo de investigación consiste en establecer los lineamientos teóricos y metodológicos para la elaboración de un instructivo de uso del equipo de Cromatografía Líquida de Alta Eficacia, (HPLC, modelo: YL9100) y facilitar su implementación en los laboratorios de la carrera de Farmacia de la Universidad Internacional de las Américas.

Cabe resaltar la importancia de ejecutar una adecuada gestión de los equipos, que cumpla los requisitos establecidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y las Buenas prácticas de Laboratorio (BPL), para garantizar la implementación de un Sistema de Gestión de Calidad.

La investigación se lleva a cabo mediante la recopilación de información sobre la técnica de Cromatografía Líquida y el manual del proveedor del equipo. Se identifican las habilidades requeridas para el uso correcto del equipo, y se diseña un instructivo de uso para que los participantes (estudiantes, profesores y personal del laboratorio) puedan mejorar sus conocimientos.

Se llega a la conclusión que el HPLC debe tener una guía de uso, ya que es necesario para: la formación académica, el uso adecuado y promover su vida útil, lo cual beneficia al futuro farmacéutico y a la Universidad, porque facilita su enseñanza y el adecuado funcionamiento del equipo.

Para finalizar, se recomienda que el equipo sea utilizado según los lineamientos establecidos en la guía de uso; así el estudiante tiene acceso al equipo mediante la supervisión de los profesores. Asimismo, se recomienda una verificación semestral por parte del personal del laboratorio y un programa de mantenimiento anual por parte de la Universidad, para procurar el adecuado funcionamiento del HPLC y su vida útil.

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

Planteamiento del problema

En la industria farmacéutica es de vital importancia el cumplimiento de un adecuado Sistema de Gestión de Calidad, que promueva la eficacia y seguridad de los medicamentos fabricados. Por esta razón, en el manual del sistema de gestión de la calidad en el laboratorio de la Organización Mundial de la Salud, se establece que: “En un sistema de gestión de la calidad es necesario abarcar todos los aspectos del funcionamiento del laboratorio” (Organización Mundial de la Salud [OMS], 2016, p. 11), y es “necesaria una adecuada gestión de los equipos para garantizar la exactitud, la fiabilidad y la puntualidad de los análisis” (OMS, 2016, p. 36).

La forma de estandarizar una adecuada gestión de los equipos se basa en la capacitación de los usuarios, mediante el manejo del instructivo de uso del equipo. Para ello, es necesario conocer los lineamientos teóricos y metodológicos sobre la aplicación de las técnicas de análisis de medicamentos.

Una de las técnicas de análisis de medicamentos más utilizada es la Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC), que es una herramienta para el análisis de drogas ampliamente usada en la industria farmacéutica para determinar la calidad de los medicamentos, ya que estos son productos al alcance de la población que mejoran sus condiciones de salud.

Dada la importancia de obtener resultados cada vez más precisos y exactos en el análisis cuantitativo de un producto farmacéutico, asimismo que de su calidad depende en muchas ocasiones, la salud e incluso la vida de un ser humano, es por eso que se exige cada vez con mayor fuerza realizar validación de las técnicas analíticas de los productos farmacéuticos, es por ello que se valida la técnica analítica, empleando un equipo HPLC. (Espinoza, 2013, párr. 28).

Por otra parte, al promover la formación de estudiantes con mayor conocimiento en el uso de la Cromatografía Líquida de Alta Eficacia, mejora el perfil profesional y los aportes que estos puedan brindar a la ciencia.

Incorporar trabajo de laboratorio dentro de los procesos de enseñanza de la Química es una necesidad que se hace evidente en el momento que se pretende hacer que el estudiante adquiera los conceptos relacionados con esta ciencia y que además le permite acercarse [sic] adecuadamente a las competencias básicas en ciencias naturales. (Durango, 2015, p. 14).

Los estudiantes de Farmacia de la Universidad Internacional de las Américas presentan una incompetencia laboral a nivel industrial, ya que durante el desarrollo de los Laboratorios de Química que involucran el uso de Cromatógrafo líquido (HPLC), el acceso y uso del mismo es insuficiente para lograr un aprendizaje adecuado. Lo anterior se debe a varios factores: el modelo académico de la Universidad, la falta de innovación docente y la falta de instructivos de uso de los equipos; es por ello que el estudiante está poco capacitado en el uso del equipo y esto se convierte en una limitación para su desempeño profesional.

Debido a los tópicos antes expuestos, surge la siguiente pregunta:

¿Cómo capacitar a los estudiantes y al personal docente de Farmacia de la UIA sobre el uso adecuado del HPLC?

Objetivos

Objetivo General.

Establecer los lineamientos teóricos y metodológicos para la elaboración de un instructivo de uso del equipo de Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC, modelo: YL9100), y facilitar su implementación en los laboratorios de la carrera de Farmacia de la Universidad Internacional de las Américas.

Objetivos específicos.

-Identificar habilidades básicas para utilizar el equipo de Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC).

-Diseñar un instructivo de uso y limpieza de un equipo de Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC).

-Validar el desempeño de estudiantes, profesores y personal de laboratorio, después de recibir la capacitación en el uso del equipo de Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC).

-Incentivar al estudiante, mediante la aplicación del instructivo de uso y limpieza del HPLC, para mejorar su conocimiento sobre las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL).

Justificación

La presente investigación es de gran importancia para la Universidad, ya que actualmente no se dispone de un instructivo de uso del Cromatógrafo líquido, por lo cual el estudiante tiene información incompleta sobre: la técnica de análisis de medicamentos y la manipulación del equipo.

La enseñanza de las ciencias y en especial de la química requiere de variedad de actividades y estrategias que permitan que los estudiantes puedan tener un acercamiento efectivo al aprendizaje de esta área mediante la experimentación, como componente práctico de las ciencias; ya que solo se aprende ciencias haciendo ciencia. (Durango, 2015, pp. 17-18).

Una de estas estrategias son las prácticas de laboratorio o también conocidas como trabajo práctico, donde el aula de clase se convierte en un ambiente práctico generador de conocimiento, donde se ponen a prueba técnicas de experimentación y se desarrolla el quehacer científico permitiendo resolver situaciones problema de manera grupal o individual. (Durango, 2015, pp. 17-18).

Entonces, las prácticas de laboratorio empleadas como una estrategia didáctica permiten establecer una relación directa entre los conceptos teóricos y la práctica, además de lograr que el estudiante desarrolle habilidades y destrezas que contribuirán en su proceso de formación. (Durango, 2015, pp. 17-18).

El uso de los equipos de laboratorio, con una apropiada capacitación durante las prácticas de laboratorio, les permite a los estudiantes adquirir habilidades para mejorar su desempeño y competencia laboral. Además, faculta a los docentes de otros cursos para ampliar el espectro de prácticas o experiencias de aprendizaje de sus cursos de laboratorio, ajustándolos a la nueva realidad profesional y al nuevo perfil profesional del farmacéutico, no solo como experto en medicamentos sino también en el control de calidad de los mismos, lo cual asegura la eficacia, seguridad y confiabilidad.

La elaboración del instructivo de uso del HPLC pretende motivar a la Universidad para la elaboración de documentos sobre los equipos y procedimientos del Laboratorio de Química, los cuales forman parte de un Sistema de Gestión de Calidad que refleja las Buenas Prácticas de Laboratorio.

“Cuando todos los procedimientos y procesos del laboratorio se organizan en una estructura comprensible y práctica, aumentan las oportunidades de garantizar que todo se gestiona de forma adecuada.” (OMS, 2016, p. 13).

Además, la OMS postula que “Para poder lograr el más alto nivel de exactitud y fiabilidad, es esencial realizar todos los procesos y procedimientos del laboratorio de la mejor forma posible.” (OMS, 2016, p. 10).

El laboratorio es un sistema complejo, que implica muchos pasos de actividad y a muchas personas. La complejidad del sistema exige que se lleven a cabo de forma adecuada diversos procesos y

procedimientos. Por tanto, el modelo de sistema de gestión de la calidad, que examina todo el sistema, es muy importante para lograr un buen rendimiento en el laboratorio. Además, la gestión de los equipos es uno de los elementos esenciales del sistema de gestión de la calidad.” (OMS, 2016, p. 10).

La implementación de un modelo de sistema de gestión de calidad les permite a los estudiantes manejar con mayor facilidad la temática y adquirir, así, criterios científicos enfocados hacia la calidad.

Antecedentes

En el proceso de enseñanza y aprendizaje de las ciencias, la actividad experimental es uno de los aspectos clave, tanto por la fundamentación teórica que puede aportar a los estudiantes, como por el desarrollo de ciertas habilidades y destrezas, según lo detallan López y Tamayo (2015, p.146), citando a Lunetta (1998), cuando mencionan:

Las prácticas de laboratorio brindan a los estudiantes la posibilidad de entender cómo se construye el conocimiento dentro de una comunidad científica, cómo trabajan los científicos, cómo llegan a acuerdos y cómo reconocen desacuerdos, qué valores mueven la ciencia, cómo se relaciona la ciencia con la sociedad, con la cultura. En síntesis, las prácticas de laboratorio aportan a la construcción en el estudiante de cierta visión sobre la ciencia. (López y Tamayo, 2015, p. 146), citando a Lunetta (1998).

Es imprescindible que el futuro profesional relacione la ciencia, la cultura y la sociedad, para lograr un aporte científico completo, de manera que le permita desarrollar ciencia y, con ello, crear conocimiento.

La formación académica es un elemento que puede marcar la diferencia en el estudiante universitario y, debido a ello, se detectan varios aspectos que influyen sobre las competencias del profesional, las cuales se describen a continuación:

Necesidad de creación de capacidades en los estudiantes para el mercado laboral.

La competencia laboral es un aspecto de suma importancia que el estudiante debe enfrentar cuando finaliza sus estudios académicos.

La Comisión creada al efecto en el Ministerio de Salud Pública definió la competencia laboral como “La capacidad del trabajador para utilizar el conjunto de conocimientos, habilidades, destrezas, actitudes y valores, ‘desarrollados a través de los procesos educacionales y la experiencia laboral’, para la identificación y solución de los problemas que enfrenta en su desempeño en un área determinada de trabajo” (Salas, Quintana & Pérez, 2016, p. 458)

La formación basada en competencias profesionales se sustenta en diferentes actuaciones: en las actividades de la educación en el trabajo en las unidades y servicios de salud, mediante el estudio/trabajo en equipos multidisciplinarios, a través de la aplicación de la innovación y la creatividad en sus diferentes formas, empleo de la identificación y solución de problemas reales y didácticos con variantes de simulación, utilización de análisis, cuestionamientos críticos y de la reflexión y habilidad y motivación para adaptarse al cambio. (Salas, Quintana & Pérez, 2016, p. 460)

La formación recibida por los estudiantes para su futuro desempeño como profesionales, se basa en las competencias que logren acentuar inicialmente en la universidad.

La formación de un profesional está estrechamente vinculada con la formación y desarrollo de competencias, en correspondencia con los modos de actuación y las funciones a cumplir por él. Sus características están determinadas por la forma en que el sujeto organiza y utiliza los conocimientos adquiridos, los integra a la práctica y los interrelaciona con el contexto, en dependencia de las peculiaridades individuales y sociales. Tejeda (2010), citado por Albear (2016), p. 303.

Además, la formación de competencias, tanto teóricas como prácticas, es necesaria para alcanzar los resultados esperados en el ejercicio profesional.

Por otra parte, este proceso unifica la parte cognitiva y emocional en los grupos de estudiantes.

En el proceso de formación de competencias se debe tener en cuenta lo interdisciplinario, grupal, métodos y procedimientos que le permitan en la práctica integrar aspectos cognitivos y motivacionales, de modo que se vaya desarrollando y formando un profesional competente capaz de transformar su objeto de profesión. Abdala, (2006) citado por Albear (2016), p. 303.

Asimismo, es importante recalcar la importancia de este tipo de formación en las áreas laborales de los futuros farmacéuticos.

La formación de la competencia de elaboración de medicamentos se manifiesta en los escenarios laborales de farmacia donde el estudiante se desempeña, y es sometido a un proceso de verificación a través del empleo de diferentes instrumentos de evaluación, la cual tiene su máxima expresión precisamente en el modo de actuación del farmacéutico. (Albear, 2016, p. 303).

Las habilidades y competencias forman al farmacéutico para un desempeño profesional que integre y ponga en práctica los conocimientos obtenidos.

Enfoque poco constructivista para el aprendizaje y uso de equipos de laboratorio.

Como parte del aprendizaje y manejo de los equipos de laboratorio, los docentes, encargados de cursos que involucren técnicas de análisis, pueden utilizar enfoques que les ayuden al aporte de conocimiento científico, como el enfoque constructivista, que busca comprender dificultades de la formación del conocimiento en el ser humano.

Según Ortiz (2015) en su trabajo, aborda “la epistemología constructivista como base orientadora de la metodología de enseñanza-aprendizaje, entendiendo que el ser humano es activo constructor de su realidad.” (p.95).

El enfoque del constructivismo:

Lo que plantea en realidad es que existe una interacción entre el docente y los estudiantes, un intercambio dialéctico entre los conocimientos del docente y los del estudiante, de tal forma que se pueda llegar a una síntesis productiva para ambos y, en consecuencia, que los contenidos son revisados para lograr un aprendizaje significativo. (Ortiz, 2015, p.94).

Por tanto, el docente es el responsable de enfocar de forma constructivista el aprendizaje del alumno.

Desde el constructivismo, se puede pensar en dicho proceso como una interacción dialéctica entre los conocimientos del docente y los del estudiante, que entran en discusión, oposición y diálogo, para llevar a una síntesis productiva y significativa: el aprendizaje. Se puede observar que el aprendizaje implica la totalidad de habilidades y destrezas de un ser humano, en todos los ámbitos que lo caracterizan. (Ortiz, 2015, p.97).

Falta de Innovación docente en temas de laboratorio.

Para que las prácticas de laboratorio incrementen el interés del estudiante, el profesor (a) debe actualizar su conocimiento y aplicarlo de manera que aporte un valor adicional al conocimiento.

Por su parte, Fidalgo, A. (2016), en su revisión sobre: La innovación docente y los estudiantes, apoya que: “la innovación docente aplicar para reducir el esfuerzo que conlleva la aplicación de actividades, donde el alumnado participa de forma activa, junto con la adaptación de los recursos y el cambio en el proceso de evaluación.” (p.87)

La mayoría de los modelos formativos sigue tomando como base modelos de enseñanza tradicional en que lo importante es transmitir información. Los estudiantes acceden a los contenidos de sus profesores a través de la red sin que haya mayor mediación o valor «añadido» en el proceso de aprendizaje. Esta es precisamente una de las causas por las cuales muchas iniciativas alrededor de la formación en línea han fracasado. (Gros y Lara, 2009, p. 236).

De hecho, el planteamiento de la formación centrada en los materiales sin que haya una mediación importante y un acompañamiento durante el proceso conduce al fracaso. La presencia del docente en la red y la interacción social generada entre los estudiantes es un elemento clave para el aprendizaje. (Gros y Lara, 2009, p. 236).

Y según Gros y Lara (2009), en su artículo acerca de Estrategias de Innovación en la Educación Superior: el caso de la Universitat Oberta de Catalunya: “La innovación en las universidades no pasa solo por generar una comunicación abierta y fluida con el exterior, sino que, en nuestra opinión, se trata también de plantearla para la propia estructura académica y el sistema formativo.” (p. 227).

Importancia de desarrollar la técnica de Cromatografía Líquida para los estudiantes de Farmacia.

Actualmente, como parte de la fabricación de medicamentos, se efectúa el control de calidad a nivel industrial, lo cual requiere el empleo de diferentes técnicas de análisis, tanto cualitativo como cuantitativo, siendo el HPLC un equipo de uso fundamental en dicho proceso.

Cabe resaltar que la técnica de Cromatografía Líquida es utilizada como método de análisis químico, desde la validación y desarrollo de métodos para los medicamentos hasta determinaciones fitoquímicas y en plasma humano.

Un ejemplo de la aplicación de la técnica de Cromatografía Líquida se expone en el resumen de la revisión sobre “Desarrollo y validación de un método analítico para la determinación de Venlafaxina en suero mediante HPLC-UV”, realizada por Sarmiento (2012).

La Venlafaxina es un fármaco antidepresivo de la familia de los derivados sintéticos de las fenetilaminas bicíclicas cuya actividad consiste en inhibir la recaptación de serotonina, noradrenalina y en menor proporción dopamina en la neurona presináptica, potenciando la neurotransmisión a nivel del sistema nervioso central. Diversos métodos han sido reportados para el análisis de Venlafaxina en variados fluidos biológicos, siendo la cromatografía líquida de alta precisión HPLC uno de los más utilizados. (p. 99).

Por otra parte, Cardozo, Jiménez, Mosquera y Tovar (2017) en un artículo sobre: “Neuroprotective activity of *Solanum ovalifolium* (solanaceae) against the toxicity induced by rotenone in *Drosophila melanogaster*”, tienen como objetivo evidenciar la presencia de flavonoides en el extracto metanólico de *Solanum ovalifolium* por Cromatografía Líquida de alta eficiencia (HPLC-UV) y exponen la importancia al citar que:

El análisis de compuestos fenólicos por HPLC se ha convertido en uno de los procedimientos analíticos más relevantes, por la simplicidad en el tratamiento de la muestra, la posibilidad de remover impurezas, permite hacer cambios en la polaridad de la fase móvil durante la corrida, los tiempos de análisis son cortos y además su reproducibilidad es alta. (p. 30).

En el 2018, Luciani-Giacobbe, Guzmán, Manzo y Olivera, en un artículo de la revista *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, sobre la "Validation of a simple isocratic HPLC-UV method for Rifampicin (RIF) and Isoniazid (INH) quantification in human plasma", mencionan que:

Sólo unos pocos métodos isocráticos de HPLC han sido publicados y ninguno de ellos ha sido validado para la cuantificación de RIF y de INH en estudios farmacocinéticos. Estos métodos son baratos y accesibles para los países en desarrollo, en los que la tuberculosis es más frecuente. (p. 94).

En esta investigación se contemplan las diferentes funciones del Cromatógrafo líquido (HPLC) para su uso en las pruebas analíticas de los fármacos. Con el HPLC se puede cuantificar la cantidad de droga en el medicamento, identificar principios activos presentes en la formulación, así como otras pruebas de desempeño y de calidad.

Proyecciones

Esta investigación pretende basar sus resultados en la opinión de estudiantes de Farmacia que cursen Análisis de drogas, personal de laboratorio y un profesor, a quienes se les capacitará mediante un instructivo de uso del HPLC, para así determinar la importancia de una inducción previa a las prácticas de Laboratorio que realizan los estudiantes. Debido a la gran población de estudiantes de Farmacia y a la temática de los cursos de laboratorio, no se aplica dicha dinámica en otros grupos de Laboratorio. Sin embargo, se recomienda, a futuro, implementar este tipo de capacitación sobre equipos, en estudiantes que cursen Química Analítica.

CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

En el presente capítulo se resalta la importancia del farmacéutico en la sociedad, así como la formación académica, las habilidades y competencias de los futuros profesionales. Además, como eje central se detalla la técnica de Cromatografía Líquida, la cual permite la caracterización química y el análisis de fármacos, conocimiento de dominio necesario para los farmacéuticos en el área de Farmacia Industrial.

Formación académica de los profesionales del área de la Salud

Para la formación de profesionales del área de la Salud como los farmacéuticos, se requiere un adecuado enfoque global en las áreas de la Carrera de Farmacia, en la cual estos podrán desempeñarse.

Para ilustrar esto, Pinilla (2013) en una revisión sobre Evaluación de competencias profesionales en Salud, indica en su resumen de antecedentes que: “La formación de profesionales en salud está inmersa en los procesos enseñanza-aprendizaje-evaluación, que dependen del modelo pedagógico y el enfoque epistemológico del profesor.” (párr. 1).

Con lo anterior se puede inferir que son vitales, para el estudiante, tanto las directrices de enseñanza como el enfoque en el área de Salud, para la obtención del conocimiento.

Por su parte, Pinilla (2011) en su investigación sobre Modelos pedagógicos y formación de profesionales en el área de la Salud, establece que:

Para dar servicio al paciente y la comunidad, se requiere que la formación de profesionales en salud se fundamente con un enfoque pedagógico y epistemológico. Además, se debe guiar a la graduación de profesionales autónomos y críticos, que en su práctica demuestren profesionalismo y competencias transversales y específicas. (párr. 1-2).

Es decir, para lograr profesionalismo y competencias adecuadas, la formación recibida a nivel universitario debe enfocarse de forma que se relacione: el proceso de enseñanza con el aprendizaje que involucra la parte teórica y experimental de las ciencias de la Salud.

A propósito de esto, Macías (2006), en un artículo sobre Ciencia-Tecnología-Sociedad en la formación de profesionales de Salud, expone que: “La nueva visión de la educación superior requiere que se combinen las exigencias de universalidad del aprendizaje superior con el imperativo de mayor pertinencia para responder a las expectativas de la sociedad en la que funciona.” (párr. 2).

El nuevo papel del conocimiento está induciendo transformaciones profundas de la educación superior, que se convierte en un factor clave para poner en marcha los procesos necesarios para enfrentar los desafíos del mundo actual. Constituye un amplio reconocimiento por parte de instituciones como la UNESCO y otras instituciones y organizaciones académicas, científicas y profesionales, que mediante sus funciones de enseñanza, formación, investigación y servicios, representan un factor necesario para el desarrollo social. (Macías, 2006, párr. 1).

Para afrontar los retos de la sociedad hoy en día se deben considerar la enseñanza, el conocimiento y la investigación, sin dejar de lado el espíritu de servicio a la sociedad.

Docencia y técnicas de aprendizaje en educación superior.

Para consolidar, de manera sólida, la docencia universitaria, es necesario aplicar técnicas de aprendizaje que le permitan al estudiante formar competencias a través de su conocimiento.

La docencia universitaria aparece así ligada a un conjunto de competencias didácticas en cuya génesis juegan un importante papel el conocimiento teórico-práctico y la actividad reflexiva sobre la

práctica. Hoy en día la educación superior debe enfrentar retos particularmente difíciles como el de formar profesionales capaces de generar y conducir los cambios de la sociedad, además de incidir de manera cada vez más decidida, permanente y eficaz en sus ámbitos. (Barrón, 2009, p. 78).

El conocimiento teórico-práctico obtenido le permite al estudiante aportar su conocimiento a la sociedad.

La educación superior permite el aprendizaje de alumnos que poseen conocimientos y experiencias previas, motivaciones y expectativas diversas, respecto a su proyecto personal y profesional, lo cual se puede realizar mediante la didáctica.

El término didáctica se refiere al arte de enseñar o instruir, es la disciplina pedagógica de carácter práctico y normativo que tiene por objeto específico la técnica de la enseñanza, esto es, la técnica de incentivar y orientar eficazmente a los alumnos en su aprendizaje. (López y Pérez, 2018, p. 3).

Los resultados revelan que la didáctica universitaria se fundamenta en las nuevas posturas epistemológicas sobre el conocimiento y su construcción, así como en los paradigmas socio-cognitivos sobre el aprendizaje. La didáctica universitaria puede conceptuarse como una didáctica especial comprometida con lo significativo de los aprendizajes del futuro profesional, con su desarrollo personal y con el potencial de su inteligencia en función de las exigencias del contexto socio-político. (López y Pérez, 2018, p. 3).

Las estrategias de aprendizaje influyen de manera significativa en el futuro profesional del estudiante, ya que de diferentes maneras se utilizan los recursos que ofrecen los centros universitarios para optimizar la enseñanza.

“Las estrategias de aprendizaje son un conjunto de procesos u operaciones mentales que se ponen en marcha intencionalmente, programados y planificados, que se usan para controlar la actividad cognitiva.” (Navea, 2018, p. 194).

Por otra parte, el tipo de aprendizaje depende de las técnicas utilizadas.

Las estrategias de aprendizaje utilizadas por los estudiantes afectan las metas de un modelo educativo e inciden en el tipo de aprendizaje que se pretende lograr. En el análisis sobre estas estrategias que utilizan los alumnos, se encontró que la mitad de ellos se apoyan con tácticas como: el ensayo, la elaboración, las metacognitivas, la autorreguladora, la autoevaluación y el apoyo afectivo; los demás combinan estrategias que conllevan a la memorización con las del aprendizaje significativo; las que menos utilizan son las de organización. (León, Risco del Valle y Alarcón, 2014, p. 123).

De manera más específica, Navea (2018) expone en una investigación sobre El aprendizaje autorregulado en estudiantes de ciencias de la salud: recomendaciones de mejora de la práctica educativa, que:

“Los estudiantes autorregulados utilizan estrategias tanto cognitivas como metacognitivas (regulación y control de la propia cognición), además de gestionar y controlar sus propios recursos de aprendizaje en sus estudios universitarios.” (p. 194).

Asimismo, Navea (2018), en ese mismo artículo, clasifica las estrategias en: “estrategias cognitivas (repetición, elaboración, organización y pensamiento crítico), estrategias metacognitivas (autorregulación metacognitiva) y estrategias de control de recursos (tiempo y lugar de estudio, regulación del esfuerzo, aprendizaje con otros compañeros y búsqueda de ayuda).” (p. 194).

Enfoques educativos y nuevas tendencias.

Un enfoque utilizado como estrategia de enseñanza es el enfoque constructivista. Para Álvarez y otros, citado por (Páez, 2018), “las estrategias desde un enfoque constructivista involucran poner en marcha la frase ‘Aprender a Aprender’ la cual significa enseñar a los estudiantes a volverse aprendices autónomos, independientes y autorreguladores, capaces de mejorar su proceso de aprendizaje”. (p. 43)

En ese sentido, es necesario que el estudiante logre conformar de manera conjunta el aprendizaje utilizando diversas actividades.

Se entiende que estas estrategias serán las herramientas, procedimientos, pensamientos, conjunto de actividades y operaciones mentales utilizadas tanto por el docente como por el estudiante tomando en cuenta aquello que mejor conoce o domina para lograr la construcción conjunta del aprendizaje significativo.” (Páez, 2018, pp. 43-44).

Otro enfoque es el aprendizaje basado en problemas, para lo cual Frontado, Guaimaro, y Flores (2018) definen el Aprendizaje Basado en Problemas (ABP) como “uno de estos métodos que permite combinar la adquisición de conocimientos con el aprendizaje de competencias, al tiempo que aprenden a aprender guiados por un tutor y un plantel de profesores”, en el cual se van a aplicar conocimientos para buscar la solución a problemas y además, al identificar sus objetivos de aprendizaje, el estudiante puede gestionar su tiempo y guiar su proceso. (p. 101).

Como complemento a este concepto, Macías (2006) caracteriza la orientación del aprendizaje basado en problemas (ABP), el cual:

No puede restringirse a las estrategias de resolución ni organizarse sobre manifestaciones de fenómenos aislados, sino que es necesario profundizar en las explicaciones de dichos problemas. Esto requiere

una aproximación científica que obligaría a fortalecer la enseñanza de las ciencias básicas. (párr. 22).

Habilidades y competencias de los estudiantes universitarios.

En la realidad, el desempeño de los trabajadores se basa no solo en su formación académica sino también en competencias.

El concepto de competencia laboral implica una capacidad comprobada de realizar un trabajo en el contexto de una ocupación. Significa no sólo disponer de los conocimientos y habilidades, hasta ahora concebidos como suficientes en los procesos de aprendizaje para el trabajo, sino que al mismo tiempo define la importancia de la comprensión de lo que se hace y conforma así un conjunto de tres elementos totalmente articulados. (Carreño, P., Bonilla, S., Rubio, C., Cortés, M. y Ojeda, J., 2007, p. 4).

La preparación profesional, basada en las competencias, permite mejorar la calidad y la eficiencia en el desempeño profesional, ya que plantea una formación integral y reduce el riesgo de obsolescencia en sus conocimientos.

Las competencias proponen acciones mediante la utilización de habilidades y conocimientos. Dentro de las competencias, se pueden clasificar como: “Competencias instrumentales (capacidad de análisis, resolución de problemas y toma de decisiones), competencias interpersonales (trabajo en equipo y compromiso ético), competencias sistémicas (aplicar el conocimiento en la práctica, investigación, creatividad y liderazgo)”. (Mendoza, X. y Bernabeu, M., 2006, párr. 5-7).

Por otra parte, estas competencias se pueden clasificar como genéricas o transversales, las cuales “se refieren a los conocimientos, habilidades y actitudes generales, comunes a diferentes profesiones; por ejemplo: de comunicación (relaciones interpersonales y trabajar en equipo); el

profesionalismo (responsabilidad, adaptabilidad, creatividad; competencias tecnológicas; en investigación, entre otras”. (Pinilla, 2011, p. 211).

Entonces, este tipo de competencias profesionales son usuales y fundamentales en los profesionales de ciencias de la salud.

Importancia de la formación química en el farmacéutico

Cabe resaltar que el farmacéutico es un profesional que combina dos áreas para la ejecución de su conocimiento: la química y la clínica, ambas al servicio de la salud de la población.

Se encontró que el Químico Farmacéutico es indispensable en el proceso de rehabilitación de pacientes drogodependientes porque su formación se basa en principios activos, entre los cuales se encuentran las sustancias psicoactivas. Las acciones realizadas por el profesional permitieron que los pacientes comprendieran los daños fisiológicos del consumo patológico de drogas. (Cataño, Mejía, Restrepo, Higuera y López, 2018, p. 257).

Es importante conocer el papel de la química como eje de la carrera de Farmacia. Es así que Vásquez y Olarte (2017), mediante su tesis sobre: “Diseño de una propuesta curricular para la formación básica en química en el contexto de la regencia en Farmacia”, evidencian que:

El conjunto de los programas de tecnología en regencia de farmacia que se analizaron en este trabajo, existe una apuesta unánime por una formación científica basadas en las clásicas disciplinas de química y biología, un poco menos de física, y la matemática necesaria para los cálculos de la formulación magistral. (p. 73), enfocando especial atención a la enseñanza-aprendizaje de la química.

Características de los profesionales de Farmacia.

Según la experiencia de la autora en la industria farmacéutica y con autorización de la empresa donde labora actualmente, se detalla el siguiente perfil del farmacéutico como jefe de control de calidad: como perfil del cargo (véase la tabla 1) y como propósito general del puesto, coordinar y supervisar la ejecución de los análisis de insumos, productos semielaborados, estabilidades y validaciones según las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL), asegurando el cumplimiento en todos los procesos que se realizan en el área de control de calidad.

Tabla 1. Perfil del cargo de un Farmacéutico como jefe de control de calidad

Perfil del cargo	
Educación	Farmacéutico.
Experiencia	5 años en cargos similares.
Idiomas	Inglés técnico.
Conocimientos específicos	Manejo de SAP y herramientas de Office.
Habilidades	Cromatografía Líquida (HPLC), Espectrofotometría, Microbiología, Buenas prácticas de Laboratorio (BPL), Buenas prácticas de Manufactura (BPM) e Higiene y Seguridad Industrial.

Nota: Fuente de la autora.

Los profesionales de Farmacia tienen varias funciones, según lo destacan Badilla et al. (2018):

La Federación Internacional Farmacéutica (FIP) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), manifestaron que existen cuatro funciones esenciales de las personas profesionales en farmacia en las que la sociedad y la ciudadanía para la que trabajan, esperan su participación o supervisión:

Función 1: Preparar, obtener, almacenar, asegurar, distribuir, administrar, dispensar y eliminar medicamentos.

Función 2: Ofrecer una gestión eficaz de los tratamientos farmacológicos.

Función 3: Mantener y mejorar el ejercicio profesional.

Función 4: Ayudar a mejorar la eficiencia del sistema de salud y la salud pública. (p. 2).

Dentro de la función 1, se puede contemplar el área de aseguramiento de la calidad y control de calidad de los medicamentos, en la cual se utiliza un sistema de gestión de calidad, que incluye, a su vez, un adecuado manejo de equipo de laboratorio, cuyo objetivo es garantizar la fiabilidad de los resultados analíticos, tópicos que se desarrollan a continuación.

Sistema de gestión de calidad

Es fundamental que se garantice la calidad en el contexto de desarrollo de medicamentos y de salud pública.

La calidad de un laboratorio se puede definir como la exactitud, fiabilidad y puntualidad de los resultados analíticos notificados. Los resultados analíticos deben ser lo más exactos posible, todos los aspectos de las operaciones analíticas deben ser fiables y la notificación de los resultados debe ser puntual para ser útil en el contexto clínico o de la salud pública. (OMS, 2016, p. 10).

Es por ello que los resultados analíticos, producidos por los laboratorios relacionados con la salud, dependen de la exactitud de los análisis y de su notificación. “Si los resultados son inexactos, las consecuencias pueden ser muy significativas, entre ellas: tratamientos innecesarios; complicaciones del tratamiento; falta de proporcionar el tratamiento adecuado; retrasos en el diagnóstico correcto y pruebas diagnósticas adicionales e innecesarias.” (OMS, 2016, p. 10).

La ISO 9000 define la gestión de la calidad como “las actividades coordinadas para dirigir y controlar una organización con respecto a la calidad”. Esta definición está íntimamente relacionada con la definición del sistema de calidad: “estructura, recursos, procesos y

procedimientos organizativos necesarios para implementar la gestión de la calidad”. (OMS, 2016, p. 16).

Los documentos ISO 9000 ofrecen pautas para la calidad en las industrias de fabricación y servicios y pueden aplicarse de manera generalizada a otros muchos tipos de organizaciones. La norma ISO 9001:2000 aborda los requisitos generales del sistema de gestión de la calidad y se aplica a los laboratorios. Además de manera específica existe la norma: ISO/IEC 17025:2005. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. Ginebra: Organización Internacional de Normalización, 2005. (OMS, 2016, p. 17).

El laboratorio contempla muchas actividades y personas, lo cual se convierte en un sistema complejo que requiere un adecuado rendimiento. Esto se puede obtener mediante un modelo de sistema de gestión de la calidad. “El modelo de la calidad que se utiliza aquí organiza todas las actividades del laboratorio en 12 elementos clave del sistema de la calidad.” (OMS, 2016, p. 13).

Este modelo se representa en la figura 1.

Figura 1. Modelo de sistema de gestión de la calidad



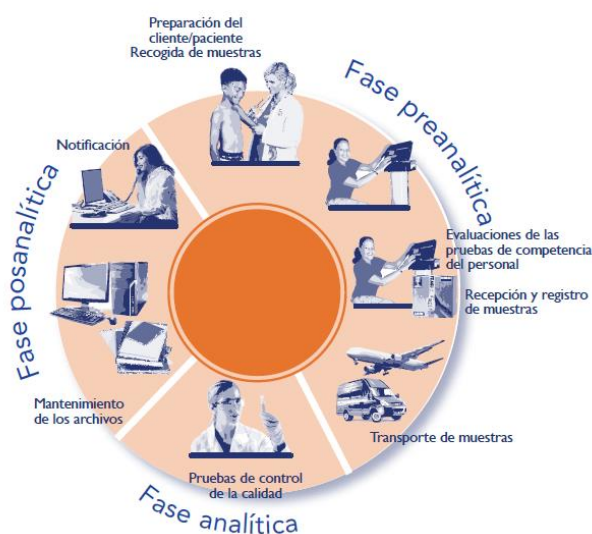
Nota: OMS, 2016, p. 13.

Además, la OMS (2016), indica que: “la implementación de un Sistema de Gestión de la Calidad quizás no garantice un laboratorio sin errores, pero ofrece la posibilidad de tener un laboratorio de alta calidad que detecte los errores y evite que vuelvan a producirse”, ya que en los laboratorios donde no se implemente un Sistema de Gestión de Calidad, los errores y problemas que ocurran pueden pasar inadvertidos. (p. 15).

Un sistema de gestión de la calidad se puede definir como “las actividades coordinadas para dirigir y controlar una organización con respecto a la calidad”. Esta definición la utilizan tanto la Organización Internacional de Normalización (ISO) como el Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (CLSI). En un sistema de gestión de la calidad es necesario abarcar todos los aspectos del funcionamiento del laboratorio, incluidos la estructura organizativa y los procesos y procedimientos, para garantizar la calidad. (OMS, 2016, p. 11).

Las normas ISO agrupan los procesos del laboratorio en las categorías de fase pre-analítica, fase analítica y fase post-analítica, como se muestra en la figura a continuación.

Figura 2. Fases del Proceso de laboratorio



Nota: OMS, 2016, p. 11.

“Los términos similares en uso en los laboratorios incluyen: procesos anteriores al análisis, durante el análisis y posteriores al análisis o procesos previos a la prueba, durante la prueba y posteriores a la prueba.” (OMS, 2016, p. 12).

“Cuando todos los procedimientos y procesos del laboratorio se organizan en una estructura comprensible y práctica, aumentan las oportunidades de garantizar que todo se gestiona de forma adecuada.” (OMS, 2016, p.13).

La complejidad del sistema del laboratorio requiere abarcar diversos factores para garantizar la calidad en el laboratorio. Algunos de estos factores son: el entorno del laboratorio; los procedimientos de control de la calidad; las comunicaciones; el mantenimiento de los archivos; personal competente y experto; los reactivos y equipos de buena calidad. (OMS, 2016, p. 12).

Lineamientos de la Organización Mundial de la Salud sobre los equipos de laboratorio.

La OMS establece que los equipos deben funcionar correctamente, contemplando cada pieza de las muchas clases de equipos utilizados. Además:

La elección de los equipos correctos, su correcta instalación, la garantía de que los equipos nuevos funcionan adecuadamente y el hecho de contar con un sistema de mantenimiento forman parte del programa de gestión de los equipos dentro de un sistema de gestión de la calidad. (OMS, 2016, p. 13).

Según la OMS (2016), al diseñar el espacio del laboratorio:

El director del laboratorio y el encargado de seguridad deben considerar las necesidades especiales de los equipos. Algunas cosas que deben tenerse en cuenta son:

- El acceso a los equipos para su entrada y mantenimiento: asegúrese de que no existen restricciones físicas para el acceso, como el tamaño de la puerta o del ascensor, que puedan suponer un problema para la entrega y el mantenimiento de las nuevas máquinas y equipos. (p. 23).
- El suministro eléctrico: considere la necesidad de contar con un suministro eléctrico estable para los equipos delicados y un suministro eléctrico de reserva o un generador de emergencia para las ocasiones en las que haya problemas con la fuente eléctrica principal del laboratorio. (p. 23).
- La gestión del desecho de líquidos procedentes de los equipos: el desecho de los reactivos líquidos, sus derivados y los residuos procedentes de los equipos y procedimientos del laboratorio es una preocupación prioritaria para los laboratorios. Cuando se coloquen equipos en el laboratorio, asegúrese de tener en cuenta el tratamiento de los residuos líquidos. Es importante conocer y cumplir las disposiciones locales y nacionales en materia de desecho de residuos líquidos con el fin de evitar la contaminación de los sistemas de aguas residuales de la comunidad con patógenos o productos químicos tóxicos. (p. 23).

También, se recomienda organizar los bancos de trabajo según el tipo de análisis que se realice, con un espacio adecuado para los equipos de sobremesa y espacio suficiente para colocar un procedimiento operativo estándar mientras se esté utilizando y poder mostrar las guías de tareas. (OMS, 2016, p. 24).

Generalidades sobre Buenas Prácticas de Laboratorio.

Las Buenas Prácticas de Laboratorio son establecidas por la OMS para la regulación y vigilancia sanitaria de los Laboratorios de Control Farmacéutico.

En la conferencia de la Organización Panamericana de la Salud (OPS), mediante la Red Panamericana de Armonización de la Reglamentación Farmacéutica (PARF), realizada en noviembre de 2008, en Buenos Aires-Argentina, la OMS elaboró el Informe 36-Anexo 3 sobre las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL), que contiene básicamente los siguientes apartados:

Parte uno: Gestión e infraestructura, que comprende (p. vii):

- Organización y gestión.
- Sistema de calidad.
- Control de documentación.
- Registros.
- Equipos con procesadores de datos.
- Personal.
- Instalaciones.
- Bodega central.
- Equipos, instrumentos y otros dispositivos.

Parte dos: Materiales y acondicionamiento de equipos, instrumentos y otros dispositivos, que comprende (p. vii):

- Archivo de especificaciones.
- Reactivos.
- Materiales de referencia.
- Calibración, validación y verificación de equipos, instrumentos y otros dispositivos.
- Trazabilidad.

Parte tres: Procedimientos de trabajo (p. vii):

- Ingreso de muestras.
- Hoja de trabajo analítico.
- Análisis.
- Evaluación de los resultados de ensayos.
- Muestras retenidas.

Parte cuatro: Seguridad (p. viii):

Para el alcance de este trabajo se profundizan los apartados: Equipos, instrumentos y otros dispositivos, y Calibración, validación y verificación de equipos, instrumentos y otros dispositivos.

El informe establece, para Equipos, instrumentos y otros dispositivos, que se debe cumplir con los siguientes enunciados:

8.1- Los equipos, instrumentos y otros dispositivos deben estar diseñados, contruidos, adaptados, ubicados, calibrados, calificados, verificados y mantenidos de acuerdo a lo requerido por las operaciones realizadas en el medio ambiente local. El usuario debería comprar los equipos a un representante capaz de proporcionar soporte técnico completo y mantenimiento cuando sea necesario. La documentación debería estar escrita en el idioma empleado en el laboratorio. (Organización Panamericana de la Salud [OPS], 2010, p. 9).

8.2- Para asegurar muestreos y mediciones apropiadas, el laboratorio debe tener los equipos de ensayo requeridos, instrumentos y otros dispositivos para la ejecución correcta de los ensayos y/o calibraciones, validaciones y verificaciones (incluyendo la preparación de los ítems de ensayo y/o calibración y el proceso y análisis de los datos de ensayo y/o calibración). (OPS, 2010, p. 9).

“8.3- Los equipos, instrumentos y otros dispositivos, incluyendo aquellos usados en el muestreo, deben cumplir con los requerimientos del laboratorio y las especificaciones estándares pertinentes, como también estar verificados y/o calibrados.” (OPS, 2010, p. 9).

El informe establece, para la calibración, validación y verificación de equipos, instrumentos y otros dispositivos, que se debe verificar el cumplimiento de los siguientes puntos:

“12.1.- Todos los equipos, instrumentos y otros dispositivos usados para medir las propiedades físicas de las sustancias deben ser regularmente calibrados, validados y verificados.” (OPS, 2010, p. 14).

12.2.- Se deben establecer procedimientos específicos para cada tipo de equipo, instrumento u otro dispositivo, considerando la extensión de uso de cada uno, para ser verificados y calibrados a intervalos regulares de acuerdo al procedimiento estándar operativo. Por ejemplo:

(a) los pHmetros son verificados con soluciones tampón estándares certificados al menos una vez al día.

(b) los espectrofotómetros infrarrojos requieren de verificación al menos una vez al día y de calibración a intervalos regulares. (OPS, 2010, p. 14).

12.3.- Solamente el personal autorizado debería operar los equipos, instrumentos y otros dispositivos. Las instrucciones actualizadas sobre el uso, mantenimiento, verificación y calibración de los equipos, instrumentos y dispositivos (incluyendo cualquier manual pertinente del fabricante) deben estar rápidamente disponibles para el uso por el personal apropiado del laboratorio (ej. una copia de estas instrucciones debería estar puesta al lado de cada aparato, junto con un plan de las fechas de verificación y/o calibración). Los resultados

de las verificaciones deben ser registrados en una carta de control, formando la base para determinar el tiempo al cual se hará la calibración. (OPS, 2010, p. 14).

“12.4.- Cada parte del equipo, instrumento o dispositivo usado para ensayo, verificación y calibración debe, cuando sea factible, tener identificación única.” (OPS, 2010, p. 14).

12.5.- Se deben mantener los registros de cada parte del equipo, instrumento u otro dispositivo usado para efectuar los ensayos, verificaciones y/o calibraciones. Los registros deben incluir al menos lo siguiente:

- (a) la identidad del equipo, instrumento u otro dispositivo;
- (b) el nombre del fabricante, la identificación del tipo, número de serie u otra identificación única;
- (c) la verificación y/o calibración requerida para cumplir con las especificaciones;
- (d) la ubicación actual, cuando corresponda;
- (e) las instrucciones del fabricante si están disponibles, o una referencia de su ubicación;
- (f) las fechas, resultados y copias de informes, verificaciones y certificados de todas las calibraciones, ajustes, criterios de aceptación y la fecha exacta de la próxima verificación y/o calibración;
- (g) el mantenimiento efectuado a la fecha y el plan de mantenimiento;
- (h) la historia de cualquier daño, mal funcionamiento, modificación o reparación. (OPS, 2010, p. 14).

También se recomienda conservar los registros y observaciones adicionales hechas al momento de haber usado los equipos, instrumentos o dispositivos. (OPS, 2010, pp.14-15).

“12.6.- Para prevenir la contaminación o deterioro, el laboratorio debe efectuar verificaciones sistemáticas, especificar procedimientos y tener un plan establecido para el

manejo seguro, transporte, almacenamiento, uso y mantenimiento de equipos de medición, de manera de asegurar su funcionamiento correcto.” (OPS, 2010, p. 15).

“12.7.- Se deben establecer procedimientos de mantenimiento (se debe realizar un servicio regular por un equipo de especialistas en mantenimiento interno o externo, cuando sea posible).” (OPS, 2010, p. 15).

12.8.- Equipos, instrumentos o dispositivos que hayan sido sometidos a sobrecarga o mala manipulación, que entreguen resultados sospechosos o que hayan demostrado estar defectuosos o fuera de los límites especificados, deben ser puestos fuera de servicio y claramente rotulados o marcados. Siempre que sea posible, ellos no deben ser usados hasta que hayan sido reparados y demostrados mediante calibración o ensayo, que funcionan correctamente. (OPS, 2010, p. 15).

“12.9.- Todos los equipos, instrumentos y otros dispositivos bajo el control del laboratorio y que requieran calibración, deben ser rotulados, codificados o identificados de alguna manera, que permita indicar su condición de calibración y la fecha de recalibración.” (OPS, 2010, p. 15).

12.10.- Cuando los equipos, instrumentos u otros dispositivos están fuera del control directo del laboratorio por un cierto periodo de tiempo, el laboratorio debe asegurar que se verifique el funcionamiento y estado de calibración y se demuestre que son satisfactorios antes de que ellos sean devueltos al servicio. (OPS, 2010, p. 15).

12.11.- Dependiendo de los tipos de equipos analíticos, instrumentos y otros dispositivos empleados, su fragilidad, la extensión de uso, y la destreza requerida para operarlos, ellos pueden ser:

- (a) agrupados juntos;
- (b) dispersos entre las diferentes unidades;
- (c) protegidos de estados extremos de humedad o temperatura en un área especialmente designada;
- (d) adecuadamente protegidos para resistir la corrosión;
- (e) protegidos contra el crecimiento de mohos y hongos. (OPS, 2010, p. 15).

12.12. Guías adicionales

- (a) en la Farmacopea Internacional (The International Pharmacopeia, Tercera edición, Vol. 1 General Methods of análisis. Ginebra, Organización Mundial de la Salud, 1979), se señalan procedimientos para la verificación y calibración de refractómetros, termómetros usados en las determinaciones de temperaturas de fusión, y potenciómetros usados para la determinación de pH, junto con métodos para verificar la confiabilidad de las escalas de espectrofotómetros ultravioleta e infrarrojo y espectrofluorómetros.
- (b) guías para la validación de procedimientos analíticos usados en el examen de los atributos químicos y fisicoquímicos de materiales farmacéuticos son proporcionadas en el Anexo 5 del informe 32 del “Comité de expertos en especificaciones para preparados farmacéuticos”, de la OMS (Validación de procedimientos analíticos usados en el examen de materiales farmacéuticos. En: WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations. Thirty-second report. Ginebra, Organización Mundial de la Salud, 1992, Anexo 5 (Serie de informes técnicos OMS, N° 823)). También se dispone de otras guías (The International Pharmacopeia and related activities. En: Quality assurance of pharmaceuticals. A compendium of guidelines and related materials. Vol.1. Ginebra, Organización Mundial de la Salud, 1997: 116-149). (OPS, 2010, p. 15).

Seguridad en el laboratorio.

Por parte de la OMS se recomienda lo siguiente, para los equipos de seguridad en general:

El encargado de seguridad debe tener asignada la responsabilidad de garantizar la existencia de suministros de equipos adecuados para la seguridad y la bioseguridad como: equipos de protección personal; extintores y mantas ignífugas; almacenes y cabinas adecuados para productos químicos inflamables y tóxicos; lavaojos y ducha de emergencia; suministros y equipos de desecho de residuos y equipos de primeros auxilios.” (OMS, 2016, p. 15).

Asimismo, la OMS (2016) promueve que se ejecuten prácticas de seguridad estándar en el laboratorio, que corresponden a:

- Limitar o restringir el acceso al laboratorio; lavarse las manos después de manipular materiales y animales infecciosos o peligrosos, después de quitarse los guantes y antes de abandonar el laboratorio.
- Prohibir comer, beber, fumar, manipular lentes de contacto y aplicarse cosméticos en las zonas de trabajo.
- Prohibir pipetear con la boca; usar técnicas que minimicen los aerosoles y la producción de salpicaduras cuando se realicen los procedimientos: deben utilizarse cabinas de bioseguridad siempre que exista la posibilidad de creación de aerosoles o salpicaduras o cuando se utilicen altas concentraciones o grandes volúmenes de agentes infecciosos.
- Evitar la exposición a la inhalación utilizando campanas de extracción de emanaciones de productos químicos u otros dispositivos de contención para los vapores, aerosoles, humos, emanaciones o polvos.

- Almacenar los productos químicos correctamente según las compatibilidades reconocidas: los productos químicos que supongan peligros o riesgos especiales se deben limitar a las cantidades mínimas necesarias para cubrir las necesidades a corto plazo y almacenarse bajo condiciones de seguridad apropiadas (es decir, los productos inflamables en cabinas de almacenamiento para productos inflamables).
- Los productos químicos no deben guardarse sobre el suelo o en campanas de extracción de emanaciones de productos químicos.
- Asegurar las bombonas de gas comprimido en todo momento.
- Descontaminar las superficies de trabajo diariamente.
- Descontaminar mediante autoclave, desinfección química, incinerador u otro método aprobado todos los cultivos, existencias y otros residuos regulados antes de su desecho.
- Implementar y mantener un programa de control de insectos y roedores.
- Usar equipos de protección personal como guantes, mascarillas, gafas protectoras, protectores faciales y batas de laboratorio cuando se trabaje en el laboratorio.
- Prohibir el uso de sandalias o zapatos con los dedos descubiertos mientras se trabaja en el laboratorio.
- Desechar los residuos químicos, biológicos y otros según las políticas del laboratorio. (OMS, 2016, pp. 25-26).

En cuanto a la gestión de residuos del laboratorio, la OMS establece que es un tema fundamental, y hace las siguientes sugerencias:

- Todos los materiales potencialmente perjudiciales y peligrosos (incluidos los líquidos y los materiales radiactivos) deben tratarse de una forma específica antes de su desecho.

- Deben emplearse recipientes separados en función de la naturaleza del residuo y estos deben ser claramente identificables mediante un código de color.
- Debe prestarse especial atención a la gestión de los residuos contaminados potencialmente perjudiciales como objetos corto-punzantes, agujas o instrumentos de cristal rotos.
- Los recipientes para objetos corto-punzantes deben estar dispuestos sobre los bancos de trabajo para que sean cómodamente accesibles al personal. (OMS, 2016, p. 26).

Ahora bien, la exposición a productos químicos tóxicos es un factor crítico para la salud y la seguridad de los estudiantes y del personal del laboratorio. Entonces, se deben seguir los siguientes lineamientos, según la OMS:

- Para evitar o reducir los incidentes que se producen por exposición a los productos químicos tóxicos, se deben etiquetar todos los productos químicos con sus nombres comunes, concentraciones y peligros, entre ellos las disoluciones y los productos químicos que se transfieren desde sus envases originales.
- También se debe apuntar otra información, como la fecha de recepción, la fecha de apertura y la fecha de caducidad.
- Es fundamental que los productos químicos se almacenen correctamente.
- Almacene los productos químicos corrosivos, tóxicos y altamente reactivos en una zona bien ventilada y los productos químicos que puedan inflamarse, a temperatura ambiente en una cabina para productos inflamables.
- Manejar ficha técnica de seguridad de las sustancias, las cuales deben ponerse a disposición de todos los empleados antes de utilizar materiales peligrosos y mantenerse cerca del lugar en el

que se utilizan y localizan los materiales peligrosos. La ficha de seguridad es un folleto técnico que proporciona información detallada en cuanto a peligros y precauciones. (OMS, 2016, p. 28).

De manera que todas las indicaciones y detalles en torno a la seguridad del laboratorio se pueden recopilar mediante un Manual de Seguridad. Inicialmente, es importante nombrar a un supervisor responsable. “El laboratorio debe contar con un manual de seguridad que defina la política y describa los procedimientos estándar para tratar los problemas de seguridad y emergencias”. (OMS, 2016, p. 34). Al final de la implementación del manual, “es necesario formar al personal sobre cómo aplicar las prácticas y técnicas de seguridad y que conozcan los posibles peligros”. (OMS, 2016, p. 34).

En el Laboratorio de la Universidad Internacional de las Américas se cuenta con directrices al respecto, las cuales se muestran en el Apéndice A. Reglamento para el uso del Laboratorio de Química de la U.I.A.

Manejo de equipos de Laboratorio.

Generalidades.

La gestión de los equipos es uno de los elementos fundamentales del sistema de gestión de la calidad, ya que con ello se garantiza la exactitud, la fiabilidad y la puntualidad de los análisis.

Según la (OMS, 2016), los beneficios de un buen programa de gestión de los equipos son muchos, entre ellos:

- Ayuda a mantener un alto nivel de rendimiento del laboratorio,
- Reduce las variaciones en los resultados de los análisis y mejora la confianza del técnico en cuanto a la exactitud de los resultados de los análisis,

- Reduce los costes en reparaciones, puesto que con un buen mantenimiento de los instrumentos se necesitarán menos reparaciones,
- Prolonga la vida de los instrumentos; reduce la interrupción del servicio debido a averías y fallos,
- Incrementa la seguridad de los trabajadores y
- Produce una mayor satisfacción del cliente. (OMS, 2016, p. 36).

Al mismo tiempo, es útil supervisar la gestión de los equipos mediante el uso de un programa.

La supervisión del programa de gestión de los equipos incluye: asignar responsabilidades para todas las actividades; asegurarse de que todo el personal tiene la formación adecuada en materia de manejo y mantenimiento y controlar las actividades de gestión de los equipos, que incluye:

- revisar todos los registros de los equipos de forma habitual,
- actualizar los procedimientos de mantenimiento, según sea necesario y
- asegurarse de que se siguen todos los procedimientos. (OMS, 2016, p. 37).

Uso de los equipos de laboratorio.

Para la selección de los equipos, “el encargado del laboratorio debe proporcionar la información que facilite la selección de los equipos que mejor sirvan a las necesidades del laboratorio”. (OMS, 2016, p. 38).

Con respecto a la instalación de los equipos, se verifica que se cumplen todos los requisitos físicos (electricidad, espacio, puertas, ventilación y suministro de agua). (OMS, 2016, p. 39).

Otros aspectos que deben tenerse en cuenta son: las responsabilidades del proveedor en relación con la instalación (deben confirmarse por escrito antes de iniciar el proceso de instalación) y se comprueba el rendimiento esperado cuando se instalen los equipos. Y siempre que sea posible, es mejor que el fabricante instale los equipos del laboratorio; esto probablemente mejorará las condiciones de la garantía y también podría garantizar que la instalación se realice de forma rápida y adecuada. (OMS, 2016, p. 39).

Una vez instalados los equipos, es necesario: asignar la responsabilidad de efectuar los programas de mantenimiento y funcionamiento, elaborar un sistema para registrar el uso de las piezas y los suministros, implementar un plan por escrito para la calibración, la verificación del rendimiento y el funcionamiento adecuado de los equipos, crear un programa de mantenimiento programado que incluya tareas de mantenimiento diarias, semanales y mensuales y facilitar la formación a todos los operadores; solo debe autorizarse como operador al personal que haya recibido la formación específica para utilizar adecuadamente los equipos. (OMS, 2016, p. 40).

En la siguiente figura se ejemplifica el proceso para la habilitación y uso de equipos de laboratorio.

Figura 3. Habilidad y uso de equipos de Laboratorio



Nota: OMS, 2016, p. 40.

En cuanto a la calibración de los equipos, la OMS indica que se deben seguir las instrucciones del fabricante detenidamente cuando se realice la calibración inicial del instrumento y, además, determinar con qué frecuencia será necesario volver a calibrar el instrumento, según su estabilidad y las recomendaciones del fabricante. (OMS, 2016, pp. 40-41).

Para que los laboratorios verifiquen el rendimiento del fabricante se pueden: “analizar las muestras con valores conocidos y comparar los resultados con el valor esperado o certificado, y si los equipos han de tener la temperatura controlada, establecer la estabilidad y la uniformidad de la temperatura.” (OMS, 2016, p. 41).

De manera semejante, se pueden implementar procesos de validación, los cuales “pueden llevarse a cabo analizando las muestras en paralelo usando tanto los equipos y métodos viejos como los nuevos durante cierto periodo de tiempo para determinar que pueden obtenerse los resultados esperados. Estos procedimientos de validación deben registrarse por completo.” (OMS, 2016, p. 41).

Para verificar que los equipos están funcionando según las especificaciones del fabricante, es necesario supervisar los parámetros del instrumento realizando comprobaciones del funcionamiento periódicas. (OMS, 2016, p. 41).

A los equipos de laboratorio se les aplica mantenimiento, principalmente preventivo, que “incluye medidas como la limpieza sistemática y rutinaria y el ajuste y la sustitución de piezas de los equipos a intervalos programados”. (OMS, 2016, p. 42). Esto se puede ejecutar mediante un “plan de mantenimiento, que incluirá procedimientos de mantenimiento preventivo, así como disposiciones relativas al inventario, la resolución de problemas y la reparación de equipos.” (OMS, 2016, p. 42).

Cuando se implemente un programa de mantenimiento de los equipos, algunos de los pasos iniciales serán:

Asignar la responsabilidad de la supervisión; elaborar políticas y procedimientos por escrito para mantener los equipos (incluyendo planes de mantenimiento rutinarios de cada parte de los equipos) que especifiquen la frecuencia con la que deben realizarse todas las tareas de mantenimiento; elaborar el formato de los registros, crear diarios y formularios y establecer los procesos de mantenimiento de los registros; formar al personal acerca del uso y el mantenimiento de los equipos y garantizar que todo el personal entiende sus responsabilidades específicas. (OMS, 2016, p. 42).

El laboratorio debe mantener inventario de todos los equipos del laboratorio, que se encuentre actualizado y que incluya tanto la información sobre los nuevos equipos, como la documentación referente a la retirada de los equipos viejos. (OMS, 2016, p. 42). Se puede considerar:

El tipo de instrumento, marca y número del modelo y número de serie para poder comentar los posibles problemas con el fabricante; fecha en la que se adquirieron los equipos y si se compraron nuevos, usados o reacondicionados; información de contacto del fabricante/proveedor; presencia o ausencia de documentación, piezas de repuesto y contrato de mantenimiento; fecha de vencimiento de la garantía; número específico del inventario que indique el año de adquisición (esto es especialmente útil para los laboratorios más grandes); por ejemplo, utilice el estilo “AA-número” (04-001, 04-002, etc.), donde “AA-número” es igual a los dos últimos números del año seguidos de un número atribuido durante ese año. (OMS, 2016, p. 42).

Los documentos y los registros de los equipos son una parte fundamental del sistema de la calidad. El registro debe estar disponible para su revisión durante toda la vida útil de los equipos.

Un documento de mantenimiento de equipos debe contener:

- Instrucciones paso a paso para el mantenimiento rutinario, que incluyan la frecuencia con la que se debe realizar y cómo mantener los registros de mantenimiento;
- Instrucciones para realizar las comprobaciones del funcionamiento, la frecuencia con la que se deben realizar y cómo registrar los resultados;
- Instrucciones para calibrar el instrumento;
- Guía para la resolución de problemas;
- Cualquier mantenimiento o reparación que exija el fabricante;
- Lista de los elementos específicos necesarios para el uso y mantenimiento, como piezas de repuesto. (OMS, 2016, p. 46).

De manera general, la OMS indica que: “todos los laboratorios deben contar con un programa de gestión de los equipos bien organizado. El programa debe abordar la selección de equipos, el mantenimiento preventivo, los procedimientos para la resolución de problemas y la reparación de los equipos.” (OMS, 2016, p. 48).

Es esencial mantener unos documentos y registros de calidad. Estos incluirán un inventario completo y exacto de todos los equipos del laboratorio, la documentación que facilita el fabricante con relación al funcionamiento, el mantenimiento y la resolución de problemas y los registros de todas las actividades de mantenimiento preventivo y reparación. (OMS, 2016, p. 48).

Áreas de la industria farmacéutica que utiliza el HPLC

Según Misiuk (2010), en una revisión sobre: El papel de los métodos de ensayo en la caracterización de la calidad de los productos farmacéuticos a granel, considera que: “Desde el punto de vista de la salud pública, la seguridad, la eficacia y la economía de la terapia con

medicamentos son cuestiones extremadamente importantes.” (p. 88). También son importantes las impurezas y la estabilidad de los medicamentos.

En el campo del análisis de medicamentos, la investigación analítica de materiales de medicamentos a granel, los intermedios en su síntesis, los productos de investigación de medicamentos, las formulaciones de medicamentos, los productos de impurezas y degradación, y las muestras biológicas que contienen los medicamentos y sus metabolitos es un área muy importante de investigación. (Misiuk, 2010, p. 88).

La cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) es el desarrollo más notable y la técnica se ha vuelto muy importante en el control de calidad de medicamentos a granel y formulaciones farmacéuticas, incluso a nivel de farmacopea. La HPLC se ha utilizado para resolver no menos del 50% de los problemas, dejando el otro 50% a aproximadamente otros métodos cromatográficos, espectroscópicos y otros.” (Misiuk, 2010, p. 88).

La industria farmacéutica utiliza ampliamente el Cromatógrafo Líquido para el análisis de fármacos en varias áreas, entre ellas: Control de Calidad (materia prima, producto en proceso y producto terminado), Validación de Proceso (validación de metodología de análisis de trazas de medicamentos o detergentes en áreas y equipos de producción), Investigación y Desarrollo (estabilidad natural, estabilidad acelerada, desarrollo y validación de métodos de análisis).

Asimismo, mediante su aporte en los resultados de análisis permite que áreas como Producción fabriquen medicamentos de alta calidad, lo que beneficia indirectamente a áreas como Asuntos Regulatorios y Mercadeo.

Técnicas de análisis de medicamentos en la industria farmacéutica.

En la industria farmacéutica, principalmente se utilizan dos técnicas de análisis de medicamentos: espectrofotometría (UV-Visible e IR) y Cromatografía (Líquida y de Gases). También puede utilizarse valoraciones volumétricas o potenciométricas, aunque estas últimas son poco usadas.

En una revisión que realizaron Samaniego, J & Arias, G. (2016) sobre: “Development and validation of analytical methodology by HPLC for the simultaneous quantification of Phenylephrine hydrochloride, Paracetamol and Chlorpheniramine maleate tablets” se resume que:

Se desarrolló y validó un método analítico para la cuantificación simultánea de Fenilefrina clorhidrato, Paracetamol, Salicilamida, Cafeína y Clorfeniramina maleato en tabletas utilizando la cromatografía líquida de alta precisión en fase reversa (HPLC-RP). La especificidad, linealidad, veracidad y precisión del método cromatográfico implementado permitirá su aplicación de forma rutinaria. (p. 196).

Como se puede ver, la técnica de Cromatografía Líquida se emplea frecuentemente en los análisis farmacéuticos.

“Sin embargo, la cromatografía líquida de alta resolución (CLAR), garantiza límites de detección y cuantificación más bajos, que facilita además la eliminación de los efectos causados por la matriz (interferencias en otros métodos de análisis)”. (Gutiérrez, 2007, p.74) citando a Gianna (2003).

Técnica de Cromatografía Líquida

Historia.

A continuación, se describe la historia de la Cromatografía, así como es desarrollo de la Cromatografía Líquida.

Historia de la Cromatografía.

(Romero, 2002) hace una secuencia por años de los descubrimientos y avances en la Cromatografía, detallando que:

En 1906, el botánico ruso Mikhail Tswett (1872-1919) formalizó el uso de la cromatografía en estudios científicos, aplicándola a la separación de los pigmentos naturales que se encuentran en las plantas (conocidos como carotenoides y clorofilas). Además le dio ese nombre a la técnica. Tswett empacó una columna de vidrio vertical (de unos cuantos centímetros de diámetro) con material adsorbente. (p. 2).

Luego, por la columna vertical vertió una solución que contenía la mezcla de pigmentos provenientes de las hojas molidas de una planta. Pasados unos minutos, el material empacado en la columna había adquirido una coloración diferente por segmentos. Es decir, había logrado la separación de los pigmentos naturales de la planta. En cada segmento de color definido había un pigmento diferente. (p. 2).

Historia de la Cromatografía Líquida.

García y Yusá (2016) describen varios periodos para los avances realizados en torno a la Cromatografía Líquida, los cuales se presentan a continuación:

Entre 1966 y 1967 los trabajos de Horváth y Lipsky alumbraron los primeros prototipos de cromatógrafos de HPLC, concretados durante los siguientes cinco años por Huber, Kirkland, Majors, Snyder, Unger y Karger en la llamada primera generación de equipos, propiciando la denominación “HPLC moderna (p. 5).

El segundo periodo en la historia de HPLC, entre 1973 y 1980, estuvo marcado por un rápido desarrollo de la instrumentación, surgiendo equipos compactos al tiempo que comenzaban a utilizarse rellenos de partículas de 10 μm de diámetro. (p. 6).

El tercer periodo instrumental comenzó en 1984, cuando la práctica totalidad de fabricantes decidió crear equipos modulares, a medida de las necesidades de los análisis y analistas. Se fue estabilizando el anterior desenfrenado crecimiento exponencial, convirtiéndose HPLC en la técnica más empleada, con más patentes, aplicaciones y publicaciones. Surgieron nuevos rellenos columnares, siempre dominados por el Octadecilsilano (C18). (p. 6).

Por último, el cuarto periodo instrumental alumbró la actual generación de cromatógrafos al incorporar un ordenador personal en los equipos, ya mayoritariamente modulares, permitiendo dos importantes funciones: el control integral de todos los parámetros instrumentales de cada módulo y, por otra parte, la capacidad de adquirir y almacenar los cromatogramas, con la posibilidad de

reprocesar los y realizar todos los cálculos y sistematizar los procesos de validación. (p. 6).

Y luego... El desarrollo de nuevas columnas ha acortado increíblemente los tiempos de análisis, como ha sucedido en las técnicas de UHPLC, el segmento de mayor crecimiento, cuyos primeros beneficiarios son los laboratorios farmacéuticos. También la incorporación de técnicas híbridadas, principalmente con espectrometría de masas (LC-MS), ha dotado por fin a las técnicas cromatográficas de la selectividad necesaria. (p. 6).

Fundamentos de la técnica.

Las técnicas de separación cromatográfica son definidas por la Pharmacopeia, U. S. [USP 38], como: “métodos de separación de múltiples etapas en los que los componentes de una muestra se distribuyen entre dos fases, una de las cuales es estacionaria y la otra móvil” (USP 38, 2015, p. 453).

Esta técnica presenta dos fases:

La fase estacionaria puede ser un sólido, un líquido absorbido sobre un sólido o un gel que puede estar empacada en una columna, extendida como una capa, distribuida como película o aplicada mediante otras técnicas. Y la fase móvil puede ser gaseosa o líquida o un fluido supercrítico.” (USP 38, 2015, p. 453).

La separación puede basarse en adsorción distribución de masa (partición) o intercambio iónico; o puede basarse en diferencias entre las propiedades fisicoquímicas de las moléculas, tales como tamaño, masa o volumen. (USP 38, 2015, p. 453).

La cromatografía es un conjunto de técnicas basadas en el principio de retención selectiva, cuyo objetivo es separar los distintos componentes de una mezcla, permitiendo identificar y determinar las cantidades de dichos componentes. (Osorio, 2009, p. XV).

La técnica de Cromatografía Líquida se puede encontrar como cromatografía líquida de alta eficacia, de alta presión, de alta resolución, de alta eficiencia o cromatografía líquida moderna.

El desarrollo instrumental de HPLC no cesa en la búsqueda de mejor sensibilidad y selectividad en la detección, mayor rapidez en los análisis y necesidad de menor cantidad de muestras y disolventes. HPLC separa y determina analitos (solutos) orgánicos e inorgánicos en muestras de prácticamente cualquier naturaleza, pues su principal ventaja y propiedad inherente es precisamente determinar cualquier compuesto disuelto en cualquier líquido. (García y Yusá, 2016, p. 5).

“HPLC constituye un grupo de métodos y técnicas, capaces de separar analitos en una enorme variedad de muestras y matrices, proporcionando información cualitativa y cuantitativa cada vez más completa y mejor.” (García y Yusá, 2016, p. 9).

Siempre observará cuatro reglas operativas: en primer lugar, la fase móvil y la fase estacionaria han de poseer naturaleza (polaridad) opuesta, pues de otra forma la fase móvil disolvería el relleno columnar; en segundo lugar, los analitos (solutos) han de ser totalmente solubles en la fase móvil (con igual polaridad que ésta), para que los pueda arrastrar compitiendo con la fase estacionaria; en tercer lugar, ha de existir propagación de los analitos a lo largo de la columna saliendo de la columna antes del final del análisis (elución), y, en cuarto lugar, y solo como objetivo deseable, los analitos deberán separarse (migración diferencial). (García y Yusá, 2016, pp. 9-10).

Por otra parte, Osorio (2009) destaca que la Cromatografía: “Es una de las técnicas analíticas ampliamente utilizada, la cual permite separar físicamente los distintos componentes de una solución por la absorción selectiva de los constituyentes de una mezcla.” (p. 4).

“En toda cromatografía existe un contacto entre dos fases, una fija que suele llamarse fase estacionaria, y una móvil (fase móvil) que fluye permanente durante el análisis, y que en este caso es un líquido o mezcla de varios líquidos.” (Osorio, 2009, p. 4).

Los procedimientos analíticos y criterios de aceptación para las pruebas de medicamentos se dividen en dos categorías: aquellas que evalúan los atributos generales de calidad del producto y aquellas que evalúan el desempeño del producto. Las pruebas de calidad de los productos evalúan atributos tales como identificación, valoración (contenido), impurezas y uniformidad de contenido de la dosis, y, por lo general, forman parte de la monografía oficial. Las pruebas de desempeño del producto incluyen la prueba de disolución para una forma farmacéutica oral sólida. (USP 38, 2015, p. 3).

En principio la técnica de Cromatografía Líquida puede aplicarse para determinar: contenido de principio activo, uniformidad de contenido, límite de impurezas o sustancias relacionadas, estabilidad del fármaco (potencia y pruebas de desempeño como disolución), entre otras.

Aplicaciones de la técnica de Cromatografía Líquida.

Seguidamente se definen las determinaciones antes mencionadas:

Contenido de Principio activo.

“Valoraciones: proporcionan un resultado exacto, que permite una declaración exacta del contenido o potencia del analito en una muestra.” (USP 38, 2015, p. 1584).

El analito puede entenderse como el fármaco o la sustancia activa.

“Contenido se refiere a la concentración de la sustancia activa (peso/peso, peso/volumen o unidad de uso/volumen o peso) y/o a la potencia, es decir, a la actividad del producto según lo indicado por pruebas de laboratorio adecuadas.” (USP 38, 2015, p. 2750).

Uniformidad de Contenido.

“El término "uniformidad de unidades de dosificación" se define como el grado de uniformidad en el contenido del fármaco entre las unidades de dosificación.” (USP 38, 2015, p. 727).

“La uniformidad de contenido se basa en la valoración del contenido individual de fármacos en un número de unidades de dosificación para determinar si los contenidos individuales son lo suficientemente cercanos a la cantidad declarada”. (USP 38, 2015, p. 73).

Sustancias Relacionadas.

Las sustancias relacionadas están vinculadas estructuralmente con un fármaco. Estas sustancias pueden ser (a) impurezas identificadas o no identificadas que surgen del proceso de síntesis como los materiales iniciales, productos intermedios o subproductos y no aumentan en el almacenamiento o (b) productos de degradación identificados o no identificados que resultan de los procesos de fabricación del fármaco o del producto farmacéutico, o que surgen durante el almacenamiento del material. (USP 38, 2015, p. 1186).

“Las pruebas para sustancias relacionadas o pureza cromatográfica también pueden usarse para evaluar la presencia de impurezas comunes.” (USP 38, 2015, p. 466).

Disolución.

La determinación de la velocidad de disolución puede ser importante durante el desarrollo de nuevas entidades químicas puesto que en

ocasiones permite predecir problemas potenciales de biodisponibilidad y puede ser útil también para caracterizar artículos farmacopeicos tales como excipientes o fármacos. (USP 38, 2015, p. 1158).

Generalidades del HPLC.

La industria farmacéutica emplea el 35% de los equipos, en un entorno donde se ha simplificado el número de fabricantes, desde los más de cincuenta habidos durante la eclosión de firmas del siglo pasado a un número mucho menor, en aplicaciones tan diversas que resultaría imposible reseñarlas aquí. HPLC se ha convertido en la técnica analítica más popular, capaz de aislar, identificar y cuantificar el 80% de las sustancias conocidas, conformando el mayor mercado de instrumentación analítica, un mercado maduro que aún crece, con más de 230.000 equipos instalados en todo el mundo, 80.000 de ellos en Europa. (García y Yusá, 2016, p. 7).

Este gran mercado de HPLC integra equipos completos (isocráticos, con gradientes, analíticos, para procesos, preparativos, industriales o en continuo), así como sus componentes “suelos” (bombas y sistemas de bombeo, detectores, hornos, sistemas de control y adquisición de datos, dispositivos de preparación y manipulación de muestras), junto a columnas, reactivos y disolventes. (García y Yusá, 2016, p. 7).

Tipos de HPLC.

Se debe aclarar que el tipo de HPLC se refiere a los tipos de detectores con los que se utilice el equipo. Los detectores serán explicados en las partes del HPLC en el apartado a continuación.

Por otra parte, existen técnicas acopladas o híbridas. “Las técnicas híbridadas acoplan en línea un método de separación cromatográfico (HPLC, GC) con un método espectroscópico sofisticado (MS, RMN).” (García y Yusá, 2016, p. 213).

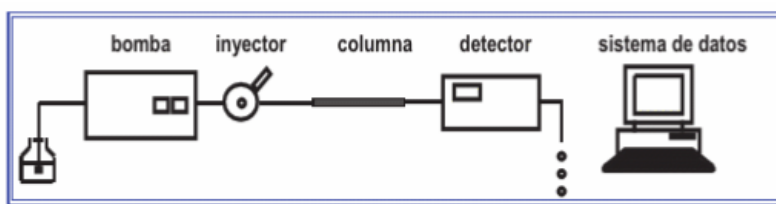
En la separación cromatográfica mediante métodos cromatográficos se puede acoplar el HPLC o el GC (Cromatógrafo de gases), con métodos espectroscópicos como MS (espectroscopia de masas) o con RMN (Resonancia Magnética Nuclear).

Partes del HPLC.

El HPLC siempre se compone de, al menos, cinco módulos, que son:

El sistema de bombeo (una o varias bombas, con o sin formación de gradientes), el inyector de muestras (manual o automático), la columna (con o sin precolumna), el detector (uno o más de uno) y el procesador de datos, que exhibe los cromatogramas con los cálculos oportunos. (Véanse detalles en la figura 4). (García y Yusá, 2016, p. 11).

Figura 4. Partes del HPLC



Nota: García y Yusá, 2016, p. 11.

La bomba.

“La bomba cromatográfica impele la fase móvil al flujo seleccionado dotándola de la presión necesaria para atravesar la columna y el resto del sistema. HPLC emplea casi exclusivamente bombas de pistón.” (García y Yusá, 2016, p. 25).

Figura 5. Tipos de bombas de Líquidos

Bombas de flujo constante	Peristálticas
	De pistón
	De jeringa
	Rotatorias de paletas
Bombas de presión constante	De presión directa mediante un gas
	De intensificador neumático
	De intensificador hidráulico

Nota: García y Yusá, 2016, p. 25.

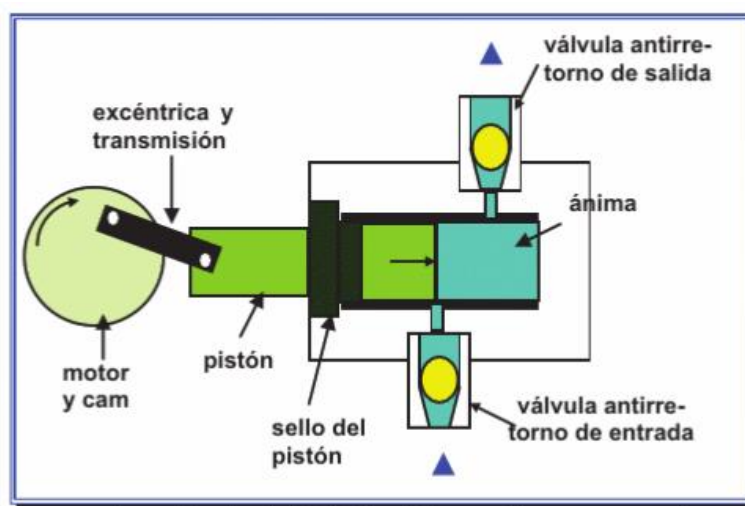
En la figura 5 se muestran los dos modos de bombear fases móviles:

A flujo constante y a presión constante. En el primer caso la bomba traduce el flujo deseado en frecuencia de sus emboladas (en las bombas de pistón) o en velocidad de desplazamiento (en las bombas de jeringa), quedando así la presión condicionada al flujo. Las bombas de presión constante estiman el empuje realizado sobre un fluido intermedio, regulando el flujo para mantener un valor de presión constante según sea la resistencia opuesta por el sistema y la columna. (García y Yusá, 2016, p. 25).

Las bombas de pistón pueden ser de pistón sencillo o de doble pistón, montando estas últimas dos pistones en serie o en paralelo. En este tipo de bombas un dispositivo eléctrico actúa sobre el pistón, que penetra en una cámara o ánima donde se halla la fase móvil, para

comprimirla y enviarla presurizada al resto del sistema. Esto se muestra en la figura 6. (García y Yusá, 2016, p. 26).

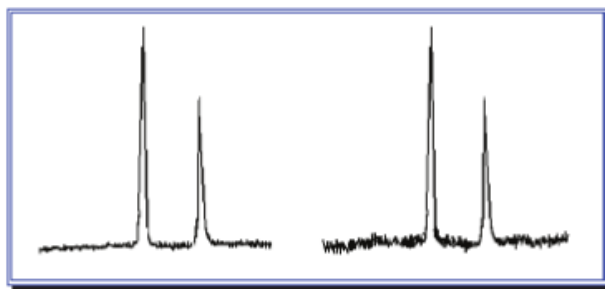
Figura 6. Esquema de una bomba de HPLC de pistón



Nota: García y Yusá, 2016, p. 26.

Si bien el resultado teórico de una bomba con dos pistones desfasados 180 grados ha de ser una línea recta, en la práctica las bombas de dos pistones generan líneas de base con ciertas oscilaciones rítmicas, denominadas “rizado” o “ruido” de bomba (figura 7), cuya razón solo puede ser una: los flujos liberados por ambos pistones no están perfectamente desfasados 180 grados (180,0000 grados), por causas físicas (precisión mecánica de la bomba y precisión de las válvulas de cierre) y químicas (compresibilidad de la fase móvil y que ésta se halle desgasificada). (García y Yusá, 2016, p. 29).

Figura 7. Ruido (rizado) en la línea de base producido por la oscilación de los dos pistones.



Nota: García y Yusá, 2016, p. 29.

La línea fluídica de las bombas de pistón suele construirse con tres materiales: acero inoxidable SS 316, el más común; PEEK, alternativa inerte para aplicaciones de presión moderada, y ocasionalmente titanio en los equipos “inertes” para separaciones de moléculas biológicas (enzimas). (García y Yusá, 2016, p. 32).

“Respecto al manejo y mantenimiento de las bombas de pistón, siguiendo la máxima de que «todo lo que se mueve se deteriora», la bomba es, sin duda, el módulo más susceptible de mantenimiento.” (García y Yusá, 2016, p. 32).

“Los gradientes de elución modifican la composición de la fase móvil durante el cromatograma, generalmente de forma gradual, con dos propósitos: separar picos poco resueltos y, por otra parte, acortar los tiempos del análisis.” (Véase la figura 8). (García y Yusá, 2016, p. 32).

Los equipos de HPLC (y la forma de trabajar con ellos) responden básicamente a dos configuraciones: isocráticas y con gradientes. Los equipos y análisis isocráticos (isos, igual; cratos, poder) utilizan la misma fase móvil a lo largo del cromatograma, con el mismo poder de elución y, por tanto, requieren una sola bomba. Los equipos con formación de gradientes de elución permiten variar la fase móvil durante el análisis, precisando un controlador programable,

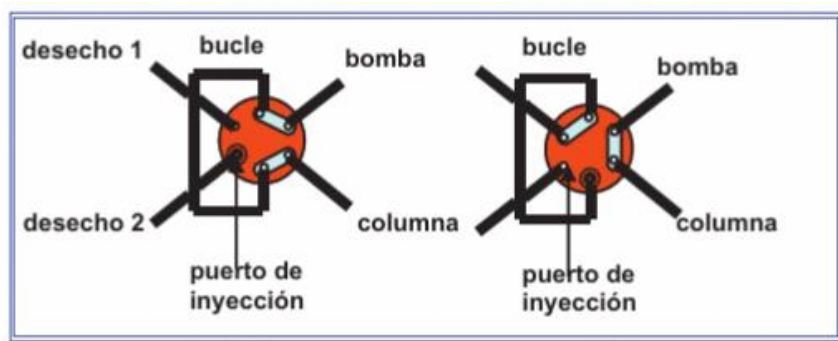
generalmente un software, donde se programa el tiempo y composición de la fase móvil.” (García y Yusá, 2016, p. 43).

inyector.

Interpuesto entre la salida de la bomba y la columna, el inyector ha de ser un dispositivo hermético, capaz de incorporar la muestra a la fase móvil previamente a la columna sin pérdidas de presión que puedan alterar el flujo proporcionado por la bomba. Prácticamente todos los equipos utilizan inyector de válvulas, por su reproducibilidad, capacidad de inyectar volúmenes muy amplios (desde nl a ml) y resistir las altas presiones. (García y Yusá, 2016, p. 57).

Prácticamente todos los inyector de HPLC, manuales o automáticos, son “de válvulas”. (Véase la figura 8). (García y Yusá, 2016, p. 59).

Figura 8. Esquema de una válvula de inyección de seis vías.

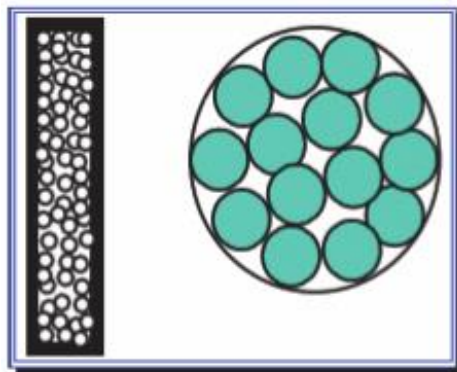


Nota: García y Yusá, 2016, p. 59.

Columna.

“La columna, un cilindro usualmente metálico que alberga micropartículas con la fase estacionaria (véase figuras 9 y 10) es la parte más importante del sistema cromatográfico.” (García y Yusá, 2016, p. 71).

Figura 9. La columna cromatográfica rellena de micropartículas



Nota: García y Yusá, 2016, p. 67.

Figura 10. Columnas de HPLC (imagen cortesía de Agilent Technologies)



Nota: García y Yusá, 2016, p. 71.

La USP 38 (2015) “establece una lista de rellenos (L), fases (G) y soportes (S) que pretende ser una referencia útil.” Seguidamente se denotan los rellenos de uso más común en la Industria Farmacéutica.

Tabla 2. Tipos de relleno de Cromatografía Líquida.

Tipo de relleno	Descripción
L1	Octadecilsilano unido químicamente a micropartículas de sílice o cerámica porosas o no porosas, de 1,5 μm a 10 μm de diámetro, o una varilla sílicea monolítica.
L3	Partículas de sílice porosas de 1,5 μm a 10 μm de diámetro, o una varilla sílicea monolítica.
L7	Octilsilano unido químicamente a partículas de sílice totalmente porosa o superficialmente porosa, de 1,5-10 μm de diámetro, o una varilla sílicea monolítica.
L10	Grupos nitrilo unidos químicamente a partículas de sílice porosas, de 1,5 μm a 10 μm de diámetro.
L11	Grupos fenilo unidos químicamente a partículas de sílice porosas, de 1,5 μm a 10 μm de diámetro.

Nota: USP 38, 2015, p. 2078.

García y Yusá (2016) sugieren realizar protocolos de chequeo, limpieza y regeneración de columnas, lo cual es detallado seguidamente.

Cada cierto tiempo se debe verificar el estado de la columna mediante un test específico con patrones, comprobando los límites de cada parámetro cromatográfico, sobre todo aquellos que afectan a la eficiencia y resolución, mediante pruebas de idoneidad (Suitability Test), que nunca están de más para confirmar la eficiencia de cada columna nueva o la calidad de fabricación del lote. (García y Yusá, 2016, p. 71).

“Tras su uso, es conveniente “limpiar” o “lavar” la columna cada cierto tiempo de las impurezas acumuladas durante su utilización, para lo cual, lo mejor es bombear una fase móvil de naturaleza lo menos lejana a su fase estacionaria.” (García y Yusá, 2016, p. 72).

García y Yusá (2016) recomiendan la regeneración de columnas, que se especifica para cada tipo de columna:

Regeneración de columnas de gel de sílice, de fase normal:

1. Reemplazar los filtros de la columna por otros nuevos.
2. Hacer pasar sucesivamente los siguientes disolventes, sin que la presión sobrepase 150 bares o el límite especificado por el fabricante: 100 ml de tetrahidrofurano a un flujo de 1 ml/min; 100 ml de metanol a un flujo de 1 ml/min; otros 100 ml de tetrahidrofurano, ahora a un flujo de 2 ml/min; 100 ml de cloruro de metileno a un flujo de 1 ml/min; finalmente, 100 ml de benceno o n-hexano a un flujo de 1 ml/min.
3. Comprobar la eficiencia (número de platos teóricos), factor de capacidad y factor de asimetría con un patrón formado por varios solutos adecuados. (García y Yusá, 2016, p. 72).

Regeneración de columnas de gel de sílice, de fase reversa:

1. Reemplazar los filtros de la columna por otros nuevos.
2. Pasar 100 ml de agua destilada y desionizada a un flujo de 1 ml/min.
3. Realizar cuatro inyecciones sucesivas de 20 μ l de dimetilsulfóxido.
4. Hacer pasar sucesivamente los siguientes disolventes, sin que la presión sobrepase 150 bares o el límite especificado por el fabricante: 100 ml de agua destilada y desionizada a un flujo de 1 ml/min; 100 ml de mezcla agua:metanol (50:50) a un flujo de 0,5 ml/min; 100 ml de mezcla agua:cloroformo (saturada) a un flujo de 0,5 ml/min; finalmente, otros 100 ml de mezcla agua:metanol (50:50) a un flujo de 0,5 ml/min.

5. Comprobar la eficiencia (número de platos teóricos), factor de capacidad y factor de asimetría con un patrón formado por varios solutos adecuados. (García y Yusá, 2016, p. 72).

Regeneración de columnas de exclusión para fases polares:

1. Reemplazar los filtros de la columna por otros nuevos.
2. Hacer pasar sucesivamente los siguientes disolventes, sin que la presión sobrepase 150 bares o el límite especificado por el fabricante: 50 ml de tolueno o tetrahidrofurano a un flujo de 0,5 ml/min; finalmente, 200 ml de ácido mercaptoacético en tolueno (1%) o tetrahidrofurano a un flujo de 0,5 ml/min.
3. Si en vez de una columna tenemos una batería de varias columnas en serie, multiplicaremos las cantidades anteriores por el número de columnas, teniendo en cuenta que la presión en cabeza de la primera columna englobará la presión total de todo el lote de columnas.
4. Comprobar la eficiencia (número de platos teóricos), factor de capacidad y factor de asimetría con un patrón formado por varios solutos adecuados. (García y Yusá, 2016, p. 72).

Regeneración de columnas de intercambio catiónico:

1. Reemplazar los filtros de la columna por otros nuevos.
2. Hacer pasar sucesivamente los siguientes disolventes, sin que la presión sobrepase 150 bares o el límite especificado por el fabricante: 100 ml de agua destilada y desionizada a un flujo de 1 ml/min; 100 ml de mezcla agua:metanol (50:50) a un flujo de 0,5 ml/min; finalmente, 100 ml de mezcla agua:cloroformo (saturada) a un flujo de 0,5 ml/min.

3. Comprobar la eficiencia (número de platos teóricos), factor de capacidad y factor de asimetría con un patrón formado por varios solutos adecuados. (García y Yusá, 2016, p. 74).

Regeneración de columnas de intercambio aniónico:

1. Reemplazar los filtros de la columna por otros nuevos.
2. Hacer pasar sucesivamente los siguientes disolventes, sin que la presión sobrepase 150 bares o el límite especificado por el fabricante: 100 ml de agua destilada y desionizada a un flujo de 0,5 ml/min; cuatro inyecciones sucesivas de 20 μ l de dimetilsulfóxido; 100 ml de agua destilada y desionizada a un flujo de 1 ml/min; finalmente, 100 ml de tetrahidrofurano a un flujo de 1 ml/min.
3. Comprobar la eficiencia (número de platos teóricos), factor de capacidad y factor de asimetría con un patrón formado por varios solutos adecuados. (García y Yusá, 2016, p. 73).

Regeneración de columnas específicas para separaciones de ácidos grasos:

1. Reemplazar los filtros de la columna por otros nuevos.
2. Hacer pasar sucesivamente 75 ml de tetrahidrofurano a un flujo de 0,5 ml/min, sin que la presión sobrepase 150 bares o el límite especificado por el fabricante.
3. Comprobar la eficiencia (número de platos teóricos), factor de capacidad y factor de asimetría con un patrón formado por varios solutos adecuados. (García y Yusá, 2016, p. 73).

Regeneración de columnas específicas para separaciones de hidratos de carbono:

1. Reemplazar los filtros de la columna por otros nuevos.
2. Hacer pasar sucesivamente 100 ml de TRISMA (acetato) de pH 7,0 a un flujo de 0,5 ml/min, sin que la presión sobrepase 150 bares o el límite especificado por el fabricante.
3. Comprobar la eficiencia (número de platos teóricos), factor de capacidad y factor de asimetría con un patrón formado por varios solutos adecuados.” (García y Yusá, 2016, p. 74).

“La precolumna aumenta el tiempo útil de la columna cromatográfica, especialmente en condiciones de alta presión, que provocan en el relleno columnar un espacio en cabeza motivo de ensanchamiento de los picos.” (García y Yusá, 2016, p. 74).

En definitiva, la precolumna asume las siguientes funciones:

- Físicamente representa dos filtros más, es decir, dos barreras adicionales ante cualquier contaminación u oclusión causada por partículas y, puesto que aumenta la presión ligeramente, amortigua algo los pulsos de la bomba en un efecto damper adicionado al que causa su propio relleno. (García y Yusá, 2016, p. 75).
- Químicamente la precolumna satura la fase móvil en fase estacionaria (aunque grosso modo ambas sean insolubles, pero por nimio [sic] que sea siempre existirá un producto de solubilidad), exigiendo que los rellenos de precolumna y columna sean exactamente iguales (es insuficiente que “ solo ” sean similares: por ejemplo, si a una columna C18 se antepone una precolumna C8, menos hidrofóbica, ésta podría no retener

algunas sustancias indeseables, que mostrarán retención en la columna); cromatográficamente el conjunto alcanza más platos teóricos y mayor resolución, por ser idénticos sus rellenos. (García y Yusá, 2016, p. 75).

- Económicamente el precio de las precolumnas es muy inferior al de las columnas con igual relleno y, además, las precolumnas se suelen vender en paquetes de varias unidades, y comprar por paquetes siempre resulta más barato). (García y Yusá, 2016, p. 75).

Un factor que afecta al gasto de fase móvil es el diámetro de la columna, ya que el gasto depende del flujo usado, como se muestra a continuación:

Figura 11. Flujo y diámetros internos de columna

Diámetro interno (mm)	Área transversal (mm²)	Flujo usual (ml/min)
1,0	0,79	0,05
2,0	3,14	0,19
3,0	7,07	0,42
4,6	16,60	1,00
7,8	47,80	1,87
22,4	394,00	23,70

Nota: García y Yusá, 2016, p. 76.

Otro factor importante en el cuidado de las columnas es el almacenamiento con solventes adecuados, para así asegurar su estabilidad. En la figura 12 se muestra cómo se deben almacenar según el tipo de fase estacionaria.

Figura 12. Solventes en los que se guardan las columnas

Fase estacionaria	Solvente de almacenamiento
Amino	1 % acetato de etilo en hexano
Diol	1 % acetato de etilo en hexano
C18, C8, ODS	60% agua : 40% acetonitrilo
Silice	1 % acetato de etilo en hexano
Ciano	4% isopropanol en hexano

Nota: García y Yusá, 2016, p. 78.

Las columnas se equilibran con suficiente fase móvil antes de su uso, bombeando aproximadamente 10 veces su volumen columnar: por ejemplo, 25 ml en el caso de las columnas analíticas (de 250 x 4,6 mm). (García y Yusá, 2016, p. 79).

Las columnas de sílice para fase normal requieren mayor cantidad de fase móvil para equilibrarse [sic]. Se debe conocer las compatibilidades de fases móviles. En cualquier caso, el primer signo de equilibrado es alcanzar un valor de presión constante en el sistema de bombeo, siendo el segundo obtener una línea de base estable y plana, y el tercero y definitivo la estabilidad de los tiempos de retención de patrones.” (García y Yusá, 2016, p. 79).

Detector.

El detector de HPLC precisa dos propiedades: responder ante muestras en estado líquido y hacerlo en régimen de flujo continuo, para generar los cromatogramas, gráficos on-line de su señal continua frente al tiempo cuando las muestras atraviesan su celda de flujo continuo, aunque algunos detectores que también lo hacen de forma discontinua (off-line). (García y Yusá, 2016, p. 81).

Seguidamente se muestran, en la figura 13, los tipos de detectores, su aplicabilidad y la mínima cantidad detectable.

Figura 13. Detectores de HPLC y Mínima Cantidad Detectable (MCD)

Detector	Aplicabilidad	MCD	Linealidad
UV-VIS	selectivo	ng	10 ⁴
Diode array	selectivo	ng	10 ⁴
Fluorimétrico	muy selectivo	pg	10 ⁶
Refractométrico	universal	µg	10 ³
Polarimétrico	muy selectivo		
Electroquímico	muy selectivo	fg	10 ⁶
Conductimétrico	universal	ng	
Radiométrico	muy selectivo	pg	
Viscosimétrico	polímeros		
Light scattering evapor.	universal		
Light scattering láser	polímeros		
Quimioluminiscencia	muy selectivo		

Nota: García y Yusá, 2016, p. 83.

Los detectores de HPLC pueden dividirse en:

- Detectores universales, que acusan cambios de una propiedad física común a todas las especies analizadas, sean analitos, disolventes o contaminantes, caso de, por ejemplo, los detectores refractométricos.
- Detectores selectivos, que solo detectan aquellos compuestos que presentan una determinada propiedad, como, por ejemplo, absorber la radiación de una longitud de onda dada, y
- Detectores específicos, donde solo muestran señal los analitos deseados, siendo insensibles a otros compuestos (otros analitos, contaminantes, metabolitos, disolventes, etc.). Evidentemente, los detectores específicos no dejan de ser detectores selectivos. (García y Yusá, 2016, p. 81).

También se puede clasificar los detectores por su fundamento físico-instrumental en:

- Detectores ópticos, basados en la interacción de una radiación con los analitos (detectores UV-VIS, diode array, fluorimétricos, refractométricos, polarimétricos, de light-scattering).
- Detectores eléctricos, basados en la medida de una propiedad eléctrica (electroquímicos, conductimétricos).
- Otros detectores específicos (radiométricos, viscosimétricos), y
- Detección hibridada, acoplando HPLC a otras técnicas (LC-MS, LC-RMN, y otros). (García y Yusá, 2016, p. 82).

Los requerimientos generales cuantitativos del detector son: número máximo de picos detectados (existe un número máximo de picos o capacidad de picos en el detector), su volumen de celda (contribuye a un eventual aumento de la anchura de pico y admite un volumen máximo), su constante temporal (o constante de integración: afecta la resolución y el ruido en el cromatograma), concentración detectable (la detectabilidad la limita cuantitativamente una concentración máxima del analito, dentro de los límites de detección), sensibilidad (la respuesta del detector) y linealidad de su respuesta (la respuesta del detector debe ser lineal dentro de unos límites). (García y Yusá, 2016, p. 83).

Requerimientos de la Farmacopeas para el HPLC.

A continuación, se describen los aspectos relevantes para el sistema de Cromatografía Líquida en la USP, el cual comprende aspectos similares a los que contiene la Farmacopea Británica (BP).

Especificaciones de la USP.

En la USP 38 se indica un procedimiento general para realizar un análisis mediante HPLC, el cual consiste en:

1. Equilibrar la columna y el detector con fase móvil a la velocidad de flujo especificada hasta obtener una señal constante.
2. Inyectar una muestra a través del inyector o usar un muestreador automático.
3. Comenzar el programa de gradientes.
4. Registrar el cromatograma.
5. Analizar según se indica en la monografía. (USP 38, 2015, p. 456).

En el apéndice B se describe un glosario con terminología utilizada en la temática del HPLC.

En relación con la aptitud del sistema cromatográfico, la USP 38 establece las siguientes consideraciones:

Las pruebas de aptitud del sistema son una parte integral de los métodos de cromatografía de líquidos y de gases. Estas pruebas se usan para verificar que el sistema cromatográfico sea adecuado para el análisis que se pretende efectuar. Las pruebas se basan en el concepto de que el equipo, los sistemas electrónicos, las operaciones analíticas y las muestras analizadas constituyen un sistema integral que se puede evaluar como tal. (USP 38, 2015, p. 460).

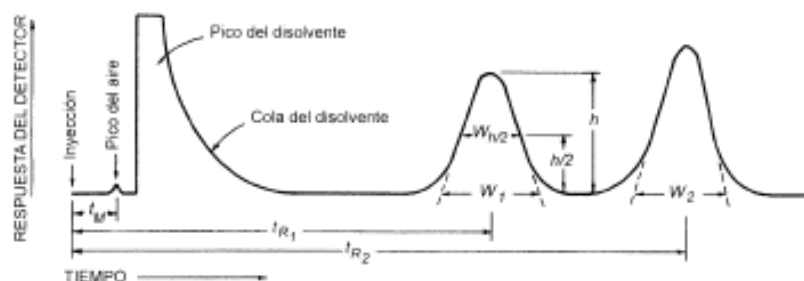
Los factores que pueden afectar el comportamiento cromatográfico incluyen lo siguiente:

- Composición, fuerza iónica, temperatura y pH aparente de la fase móvil.

- Velocidad de flujo, dimensiones de la columna, temperatura de la columna y presión.
- Las características de la fase estacionaria, incluyendo el tipo de soporte cromatográfico (basado en partículas o monolítico), tamaño de partícula, tamaño de poro y área superficial específica.
- En fase reversa y otras modificaciones superficiales de las fases estacionarias, el grado de modificación química (según se expresa mediante recubrimiento exhaustivo (end-capping), carga de carbono, etc.). (USP 38, 2015, p. 460).

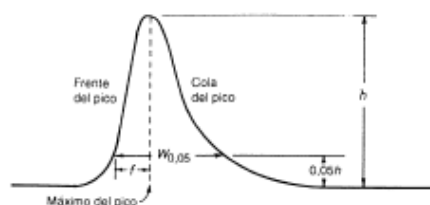
El objetivo principal en una determinación cromatográfica es obtener un cromatograma que presente atributos adecuados, entre ellos: una separación aceptable entre las dos sustancias (véase la figura 14), evitar que el pico cromatográfico sea asimétrico (véase la figura 15) y que el ruido no altere la altura del pico (véase la figura 16).

Figura 14. Separación cromatográfica de las dos sustancias

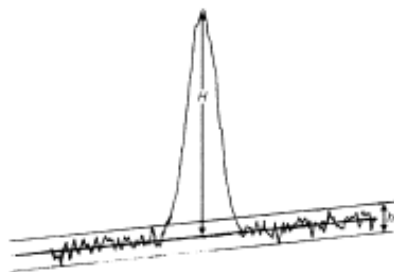


Nota: USP 38, 2015, p. 457.

Figura 15. Pico cromatográfico asimétrico



Nota: USP 38, 2015, p. 460.

Figura 16. Ruido y pico cromatográfico

Nota: USP 38, 2015, p. 461.

Es importante considerar que la USP permite realizar modificaciones durante la ejecución de un análisis por HPLC. En la siguiente tabla se resume el ajuste permitido para cada parámetro.

Tabla 3. Ajustes permitidos en los parámetros cromatográficos por HPLC

Parámetro	Ajuste permitido
pH de la Fase Móvil	±0,2 unidades.
Concentración de Sales en la Solución Amortiguadora	± 10%.
Relación de los Componentes en la Fase Móvil	Para componentes minoritarios de la fase móvil (especificados a 50% o menos). La cantidad de estos componentes se puede ajustar en un ±30%.
Longitud de Onda del Detector UV-Visible	No están permitidas las desviaciones de las longitudes de onda especificadas en el procedimiento.
Velocidad de Flujo	$F2 = F1 \times [(dc_2^2 \times dp_1) / (dc_1^2 \times dp2)]$ Donde $F1$ y $F2$ son las velocidades de flujo para las condiciones originales y modificadas, respectivamente; dc_1 y dc_2 son los diámetros de columna respectivos; y dp_1 y $dp2$ son los tamaños de partícula.
Volumen de Inyección	Se puede ajustar siempre que sea congruente con la precisión, la linealidad y los límites de detección aceptados.
Temperatura de la Columna	± 10°C.

Nota: USP 38, 2015, p. 461.

Funcionamiento del HPLC

Es de vital importancia manipular adecuadamente el Cromatógrafo líquido, ya que este equipo es costoso y aporta conocimiento científico al personal que lo utilice. Además, es punto importante en el seguimiento de un Sistema de Gestión de Calidad, tal como lo establece la Organización Panamericana de la Salud.

La calificación de los equipos es un requisito para el cumplimiento de un Sistema de Gestión de Calidad, razón por la cual se aborda el siguiente tópico.

Calificación del HPLC.

La USP establece que: “el uso de un instrumento calificado en los análisis contribuye a la confianza en la validez de los datos generados”. (USP 38, 2015, p. 1056).

Asimismo, la calificación de instrumentos analíticos (AIQ, por sus siglas en inglés) “es la colección de pruebas documentadas de que un instrumento se desempeña adecuadamente para su uso previsto”. (USP 38, 2015, p. 1056).

Dentro de las categorías de los instrumentos, los HPLC pertenecen a la categoría C.

El Grupo C incluye instrumentos y sistemas analíticos computadorizados, donde los requisitos del usuario para la funcionalidad y los límites operativos y de desempeño son específicos para la aplicación analítica. La conformidad de los instrumentos del Grupo C con los requisitos del usuario se determina por pruebas de función y pruebas de desempeño específicas. (USP 38, 2015, p. 1061).

La calificación de instrumentos se puede agrupar en cuatro fases: calificación del diseño (DQ, por sus siglas en inglés), calificación de la instalación (IQ, por sus siglas en inglés),

calificación operativa (OQ, por sus siglas en inglés) y calificación del desempeño (PQ, por sus siglas en inglés).

La calificación del diseño (DQ).

La calificación del diseño (DQ) es la colección documentada de actividades que definen las especificaciones funcionales y operativas del instrumento y los criterios para la selección del proveedor, basándose en el uso previsto del instrumento. La calificación del diseño (DQ) puede ser realizada no sólo por el que desarrolla o fabrica el instrumento, sino también por el usuario. (USP 38, 2015, p. 1057).

La calificación de la instalación (IQ).

La calificación de la instalación (IQ) es la colección documentada de actividades necesarias para establecer que un instrumento se entrega como fue diseñado y especificado y está debidamente instalado en el entorno seleccionado, y que este entorno es adecuado para el instrumento. Las actividades y la documentación asociadas típicamente con la IQ son las siguientes.

- Descripción: Proporcionar una descripción del instrumento o del conjunto de componentes del instrumento, incluyendo el fabricante, el modelo, el número de serie, la versión del software y la ubicación.
- Entrega del Instrumento: Asegurar que el instrumento, el software, los manuales, los suministros y cualquier otro accesorio del instrumento lleguen según se especifique en la orden de compra y que no hayan sufrido daño.
- Montaje e Instalación: Ensamblar e instalar el instrumento y efectuar cualquier diagnóstico o prueba preliminar. El montaje e

instalación deben ser hechos por el fabricante, proveedor, ingenieros especializados o personal interno calificado.

- Red y Almacenamiento de Datos: Algunos sistemas analíticos requieren que los usuarios proporcionen las conexiones en red y las capacidades de almacenamiento de datos en el lugar de instalación. Cuando sea necesario, conectar el instrumento a la red y verificar su funcionalidad.
- Verificación de la Instalación: Efectuar los diagnósticos y pruebas iniciales del instrumento después de la instalación. (USP 38, 2015, p. 1058).

La calificación operativa (OQ).

La calificación operativa (OQ) es la colección documentada de las actividades necesarias para demostrar que un instrumento funcionará de acuerdo con su especificación operativa en el entorno seleccionado. Las actividades de prueba en la fase OQ pueden constar de los siguientes parámetros:

- Parámetros Fijos: longitud, altura, peso, entradas de voltaje, presiones aceptables y cargas. Los parámetros fijos no cambian durante la vida del instrumento y por lo tanto no es necesario volver a determinarlos.
- Almacenamiento de Datos, Copia de Seguridad (backup) y Archivo Seguros: probar el manejo seguro de datos, tal como almacenamiento, copia de seguridad, registros de auditoría y archivo en el sitio del usuario.
- Pruebas de las Funciones del Instrumento: para verificar que el instrumento funcione según lo previsto por el fabricante. (USP 38, 2015, p. 1058).

La calificación de desempeño (PQ).

La calificación de desempeño (PQ) es la colección, documentada, de las actividades necesarias para demostrar que un instrumento se desempeña uniformemente de acuerdo con las especificaciones definidas por el usuario, y es apropiado para el uso previsto. La fase PQ puede incluir los siguientes parámetros.

- Controles de Desempeño: Establecer una prueba o serie de pruebas para verificar el desempeño aceptable del instrumento para su uso previsto.
- Mantenimiento Preventivo y Reparaciones: Cuando un instrumento deja de cumplir con las especificaciones de la prueba PQ, puede requerir mantenimiento o reparación. Un mantenimiento preventivo periódico puede también estar recomendado para muchos instrumentos.
- Prácticas de Operación, Calibración, Mantenimiento y Control de Cambios: Establecer prácticas para mantener y calibrar el instrumento. (USP 38, 2015, p. 1059).

Mantenimiento preventivo del HPLC.

Para un adecuado funcionamiento del HPLC es necesario realizar verificaciones del equipo y proporcionar un mantenimiento preventivo del mismo.

Como parte de la implementación del mantenimiento preventivo del equipo es importante considerar aspectos críticos a controlar.

Como indica Osorio (2009, p. 35) en su Guía para la instalación, calificación y mantenimiento de sistemas de cromatografía, dentro de un laboratorio acreditado ISO 17025, existen puntos críticos del sistema cromatográfico que se deben monitorear, los cuales son descritos en la siguiente tabla.

Tabla 4. Puntos críticos del sistema cromatográfico

Punto Crítico	Problema(s)	Posible BPL que previene o evita que se presente el o los problema(s)
Limpieza	- Aumento paulatino de presión debido a obstrucción total o parcial del sistema.	Lavado general del sistema cromatográfico.
Funcionamiento	-Fallas técnicas.	<p>-Programa y ejecución del mantenimiento preventivo del equipo.</p> <p>-Verificar que la alimentación de poder esté dentro del intervalo de trabajo del equipo.</p> <p>-Registrar el funcionamiento, en forma de cartas de operación del equipo en general y de los módulos por separado, 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.</p> <p>En casos de sospechar de alguna posible anomalía, atenderla, solicitando el mantenimiento de inmediato en los casos en que el operador no lo puede hacer.</p>

Nota: Osorio, 2009, pp. 35-36.

Para el caso de la entrega de disolventes se tienen tres partes importantes a considerar, que son: la interacción entre los disolventes y contenedores, los disolventes por sí solos y la bomba que los provee. (Osorio, 2009, p. 37). En la siguiente tabla se muestran los puntos críticos en la interacción entre los disolventes y contenedores.

Tabla 5. Puntos críticos en la interacción entre disolventes y contenedores

Punto Crítico	Problema(s)	Posible BPL que previene o evita que se presente el o los problema(s)
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.	-La boca debe ser de menor diámetro posible. -Emplear tapones diseñados para que el orificio donde se inserta la tubería selle a la misma.
Heterogeneidad de los disolventes	-Cambios en los tiempos de retención cuando la fase móvil se renueva.	-Si es un análisis rutinario se puede emplear el envase original del disolvente. -En caso de ser necesario, tratar de emplear el mismo lote, hasta donde sea posible.
Viales	-Cambios en los tiempos de retención cuando la fase móvil se renueva.	-Análisis de polímeros-No usar contenedores de plástico. -Análisis de iones metálicos-No usar contenedores de vidrio.
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 [sic] de la luz, usar su propio contenedor si es posible o en su defecto proteger el contenedor; se puede emplear un plástico oscuro [sic] o papel aluminio.

Nota: Osorio, 2009, pp. 38-39.

“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.” (Osorio, 2009, p. 37).

En la siguiente tabla se muestran los puntos críticos en los disolventes por sí solos.

Tabla 6. Puntos críticos de los disolventes por sí solos

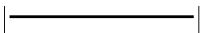
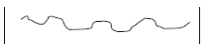
Punto Crítico	Problema(s)	Posible BPL que previene o evita que se presente el o los problema(s)
Los disolventes usados como fase móvil	-Daños a columnas.	-La pureza debe ser grado HPLC o no menor del 99%. -Inyectar el disolvente puro para verificar que no interfiera. -Filtrar y desgasificar los disolventes antes de usarse y usar filtros en línea. -Lavar los filtros de acero inoxidable o de teflón de la línea de entrada de los disolventes o cambiarlos frecuentemente si se tienen en línea.
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.
Diseño del método	-Muestras no retenidas; por lo tanto, hay separaciones pobres. -Muestras retenidas excesivamente, y en consecuencia tiempos de análisis muy largos.	-Pruebas previas con disolventes puros. -Mezcla de disolventes para lograr separaciones con factor de capacidad entre 1 y 10. -Intentar gradientes de elusión.
Desgasificación	-Tiempos de retención modificados por cambios en la presión. -Señal de ruido proveniente del detector, señales confusas. -Columnas sensibles al oxígeno, como NH_2 o NH_3 .	-Desgasificar con gas inerte a flujo y presión constante, sobre todo en bombas reciprocantes.
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.
Viscosidad alta	-Presión alta. -Picos coleados.	-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.

Nota: Osorio, 2009, pp. 40-42.

“Las Buenas Prácticas de Laboratorio para las bombas deben dirigirse a conocer el desempeño de la bomba y prevención de la corrosión del sistema de bombeo (cabezales, pistones y válvulas “check”)” (Osorio, 2009, p. 44).

Los puntos críticos que se deben considerar en las bombas se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 7. Puntos críticos de las bombas

Punto Crítico	Problema(s)	Posible BPL que previene o evita que se presente el o los problema(s)
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.
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 1mm de diámetro) entre la bomba y la cámara de inyección; este tubo capilar se deja flotar libremente y así absorbe las pulsaciones producidas por la bomba.
Cabezales	-Sellos del pistón dañados. -Pistón dañado. -Válvulas “check” dañadas.	-Con el proceso de 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).

Nota: Osorio, 2009, pp. 44-45.

“La inyección es muy importante para obtener resultados veraces, esto es, que el volumen inyectado corresponda al que se está tomando en cuenta en los cálculos.” (Osorio, 2009, p. 46).

Los puntos críticos que se deben considerar en los inyectores se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 8. Puntos críticos en la introducción de muestras (inyectores)

Punto Crítico	Problema(s)	Posible BPL que previene o evita que se presente el o los problema(s)
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 [sic] el tamaño de los picos.	-Asegurarse de no crear vacíos en el vial.
	-Fugas de líquido.	-Verificar si la guja [sic] de inyección tiene el diámetro apropiado y la punta está en buen estado. -Verificar que el sello del puerto de inyección se encuentre en buen estado. -Verificar que el “loop” este bien conectado.
	-Agujas dobladas.	-No colocar septas rígidas en los viales. -Verificar que la tapa del vial esté colocada correctamente.
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.
	Partículas en la muestra.	-Filtrar las muestras antes de inyectarlas.
Tiempo de retención	-Variaciones en los tiempos de retención de los picos debido a variaciones en la señal de arranque o activación en el inyector.	-Cuando se da la señal de activación de manera manual, homogenizar el tiempo que se toma en dar dicha señal.

Nota: Osorio, 2009, pp. 46-48.

“Las columnas pueden deteriorarse por diversas razones, como la contaminación, el cambio de polaridad debido a la pérdida de actividad o una perturbación en la geometría de la columna.” (Osorio, 2009, p. 48).

A continuación, se muestran los puntos críticos que se deben considerar en las columnas.

Tabla 9. Puntos críticos en columnas y empaques

Punto Crítico	Problema(s)	Posible BPL que previene o evita que se presente el o los problema(s)
Eficiencia	-Pérdida de eficiencia.	<p>Siempre que se adquiriera una columna nueva se deben evaluar los parámetros N (eficiencia), k', R, y α con los que se puede llevar un control de vida de la columna.</p> <p>-Es recomendable tener una carpeta de control o bitácora con el historial de cada columna.</p> <p>-Cuando se tenga pérdida en la eficiencia de la columna esta debe ser regenerada, reemplazar los filtros y comprobar su eficiencia caracterizándola (N, k', R, y α).</p>
	-Columna dañada.	<p>-Seleccionar adecuadamente las condiciones de trabajo, con base en indicaciones del proveedor.</p> <p>-Evitar disminuir o aumentar bruscamente el flujo cuando la columna esté conectada, para evitar cambios bruscos de presión.</p> <p>-Evitar disolventes que reaccionen con la columna (que sangren la columna).</p>
Temperatura	<p>-Variaciones en los tiempos de retención y afinidad entre analito y columna.</p> <p>-Formas de los picos.</p>	<p>-Controlar la temperatura con la mayor precisión posible dentro de los límites; puede ser con baño recirculador de agua u horno de resistencia eléctrica.</p>
	-Disminución de la eficiencia de la columna por altas temperaturas.	<p>-Seguir las indicaciones del proveedor, por ejemplo:</p> <p>-Columnas con base de sílica no se deben calentar por arriba de 60°C, así como algunas</p>

		columnas de tamaños de partículas pequeños, debido a que pierden eficiencia (N) hasta de [sic] un 50 % cuando se calientan a temperaturas altas; para tamaños de partícula de 3 μm se degradan con temperatura por arriba de 40°C.
Conexión	-Fugas.	-Verificar que las tuercas o férula no estén mal apretadas. -Verificar que el filtro sea el adecuado. -Verificar que la columna no esté tapada por objetos extraños. Verificar que el diámetro de las tuberías sea el correcto.
	-Columnas obstruidas. -Presión alta. -Picos fantasmas. -Picos coleados.	-Usar filtros y guarda columnas en línea. -Filtrar y limpiar hasta donde sea posible, muestras sucias. -Cambiar los filtros frecuentemente. -Lavar la columna frecuentemente con un disolvente fuerte.
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 almacenar en disoluciones amortiguadoras con 0.1% de azida. -Ver las recomendaciones del fabricante. -Asegurarse de colocar bien los tapones en los extremos de la columna antes de almacenarlas.
pH	-Cambios en la forma de los picos. -Degradación de columnas. -Decrece el tiempo de retención en compuestos no básicos y aumenta el tiempo de retención para compuestos básicos.	-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.

Nota: Osorio, 2009, pp. 49-53.

“Los problemas que se suelen presentar en los detectores depende del tipo de detector. 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.” (Osorio, 2009, p. 48).

A continuación, se muestran los puntos críticos que se deben considerar en las columnas.

Tabla 10. Puntos críticos en detectores

Punto Crítico	Problema(s)	Posible BPL que previene o evita que se presente el o los problema(s)
Ruido	<ul style="list-style-type: none"> -Problemas en la integración por presencia de señales de ruido, lo que disminuye el nivel de detección. -Picos fantasmas debido a ruido. 	<ul style="list-style-type: none"> -Permitir que se caliente el detector por aproximadamente media hora, o una hora para que alcance su máxima sensibilidad. -Control del tiempo de uso de las lámparas. -Contar con una lámpara para repuesto. -Cambiar la lámpara cuando el tiempo de vida está por terminar (2500 horas), limpiar la superficie de la lámpara con algodón o metanol, no dejar residuos de grasa, ni de algodón. -Si se cambia la lámpara, calentar una hora. -Desgasificar la fase móvil.
	<ul style="list-style-type: none"> -Problemas de carga estática. 	<ul style="list-style-type: none"> -Conexión adecuada del detector a tierra. -Usar tapetes antiestáticos.
Linealidad de la respuesta	<ul style="list-style-type: none"> -Deriva en la línea base causada por el detector, no por un gradiente: esto se traduce en problemas en la cuantificación. 	<ul style="list-style-type: none"> -Control de temperatura del ambiente. -Verificar que la fuente de energía sea adecuada.
Sensibilidad	<ul style="list-style-type: none"> -Picos pequeños en soluciones con concentraciones altas. 	<ul style="list-style-type: none"> -Seleccionar adecuadamente los parámetros de trabajo del detector; ejemplos: UV-VIS, que la longitud de onda (λ) sea la adecuada para el o los analito (s), y que la fase móvil no dé respuestas altas en es [sic] λ. Electroquímico, que el electrodo de trabajo sea el correcto.

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

Nota: Osorio, 2009, pp. 54-56.

Además, “se listan de una forma ordenada las fallas típicas que se podrían presentar en los equipos de Cromatografía, dicha tabla incluye las posibles causas de la falla y posibles soluciones tipificadas, para el mantenimiento correctivo y/o preventivo.” Osorio, 2009, p. 48) (Véase la tabla 11).

Tabla 11. Fallas típicas/causas/solución

Tipo de síntoma	Causa posible	Solución
Distorsión línea base en tiempo muerto	Positiva/negativa-Diferencia en el índice de refracción del disolvente de inyección.	Usar fase móvil para disolver la muestra.
Fugas en el detector	Catastrófico-Fallo del sello del detector.	Cambiar sellos/juntas.
Desviación de la línea base	Dirección positiva-Acumulación de contaminantes/elución.	Lavar la columna, eliminar la contaminación de la muestra, usar disolventes puros.
	Dirección negativa (gradiente). Absorbancia del disolvente de fase móvil “A”.	Usar disolvente no absorbente o de calidad HPLC.
	Dirección positiva (gradiente).	Usar longitudes de onda UV mayores.

	Absorbancia de fase móvil "B".	
	Dirección positiva (gradiente) [sic]- Absorbancia del disolvente de fase móvil "B".	Usar disolvente no absorbente o de calidad HPLC.
Picos fantasma	Picos de inyecciones previas.	Lavar la columna al final del análisis con un disolvente fuerte.
	Contaminación.	Lavar la columna para eliminar los contaminantes.
	Picos extra-Burbujas en disolvente.	Desgasificar el disolvente.
Fugas	Sutil; polvo blanco en la conexión -conexión floja.	Apretar la conexión, cortar el tubo o cambiar la ferrula.
Fuga en la válvula de inyección	Catastrófico-Rotor de la válvula gastado.	Cambiar el rotor de la válvula.
Fuga en la columna u otras conexiones	Catastrófico-Conexiones flojas.	Apretar o cambiar las conexiones.
Fuga en la bomba	Catastrófico-fallo del sello de la bomba.	Cambiar el sello de la bomba.
Picos de negativos	Detector UV-La absorbancia del soluto es menor que la de la fase móvil.	Usar fase móvil con menor absorbancia UV; no reciclar el disolvente mucho tiempo.
Línea base con ruido	Aleatorio-Acumulación de contaminantes.	Lavar la columna, purificar la muestra; usar disolvente de calidad HPLC.
	Continuo-Problema con la lámpara del detector.	Cambiar la lámpara UV (dura 1000 horas).
	Esporádico-Interferencia eléctrica externa.	Usar estabilizador de voltaje para LC.
	Picos extra-burbuja en el detector.	Desgasificar la fase móvil o regular la retropresión.
Picos dobles	Volumen de muestra demasiado grande.	El volumen de muestra debe ser 1/6 cuando se use fase móvil para inyección.
	Disolvente de inyección demasiado fuerte.	Usar un disolvente o fase móvil más débil.
Colas de picos	Inicio de picos dobles.	Vea los picos dobles. Minimizar el número de conexiones.

	No hay barrido de volúmenes muertos.	Comprobar el sello del inyector. Comprobar el ajuste de las conexiones.
Picos muy anchos	Volumen de inyección demasiado grande.	Disminuir la fuerza del disolvente de inyección para localizar el soluto.
Fluctuación de la presión	Fuga en la válvula de seguridad.	Cambiar la válvula de seguridad.
	Burbujas en la bomba.	Desgasificar.
	Fugas en el sello de la bomba.	Cambiar los sellos de la bomba.
Incremento de la presión	Acumulación de partículas.	Filtrar la muestra, colocar un filtro en línea, filtrar la fase móvil.
	Sistemas acuosos/orgánicos- Precipitación del tampón.	Comprobar las mezclas tampón-orgánicas para asegurar la compatibilidad.
Cambios en los tiempos de retención	Variación de la temperatura de la columna.	Termostatar o aislar la columna, mantener constante la temperatura.
	Tiempo de equilibrado insuficiente con análisis en gradiente o cambios en la fase móvil isocrática.	Asegurarse de que como mínimo 10 volúmenes de columna pasan a través de la columna tras el cambio de disolvente o finalización del gradiente.

Nota: Osorio, 2009, pp. 57-67.

La información anterior sobre el mantenimiento preventivo describe los cuidados básicos que deben ejecutarse con el HPLC.

CAPÍTULO III: MARCO METODOLÓGICO

En el presente apartado se presentará la metodología utilizada para la elaboración de este trabajo. Para esto, se analizará el método que conlleva la investigación, las fuentes de información, los criterios de inclusión de información, los criterios de exclusión de información y categorías de análisis.

Enfoque de la investigación

La presente investigación presenta un enfoque cualitativo.

El enfoque cualitativo según (Hernández, Fernández y Baptista, 2014), utiliza la recolección y análisis de los datos para afinar las preguntas de investigación o revelar nuevas interrogantes en el proceso de interpretación. (p. 7). Además, revela las siguientes características: los estudios cualitativos pueden desarrollar preguntas e hipótesis antes, durante o después de la recolección y el análisis de los datos, y el investigador cualitativo utiliza técnicas para recolectar datos, como la observación no estructurada, entrevistas abiertas, revisión de documentos, discusión en grupo, evaluación de experiencias personales, registro de historias de vida, e interacción e introspección con grupos o comunidades. (pp. 8-9).

La razón por la que esta revisión tiene un enfoque cualitativo, es porque se describen las características del equipo (HPLC) y porque se pretende comprobar las habilidades y el desempeño de los estudiantes, profesores y personal del laboratorio, al utilizar el HPLC.

Diseño metodológico

El diseño metodológico de esta investigación es transversal, descriptivo y pre-experimental.

“Los diseños de investigación transeccional o transversal recolectan datos en un solo momento, en un tiempo único. (Liu, 2008 y Tucker, 2004) citados por (Hernández et al., 2014). Su

propósito es describir variables y analizar su incidencia e interrelación en un momento dado.” (Hernández et al., 2014, p. 154).

Los diseños transeccionales descriptivos tienen como objetivo indagar la incidencia de las modalidades o niveles de una o más variables en una población. El procedimiento consiste en ubicar en una o diversas variables a un grupo de personas u otros seres vivos, objetos, situaciones, contextos, fenómenos, comunidades, etc., y proporcionar su descripción. (Hernández et al., 2014, p. 155).

“El término experimento tiene al menos dos acepciones, una general y otra particular. La general se refiere a “elegir o realizar una acción” y después observar las consecuencias.” (Babbie, 2014), citado por (Hernández et al., 2014, p. 129).

El método pre-experimental consiste en:

Administrar un estímulo o tratamiento a un grupo y después aplicar una medición de una o más variables para observar cuál es el nivel del grupo en éstas. Este diseño no cumple con los requisitos de un experimento “puro”. No hay manipulación de la variable independiente (niveles) o grupos de contraste (ni siquiera el mínimo de presencia o ausencia). (Hernández et al., 2014, p. 141).

El diseño utilizado se debe a lo siguiente:

- Es transversal, porque la recolección de datos se efectúa en un momento dado (I cuatrimestre del 2019).
- Es descriptivo, porque se va a desarrollar un instructivo de uso del HPLC y se van a determinar las habilidades de los estudiantes, profesores y personal del laboratorio, con la aplicación de la técnica de Cromatografía Líquida.
- Es pre-experimental, porque se va a determinar el desempeño de los estudiantes, profesores y personal del laboratorio, al utilizar el instructivo de uso del HPLC desarrollado.

Variables

Tabla 12. Variables de la investigación

Objetivo	Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Definición instrumental
Identificar habilidades básicas para utilizar el equipo de Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC).	Habilidades.	<p>Habilidades (metacognitivas): Comportamientos planificados que seleccionan y organizan mecanismos cognitivos, afectivos y motrices, con el fin de enfrentarse a situaciones-problema, globales o específicas, de aprendizaje. (Klimenko, O. & Alvares, J., 2009, p.18), citando a Muria (1994)</p>	Observación de la aplicación del conocimiento de estudiantes, profesores y personal de laboratorio.	Guía de sesión.
Diseñar un instructivo de uso y limpieza de un equipo de Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC).	Instructivo del HPLC.	<p>El Instructivo de Usuario tiene como objetivo facilitar la tarea de conocimiento, uso y aprendizaje del sistema desarrollado. Debe contener información acerca de todas las operaciones básicas que el sistema ofrece, así como capturas de pantallas útiles para el seguimiento de la explicación. El lenguaje utilizado debe ser lo más adecuado al perfil del usuario.</p>	Elaboración de un Instructivo que permita el funcionamiento básico del equipo.	Revisión bibliográfica y con el Manual del fabricante.

Validar el desempeño de estudiantes, profesores y personal de laboratorio, después de recibir la capacitación en el uso del equipo de Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC).	Desempeño en el uso del HPLC.	El desempeño se considera como el desarrollo de las tareas y actividades, en relación con los estándares y los objetivos deseados. Está integrado por los conocimientos, la pericia, las actitudes y el compromiso.	Observación del desempeño de estudiantes, profesores y personal de laboratorio al usar el equipo.	Guía de sesión.
--	-------------------------------	--	---	-----------------

Instrumentos

Tabla 13. Matriz general para el diseño de instrumentos

Objetivo	Variable	Técnica	Instrumento	Sujetos y fuentes de información
Identificar habilidades básicas para utilizar el equipo de Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC).	Habilidades.	Grupo Focal.	Guía de sesión.	Grupo de estudiantes, profesores y personal de laboratorio de la UIA.
Diseñar un instructivo de uso y limpieza de un equipo de Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC).	Equipo: HPLC.	Revisión documental.	Instructivo de uso del HPLC.	Manual del equipo y personal del laboratorio.
Validar el desempeño de estudiantes, profesores y personal de laboratorio, después de recibir la capacitación en el uso del equipo de Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC).	Desempeño en el uso del HPLC.	Grupo Focal.	Guía de sesión.	Grupo de estudiantes, profesores y personal de laboratorio de la UIA.

Procedimiento de recolección y análisis de los datos

En esta sección se describen los instrumentos de recolección y análisis de los datos de la presente investigación.

La recolección y análisis de resultados se realizará en la Universidad Internacional de las Américas. En concreto, el diseño y la elaboración de los instructivos se realizan en los laboratorios de química de la carrera de Farmacia. Esto se divide en fases secuenciales, lo cual le confiere un orden lógico a la metodología utilizada en la investigación.

Fase 1: Caracterización del equipo.

Investigar las características y funciones básicas del HPLC del Laboratorio de Química de la UIA; para esto se estudiará el manual del equipo con el objetivo de manipularlo correctamente. (Véase el apéndice C).

Fase 2: Observación del personal involucrado utilizando los equipos sin el instructivo.

Observar a los estudiantes, profesores y personal de laboratorio de Farmacia utilizando el HPLC del Laboratorio de Química de la UIA, sin uso de la guía a implementar, con el fin de verificar cuáles son las deficiencias presentadas para posteriormente elaborar el manual, mediante una hoja de cotejo (Véase el apéndice D).

Fase 3: Consideración de las deficiencias según la hoja de cotejo 1.

Analizar las deficiencias de los estudiantes, profesores y personal de laboratorio, para considerarlas a la hora de confeccionar el instructivo de uso del HPLC.

Fase 4: Realización del instructivo.

Elaborar la guía de uso para el HPLC del Laboratorio de Química de la UIA, contemplando los aportes brindados por los estudiantes, profesores y personal de laboratorio en las fases anteriores.

Fase 5: Evaluación del instructivo.

Evaluar la implementación del instructivo de uso del HPLC en: los estudiantes, profesores y personal de laboratorio, para validar el desempeño al utilizar la guía de uso del HPLC. (Véase el apéndice E).

Fase 6: Valoración de los resultados.

Análisis obtenidos antes y después de la implementación de la guía de uso del HPLC del Laboratorio de Química de UIA.

Para dar seguimiento al avance de la tesis se elabora un cronograma de actividades, el cual se muestra en el Apéndice I.

CAPÍTULO IV: ANÁLISIS DE RESULTADOS

En este capítulo se pretende exponer los diferentes resultados obtenidos a través de la investigación realizada. Para la elaboración de este se tomó en cuenta la implementación de la guía de uso del HPLC con el personal involucrado, así como responder a los objetivos específicos planteados al inicio de la presente investigación.

En relación con el primer objetivo específico: Identificar habilidades básicas para utilizar el equipo de Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC):

Inicialmente, se realiza una exhaustiva revisión bibliográfica sobre: la Cromatografía Líquida como técnica instrumental, la calificación y mantenimiento del HPLC, para un adecuado seguimiento de las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL). Además, se revisa el manual del fabricante para investigar las características y funciones básicas del HPLC, y se recopila la información brindada por un asistente de laboratorio, sobre el uso del HPLC.

El HPLC es un equipo que permite analizar la composición química de los fármacos, y la técnica de análisis se basa en la separación mediante una fase móvil y una fase estacionaria (columna cromatográfica). Tiene las siguientes partes:

Desgasificador: cuya función es eliminar el aire de los solventes usados y así evitar alteraciones en el sistema cromatográfico.

Bomba: su función es bombear la fase móvil o los solventes, los cuales transportan posteriormente la muestra.

Automuestreador: consiste en una bandeja que sostiene el vial con la muestra que se inyecta en el equipo y llega a la columna cromatográfica para que ocurra la separación del componente.

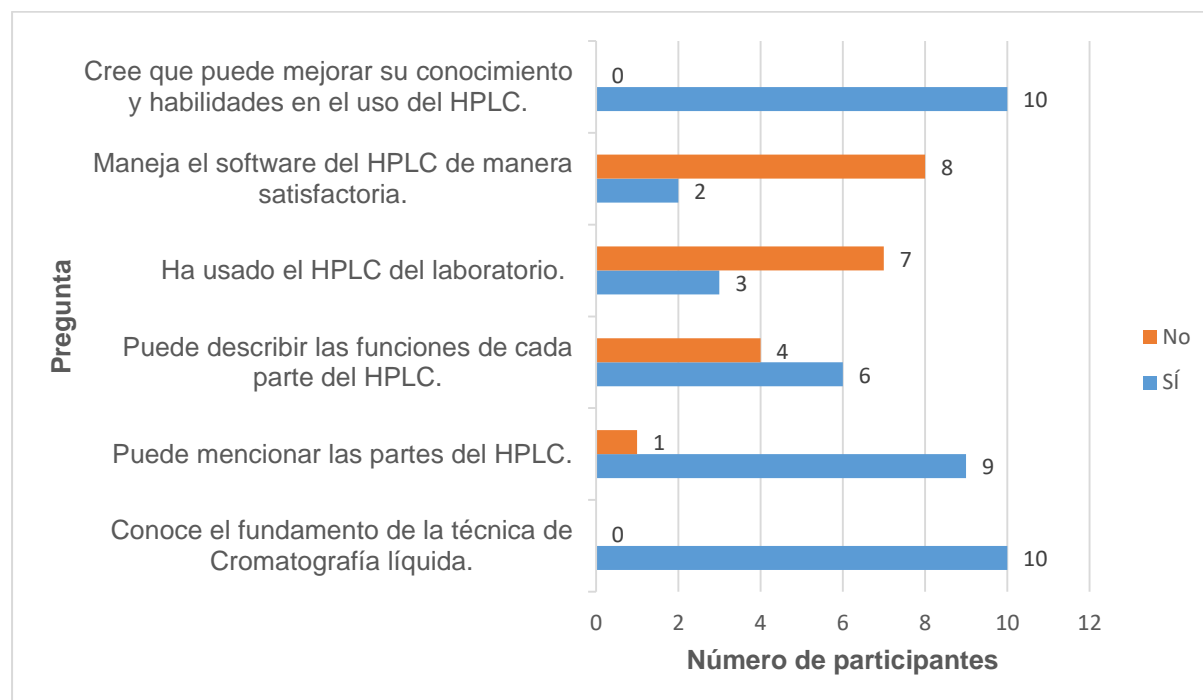
Horno o compartimiento de la columna: soporta la columna y mantiene una determinada temperatura durante el análisis.

Detector: tiene como función detectar la señal química producida durante la separación entre la fase estacionaria y la fase móvil y convertirla en una señal eléctrica, que puede ser integrada y que genera un valor matemático o área bajo la curva.

Software: consiste en el sistema computacional que permite usar el equipo y obtener los resultados del análisis.

Para identificar el nivel de conocimiento y las habilidades requeridas por el personal que está involucrado en la manipulación y uso del HPLC, se realiza una entrevista a los siguientes grupos: estudiantes de análisis de drogas (6 personas), profesor (1 persona) y personal del laboratorio (3 personas). En total, se les aplica la hoja de cotejo 1 (véase el apéndice D) a 10 personas y se obtienen los resultados mostrados en la siguiente figura.

Figura 17. Gráfico sobre conocimiento del HPLC y habilidades de los participantes



Nota: Fuente propia, a partir de los resultados de la hoja de cotejo 1.

Se puede evidenciar que todos los participantes conocen el fundamento de la técnica de Cromatografía Líquida, lo que representa un 100%. Sin embargo, uno de ellos no pudo mencionar todas las partes del HPLC, para un 90% de respuesta.

Además, seis participantes pueden describir las funciones de cada parte del HPLC, que corresponden a tres estudiantes, un profesor y dos auxiliares del laboratorio, lo que corresponde a un 60%.

También se observa que solamente tres personas han usado el HPLC del laboratorio, que representa un 30%. Y únicamente dos personas consideran que manejan el software del HPLC de manera satisfactoria, es decir, un 20%.

Y finalmente, los diez participantes o el 100% creen que puede mejorar su conocimiento y habilidades en el uso del HPLC.

Al analizar los resultados anteriores, se determina la necesidad de elaborar una guía de uso y limpieza del HPLC para los usuarios del Laboratorio de Química de la UIA.

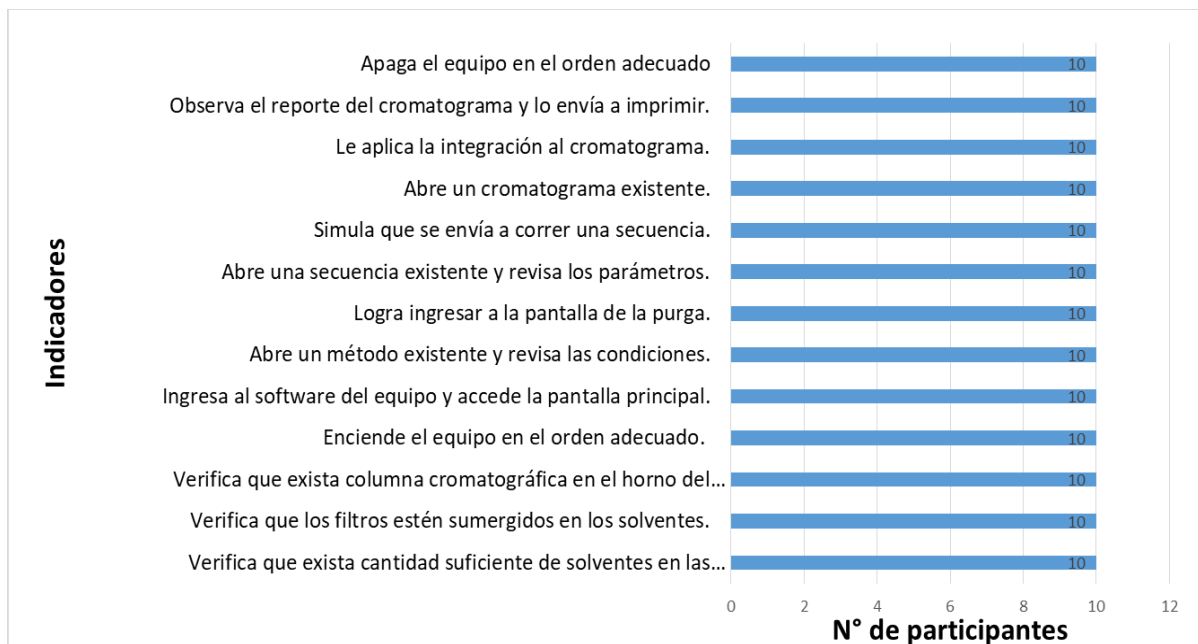
Con respecto al segundo objetivo específico: Diseñar un instructivo de uso y limpieza de un equipo de Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC), se elabora la guía de uso para el HPLC del Laboratorio de Química de la UIA, considerando: revisión del manual del fabricante, la experiencia personal de la autora y los aportes brindados por los estudiantes, profesores y personal de laboratorio en las fases anteriores.

La guía de uso contiene un instructivo de uso y limpieza de un equipo de Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC), y se muestra en el capítulo VI. Propuesta de Guía de uso del Cromatógrafo Líquido YL-CLARITY®.

Para ejecutar el tercer objetivo específico: Validar el desempeño de estudiantes, profesores y personal de laboratorio, después de recibir la capacitación en el uso del equipo de Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC), se utiliza la hoja de cotejo 2 (véase el apéndice E), se les aplica

a las mismas personas que se les aplicó la hoja de cotejo 1, y se obtienen los resultados que se describen en la figura siguiente.

Figura 18. Gráfico sobre desempeño de los participantes posterior a la capacitación de Uso del HPLC



Nota: Fuente propia, a partir de los resultados de la hoja de cotejo 2.

Según el gráfico anterior, se logra evidenciar que el instructivo de uso y limpieza elaborado para el HPLC, permite que todos los participantes logren ejecutar las indicaciones y el procedimiento para el adecuado manejo del equipo. Asimismo, se obtuvo retroalimentación por parte de los participantes, quienes comunican que el instructivo está detallado y sencillo para un manejo accesible y fácil del equipo y su software y, además, que el instructivo sirve como herramienta para que el equipo pueda ser utilizado por los estudiantes y profesores de la carrera de Farmacia, debido a que hasta el momento no había sido aprovechado porque no existía ninguna guía de uso del equipo.

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

En el siguiente capítulo se expondrán, de manera puntual y específica, las principales conclusiones y recomendaciones a las cuales se logró llegar luego de realizar el análisis de los resultados; las mismas responden a los objetivos planteados en la investigación.

Conclusiones

En cuanto a las habilidades básicas para utilizar satisfactoriamente el HPLC, se determinó que el personal involucrado (estudiantes, profesores y personal del laboratorio) posee el conocimiento teórico sobre la técnica instrumental, pero requiere de un instructivo que le permita manipular el equipo y su software adecuadamente.

Asimismo, un instructivo de uso del HPLC permite estandarizar el procedimiento y mantener la configuración recomendada para el equipo, además de optimizar sus funciones y prevenir daños al aparato.

La guía de uso del HPLC es una herramienta para que los docentes enseñen a los estudiantes, y para que el mismo personal del laboratorio pueda capacitar a los profesores que desconocen el uso del equipo.

La existencia de un instructivo de uso de un equipo es de vital importancia para cumplir con las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL), ya que una adecuada gestión de los equipos garantiza la exactitud, la fiabilidad y la puntualidad de los análisis, aspecto fundamental en un sistema de gestión de la calidad.

Para promover la vida útil del HPLC, es necesario el compromiso, por parte de la Universidad, en cuanto al mantenimiento preventivo que requiere el equipo.

La formación académica especializada en temas tecnológicos, como el uso de HPLC, logra que el perfil del futuro farmacéutico sea sobresaliente ante la demanda laboral a nivel industrial.

Se concluye que la elaboración de la guía de uso del HPLC era una necesidad para la Universidad, y que su aporte beneficia de manera estratégica a la carrera de Farmacia.

Recomendaciones

Según la experiencia de la autora en el uso de los equipos de Cromatografía Líquida, estima importante considerar las siguientes indicaciones y cuidados generales, para todo el personal que utilice el equipo:

Filtrar adecuadamente solventes o muestras con filtros de 0.45 o 0.20 μm .

Filtrar semanalmente el agua purificada.

Revisar el estado de los solventes para que no presenten burbujas de aire o turbidez.

Revisar que el filtro se encuentre sumergido dentro de cada botella de solvente.

Mantener las botellas llenas del solvente respectivo y manipularlas adecuadamente, de tal forma que antes de adicionar el solvente se realice un enjuague previo.

Purgar los cuatro canales el tiempo suficiente para garantizar la salida de aire del sistema, y revisar que la purga esté cerrada para empezar el análisis.

Purgar el canal de la fase móvil con agua purificada para eliminar sales de las soluciones amortiguadoras, y luego colocar una unión en el compartimiento de la columna y cerrar la purga, para procurar que todo el sistema, incluyendo el detector, sea limpiado con agua purificada. (Véase el apéndice F).

Colocar adecuadamente la bandeja de viales y revisar la posición de estos, para evitar dañar la aguja del inyector.

Programar siempre el lavado de la columna al finalizar el análisis, para procurar la limpieza de las tuberías y de las columnas, y evitar así el crecimiento bacteriano.

Para el personal del laboratorio, se recomienda implementar un procedimiento del lavado de viales y encender una vez a la semana el equipo para purgar y bombear los solventes, y así procurar que los solenoides de la válvula de proporcionamiento funcionen adecuadamente.

Asimismo, se cree conveniente que el personal del laboratorio realice un mantenimiento mensual y rotación de canales según el uso del equipo para evitar daños. (Véase el apéndice G). Además, ejecutar una verificación semestral para determinar el estado del equipo. (Véase el apéndice H).

Para los profesores, se recomienda que el estudiante sea el que opere el HPLC durante las prácticas de laboratorio, y que el profesor lo supervise y guíe durante la práctica.

Para la Dirección de la Carrera de Farmacia, se recomienda que se fomente el uso de la tecnología, como el HPLC, en otros cursos de la carrera o investigaciones afines a la técnica de análisis instrumental, con el objetivo de que el estudiante utilice la guía de uso elaborada y logre así familiarizarse con estas herramientas, que le sirven de experiencia para su futuro desempeño laboral.

Para la Universidad, se recomienda establecer un programa de mantenimiento mínimo una vez al año, por parte del proveedor del equipo o por una entidad calificada, para garantizar el adecuado funcionamiento del HPLC y procurar que se extienda la vida útil del mismo. Se consideran principalmente las partes móviles del HPLC, como el horno y el detector, que se desgastan con más frecuencia y además, consumibles como: columnas, filtros y lámparas del detector.

Es de suma importancia que el estudiante se familiarice con los aspectos involucrados dentro de un SGC y sobre los lineamientos establecidos en las BPL en general, ya que, ante un escenario laboral en el área industrial, es requisito que el Farmacéutico integre los aspectos relacionados con documentación y normativa; por ejemplo, las normas ISO 17025 y otras. Entonces, se recomienda que el estudiante manipule el equipo y utilice procedimientos, registros de uso, codificaciones y hasta certificados de calibraciones; para que así pueda mejorar su conocimiento sobre esta temática.

CAPÍTULO VI: PROPUESTA DE GUÍA DE USO DEL CROMATÓGRAFO LÍQUIDO YL-CLARITY®

Equipo

El equipo HPLC se encuentra ubicado en el laboratorio de Química de la UIA, tal como se presenta en la figura seguidamente.

Figura 19. Fotografía del HPLC, marca: YL. modelo: YL 9100



Nota: Foto tomada por la autora (febrero, 2019).

Introducción

El Cromatógrafo Líquido de Alta Eficacia (HPLC) es un equipo complejo y de alta precisión, que se utiliza ampliamente en la industria farmacéutica para el análisis y cuantificación de drogas.

El manejo de esta técnica de análisis instrumental es importante para el perfil de un farmacéutico en el área industrial, ya que es una herramienta utilizada habitualmente en las industrias farmacéuticas, en áreas como control de calidad e investigación y desarrollo.

En el uso de un Cromatógrafo Líquido están involucrados: estudiantes, personal de laboratorio y profesores, a nivel académico y además, profesionales farmacéuticos, quienes obtienen beneficios laborales al aplicar sus conocimientos sobre este equipo.

El personal que manipule el HPLC debe conocer la diferencia entre calibración y calificación del equipo. Por lo tanto, la calibración se define como un conjunto de operaciones que establecen, bajo condiciones especificadas, la relación entre los valores indicados por un instrumento con los correspondientes valores conocidos de un estándar de referencia. Deben establecerse los límites de aceptación de los resultados de la medición. Asimismo, la calificación de equipos consiste en la acción de probar y documentar que cualquier equipo analítico cumple con las cinco especificaciones requeridas y funciona adecuadamente para su uso previsto. (OMS, 2010, p. 4).

Objetivos Instrumentales


Como objetivos instrumentales se consideran los siguientes:

- Aplicar la técnica de uso del Cromatógrafo líquido de Alta Eficacia (HPLC) a procesos educativos.
- Manipular el Cromatógrafo Líquido de Alta Eficacia (HPLC).
- Ejecutar análisis básicos de drogas.

Instructivo de Uso

A continuación, se detalla el documento de tipo instructivo para el Cromatógrafo Líquido de Alta Eficacia (HPLC), marca YL, el cual incluye los siguientes apartados: encabezado, objetivo, alcance, responsable, frecuencia, definiciones, equipos y materiales, procedimiento, documentos relacionados y anexos.

Tabla 14. Encabezado del instructivo

Universidad Internacional de las Américas	
Instructivo	
Título: Uso y limpieza del Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución marca YL	Rige desde: Mayo, 2019
	Página: 114 de 49
Realizado por: Angélica Quesada Vargas	Reemplaza a: Ninguno

1. OBJETIVO

1.1 Establecer un procedimiento para el uso correcto del Cromatógrafo Líquido de Alta Presión marca YL, con el fin de mantenerlo en óptimas condiciones y cumplir con las Buenas Prácticas de Laboratorio.

2. ALCANCE

2.1 Aplica al Cromatógrafo Líquido de Alta Presión marca YL, modelo: YL-9100, ubicado en el laboratorio de Química de la Universidad Internacional de las Américas (UIA).

3. RESPONSABLES

3.1 Del uso y limpieza: los estudiantes, profesores y el personal de laboratorio de la UIA.

3.2 De la supervisión: profesores y el personal de laboratorio de la UIA.

4. FRECUENCIA

4.1 Cada vez que se utilice el equipo.

5. DEFINICIONES

- 5.1 Aparato (HPLC):** un cromatógrafo líquido consta de un recipiente que contiene la fase móvil, una bomba para forzar el paso de la fase móvil a través del sistema a alta presión, un inyector para introducir la muestra en la fase móvil, una columna cromatográfica, un detector y un dispositivo de recolección de datos.
- 5.2 Automuestreador:** consiste en una bandeja que sostiene el vial con la muestra que se inyecta en el equipo, y llega a la columna cromatográfica para que ocurra la separación del componente.
- 5.3 Bomba:** su función es bombear la fase móvil o los solventes, los cuales transportan posteriormente la muestra. Existen de dos tipos: isocrática (un solo canal de fase móvil) o cuaternaria (de cuatro canales).
- 5.4 Calificación de la instalación (IQ, por sus siglas en inglés):** consiste en la ejecución de pruebas para asegurar que los equipos analíticos usados en un laboratorio están instalados correctamente y operan de acuerdo con las especificaciones establecidas.
- 5.5 Calificación del desempeño (PQ, por sus siglas en inglés):** consiste en la verificación documentada de que un equipo analítico opera consistentemente y da reproducibilidad dentro de los parámetros y especificaciones definidas durante períodos prolongados.
- 5.6 Calificación del diseño (DQ, por sus siglas en inglés):** consiste en la verificación documentada de actividades que definen las especificaciones operacionales y funcionales del equipo o instrumento y criterios para la selección del vendedor, basándose en el uso previsto del equipo o instrumento.
- 5.7 Calificación operativa (OQ, por sus siglas en inglés):** consiste en la verificación documentada de que el equipo analítico se desempeña según lo planeado en todos los intervalos de operación previstos.
- 5.8 Columna Cromatográfica:** incluye columnas de acero inoxidable, de acero inoxidable con recubrimiento interno y poliméricas, rellenas con una fase estacionaria en la cual se da la separación de compuestos.
- 5.9 Compartimiento de la columna u horno:** soporta la columna y mantiene una determinada temperatura durante el análisis.
- 5.10 Cromatografía líquida:** es una técnica de separación basada en una fase estacionaria sólida y una fase móvil líquida.

- 5.11 Cromatograma:** es una representación gráfica de la respuesta del detector, concentración de analito en el efluente u otra cantidad usada como una medida de concentración del efluente en función del volumen de efluente o del tiempo.
- 5.12 Desgasificador:** parte del HPLC cuya función es eliminar el aire de los solventes usados, y así evitar alteraciones en el sistema cromatográfico.
- 5.13 Detector:** tiene como función detectar la señal química, producida durante la separación entre la fase estacionaria y la fase móvil, y convertirla en una señal eléctrica, que puede ser integrada, que genera un valor matemático o área bajo la curva.
- 5.14 Elución en Gradiente:** es una programación del disolvente a la técnica de cambiar continuamente la composición del disolvente durante la cromatografía. El perfil de elución en gradiente se presenta en la monografía individual como una tabla de gradientes, que indica el tiempo y la composición proporcional de la fase móvil en el tiempo indicado.
- 5.15 Eventos de integración:** son parámetros que definen la integración de un pico cromatográfico, para definir el área que se va a cuantificar. Por ejemplo, un rango de tiempo para la integración.
- 5.16 Factor de Retención (k):** es un parámetro de desempeño que se conoce como el factor de capacidad (k'). Se define como: $k = \frac{\text{tiempo de la sustancia en la fase estacionaria}}{\text{tiempo de la sustancia en la fase móvil}}$.
- 5.17 Fase Estacionaria:** las separaciones se logran por procesos de partición, adsorción o intercambio iónico, según el tipo de fase estacionaria empleada. Las fases estacionarias más comúnmente usadas son la sílice modificada o las microperlas de polímero. Es el contenido de las columnas.
- 5.18 Fase Móvil:** es un disolvente o mezcla de disolventes, según se define en la monografía individual.
- 5.19 Flujo:** la relación de volumen entre tiempo que representa la velocidad de transporte de los solventes en las tuberías.
- 5.20 Integración:** es la cuantificación del área bajo la curva del pico cromatográfico.
- 5.21 Loop:** es el volumen de inyección de la muestra de análisis.
- 5.22 Número de Platos Teóricos (N):** es una medida de eficiencia de la columna. El valor de N depende de la sustancia cromatografiada, así como de las condiciones operativas,

tales como la velocidad de flujo y la temperatura de la fase móvil o gas transportador, la calidad del relleno, la uniformidad del relleno dentro de la columna.

- 5.23 Parámetros de análisis o método:** son los valores que especifica en método de análisis, como: temperatura, flujo, longitud de onda, loop, tipo de columna y proporción de fase móvil.
- 5.24 Parámetros de desempeño:** son parámetros del buen funcionamiento de la columna entre ellos: Factor de Retención (k), Número de Platos Teóricos (N), Resolución (R) y asimetría.
- 5.25 Pico cromatográfico:** es la porción del cromatograma que registra la respuesta del detector cuando un componente individual eluye de la columna. Si la separación es incompleta, se puede registrar la elución de dos o más componentes como un pico no resuelto.
- 5.26 Resolución (R):** es la separación de dos componentes en una mezcla.
- 5.27 Retención Relativa (r):** es el cociente entre el tiempo de retención ajustado de un componente y el de otro usado como referencia obtenido en condiciones idénticas.
- 5.28 Relación Pico/Valle (p/v):** la p/v se puede emplear como un criterio de aptitud del sistema en una prueba de sustancias relacionadas cuando no se logra la separación entre dos picos en la línea base.
- 5.29 Ruido:** es cualquier perturbación generada por la señal del detector y que no es originada por la salida del soluto de la columna.
- 5.30 Simetría:** es un rasgo característico tipo espejo que presenta un pico al dividirse en dos. La unidad es el valor que adquiere para picos perfectamente simétricos.
- 5.31 Tiempo Muerto (t_M):** es el tiempo requerido para la elución de un componente no retenido (mostrado como un pico de aire o de componente no retenido, con la escala de la línea base en minutos).
- 5.32 Tiempo de Retención (t_R):** es el tiempo transcurrido entre la inyección de la muestra y la aparición de la respuesta máxima. Se puede usar t_R como un parámetro para identificación.
- 5.33 Vial:** es el contenedor de la muestra de análisis con capacidad de aproximadamente dos mL.

5.34 Volumen Muerto (VM): es el volumen de fase móvil requerido para eluir un componente no retenido.

5.35 Volumen de Residencia (D): es el volumen entre el punto en el que se encuentran los eluyentes y la entrada de la columna.

5.36 Volumen de Retención (VR): el volumen de retención es el volumen de fase móvil requerido para la elución de un componente.

6. EQUIPOS Y MATERIALES

6.1 Agua purificada.

6.2 Alcohol.

6.3 Acetonitrilo grado HPLC.

6.4 Metanol grado HPLC.

6.5 Pañuelos Kleenex.

6.6 Reactivos utilizados según el método.

6.7 Isopropanol al 10% v/v en agua purificada.

7. PROCEDIMIENTO

7.1 Uso del Cromatógrafo Líquido de Alta Presión

Figura 20. Descripción del equipo



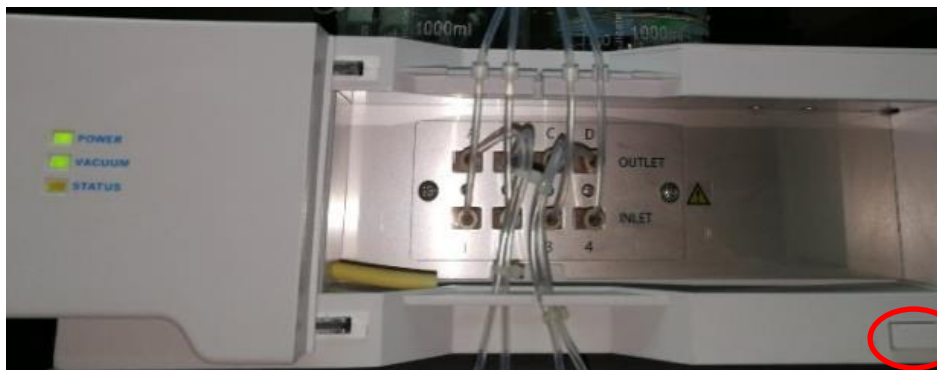
Nota: Foto tomada por la autora (febrero, 2019).

7.1.1 Algunas recomendaciones generales son:

- 7.1.1.1 Anotarse en la bitácora de uso del equipo HPLC.
- 7.1.1.2 Filtrar adecuadamente solventes o muestras con filtros de 0.45 o 0.20 μm .
- 7.1.1.3 No abrir el automuestreador cuando se realiza la inyección.
- 7.1.1.4 Colocar adecuadamente la bandeja de viales y revisar su posición (debe estar de izquierda a derecha si así lo asignó en el método en METHOD SETUP). (Véase la figura 25).
- 7.1.1.5 Evitar derrames dentro del automuestreador o cerca del equipo.
- 7.1.1.6 No cambiar la configuración del equipo a menos que se tenga autorización.
- 7.1.1.7 Consultar cualquier cambio a realizar.
- 7.1.1.8 Revisar que la purga está cerrada para empezar el análisis. (Véase la figura 13).
- 7.1.1.9 Informar si el recipiente de residuos está lleno.
- 7.1.1.10 Evitar la manipulación de los frascos de solventes, en caso contrario, informar y etiquetar el cambio.
- 7.1.1.11 Seguir las instrucciones del profesor o auxiliar del laboratorio al realizar el análisis.
- 7.1.1.12 Informar cualquier inconveniente con el equipo a los encargados del laboratorio.
- 7.1.1.13 Trabajar de forma ordenada.
- 7.1.1.14 No olvidar programar el lavado de la columna.
- 7.1.1.15 Manipular el equipo cuidadosamente.
- 7.1.1.16 Verificar visualmente el estado del equipo.

7.1.2 Partes del equipo:

- 7.1.2.1 Desgasificador de Vacío YL9101: que cumple con las siguientes características: número de canales: 4; caudal máximo: 10 ml/min por canal > 0 ~ 2.0 ml/min por canal para 70% de gas eliminado de metanol; volumen interno por canal: 925 μL por canal y materiales en contacto con solvente: Teflón AF y PEEK.

Figura 21. Desgasificador

Nota: Foto tomada por la autora (febrero, 2019).

- 7.1.2.2 Bomba cuaternaria YL9110: que cumple con las siguientes características: principio de operación (bomba de doble émbolo paralelo gradiente de baja presión), número de solventes: hasta 4 disolventes, formación de gradiente: válvula mezcladora de 4 canales, precisión de la composición: $<0.1\%$ y exactitud de la composición: $<0.5\%$

Figura 22. Bomba

Nota: Foto tomada por la autora (febrero, 2019).

- 7.1.2.3 Detector UV/Vis YL9120: rango de longitud de onda: 190-900 nm, velocidad de recolección de datos: hasta 50Hz, fuente de luz: lámpara de deuterio y lámpara de tungsteno, nivel de ruido: $<\pm 0.5 \times 10^{-5}$ AU, 254 nm, celda seca, deriva: $<1 \times 10^{-4}$

AU/hr, ancho de banda: 5,5 nm, precisión de la longitud de onda: ± 1 nm, precisión de longitud de onda: ± 0.1 nm, linealidad: $> 99.5\%$ para 2.5 AU (acetona, 254 nm), longitud del recorrido: 10 mm (celda analítica) y volumen de celda: 10 μL (celda analítica).

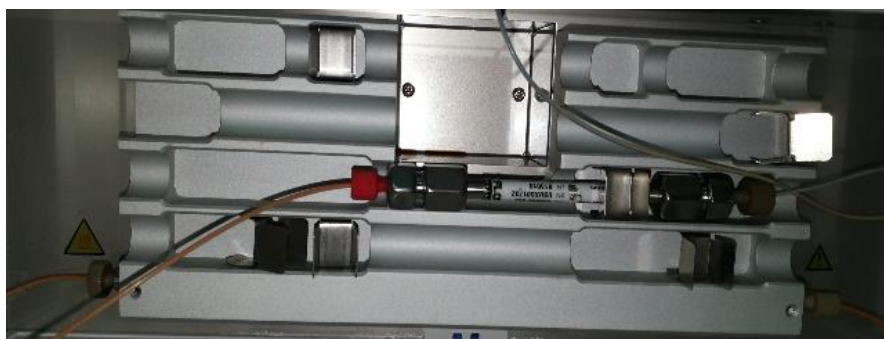
Figura 23. Detector



Nota: Foto tomada por la autora (febrero, 2019).

7.1.2.4 Horno o compartimiento de columna YL9131: rango de temperatura: 4°C (enfriamiento) - 90°C, estabilidad a la temperatura: $\pm 0.05^\circ\text{C}$, precisión de la temperatura: $\pm 0.5^\circ\text{C}$, programas de temperatura: 40 pasos, capacidad de columna: máximo. OD 18 mm, tiempo de calentamiento: 16 minutos de 4°C a 90°C, tiempo de enfriamiento: 13 minutos de 90°C a 4°C.

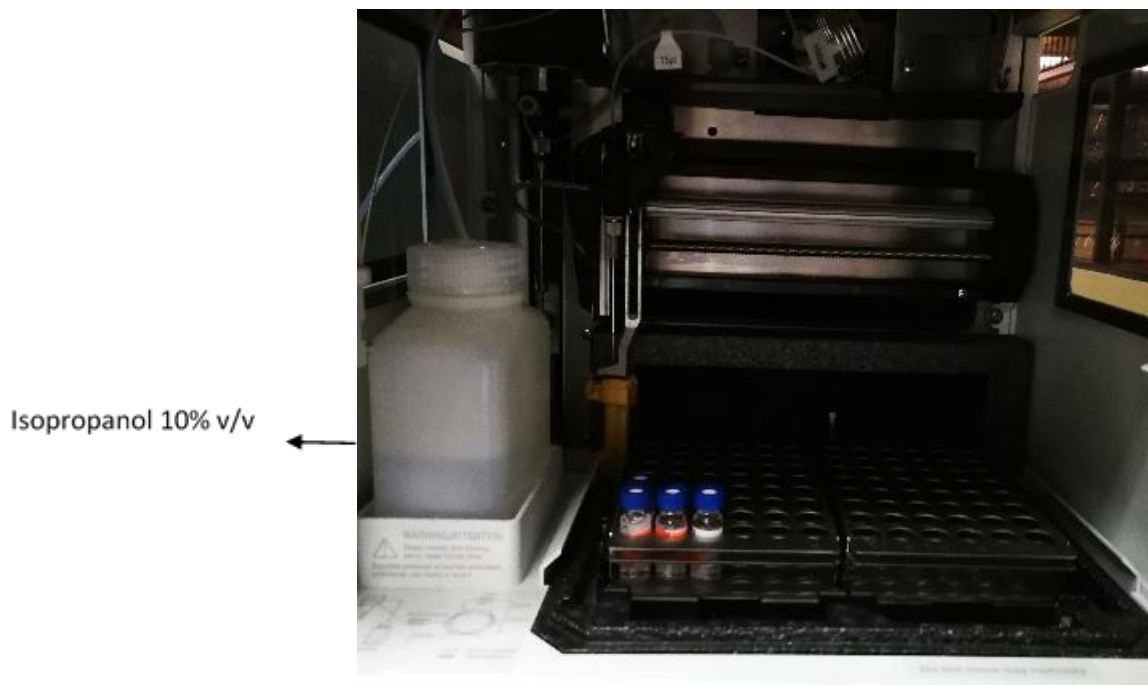
Figura 24. Compartimiento de columna



Nota: Foto tomada por la autora (febrero, 2019).

- 7.1.2.5 Automuestreador YL9150: volumen de bucle: 1-9999 μL programable, reproducibilidad: $\text{RSD} \leq 0.3\%$ para inyecciones de bucle completo, $\text{RSD} \leq 0.5\%$ para inyecciones de relleno parcial, $\text{RSD} \leq 1.0\%$ para inyecciones de pastillas μL y opción de enfriamiento/calentamiento: $4^\circ\text{C} \sim 40^\circ\text{C}$.

Figura 25. Automuestreador



Nota: Foto tomada por la autora (febrero, 2019).

7.1.3 Encendido del equipo:

7.1.4 Conecte el equipo a la fuente de poder.

7.1.5 Revise que las botellas estén limpias y llénelas con sus respectivos solventes; revise que los filtros de cada botella estén colocados y sumergidos; en caso de que los filtros no estén limpios sonifique por un periodo de 30 min con Isopropanol al 10% v/v en agua purificada. Además, llene la botella de lavado de sellos con una mezcla de isopropanol al 10% en agua. (Véase la figura 25).

- 7.1.6 Coloque la fase móvil y los diferentes solventes debidamente filtrados y desgasificados, introduciendo lentamente dentro de las botellas la tubería que tiene el filtro; coloque las tapas o de ser necesario utilice papel parafilm.
- 7.1.7 Conecte la columna de la siguiente manera: enrosque cuidadosamente los conectores en la salida y la entrada de la columna. Colóquela con la flecha de flujo en dirección del flujo que sigue la bomba del equipo HPLC. Prese firmemente la columna al soporte.
- 7.1.8 Encienda el equipo respetando el siguiente orden: desgasificador, bomba, detector, compartimiento de columna y automuestreador; para ello presione el botón a la derecha de cada módulo (véase el círculo rojo en la figura 2) y en caso del automuestreador presione el botón que se encuentra en la parte posterior del módulo (véase la figura 26).
- 7.1.9 Para detallar el procedimiento de encendido, véase el anexo 9.1.

Figura 26. Botón de encendido/apagado del automuestreador



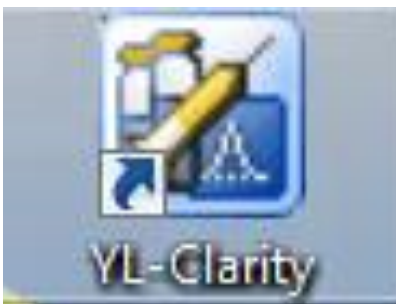
Nota: Foto tomada por la autora (febrero, 2019).

7.1.10 Espere que todos los módulos enciendan y espere unos 5 minutos para encender la computadora.

7.2 Acceso al software (Clarity®):

7.2.1 Una vez que el equipo esté encendido por completo, ingrese al sistema de la siguiente manera: en el escritorio aparecerá el ícono del software Clarity® (véase la figura 27), con el cual se ingresa al software del equipo.

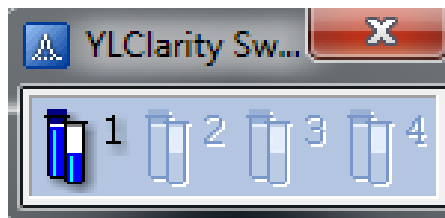
Figura 27. Ícono del software Clarity®



Nota: [Captura de pantalla] software Clarity® tomada por la autora (febrero, 2019).

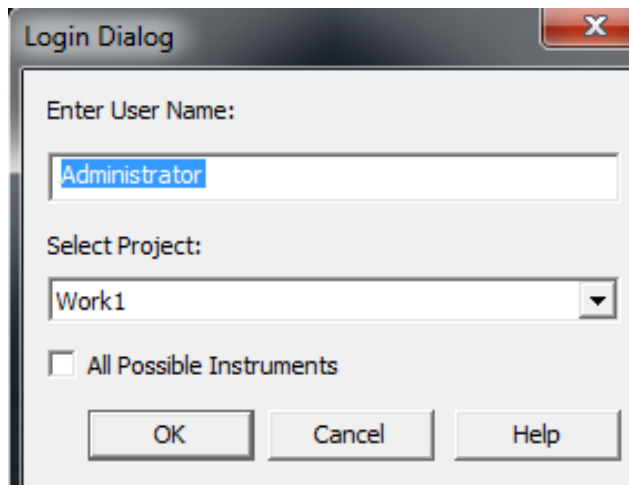
7.2.2 Al ingresar al ícono YL-Clarity, aparecerá una pequeña ventana que se abre presionando la opción 1 (véase la figura 28).

Figura 28. Ventana equipo 1



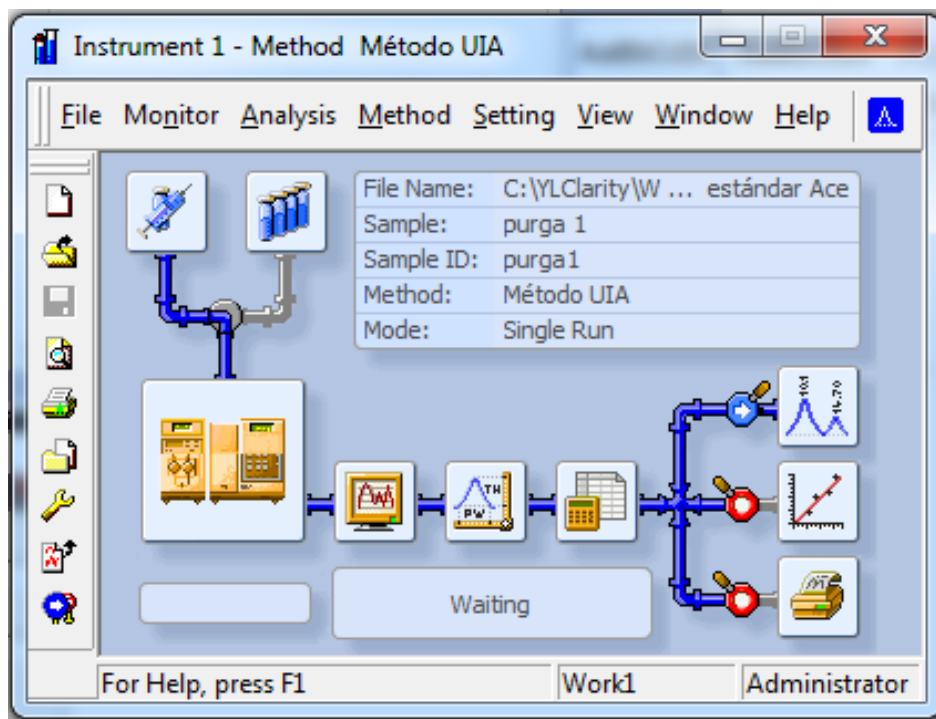
Nota: [Captura de pantalla] software Clarity® tomada por la autora (febrero, 2019).

7.2.3 Luego aparecerá un cuadro de diálogo, tal como se observa en la figura 29. Presione OK.

Figura 29. Cuadro de diálogo de ingreso

Nota: [Captura de pantalla] software Clarity® tomada por la autora (febrero, 2019).

7.2.4 Posteriormente se abre la ventana principal del software (véase la figura 30). donde se pueden realizar diferentes funciones.

Figura 30. Ventana principal del software Clarity®

Nota: [Captura de pantalla] software Clarity® tomada por la autora (febrero, 2019).

- 7.2.5 Para preparar el equipo para la purga, coloque agua purificada y filtrada en el canal de la Fase móvil; desconecte la columna y recolecte los desechos en un beaker, tal como se muestra en la figura 31.

Figura 31. Recolección de desechos de la purga



Nota: Foto tomada por la autora (febrero, 2019).

- 7.2.6 Abra la purga un cuarto de vuelta en sentido antihorario de las manecillas del reloj (véase la figura 32).

Figura 32. Movimiento adecuado de la válvula de la purga



Nota: Foto tomada por la autora (febrero, 2019).


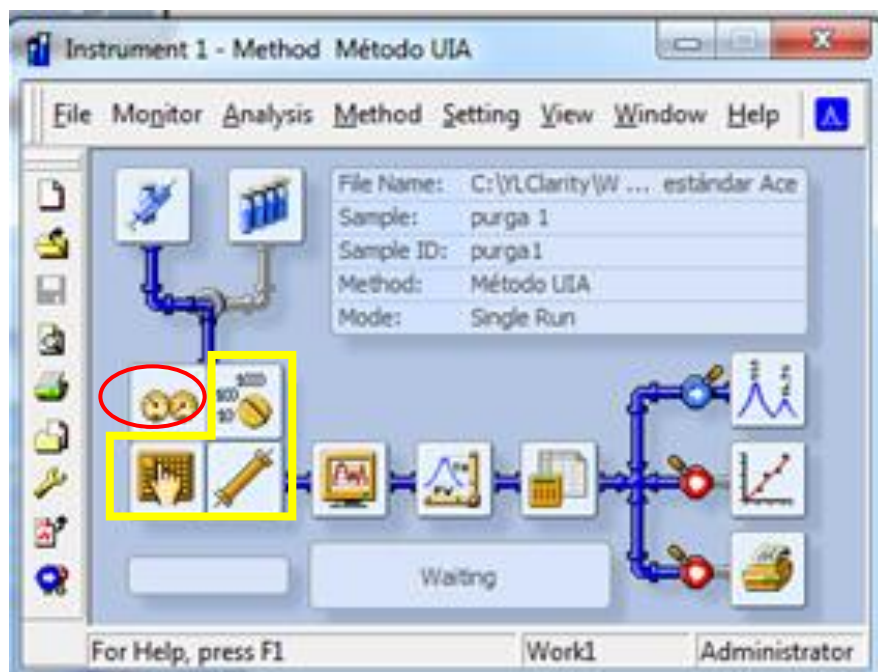
7.2.7 Para ejecutar la purga del equipo seleccione el ícono  de la pantalla principal de la figura 33. (Véase el círculo rojo).

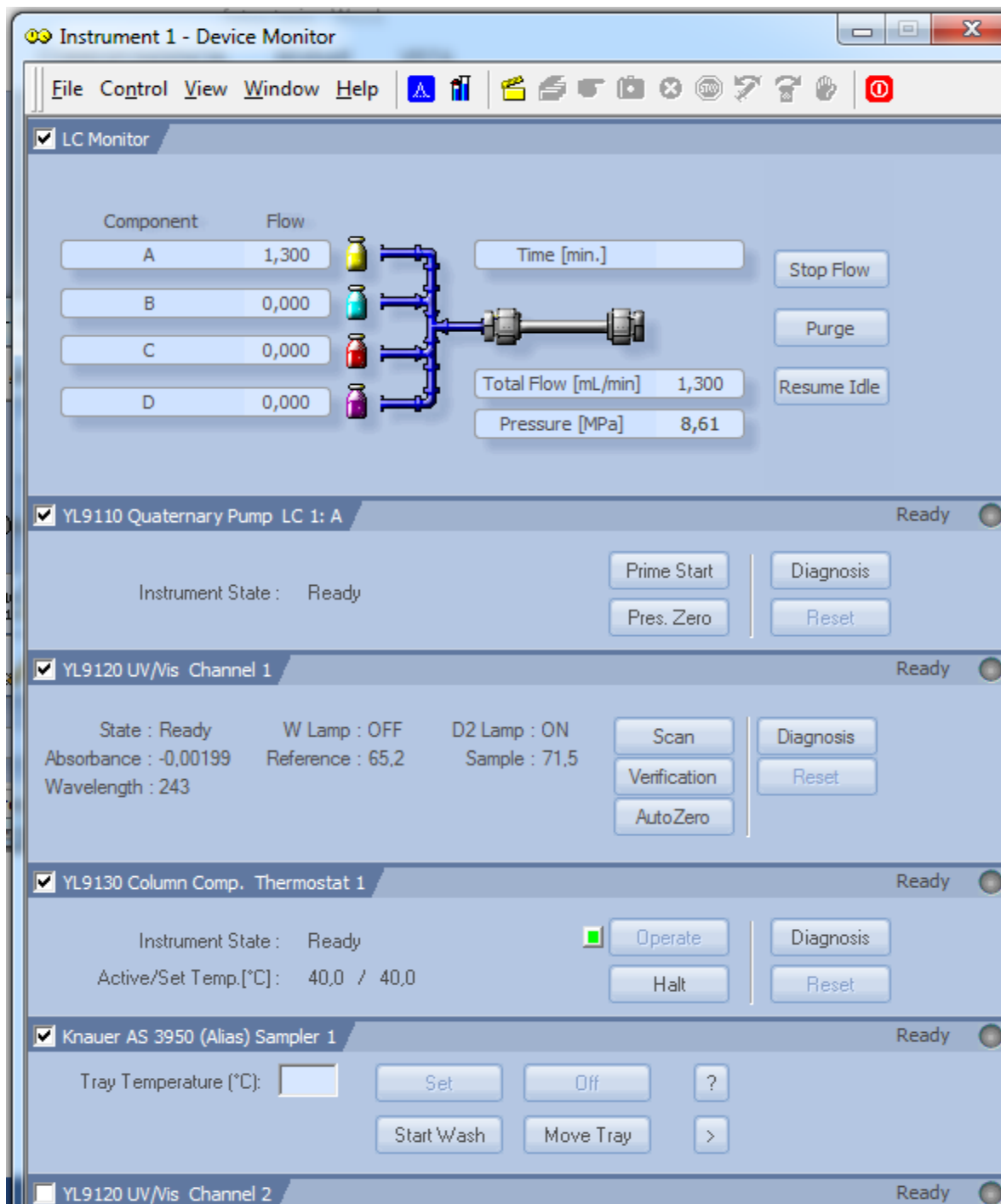
Figura 33. Ventana principal del software Clarity®



Nota: [Captura de pantalla] software Clarity® tomada por la autora (febrero, 2019).

7.2.8 Aparece la ventana de la figura 34 (DEVICE MONITOR), en la cual se presiona el botón PURGE.

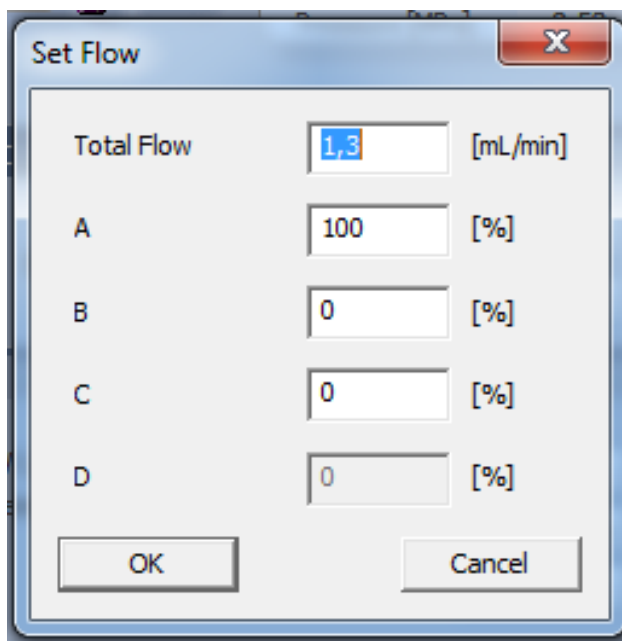
Figura 34. Ventana principal del monitoreo del equipo



Nota: [Captura de pantalla] software Clarity® tomada por la autora (febrero, 2019).

7.2.9 Aparece el cuadro de diálogo y se seleccionan los porcentajes (%) de cada solvente y el flujo deseado (véase la figura 35) y presiona OK.

Figura 35. Ventana principal del monitoreo del equipo



Nota: [Captura de pantalla] software Clarity® tomada por la autora (febrero, 2019).

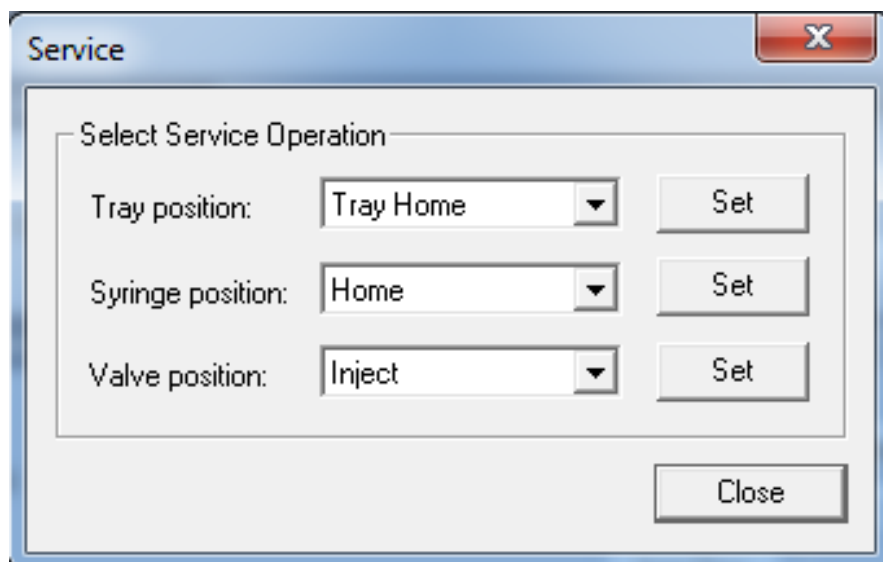
7.2.10 Espere que se purguen los canales a un flujo de 1,5 ml/min por no menos de 15 minutos por canal, y cuando desee terminar presione STOP FLOW, como en la figura 34.

7.2.11 Después de purgar los canales adecuadamente cierre la purga girando la válvula hacia la derecha (regresando en sentido de las manecillas del reloj). (Véase la figura 32).

7.2.12 En el módulo de la bomba de la figura 34, la opción PRIME START permite hacer una purga. Además, se puede hacer un diagnóstico (DIAGNOSIS) y cambiar la presión a cero (PRES. ZERO).

- 7.2.13 En el módulo del detector de la figura 34, la opción AUTOZERO lleva la línea base a cero en la lectura del detector. Además, se puede hacer un diagnóstico (DIAGNOSIS), verificación (VERIFICATION) y un escaneo del funcionamiento (SCAN).
- 7.2.14 En el módulo del compartimiento de la columna de la figura 34 se indica, en color verde, que el horno está encendido y si desea detenerlo presiona HALT. Cuando está apagado aparece un cuadro rojo y para encenderlo se presiona OPERATE.
- 7.2.15 En el Automuestreador se le puede asignar una temperatura a la bandeja de las muestras. Además, se puede mover la bandeja (MOVE TRAY) para cargar los viales y luego volverla a su posición para la inyección o iniciar la limpieza del inyector (STAR WASH). En el icono de la flecha junto a MOVE TRAY se puede configurar la operación del Automuestreador. Sin embargo, debe permanecer como se muestra en la figura 36.

Figura 36. Cuadro de diálogo del Automuestreador



Nota: [Captura de pantalla] software Clarity® tomada por la autora (febrero, 2019).


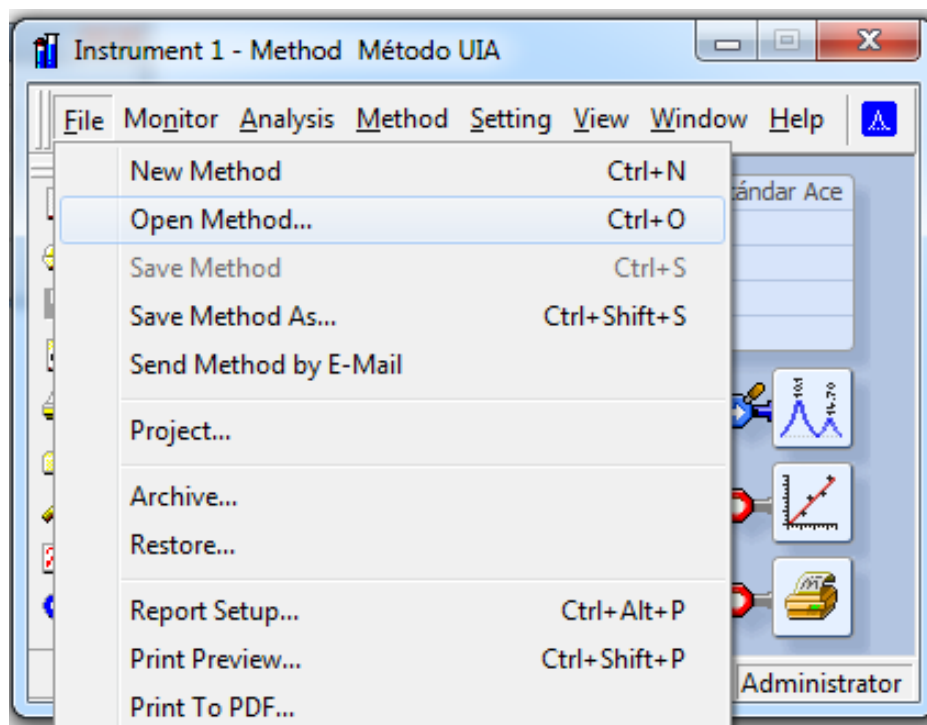
7.2.16 Para acceder un método existente se presiona el fólder amarillo en la barra de la izquierda  o desde FILE/OPEN METHOD en la figura 37, el cual se abre y aparece la información en el cuadro de la figura 33. Además, aparece el estado del método (WAITING O RUNNING).

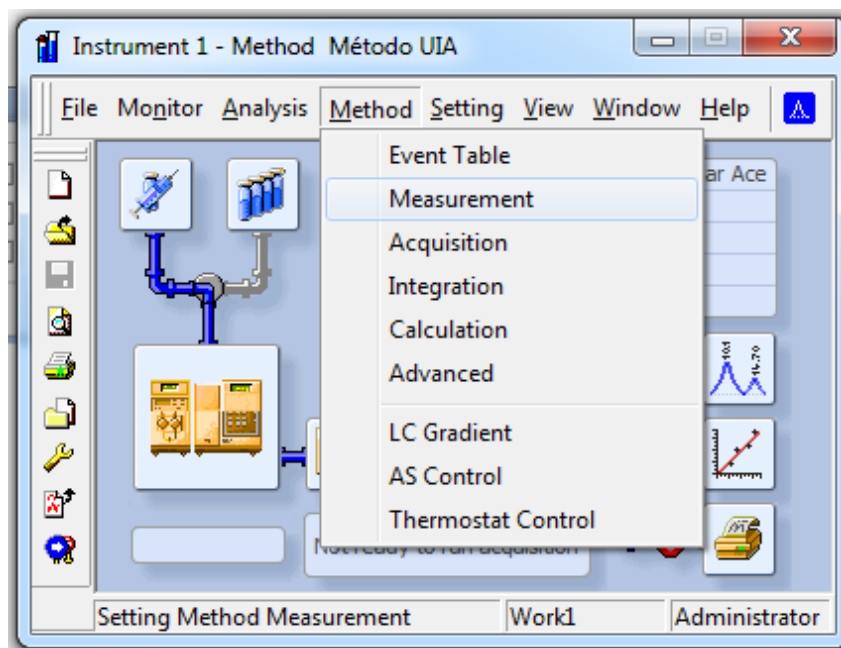
Figura 37. Pantalla para abrir un método



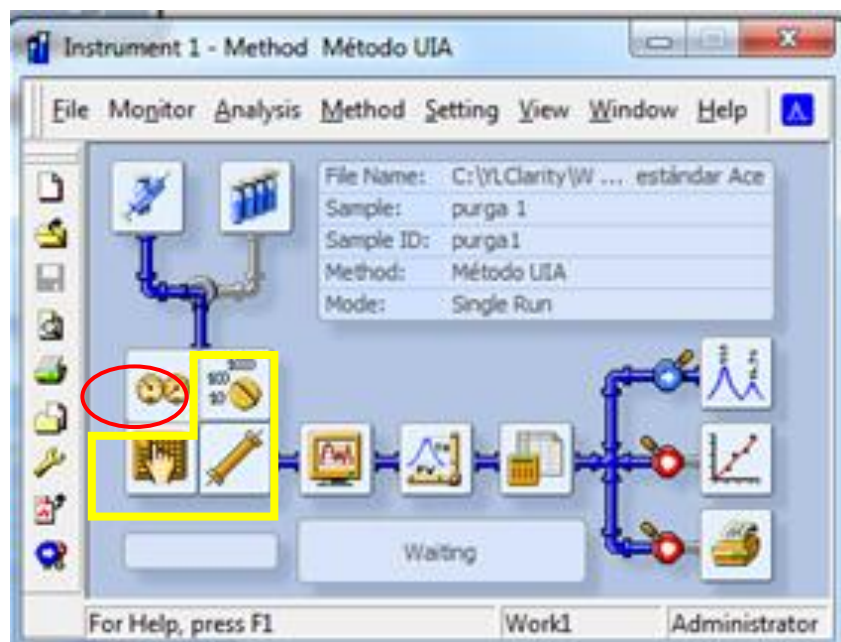
Nota: [Captura de pantalla] software Clarity® tomada por la autora (febrero, 2019).

7.2.17 Para modificar un método existente se procede según el punto anterior. Se abre y se guarda con el nombre del nuevo método en FILE/SAVE METHOD AS. Posteriormente se puede modificarlo según su conveniencia.

7.2.18 Para realizar las modificaciones del método se abre la configuración del método (METHOD SETUP) usando en la pestaña METHOD en la barra superior de la pantalla inicial y seleccionando MEASUREMENT (véase la figura 38) o presionando cualquiera de los tres iconos encerrados en forma amarilla de la figura 33.

Figura 38. Acceso a método desde barra de herramientas de ventana principal

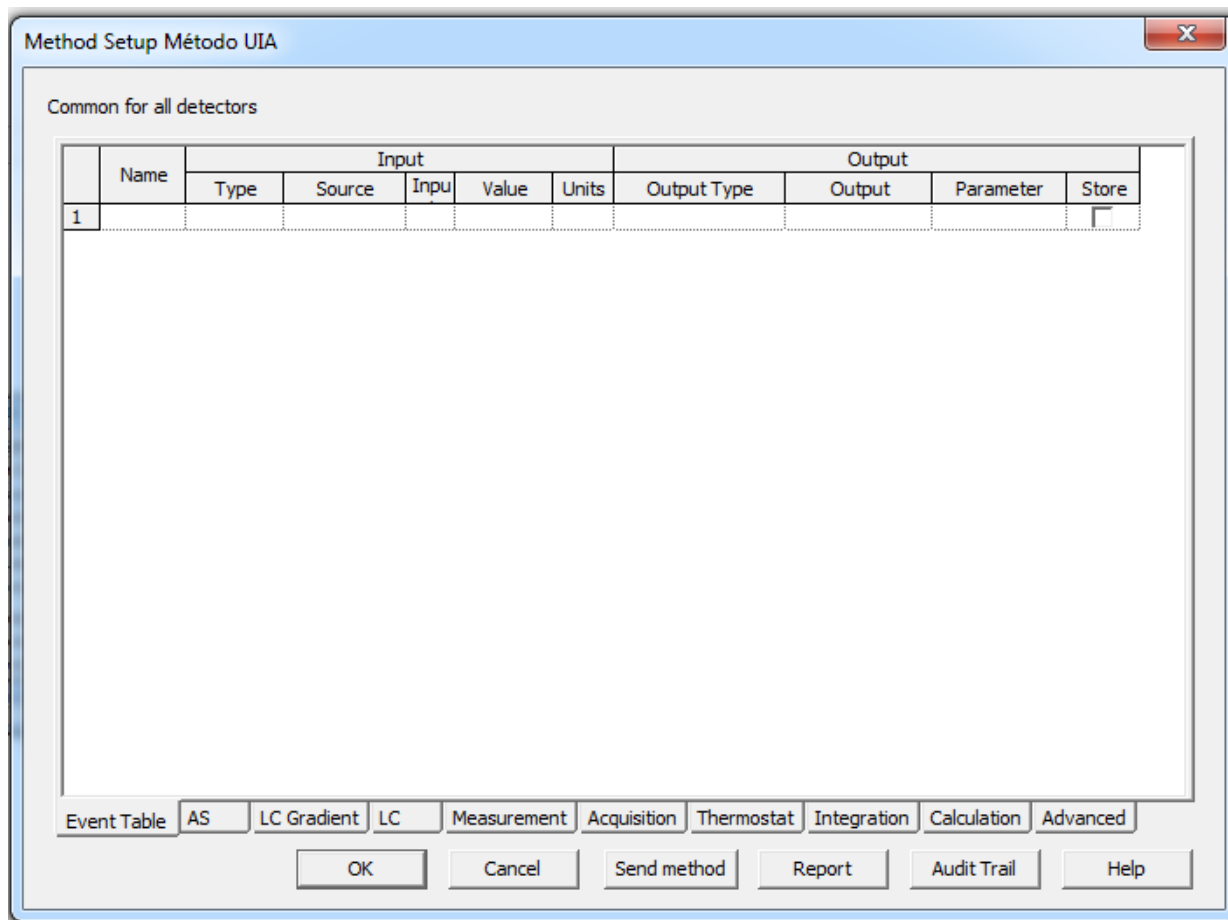
Nota: [Captura de pantalla] software Clarity® tomada por la autora (febrero, 2019).

Figura 33. Ventana principal del software Clarity®.

Nota: [Captura de pantalla] software Clarity® tomada por la autora (febrero, 2019).

7.2.19 En ambos casos se abre la ventana de la figura 39, en la cual se establecen las condiciones de método.

Figura 39. Ventana de la configuración del método (Method Setup)



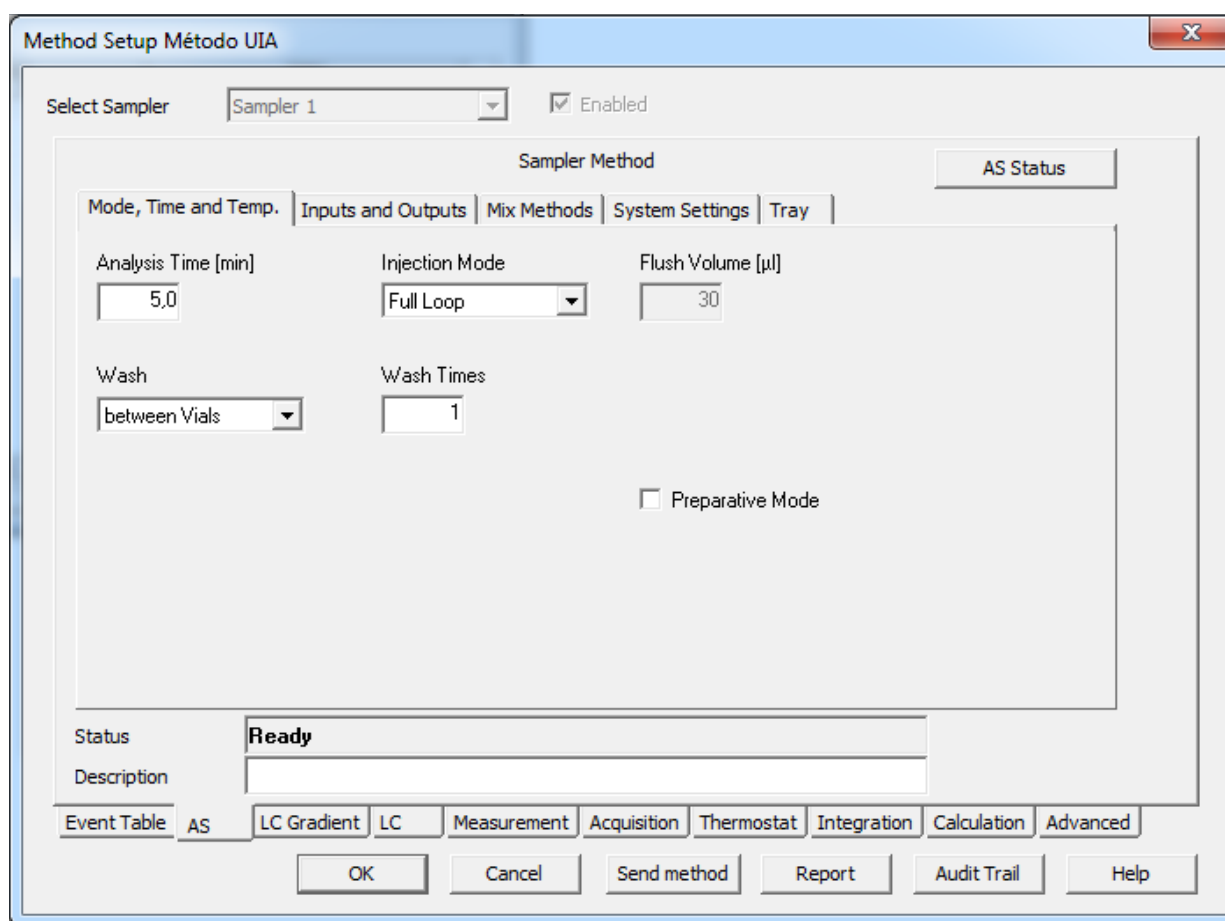
Nota: [Captura de pantalla] software Clarity® tomada por la autora (febrero, 2019).

7.2.20 Se va a revisar y actualizar cada pestaña de la parte inferior de la figura anterior (figura 39), de izquierda a derecha.

7.2.21 En EVENT TABLE las opciones de configuración se mantienen según se muestra en la figura 39.

7.2.22 En AS o Autosampler (automuestreador), en la pestaña MODE, TIME AND TEMP, se establece su tiempo de análisis (Analysis Time), se selecciona en INYECTION MODE: Full Loop, en WASH: between Vials y en WASH TIME: 1. (Véase la figura 40).

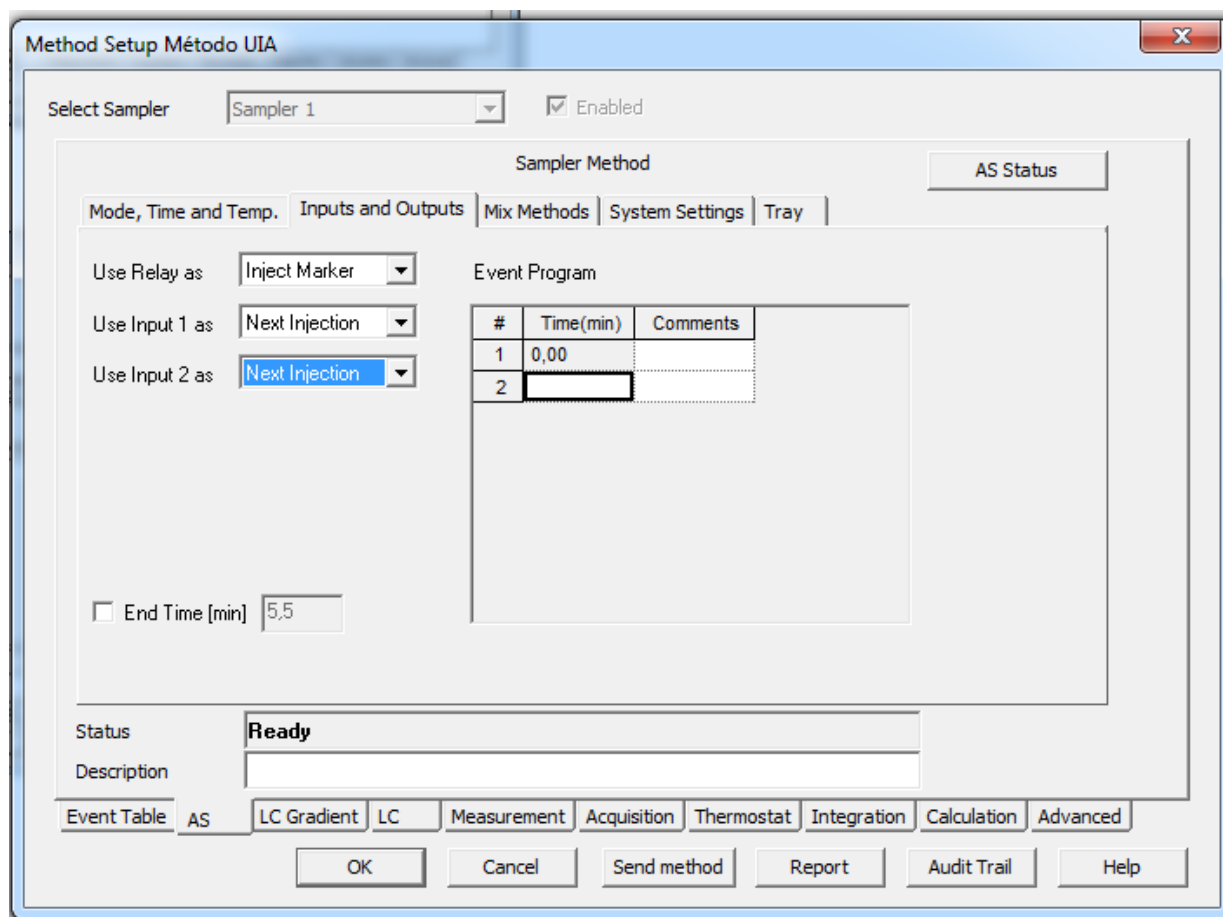
Figura 40. Automuestreador (AS)/MODE, TIME AND TEMP



Nota: [Captura de pantalla] software Clarity® tomada por la autora (febrero, 2019).

7.2.23 En AS o Autosampler (automuestreador), en la pestaña INPUTS AND OUTPUTS, se selecciona USE RELAY AS: Inject Marker, USE INPUT 1 AS: Next injection y USE INPUT 2 AS: Next injection. Las restantes opciones de configuración se mantienen, según se muestra en la figura 41.

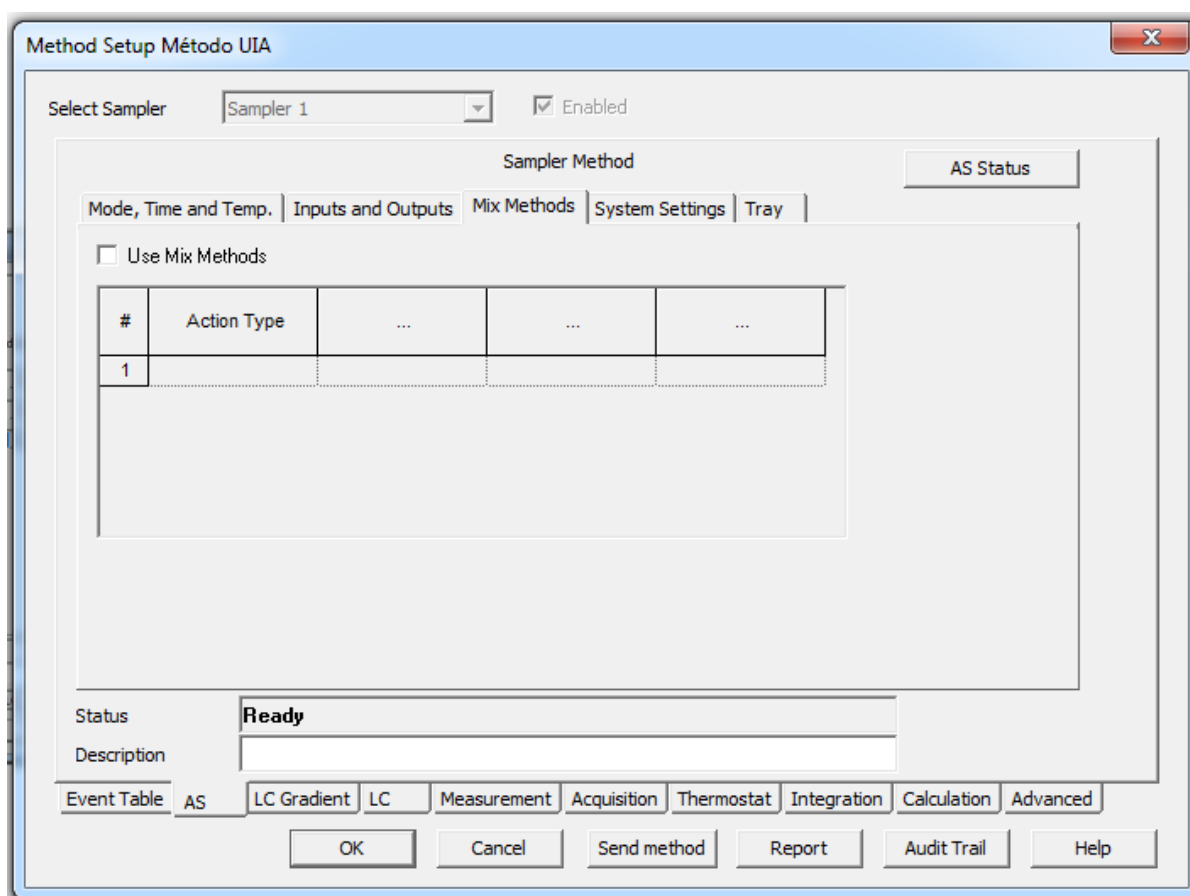
Figura 41. Automuestreador (AS)/INPUTS AND OUTPUTS



Nota: [Captura de pantalla] software Clarity® tomada por la autora (febrero, 2019).

7.2.24 En AS o Autosampler (automuestreador), en la pestaña MIX METHODS, las opciones de configuración se mantienen según se muestra en la figura 42. Esta función tiene como utilidad mezclar métodos de análisis.

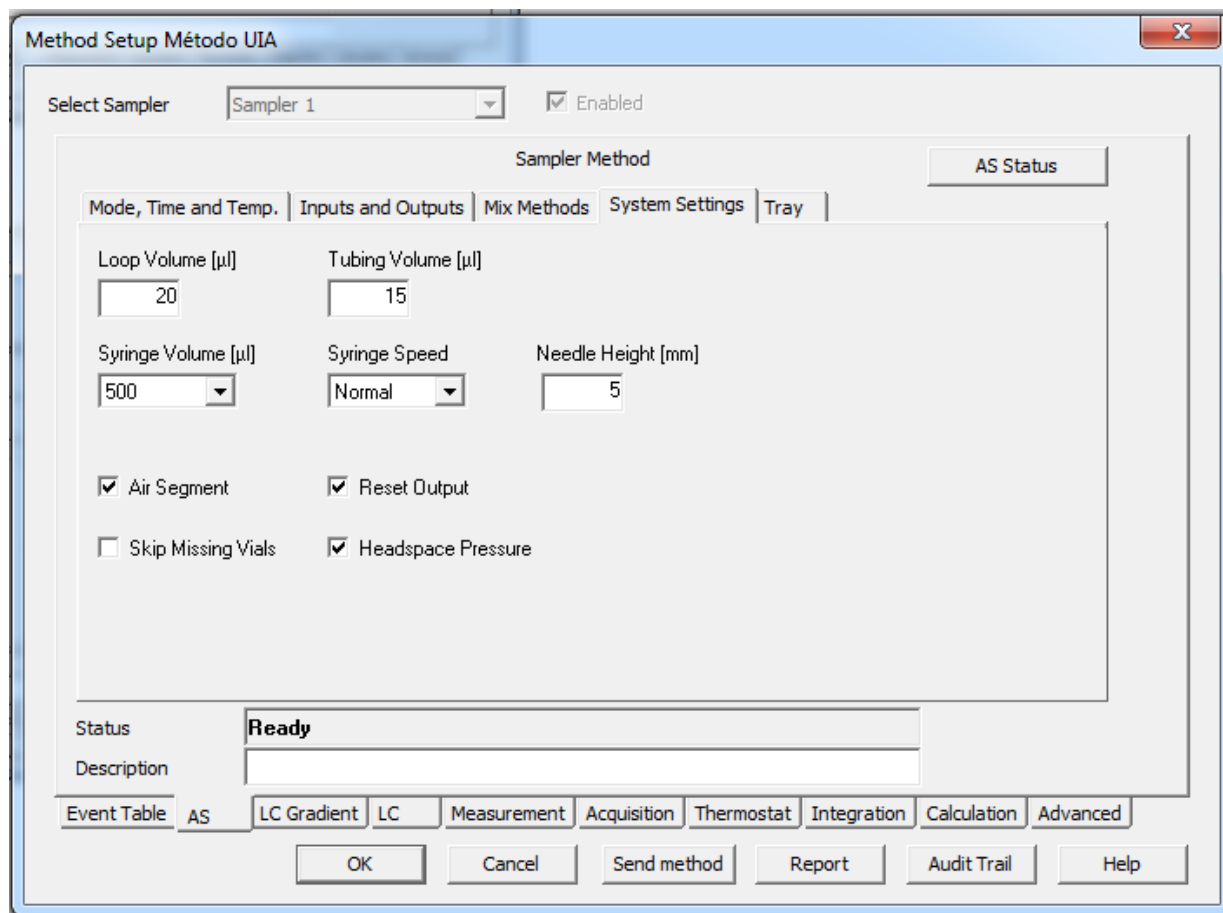
Figura 42. Automuestreador (AS)/MIX METHODS



Nota: [Captura de pantalla] software Clarity® tomada por la autora (febrero, 2019).

7.2.25 En AS o Autosampler (automuestreador), en la pestaña SYSTEM SETTINGS, se asigna volumen del loop únicamente. Las restantes opciones de configuración se mantienen, según se muestra en la figura 43.

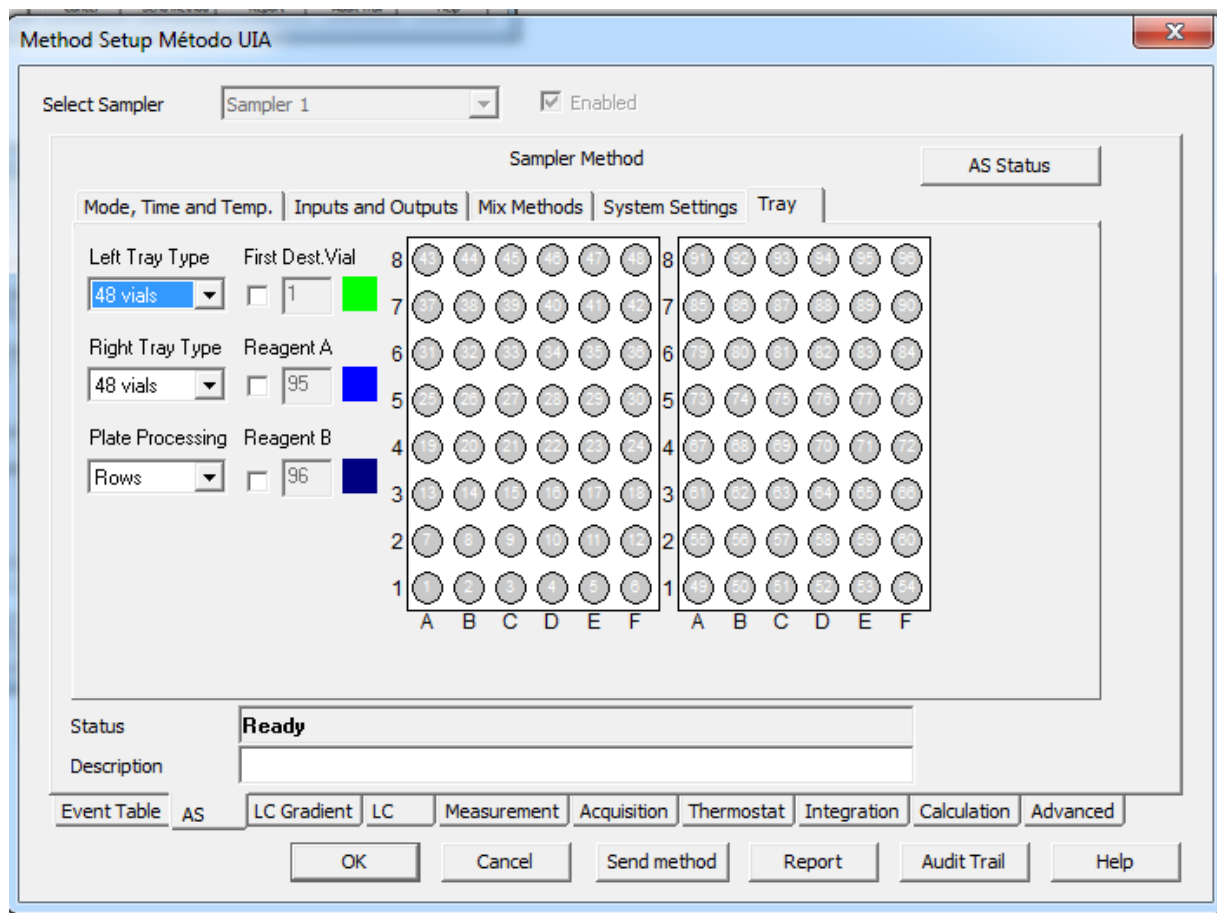
Figura 43. Automuestreador (AS)/SYSTEM SETTINGS



Nota: [Captura de pantalla] software Clarity® tomada por la autora (febrero, 2019)

7.2.26 En AS en la pestaña TRAY se establece la configuración de la correcta ubicación de los viales en la bandeja. Debe quedar: LEFT TRAY TYPE: 48 vials, LEFT TRAY TYPE: 48 vials y PLATE PROCESSING: Rows, para lo cual se deben colocar los viales iniciando en la posición 1 (de la bandeja 1) de izquierda a derecha (bandeja 1: de vial 1 al 48 y bandeja 2: de vial 49 al 96). (Véase la figura 44).

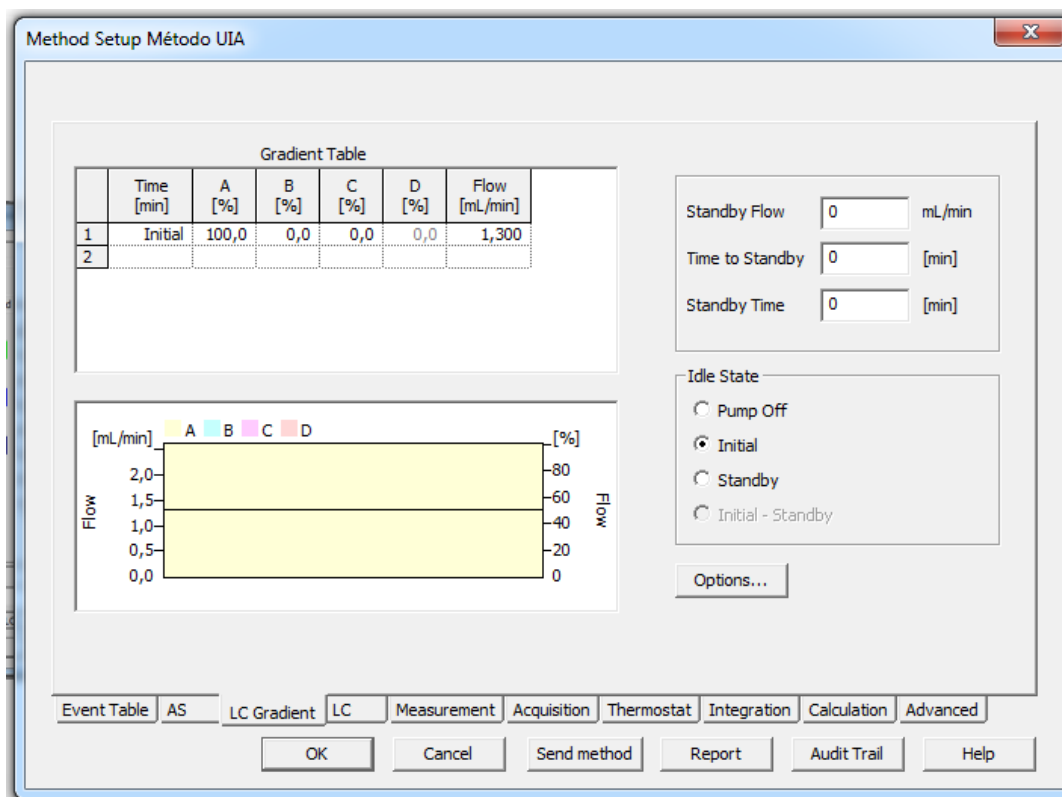
Figura 44. Automuestreador (AS)/TRAY



Nota: [Captura de pantalla] software Clarity® tomada por la autora (febrero, 2019).

7.2.27 En LC GRADIENT, en la tabla se determinan los porcentajes de cada canal y el flujo. Además, STANDBY FLOW: 0, TIME TO STANDBY: 0, STANDBY TIME: 0 (para que el equipo al final de la corrida quede en flujo cero) y en IDLE STATE: Initial (para que al terminar una inyección el equipo vuelva a la configuración inicial). (Véase la figura 45).

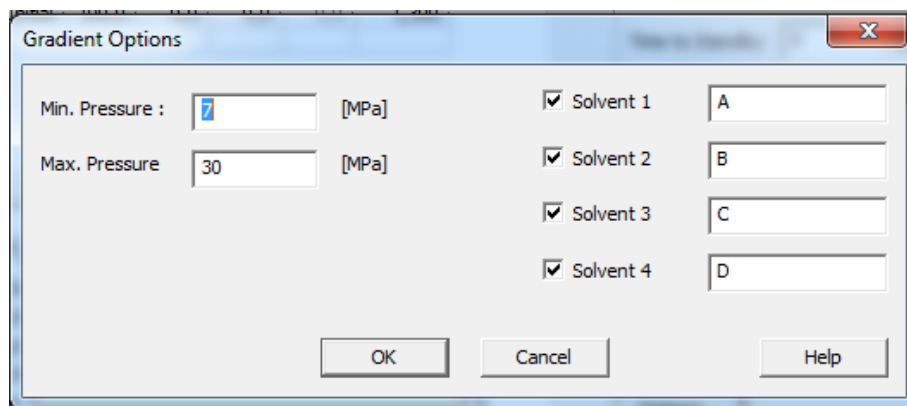
Figura 45. Tabla del Gradiente (LC GRADIENT)



Nota: [Captura de pantalla] software Clarity® tomada por la autora (febrero, 2019).

7.2.28 Para configurar la presión máxima y mínima del equipo y el nombre de cada solvente se selecciona OPTIONS de la pantalla LC GRADIENT (figura 45) y se muestra la figura 46 (ya que al imprimir se muestra esta información en el reporte).

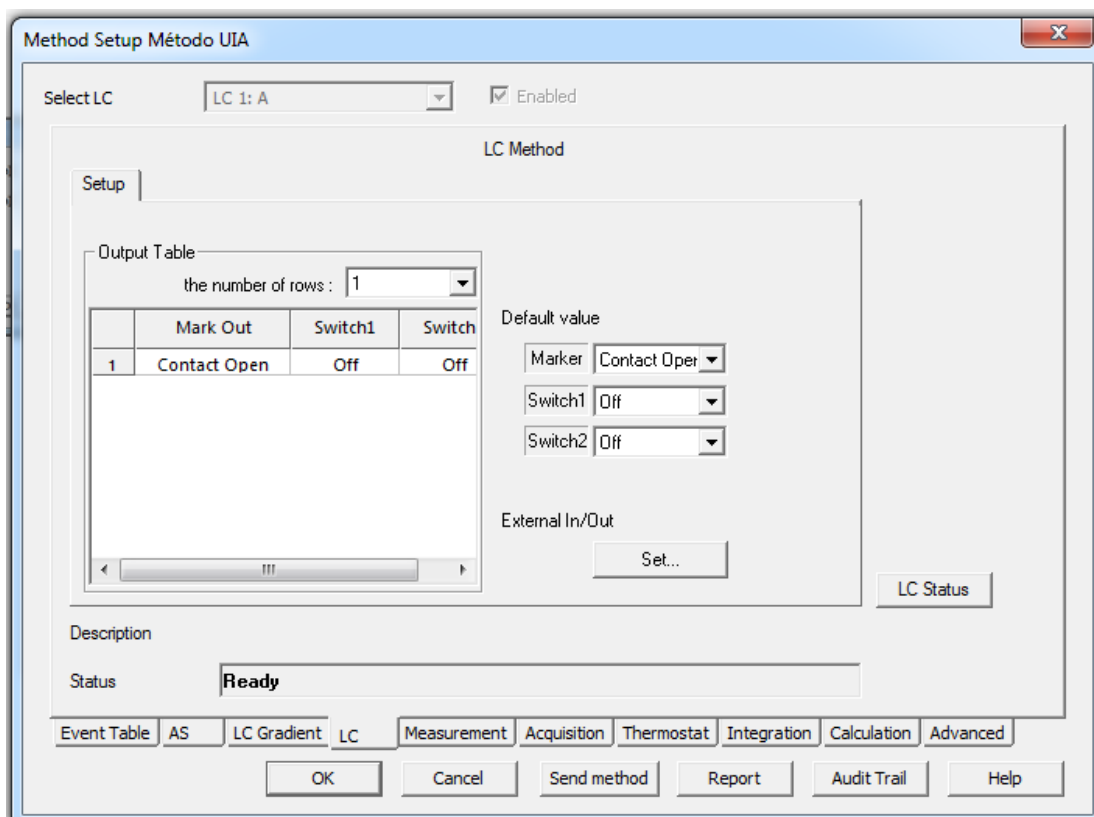
Figura 46. Tabla del Gradiente (LC GRADIENT)/OPTIONS



Nota: [Captura de pantalla] software Clarity® tomada por la autora (febrero, 2019).

7.2.29 En LC la opción ENABLED debe estar con check (✓), de forma que se encuentre habilitado, ya que todos los componentes son del equipo (se deshabilita cuando el equipo tiene otro detector o modelo de bomba diferente al equipo). Las restantes opciones de configuración se mantienen según se muestra en la figura 47.

Figura 47. Pantalla (LC)



Nota: [Captura de pantalla] software Clarity® tomada por la autora (febrero, 2019).

7.2.30 En MEASUREMENT se seleccionan las condiciones en las cuales se desarrolla el método, y se anotan: especificaciones o detalle de la columna, proporciones de la fase móvil, velocidad de flujo, presión, longitud de onda del detector, temperatura y notas. Además, se repite el tiempo de corrida que se anotó en el AS/MODE, TIME AND TEMP (véase la figura 21). Se habilita ENABLE AUTOSHOP (✓), se habilita EXTERNAL START/STOP (✓) y se selecciona START-RESTART y DOWN. (Véase la figura 48).

Figura 48. Pantalla de Mediciones (MEASUREMENT)

Method Setup Método UIA

Common for all detectors

Method Description
Acetaminofen

Column
C18

Mobile Phase
Metanol: Agua (25:75)

Flow Rate
1,5

Pressure
17

Detection
243

Temperature
30

Note

Enable Autostop

Run Time:
5 [min.]

External Start/Stop

Start Only

Start - Restart

Start - Stop

Up

Down

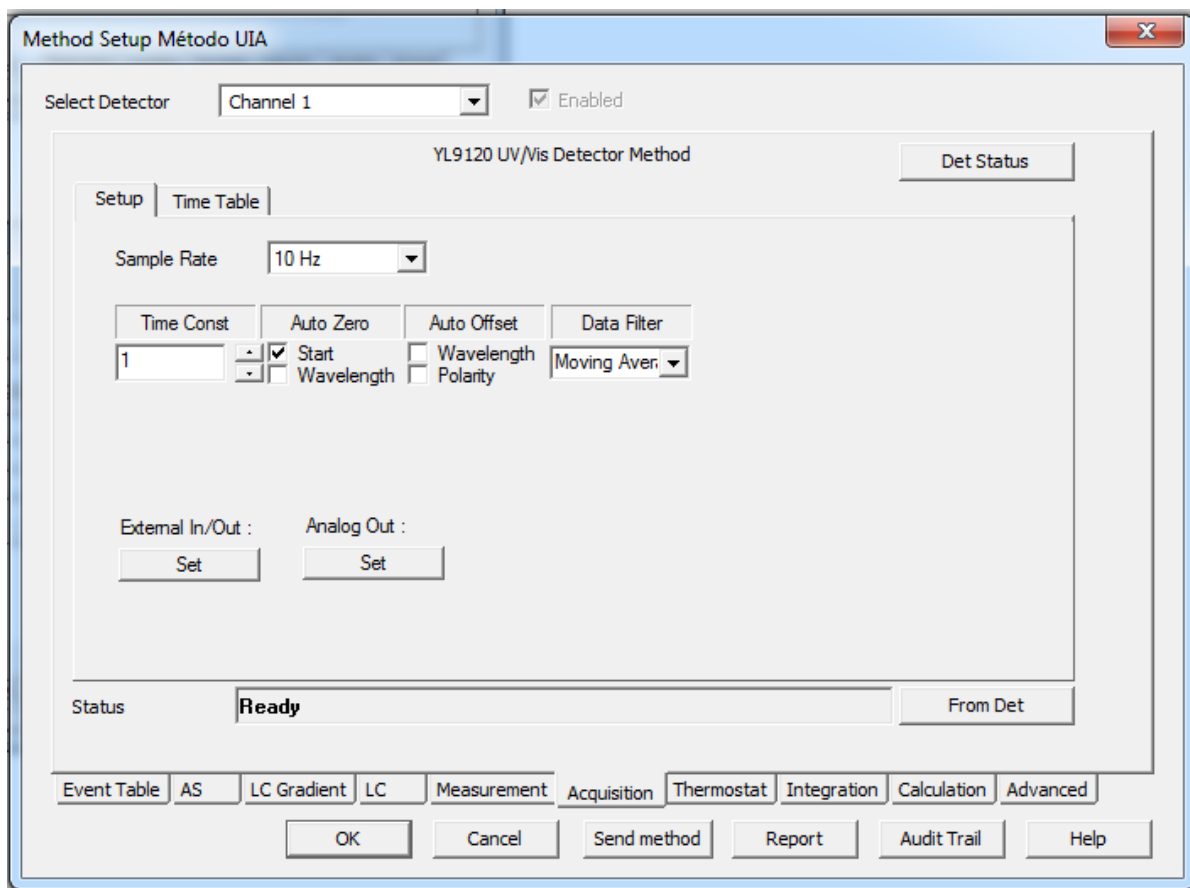
Event Table AS LC Gradient LC Measurement Acquisition Thermostat Integration Calculation Advanced

OK Cancel Send method Report Audit Trail Help

Nota: [Captura de pantalla] software Clarity® tomada por la autora (febrero, 2019).

7.2.31 En ACQUISITION la selección del detector es el canal 1 (Channel 1). En la pestaña SETUP debe seleccionarse SAMPLE RATE: 10 Hz, TIME CONST: 1, en AUTOZERO debe estar habilitado Start (✓), para que la línea base se establezca en cero después de cada inyección; en filtrar datos (DATA FILTER) se mantiene siempre en el promedio (Moving Average). (Véase la figura 49).

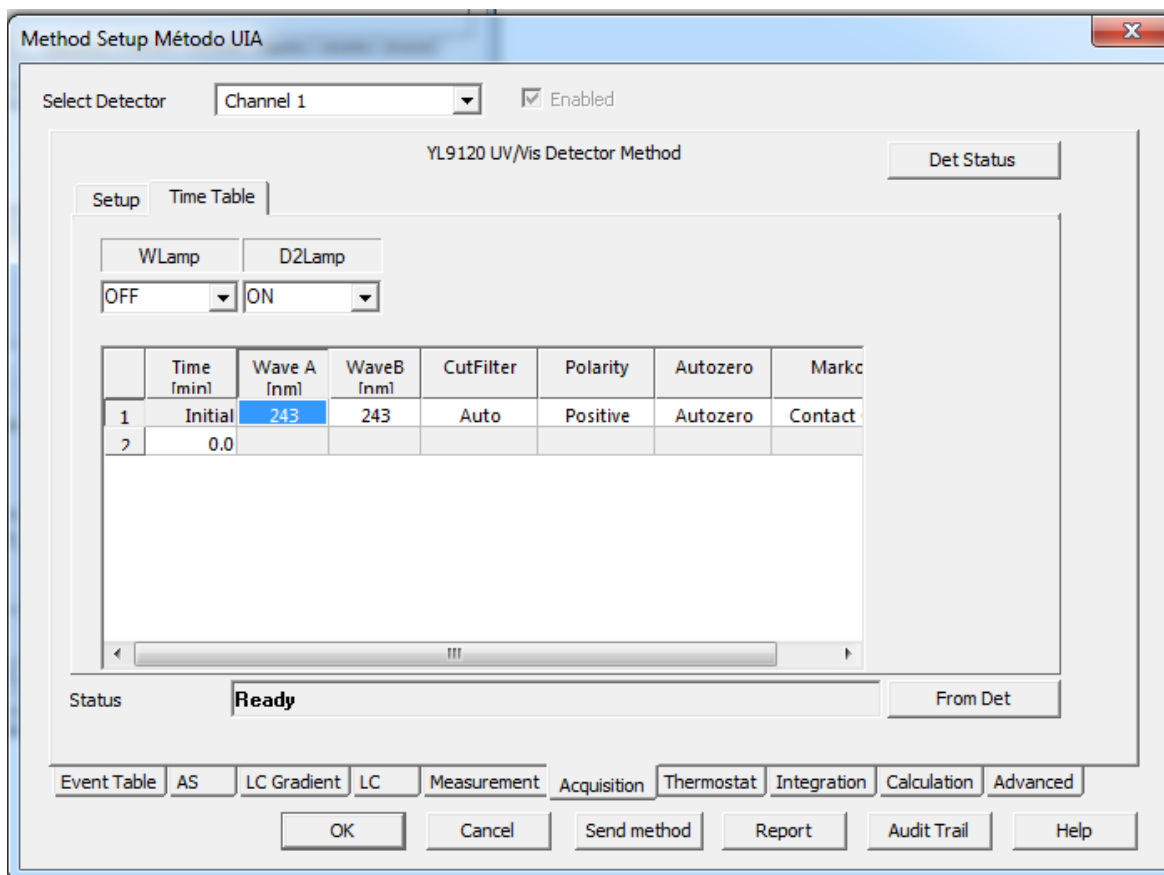
Figura 49. Pantalla ACQUISITION- SETUP



Nota: [Captura de pantalla] software Clarity® tomada por la autora (febrero, 2019).

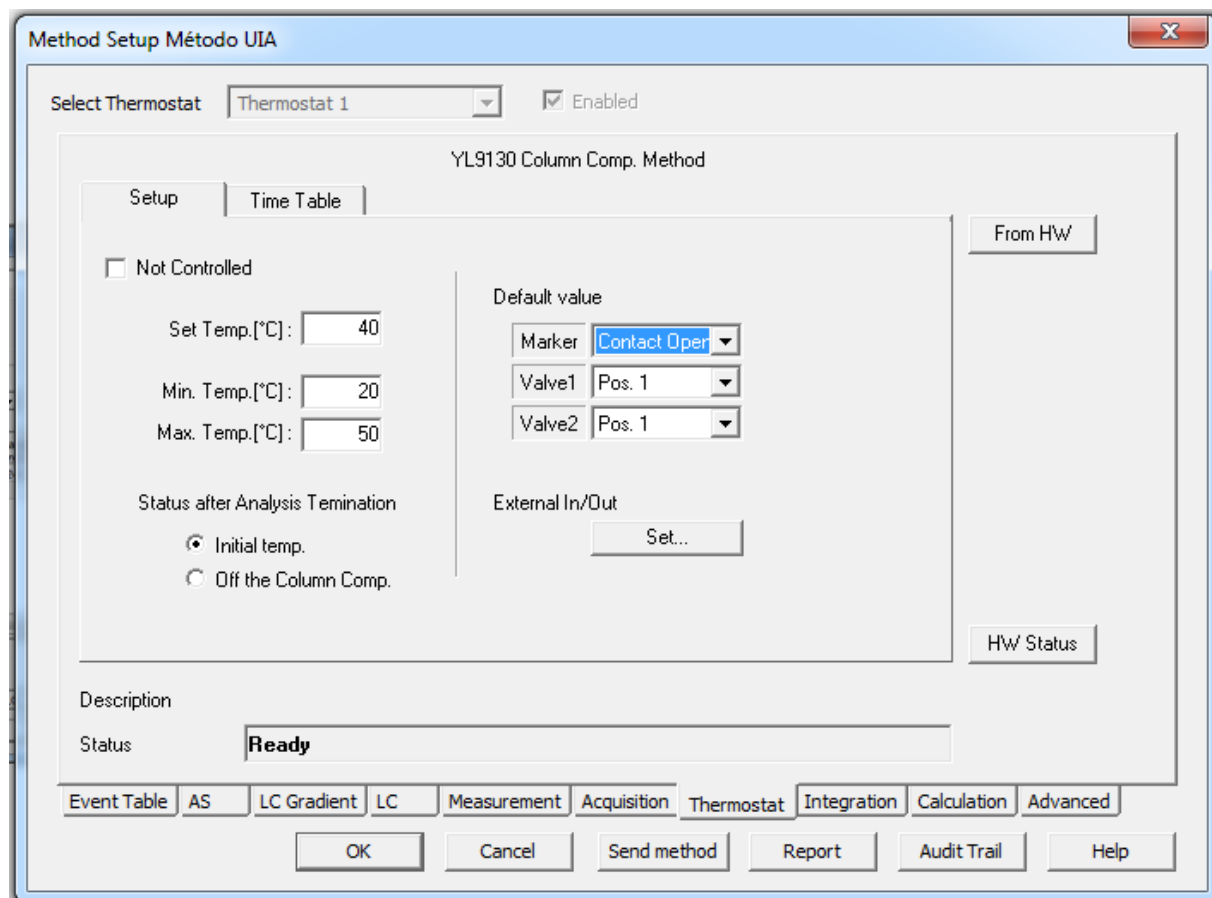
7.2.32 En ADQUISITION, en la pestaña TIME TABLE se controlan las lámparas. D2 Lamp es la lámpara de Deuterio, la que se desea mantener encendida (se activa ON). En TIME: Initial, En WAVE A se anota la longitud de onda (además, se permite hacer gradientes para que a determinado tiempo detecte otra longitud de onda). Las restantes opciones de configuración se mantienen, según se muestra en la figura 50.

Figura 50. Pantalla ADQUISITION-TIME TABLE



Nota: [Captura de pantalla] software Clarity® tomada por la autora (febrero, 2019).

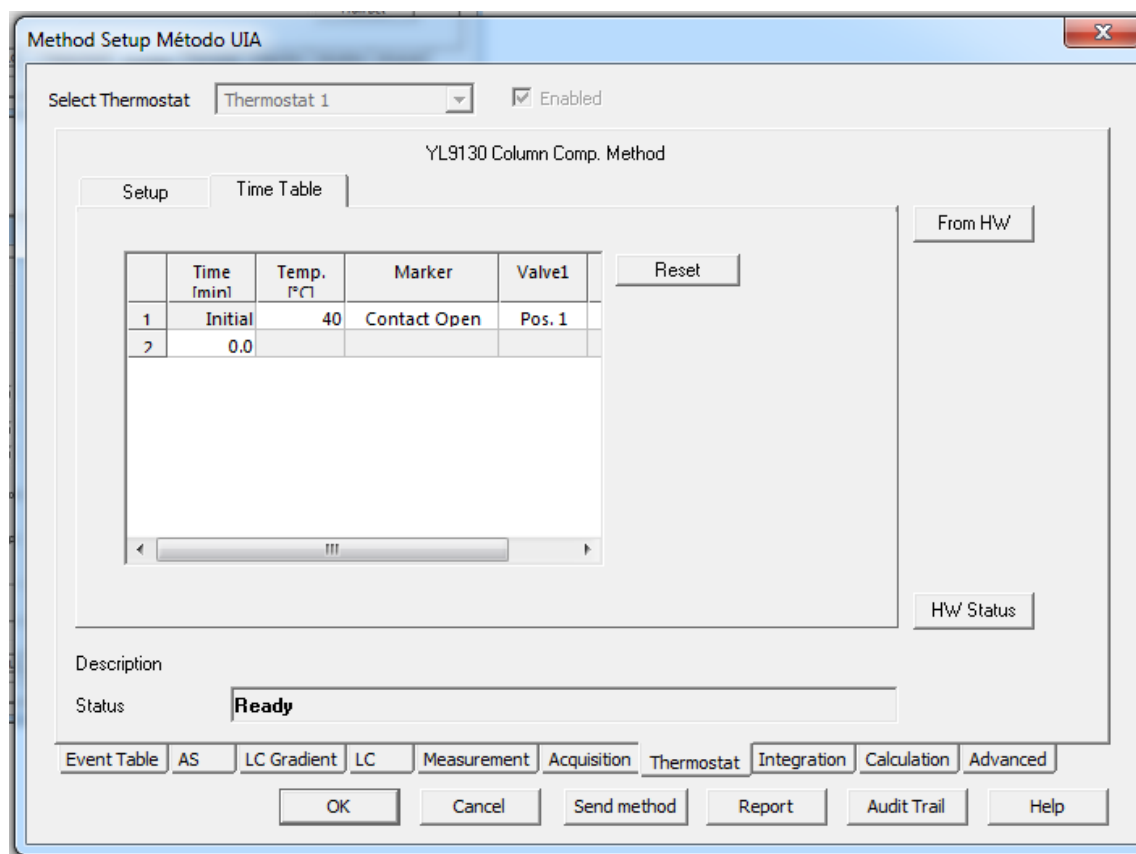
7.2.33 En THERMOSTAT se configuran las condiciones del horno o compartimiento de la columna. En la pestaña SETUP se controla la temperatura del análisis (SET TEMP) y las temperaturas máximas y mínimas; en DEFAULT VALUE, debe seleccionarse: MARKER: Contact Open, VALVE1: Pos. 1 y VALVE2: Pos. 1. En STATUS AFTER ANALYSIS TERMINATION, se selecciona Initial termination (para que vuelva a la temperatura inicial) u Off the column comp (para que apague el horno). Se recomienda seleccionar Off the column comp. (Véase la figura 51).

Figura 51. Pantalla de configuración del horno (THERMOSTAT)-SETUP

Nota: [Captura de pantalla] software Clarity® tomada por la autora (febrero, 2019).

7.2.34 En THERMOSTAT-TIME TABLE se pueden hacer gradientes de temperatura aunque, si el método no lo pide, se le coloca la temperatura del análisis, la cual se configuró anteriormente en la pantalla anterior en SET TEMP. y se muestra en la figura 52.

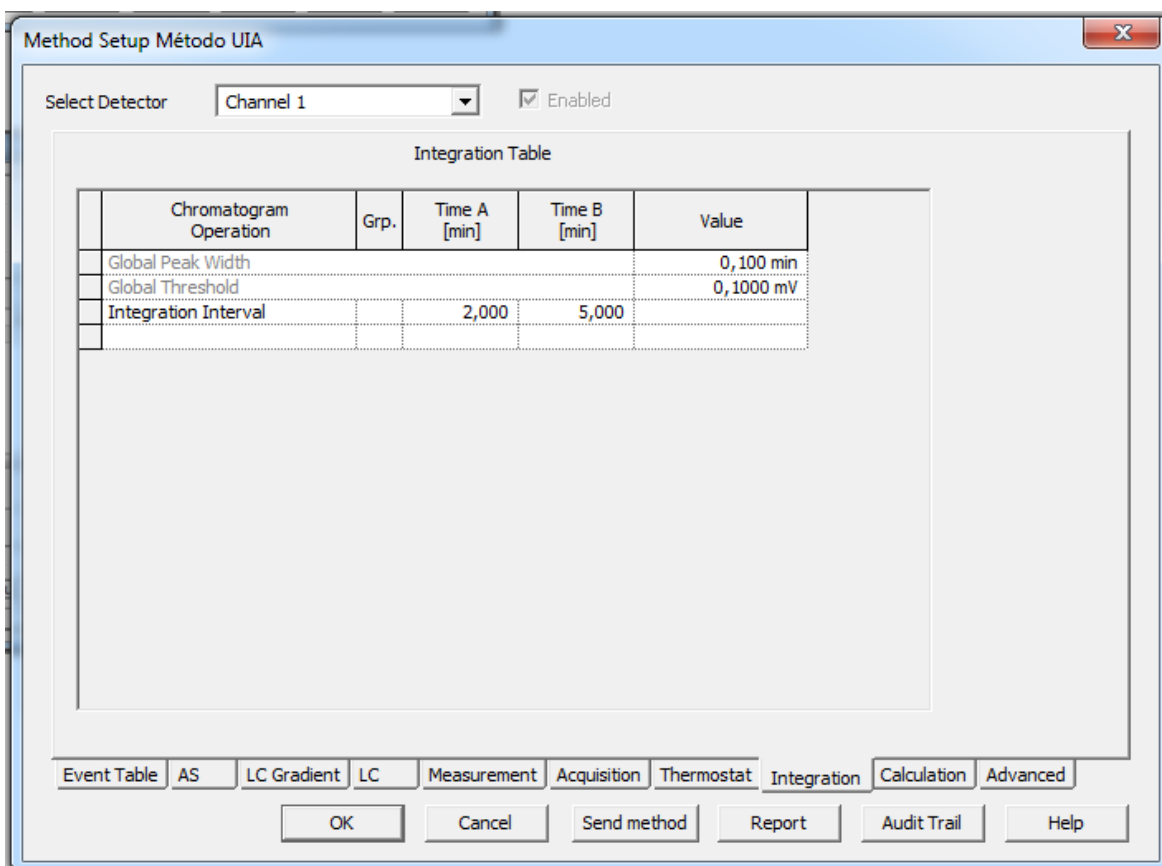
Figura 52. Pantalla de configuración del horno (THERMOSTAT)-TIME TABLE



Nota: [Captura de pantalla] software Clarity® tomada por la autora (febrero, 2019).

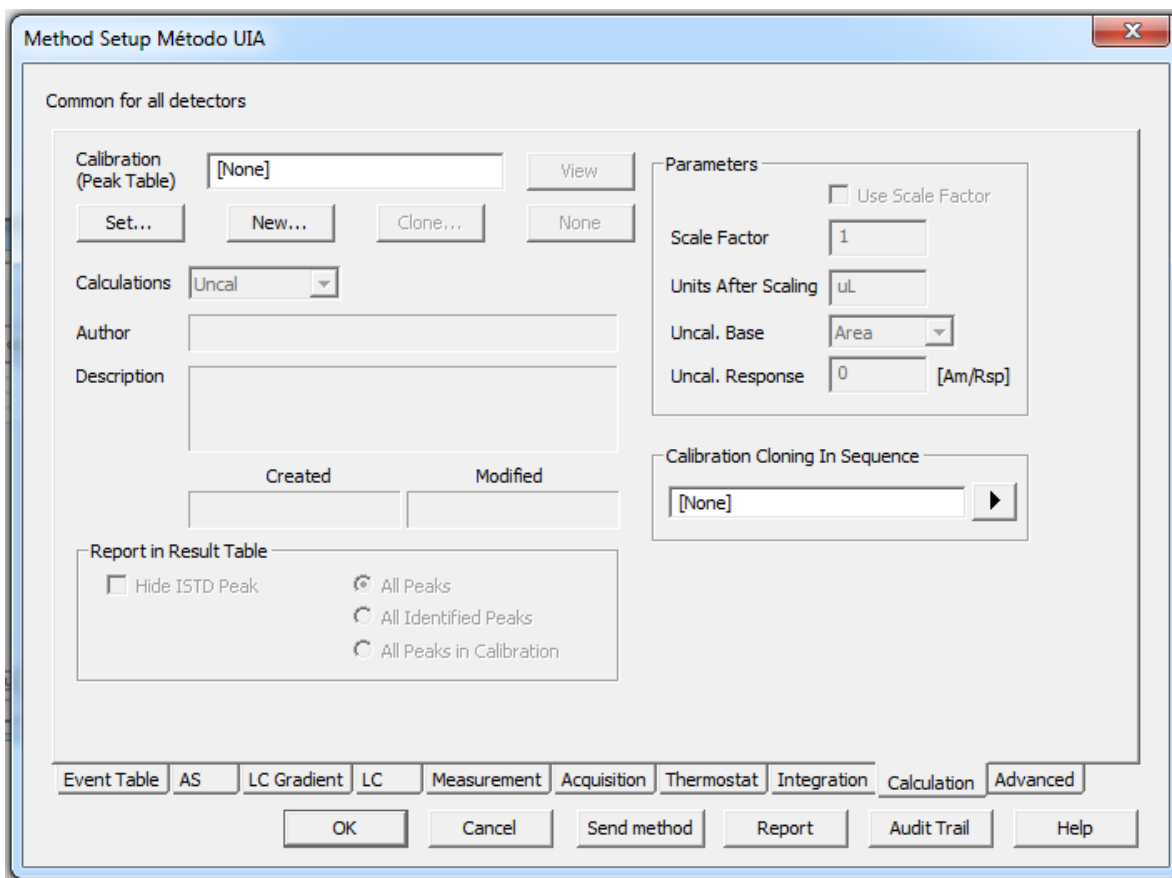
7.2.35 En INTEGRATION se configuran los eventos de integración; básicamente se escoge un intervalo de integración que abarque el tiempo de retención del pico (si se conoce este tiempo), ya que después se puede modificar cuando se procesa la secuencia de inyecciones y utilizar los eventos necesarios. (Véase la figura 53).

Figura 53. Pantalla de eventos de Integración (INTEGRATION)



Nota: [Captura de pantalla] software Clarity® tomada por la autora (febrero, 2019).

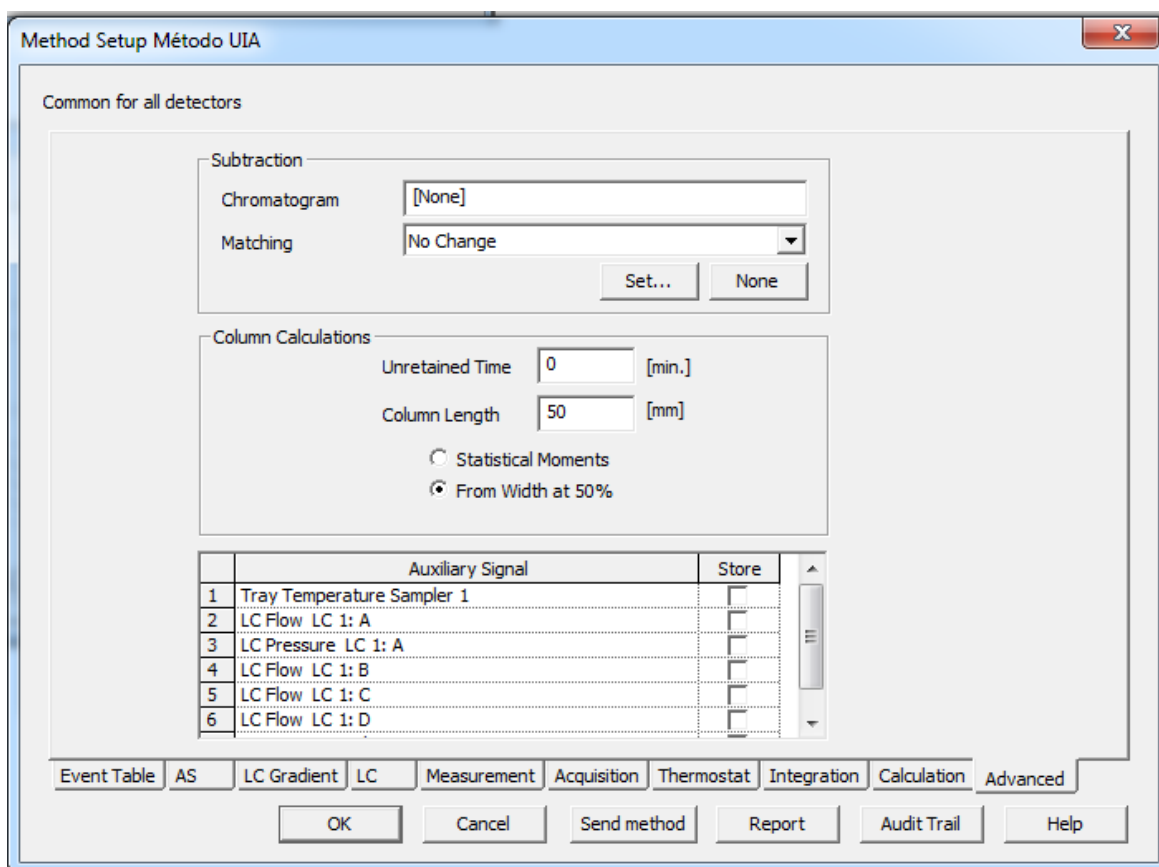
7.2.36 En CALCULATION se puede programar al equipo para que realice los cálculos, pero debido a la complejidad es preferible deshabilitarlo; entonces debe aparecer en CALIBRATION (Peak Table): [None] y CALIBRATION CLONING IN SEQUENCE: [None]. (Véase la figura 54).

Figura 54. Pantalla Cálculos (CALCULATION)

Nota: [Captura de pantalla] software Clarity® tomada por la autora (febrero, 2019).

7.2.37 En ADVANCED las opciones de configuración se mantienen según se muestra en la figura 55.

Figura 55. Pantalla Avanzada (ADVANCED)



Nota: [Captura de pantalla] software Clarity® tomada por la autora (febrero, 2019).

7.2.38 Al configurar todas las pestañas del método se presiona SEND METHOD y luego OK, y aparecerá en la pantalla principal, figura 33 (Waiting). Se guarda el método en ícono en la columna izquierda de la pantalla principal o en FILE/SAVE METHOD AS.


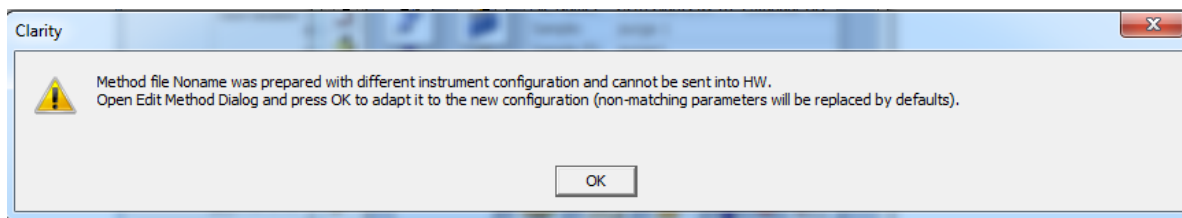
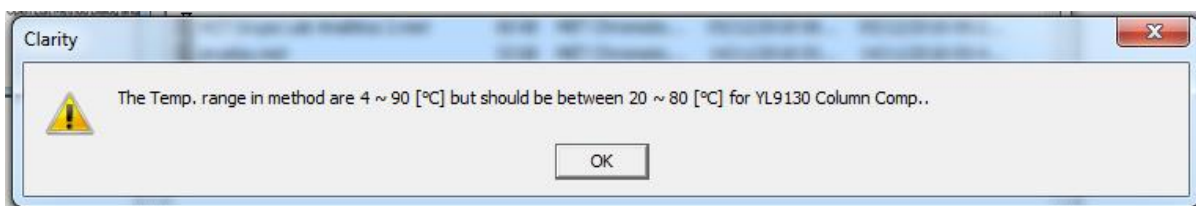
7.2.39 Para crear un método desde cero, se abre FILE/NEW METHOD o presiona el ícono de la hoja en blanco  en la fila de la izquierda de la pantalla principal y aparece el siguiente cuadro de diálogo (véase la figura 56), en el cual se indica que el método tiene una configuración diferente al instrumento y que debe editar el método con la nueva configuración. Se presiona OK.

Figura 56. Cuadro de diálogo 1 de Método nuevo

Nota: [Captura de pantalla] software Clarity® tomada por la autora (febrero, 2019).

7.2.40 Aparece un cuadro de diálogo indicando que el rango de temperatura de nuevo método es de 4-90°C y que debe ser de 20-80°C, para el compartimiento de columna de este equipo. Se le da OK. (Véase la figura 38).

Figura 57. Cuadro de diálogo 2 de Método nuevo

Nota: [Captura de pantalla] software Clarity® tomada por la autora (febrero, 2019).

7.2.41 Se le asigna un nombre al nuevo método y se presiona OK; se configura el método con sus parámetros de análisis y con las consideraciones de la configuración establecida para el equipo desde el punto 6.2.17 hasta el punto 6.2.37. Se presiona SEND METHOD, OK y se guarda.


7.2.42 Nota: Para realizar una prueba en teoría se realiza con el ícono  de la pantalla principal, pero no aparece cómo indicar el vial para la inyección, y al completar la información solicitada y darle SEND METHOD y luego RUN, el equipo lo que hace es correr la fase móvil sin la muestra, ya que no realiza la inyección (véase la figura 58). Lo anterior ocurre por la configuración del equipo, debido a que el automuestreador es el cabezal de la comunicación a la PC (computadora). Por lo tanto, las pruebas se realizan desde la secuencia utilizando una línea de la misma.

Figura 58. Pantalla para ejecutar una Prueba

Single Analysis - (Acetaminofen)

Analysis

Sample ID: PBA SINGLE 260218

Sample: PBA SINGLE 260218

Amount: 1 ISTD Amount: 0

Dilution: 1 Inj. Volume [mL]: 0,01

Calibration Standard

Level: 1

Method...

Comments...

Control

Send method Run Stop Abort Snapshot

Chromatogram File Name (PBA SINGLE 260218)

PBA SINGLE 260218

Enable File Overwrite Counter: 7 Data Recovery...

OK Cancel Help

Nota: Fuente propia [captura de pantalla], software Clarity®.


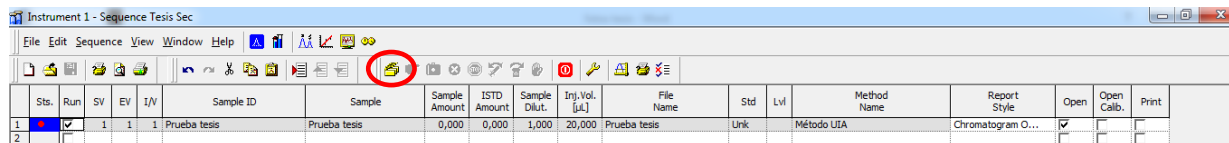

7.2.43 Para realizar una prueba se puede utilizar el ícono  de la pantalla principal (figura 14) y aparece la ventana de la secuencia (figura 59); se selecciona hoja en blanco para elaborar una secuencia nueva, en la cual se completa únicamente la primera fila donde Start Vial (SV:1), que indica que inicie en el vial 1, End Vial Number (EV:1), que indica la posición del vial (en cual vial termina) y Número de Inyecciones (I/V:1).

Figura 59. Pantalla de la Secuencia para la prueba



Nota: [Captura de pantalla] software Clarity® tomada por la autora (febrero, 2019).

7.2.44 Se escribe el mismo nombre de la inyección en: SAMPLE ID, SAMPLE y FILE NAME. Se indica el loop en INJ. VOL. Se selecciona el método y las demás opciones se dejan a como aparecen ya determinadas en la secuencia; se activa el check (✓) en la columna RUN. Se guarda y se presiona el ícono  en la barra superior que indica RUN SEQUENCE. (Véase el círculo rojo en la figura 59).




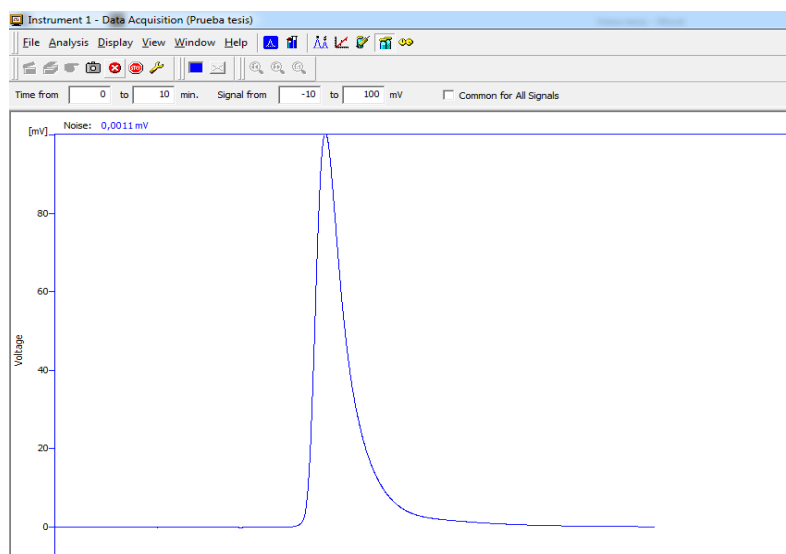
7.2.45 En la pantalla principal aparece que está corriendo (RUNNING) y se puede ver la corrida en proceso con el ícono  de la pantalla principal o de la barra superior de la secuencia, con lo que aparece la pantalla de la figura 60. Para abortar una inyección se hace clic en la barra superior de la pantalla de la secuencia  (véase la figura 40). No se recomienda detener la secuencia (stop)  porque se cierra la secuencia y entonces hay que empezar nuevamente.

Figura 60. Pantalla de la inyección en proceso



Nota: [Captura de pantalla] software Clarity® tomada por la autora (febrero, 2019).


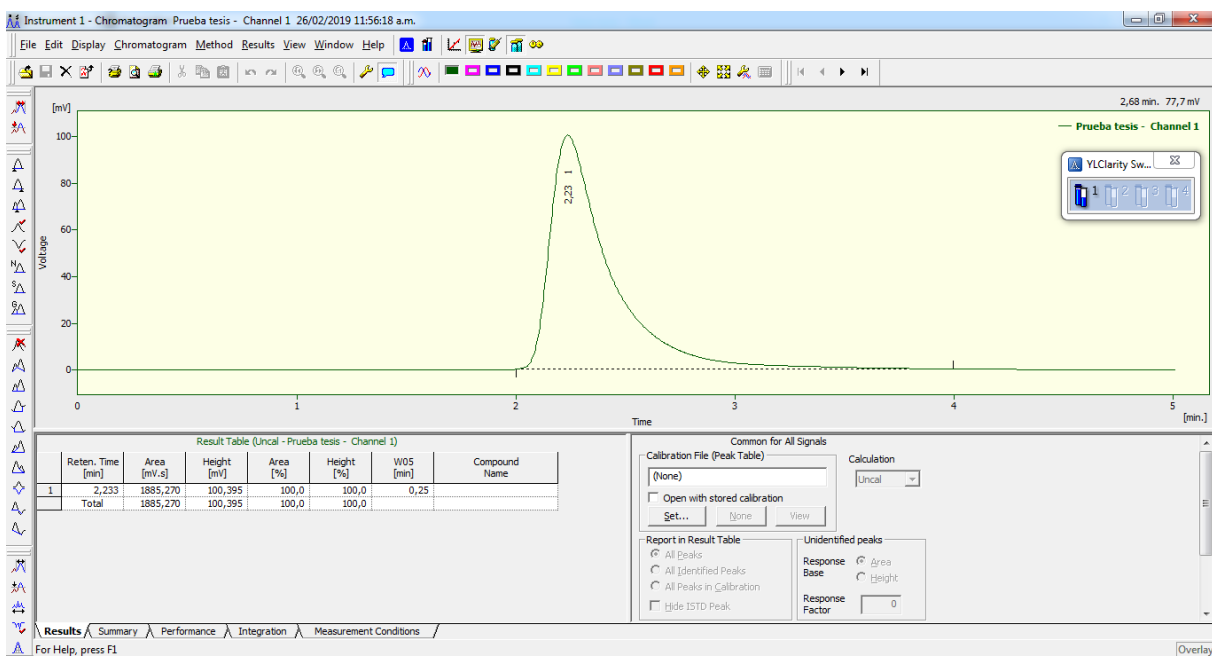
7.2.46 Al terminar la corrida se abre automáticamente la pantalla del cromatograma (véase la figura 61) o bien se puede abrir desde el ícono  desde la secuencia.

Figura 61. Pantalla del cromatograma-RESULT

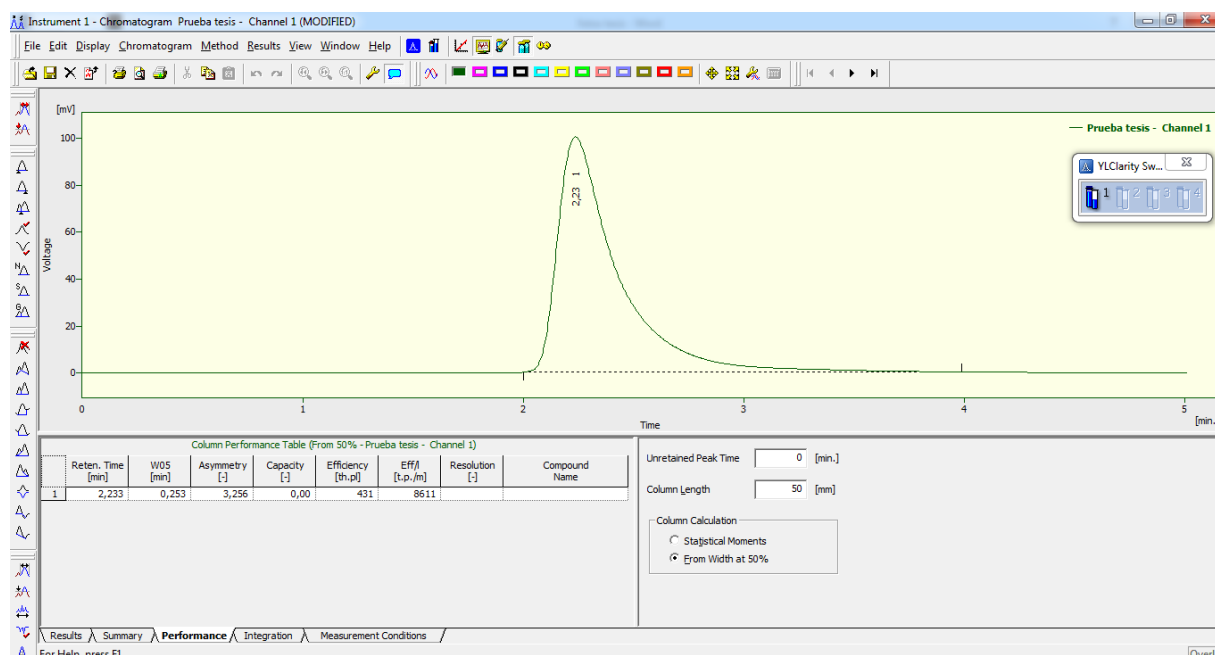


Nota: [Captura de pantalla] software Clarity® tomada por la autora (febrero, 2019).

7.2.47 En la pestaña RESULT se muestra: el cromatograma, la tabla de la información de los picos (tiempo de retención, área y otros) y las opciones de cálculos, cuando se les ha habilitado en el método. (Véase la figura 61).

7.2.48 En la pestaña PERFORMANCE se muestran los valores de parámetros de desempeño como: asimetría, eficiencia de columna y resolución. Con clic derecho sobre la tabla se pueden adicionar los otros parámetros y, además, eliminar columnas. (Véase la figura 62).

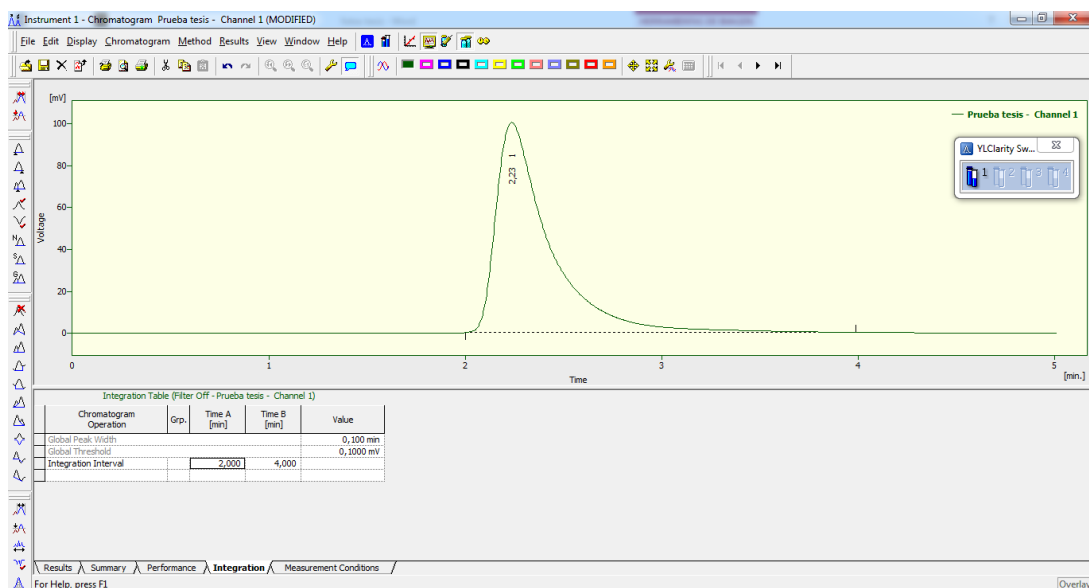
Figura 62. Pantalla del cromatograma-PERFORMANCE



Nota: [Captura de pantalla] software Clarity® tomada por la autora (febrero, 2019).

7.2.49 En la pestaña INTEGRATION se modifican los eventos de integración. (Véase la figura 63).

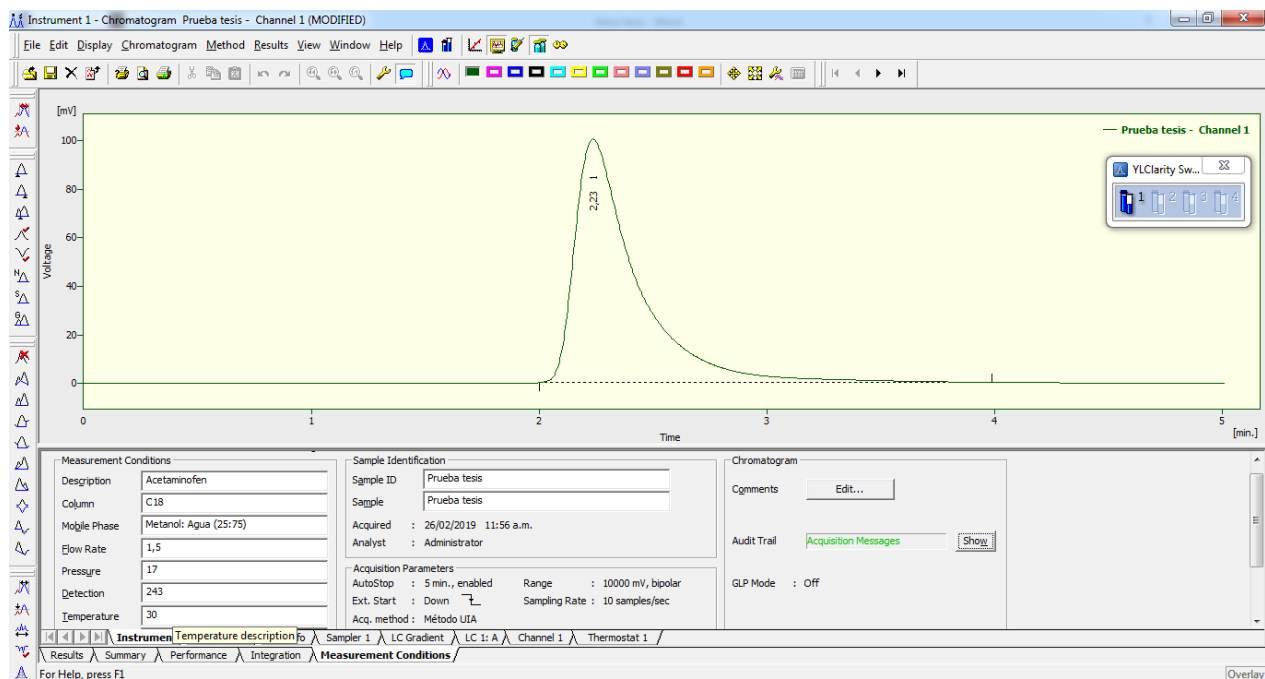
Figura 63. Pantalla del cromatograma- INTEGRATION



Nota: [Captura de pantalla] software Clarity® tomada por la autora (febrero, 2019).

7.2.50 En la pestaña MEASUREMENT CONDITIONS se muestran todos los parámetros de la configuración del método. (Véase la figura 64).

Figura 64. Pantalla del cromatograma-MEASUREMENT CONDITIONS



Nota: [Captura de pantalla] software Clarity® tomada por la autora (febrero, 2019).

7.2.51 En la barra de herramientas de la izquierda de la pantalla del cromatograma se pueden realizar modificaciones al pico para mejorar la integración.


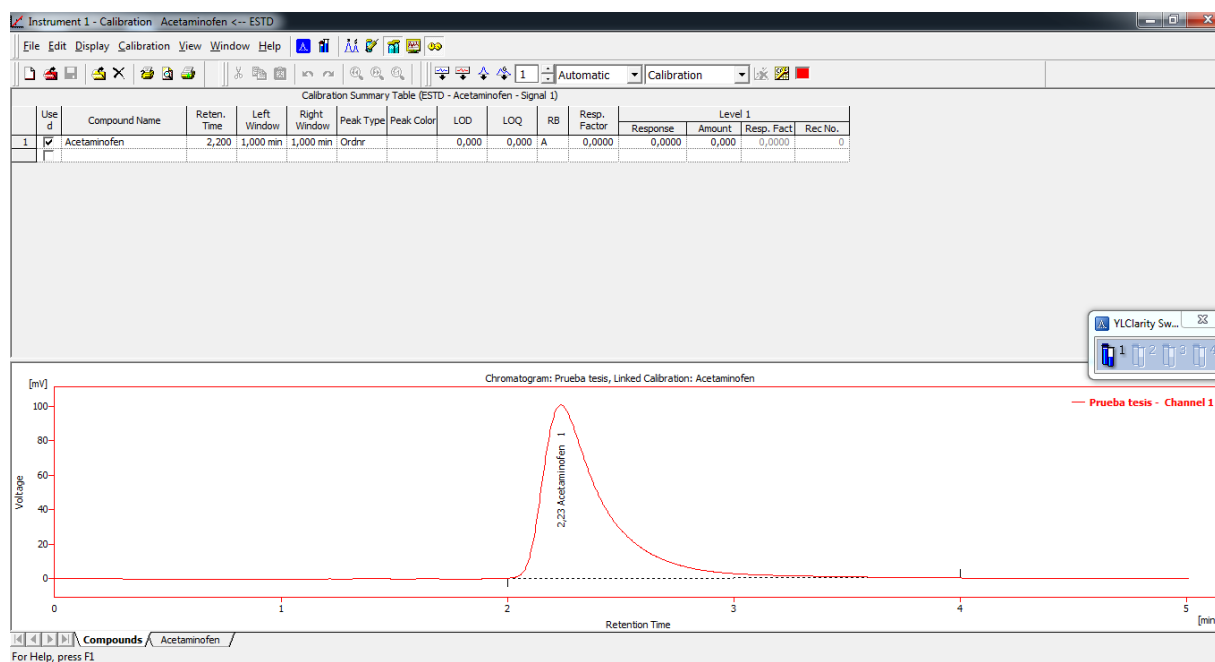
7.2.52 Para asignarle nombre a cada pico o componente se presiona el ícono  en la pantalla del cromatograma-RESULT (figura 61) y aparece la siguiente ventana (figura 65).

Figura 65. Pantalla de CALIBRATION



Nota: [Captura de pantalla] software Clarity® tomada por la autora (febrero, 2019).



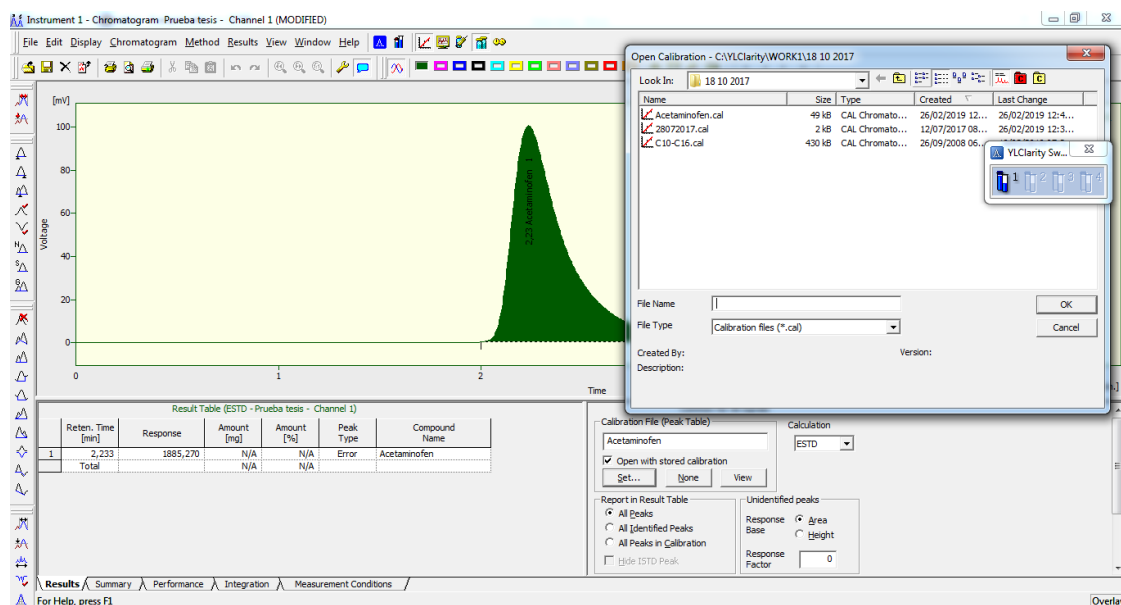
7.2.53 Se abre un documento nuevo  y se salva con el nombre del componente. Se nombra el componente, se detalla el tiempo de retención y se guarda. Se pasa a la pantalla del cromatograma con el ícono  y en pestaña RESULT se carga el archivo de la calibración presionando SET y seleccionando el archivo (véase la figura 66). Se guarda el documento.

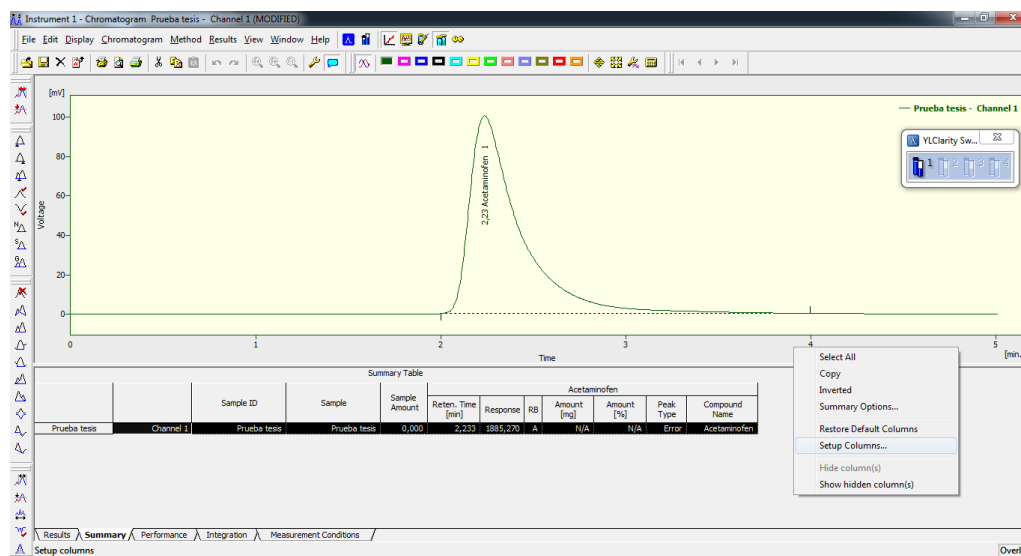
Figura 66. Pantalla del Cromatograma con el nombre del componente



Nota: [Captura de pantalla] software Clarity® tomada por la autora (febrero, 2019).

7.2.54 Se abre la pestaña resumen (SUMMARY) en la pantalla del cromatograma y ya aparece la información completa actualizada del cromatograma (véase la figura 67). Se puede eliminar columnas para acomodar el reporte haciendo clic derecho. Además, se puede reducir el ancho de las columnas.

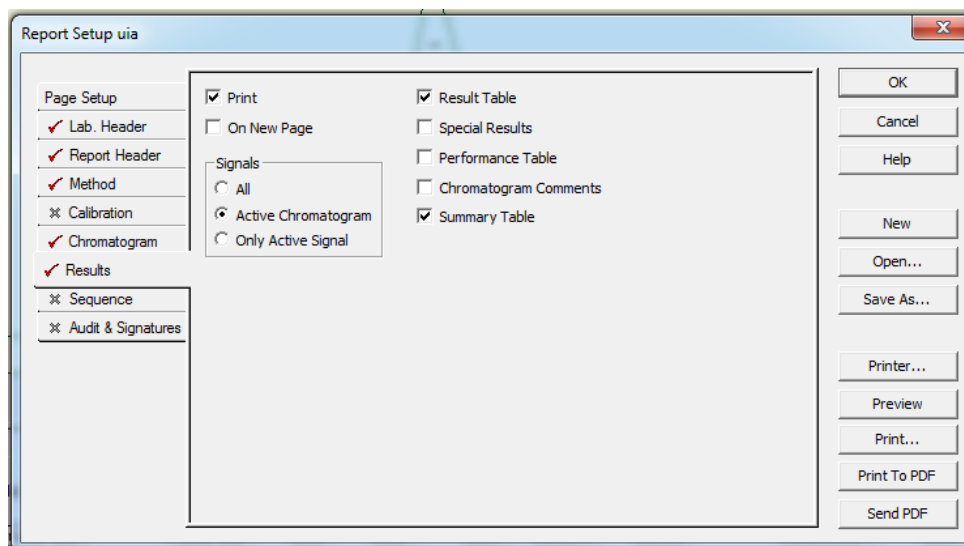
Figura 67. Pantalla del Cromatograma-SUMMARY



Nota: [Captura de pantalla] software Clarity® tomada por la autora (febrero, 2019).

7.2.55 Para crear el reporte desde la pantalla del Cromatograma vaya a FILE/REPORT SETUP y aparece la figura 68, seleccione RESULTS, debe estar habilitado: PRINT, RESULT TABLE y SUMMARY TABLE.

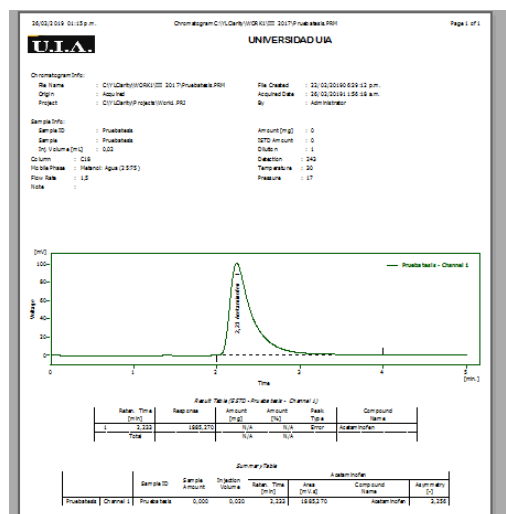
Figura 68. Pantalla del Reporte



Nota: [Captura de pantalla] software Clarity® tomada por la autora (febrero, 2019).

7.2.56 Luego presione SAVE AS, asigne un nombre y guarde. Luego abra una vista previa (PREVIEW) (véase la figura 69). Luego puede imprimir el documento.

Figura 69. Vista previa del Reporte



Nota: [Captura de pantalla] software Clarity® tomada por la autora (febrero, 2019).

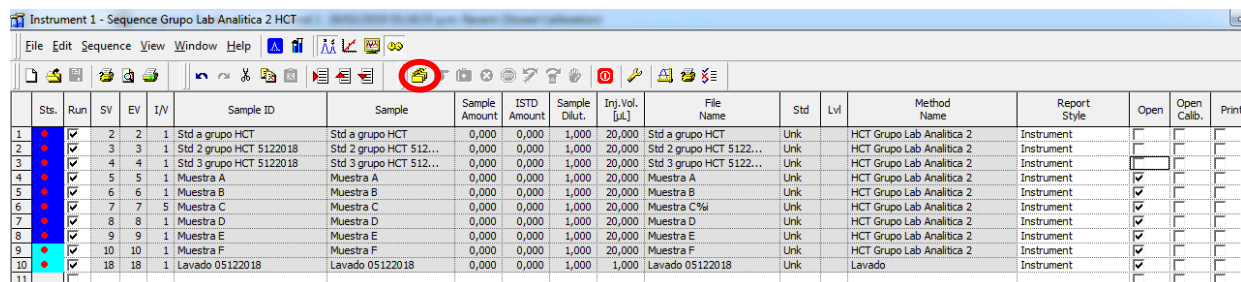
7.2.57 Para realizar una secuencia se utiliza el mismo procedimiento que para la prueba a partir del punto 6.2.42, aunque se adicionan las inyecciones necesarias para los estándares y las muestras, donde Start Vial (SV: 1) indica que inicie en el vial 1, End Vial Number (EV: 3) indica la posición del vial (en cuál vial termina) y Número de Inyecciones (I/V: 1).

7.2.58 Para copiar la misma información en las filas siguientes puede presionar clic derecho y seleccionar Fill down.

7.2.59 Es necesario activar todas las opciones de check (✓) en RUN y deshabilitar el check en OPEN para los estándares. Recuerde colocar en la fila final el método de lavado.

7.2.60 Se guarda y se presiona la figura amarilla en la barra superior que indica RUN SEQUENCE. (Véase el círculo rojo). (Véase la figura 70).

Figura 70. Pantalla de la Secuencia Total

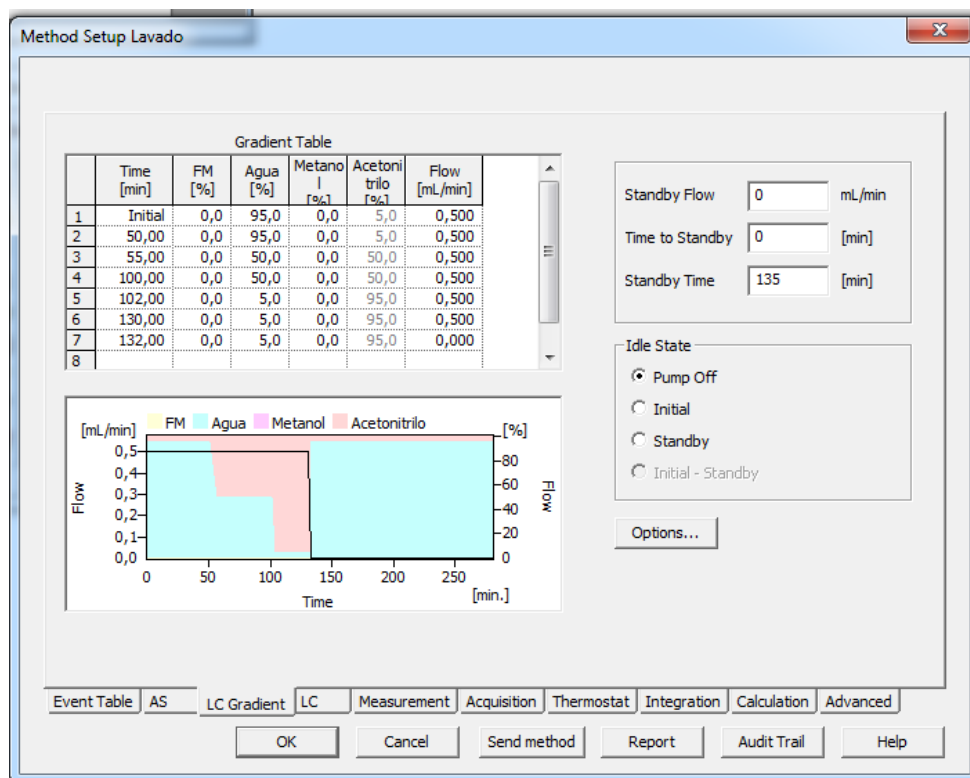


	Sts.	Run	SV	EV	I/V	Sample ID	Sample	Sample Amount	ISTD Amount	Sample Dilut.	Inj. Vol. [μL]	File Name	Std	Lvl	Method Name	Report Style	Open	Open Calib.	Print
1	✓	2	2	1	1	Std a grupo HCT	Std a grupo HCT	0,000	0,000	1,000	20,000	Std a grupo HCT	Unk		HCT Grupo Lab Analitica 2	Instrument	✓		
2	✓	3	3	1	1	Std 2 grupo HCT 5122018	Std 2 grupo HCT 5122...	0,000	0,000	1,000	20,000	Std 2 grupo HCT 5122...	Unk		HCT Grupo Lab Analitica 2	Instrument	✓		
3	✓	4	4	1	1	Std 3 grupo HCT 5122018	Std 3 grupo HCT 5122...	0,000	0,000	1,000	20,000	Std 3 grupo HCT 5122...	Unk		HCT Grupo Lab Analitica 2	Instrument	✓		
4	✓	5	5	1	1	Muestra A	Muestra A	0,000	0,000	1,000	20,000	Muestra A	Unk		HCT Grupo Lab Analitica 2	Instrument	✓		
5	✓	6	6	1	1	Muestra B	Muestra B	0,000	0,000	1,000	20,000	Muestra B	Unk		HCT Grupo Lab Analitica 2	Instrument	✓		
6	✓	7	7	5	5	Muestra C	Muestra C	0,000	0,000	1,000	20,000	Muestra C%	Unk		HCT Grupo Lab Analitica 2	Instrument	✓		
7	✓	8	8	1	1	Muestra D	Muestra D	0,000	0,000	1,000	20,000	Muestra D	Unk		HCT Grupo Lab Analitica 2	Instrument	✓		
8	✓	9	9	1	1	Muestra E	Muestra E	0,000	0,000	1,000	20,000	Muestra E	Unk		HCT Grupo Lab Analitica 2	Instrument	✓		
9	✓	10	10	1	1	Muestra F	Muestra F	0,000	0,000	1,000	20,000	Muestra F	Unk		HCT Grupo Lab Analitica 2	Instrument	✓		
10	✓	18	18	1	1	Lavado 05122018	Lavado 05122018	0,000	0,000	1,000	1,000	Lavado 05122018	Unk		Lavado	Instrument	✓		
11																			

Nota: [Captura de pantalla] software Clarity® tomada por la autora (febrero, 2019).

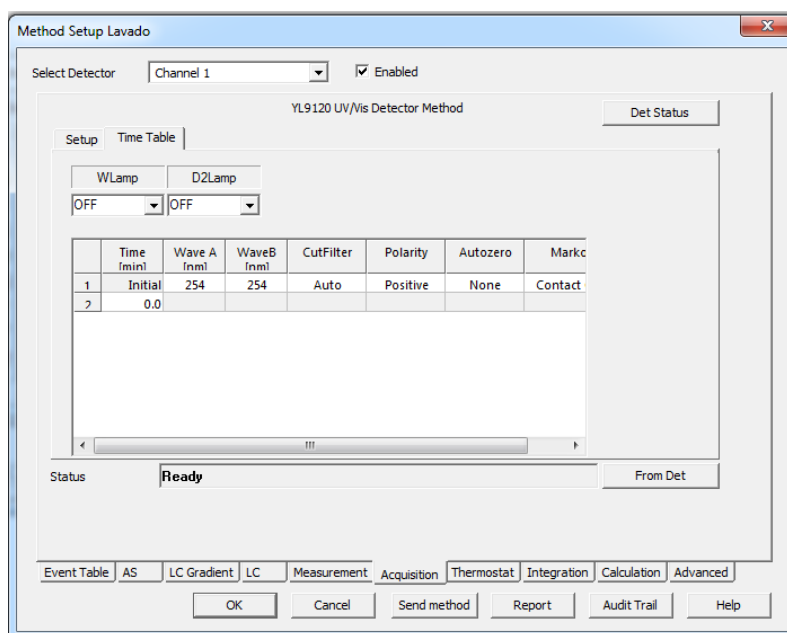
7.2.61 El método de lavado para columnas tipo C18 se realiza de la siguiente manera en METHOD SETUP: en la pestaña THERMOSTAT se selecciona SET TEMP: 45°C; en la pestaña AS, ANALYSIS TIME: 135 min; en la pestaña LC GRADIENT (véase la figura 71) y en ACQUISITION-TIME TABLE debe seleccionar OFF en ambas lámparas. (Véase la figura 72).

Figura 71. METHOD SETUP Lavado-LC GRADIENT



Nota: [Captura de pantalla] software Clarity® tomada por la autora (febrero, 2019).

Figura 72. METHOD SETUP Lavado-ACQUISITION-TIME TABLE



Nota: [Captura de pantalla] software Clarity® tomada por la autora (febrero, 2019).

7.2.62 Para el lavado de columnas tipo C18 que se utilicen con muestras de Jarabe, se recomienda pasar agua purificada durante una hora a una temperatura de 45°C.

7.3 Apagado del equipo:

7.3.1 El apagado del equipo se realiza de manera inversa al encendido; es decir, se apaga en el orden: automuestreador, compartimiento de columna, detector, bomba y desgasificador, y finalmente se apaga la computadora. Véase el

7.3.2 .

7.4 Limpieza de superficies externas:

7.4.1 Limpie con pañuelos Kleenex humedecidos con agua purificada y alcohol (50:50) en toda su parte externa cada vez que sea necesario.

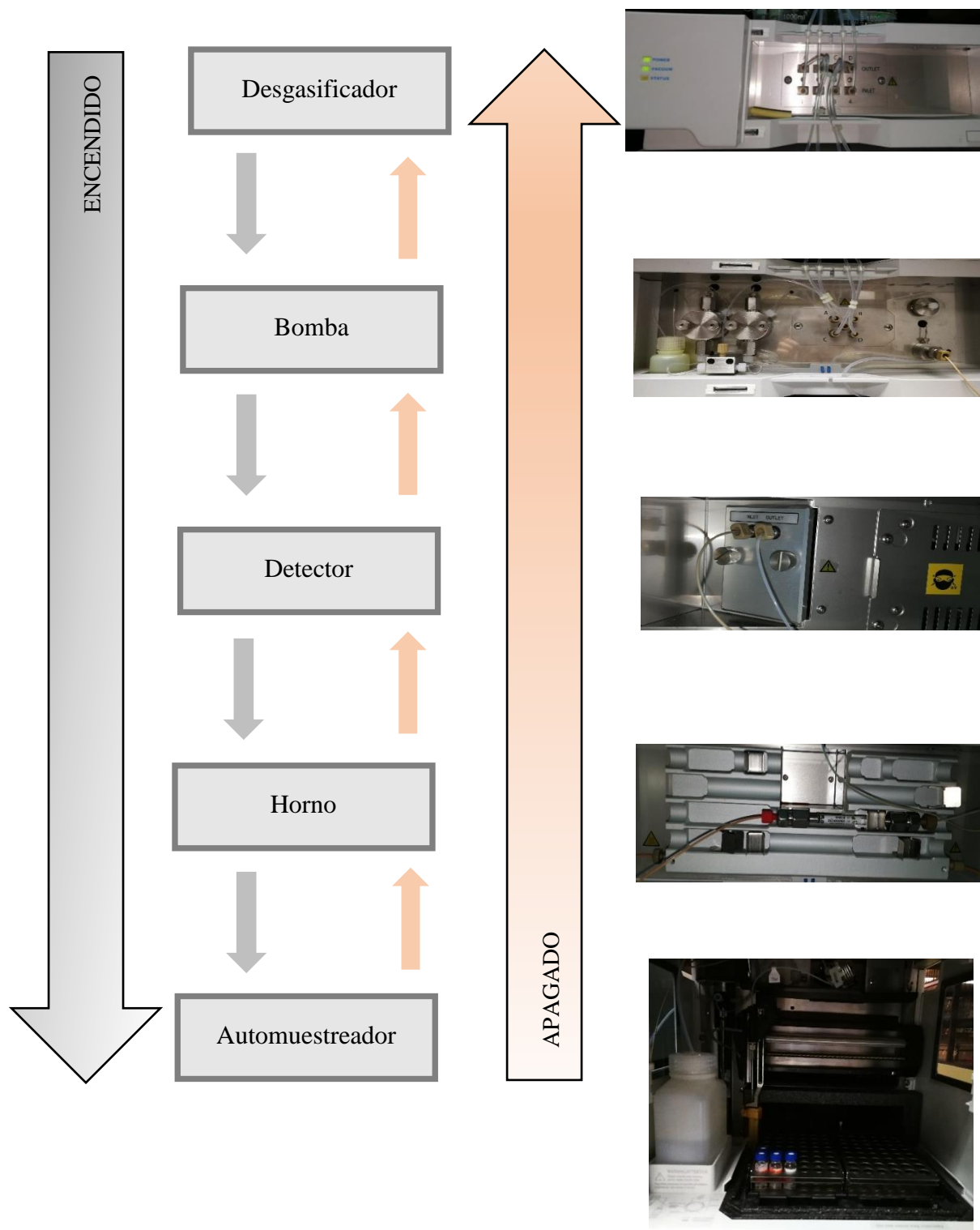
8. DOCUMENTOS RELACIONADOS:

8.1 Manual del fabricante. (Apéndice C).

9. ANEXOS:

9.1 Apagado y encendido del HPLC

Anexo 9.1. Apagado y encendido del HPLC



Con el instructivo anterior se pretende optimizar la manipulación del HPLC y mejorar el conocimiento con los estudiantes, profesores, personal del laboratorio y personal involucrado.

Instrucciones para verificar el uso adecuado del equipo con el personal involucrado.

El objetivo es verificar que el estudiante pueda utilizar de manera general el equipo, para lo cual se aplica la Hoja de cotejo 2 (Apéndice E).

REFERENCIAS

- Albear, F. H. (2016). Metodología para la evaluación de la competencia de elaboración de medicamentos en escenarios laborales. *Revista Información científica*, (2), 302-309. Obtenido de <http://www.revinfcientifica.sld.cu/index.php/ric/article/view/110/1246>
- Badilla, B., Montero, N., Mora, A.I., Quesada, Y., Castro, G. & Monge, M. (2018). Contribución al desarrollo de la educación farmacéutica costarricense: Perfil Académico Profesional de la persona farmacéutica asistencial. *Revista Electrónica "Actualidades Investigativas en Educación"*, 18(3), 30. Obtenido de <https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/aie/article/view/34421/34005>
- Barrón, M. C. (2009). Docencia universitaria y competencias didácticas. *Perfiles educativos*, 31(125), 76-87. Obtenido de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-26982009000300006&lng=es&tlng=es
- Cardozo, F., Jiménez, E., Mosquera, O.M. & Tovar, J. (2017). Neuroprotective activity of *Solanum ovalifolium* (solanaceae) against the toxicity induced by rotenone in *Drosophila melanogaster*. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 13(1), 26-34. Obtenido de <https://revistas.unimilitar.edu.co/index.php/rfcb/article/view/2751/2446>
- Carreño, P., Bonilla, S., Rubio, C., Cortés, M. & Ojeda, J. (2007). Responsabilidad social en la formación del químico Farmacéutico de la Universidad de Valparaíso, Chile. *Edusfarm, revista d'educació superior en Farmàcia*, 2, 12. Recuperado el 13 de Octubre de 2018, de <http://www.publicacions.ub.edu/revistes/edusfarm2/documentos/115.pdf>
- Cataño, Y., Mejía, V., Restrepo, J., Higuera, E. & López, M. (2018). Aporte del químico farmacéutico en el tratamiento de pacientes drogodependientes de Medellín. *Drugs and Addictive Behavior*, 3(2), 256-265. Obtenido de <http://www.funlam.edu.co/revistas/index.php/DAB/article/view/2871>
- Durango, P. (2015). *Las prácticas de laboratorio como una estrategia didáctica alternativa para desarrollar las competencias básicas en el proceso de enseñanza-aprendizaje de la*

química. (U. N. Colombia, Ed.) Colombia. Obtenido de
<http://www.bdigital.unal.edu.co/49497/1/43905291.2015.pdf>

Espinoza, H. (2013). *Validación del método analítico por HPLC para la valoración de Levofloxacino 500 mg tabletas recubiertas*. Perú. Obtenido de
<http://www.dspace.unitru.edu.pe/bitstream/handle/UNITRU/1274/Espinoza%20Alva%2c%20Haidy%20Milagros.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Fidalgo, A. (Octubre de 2016). La innovación docente y los estudiantes. *La Cuestión Universitaria*(7), 84-91. Obtenido de
<http://polired.upm.es/index.php/lacuestionuniversitaria/article/view/3372/3426>

Frontado, Y., Guaimaro, Y. & Flores, M. G. (2018). Metodología ABP como Herramienta Educativa Universitaria para Crear Ciudades Sustentables. *Revista de la Facultad de Ingeniería*, 21(1), 99-107. Obtenido de
<http://revistasenlinea.saber.ucab.edu.ve/temas/index.php/tekhne/article/view/3549/3046>

García, A. & Yusá, D. (2016). *HPLC instrumental*. Editorial de la Universidad Politécnica de Valencia. Obtenido de
https://gdocu.upv.es/alfresco/service/api/node/content/workspace/SpacesStore/18923b6c-0080-4aab-b237-547a4678e10b/TOC_6234_01_01.pdf?guest=true

Gros, B. & Lara, P. (2009). Estrategias de innovación en la educación superior: el caso de la Universitat Oberta de Catalunya. *Revista Iberoamericana de Educación*, 49, 223-245. Obtenido de <https://rieoei.org/historico/documentos/rie49a09.pdf>

Gutierrez, T. H. (Marzo de 2007). Determinación del contenido de ácido ascórbico en uchuva (*physalis peruviana* L.), por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR). *Facultad de Ciencias Agropecuarias*, 5(1), 70-79. Obtenido de
<https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6117626>

Hernández, R. F. (2014). *Metodología de la investigación 6a Edición*. México: McGraw Hil.

Klimenko, O. & Alvares, J. (2009). Aprender cómo aprendo: la enseñanza de estrategias metacognitivas. *Educación y Educadores*, 12(2), 11-28. Obtenido de
<https://www.redalyc.org/pdf/834/83412219002.pdf>

- León, A.P., Risco del Valle, E. & Alarcón, C. (Octubre-Diciembre de 2014). Estrategias de aprendizaje en educación superior en un modelo curricular por competencias. *Revista de la Educación Superior*, 43(172), 123-140. Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0185276015000552>
- López, A. M. & Tamayo, Ó. E. (enero-junio de 2015). Las prácticas de laboratorio en la enseñanza de las ciencias naturales. *Revista Latinoamericana de Estudios Educativos*, 8(1), 145-166. Obtenido de <http://www.redalyc.org/pdf/1341/134129256008.pdf>
- López, J. C. & Pérez, I. (febrero de 2018). ¿Por qué es necesaria una didáctica específica para la educación superior? *Revista Científica ECOCIENCIA*, 5(1), 17. Obtenido de <http://ecociencia.ecotec.edu.ec/upload/php/files/febrero18/04.pdf>
- Luciani-Giacobbe, L., Guzman, M.L., Manzo, R. & Olivera, M.E. (Julio de 2018). Validation of a simple isocratic HPLC-UV method for rifampicin and isoniazid quantification in human plasma. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 8(7), 93-99. Obtenido de http://japsonline.com/admin/php/uploads/2681_pdf.pdf
- Macías, M. E. (2006). Science-Technology-Society in the Health professional training. *Humanidades Médicas*, 6(3). Recuperado el 13 de Octubre de 2018, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1727-81202006000300009&lng=es&tln
- Mendoza, X. & Bernabeu, M. (2006). Aprendizaje basado en problemas: competencias del profesional de la salud. *Innovación Educativa*, 6(35), 14. Obtenido de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=179420847008>
- Misiuk, W. (2010). El papel de los métodos de ensayo en la caracterización de la calidad de los productos farmacéuticos a granel. *Journal of pharmacy & bioallied sciences*, 2(2), 88-92. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3147109/>
- Navea, A. (2018). El aprendizaje autorregulado en estudiantes de ciencias de la salud: recomendaciones de mejora de la práctica educativa. *Educación médica*, 19(4), 193-200. Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S157518131730013X>

- Organización Mundial de la Salud. (2010). *Anexo 1 Buenas prácticas de la OMS para laboratorios de control de calidad de productos farmacéuticos*. Obtenido de Serie de Informes Técnicos de la OMS, No. 957:
https://extranet.who.int/prequal/sites/default/files/documents/TRS957_annex1_SPANISH.pdf
- Organización Mundial de la Salud. (2016). *Sistema de gestión de la calidad en el laboratorio (LQMS)*. Obtenido de
<http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/252631/9789243548272-spa.pdf;jsessionid=35637597389E335A2324602721502707?sequence=1>
- Organización Panamericana de la Salud. (2010). *Organización Mundial de la Salud: Serie de Informes Técnicos, No. 902, 2002 Informe 36, Anexo 3 Buenas prácticas para Laboratorios Nacionales de Control Farmacéutico*. Obtenido de
<http://www1.paho.org/hq/dmdocuments/2011/Red%20PARF%20Documento%20Tecnico%20No%202-Span-Eng-Por.pdf>
- Ortiz, D. (2015). El constructivismo como teoría y método de enseñanza. *Sophia: colección de Filosofía de la Educación*, 19(2), 93-110. Obtenido de
<https://sophia.ups.edu.ec/index.php/sophia/article/view/19.2015.04>
- Osorio, A. (2009). Guía para la instalación, calificación y mantenimiento de sistemas de cromatografía, dentro de un laboratorio acreditado ISO 17025. *Universidad de San Carlos de Guatemala*. Guatemala. Obtenido de
http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/08/08_0724_EA.pdf
- Páez, A. (2018). Estrategias Constructivistas Aplicadas por el Docente para el Aprendizaje de la Física en el Nivel Superior. *Revista Científica*, 3(7), 37-56. Obtenido de
http://www.indteca.com/ojs/index.php/Revista_Scientific/article/view/175
- Pharmacopeia, U. S. (2015). *Farmacopea de los Estados Unidos de América USP 38 NF 33*. Estados Unidos: United States Pharmacopeia.

- Pinilla, A. (2011). Modelos pedagógicos y formación de profesionales en el área de la salud. *Acta Médica Colombiana*, 36(4), 204-218. Obtenido de <http://www.redalyc.org/html/1631/163122508008/>
- Pinilla, A. (2013). Evaluación de competencias profesionales en salud. *Revista de la Facultad de Medicina*, 61(1), 53-70. Recuperado el 13 de octubre de 2018, de <https://revistas.unal.edu.co/index.php/revfacmed/article/view/39632/47334>
- Romero, A. (2002). *Cromatografía*. Obtenido de Instituto de Biotecnología, UNAM: <http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/Cromatografia.pdf>
- Salas, R., Quintana, M. & Pérez, G. (Sep de 2016). Formación basada en competencias en ciencias de la salud. *Medisur*, 14(4), 456-463. Obtenido de <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=68052>
- Samaniego, J & Arias, G. (2016). Development and validation of analytical methodology by HPLC for the simultaneous quantification of phenylephrine hydrochloride, paracetamol and chlorpheniramine maleate tablets. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 82(2), 196-207. Obtenido de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1810-634X2016000200010&script=sci_arttext&tlng=en
- Sarmiento, L.A. & Espinosa, M. P. (2012). Desarrollo y validación de un método analítico para la determinación de venlafaxina en suero mediante HPLC-UV. *ORINOQUIA*, 16(2), 99-106. Recuperado el 27 de Setiembre de 2018, de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-37092012000200011&lng=en&tlng=es.
- Vásquez, G & Olarte, J. (2017). *Diseño de Una Propuesta Curricular para la Formación Básica en Química en el Contexto de la Regencia en Farmacia*. Bogotá: Universidad Pedagógica Nacional. Obtenido de <http://repository.pedagogica.edu.co/bitstream/handle/20.500.12209/7771/TE-21048.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Apéndices

Apéndice A. Reglamento para el uso del laboratorio de química de la U.I.A.

- Localizar los dispositivos de seguridad, extintores, lavaojos, ducha de seguridad, salidas de emergencias. La zona de seguridad del laboratorio está ubicada en el parqueo bajo techo, en la parte de la salida de vehículos.
- Revisar los afiches de medidas en caso de un posible accidente, que se encuentren visibles en los laboratorios.
- No ingerir alimentos y bebidas.
- **Utilice correctamente la vestimenta de seguridad requerida. En caso de portar vestimenta inadecuada (falta de medias altas, de gabacha, gafas de seguridad, zapatos que cubran totalmente el pie), se le notificará que debe retirarse del laboratorio. La seguridad del estudiante es primero.**
- Las personas que usan cabello largo deberán recogerlo con cola (hombre o mujer).
- Trabajar de manera ordenada y seria en el laboratorio, mantener mesas y/o áreas de trabajo limpias y ordenadas. Anótese en las bitácoras para uso de los equipos del laboratorio.
- No deben ingresar al laboratorio personas ajenas a las matriculadas en el curso.
- Asegúrese de desechar los residuos químicos en los recipientes debidamente identificados DEBAJO DE LAS CAPILLAS DE GASES, no deseche residuos en las pilas, tanto químicos como residuos biodegradables como cáscaras u hojas.
- En caso de quebrar algún instrumento debe cancelar el precio total del mismo en su próxima matrícula, este cobro se realizará por medio de una boleta.
- En caso de no reportar el daño en los instrumentos, el costo total del mismo deberá asumirlo el grupo, la Dirección de Carrera notificará las disposiciones a seguir.
- Utilice correctamente los reactivos químicos dispuestos para su práctica, asegúrese de que estén bien cerrados y no los mezcle ni desordene. En caso de derrame informe a los encargados del laboratorio.
- En caso de necesitar algún material adicional, informe al personal del laboratorio.
- Los reactivos químicos siempre deben quedar en la mesa de reactivos donde los encontraron, no en balanzas ni cuartos de equipo. En caso de encontrar reactivos fuera de su lugar, se le notificará al profesor y a la dirección de carrera en caso de que persista la situación. (*En especial los cursos de Industrial*)
- Revise la cristalería asignada, sino está conforme con la cristalería asignada, repórtelo inmediatamente. Cualquier cristalería que sufra daños bajo su responsabilidad será cobrada, y a pagar en su próxima matrícula. Regrese la cristalería limpia.
- El préstamo de gabachas o lentes de seguridad, es exclusivamente para estudiantes del laboratorio de Química.

- **EL ESTUDIANTE QUE NO CUMPLA CON ESTAS DISPOSICIONES DE SEGURIDAD SERÁ RETIRADO DEL LABORATORIO, CON AVISO PREVIO A LA DIRECCIÓN DE CARRERA.**

EN CASO DE ACCIDENTE

El laboratorio de química es un lugar con posibles riesgos de accidente, cuide su salud y la de sus compañeros, trabaje de manera ordenada, no juegue ni corra, acate las recomendaciones y No realice ninguna acción innecesaria sin consultar.

- Informe inmediatamente al profesor y al personal del laboratorio.
- Siga los procedimientos de “EN CASO DE ACCIDENTES” que se encuentra visiblemente en los laboratorio, asesorados por el personal del laboratorio que se encuentra capacitado para atención de emergencias.
- Mantenga la calma, y espere a la unidad médica, para ser trasladados al centro médico más cercano, en caso de ser necesario.

USO DE LOS CASILLEROS

- Ningún estudiante puede ingresar al laboratorio con bolsos, bultos, únicamente con los materiales necesarios.
- Cada uno de los estudiantes puede hacer uso de los casilleros en el turno del laboratorio matriculado. Terminada la práctica, cada estudiante debe retirar sus pertenencias, de manera que el espacio quede habilitado para el siguiente curso/estudiante, caso contrario el laboratorio de química está autorizado en cortar candados y no está obligado a reponer, ya que, es responsabilidad de cada estudiante desocupar el casillero.
- A cada estudiante se le asignará un número de casillero, para cada curso. Recomendación anote su número de casillero en la bitácora del curso.
- El tiempo de uso del casillero es ÚNICAMENTE en el turno matriculado.
- Cada estudiante debe portar su candado, de lo contrario queda bajo su responsabilidad el cuidado de sus pertenencias.
- El laboratorio de química no se hace responsable por objetos perdidos u olvidados.

Apéndice B. Glosario

Aparato	Un cromatógrafo de líquidos consta de un recipiente que contiene la fase móvil, una bomba para forzar el paso de la fase móvil a través del sistema a alta presión, un inyector para introducir la muestra en la fase móvil, una columna cromatográfica, un detector y un dispositivo de recolección de datos.
Automuestreador	Consiste en una bandeja que sostiene el vial con la muestra que se inyecta en el equipo y llega a la columna cromatográfica para que ocurra la separación del componente.
Bomba	Su función es bombear la fase móvil o los solventes, los cuales transportan posteriormente la muestra. Existen de dos tipos: isocrática (un solo canal de fase móvil) o cuaternaria (de cuatro canales).
Columna Cromatográfica	El término incluye columnas de acero inoxidable, de acero inoxidable con recubrimiento interno y poliméricas, rellenas con una fase estacionaria.
Compartimiento de la columna u horno	Soporta la columna y mantiene una determinada temperatura durante el análisis.
Cromatografía de líquidos	Es una técnica de separación basada en una fase estacionaria sólida y una fase móvil líquida.
Cromatograma	Un cromatograma es una representación gráfica de la respuesta del detector, concentración de analito en el efluente u otra cantidad usada como una medida de concentración del efluente en función del volumen de efluente o del tiempo.
Desgasificador	Parte del HPLC cuya función es eliminar el aire de los solventes usados y así evitar alteraciones en el sistema cromatográfico.
Detector	Tiene como función detectar la señal química producida durante la separación entre la fase estacionaria y la fase móvil y convertirla en una

señal eléctrica que puede ser integrada, que genera un valor matemático o área bajo la curva.

Elución en Gradiente	Se denomina <i>elución en gradiente</i> o programación del disolvente a la técnica de cambiar continuamente la composición del disolvente durante la cromatografía. El perfil de elución en gradiente se presenta en la monografía individual como una tabla de gradientes, que indica el tiempo y la composición proporcional de la fase móvil en el tiempo indicado.
Eventos de integración	Son parámetros que definen la integración de un pico cromatográfico, para definir el área que se va a cuantificar. Por ejemplo, un rango de tiempo para la integración.
Factor de Retención (k)	Se conoce como el factor de capacidad (k'). Se define como: $k = \text{tiempo de la sustancia en la fase estacionaria} / \text{tiempo de la sustancia en la fase móvil}$.
Fase Estacionaria	Las separaciones se logran por procesos de partición, adsorción o intercambio iónico, según el tipo de fase estacionaria empleada. Las fases estacionarias más comúnmente usadas son la sílice modificada o las microperlas de polímero.
Fase Móvil	La fase móvil es un disolvente o mezcla de disolventes, según se define en la monografía individual.
Número de Platos Teóricos (N)	Es una medida de eficiencia de la columna. El valor de N depende de la sustancia cromatografiada, así como de las condiciones operativas, tales como la velocidad de flujo y la temperatura de la fase móvil o gas transportador, la calidad del relleno, la uniformidad del relleno dentro de la columna.
Pico	Es la porción del cromatograma que registra la respuesta del detector cuando un componente individual eluye de la columna. Si la separación es incompleta, se puede registrar la elución de dos o más componentes como un pico no resuelto.

Resolución (R)	Es la separación de dos componentes en una mezcla.
Retención Relativa (r)	Es el cociente entre el tiempo de retención ajustado de un componente y el de otro usado como referencia obtenido en condiciones idénticas.
Relación Pico/Valle (p/v)	La p/v se puede emplear como un criterio de aptitud del sistema en una prueba de sustancias relacionadas cuando no se logra la separación entre dos picos en la línea base.
Ruido	Es cualquier perturbación generada por la señal del detector y que no es originada por la salida del soluto de la columna.
Tiempo Muerto (tM)	Es el tiempo requerido para la elución de un componente no retenido (mostrado como un pico de aire o de componente no retenido, con la escala de la línea base en minutos).
Tiempo de Retención (tR)	Es el tiempo transcurrido entre la inyección de la muestra y la aparición de la respuesta máxima. Se puede usar tR como un parámetro para identificación.
Volumen Muerto (VM)	Es el volumen de fase móvil requerido para eluir un componente no retenido.
Volumen de Residencia (D):	Es el volumen entre el punto en el que se encuentran los eluyentes y la entrada de la columna.
Volumen de Retención (VR)	El volumen de retención es el volumen de fase móvil requerido para la elución de un componente.

(USP 38, 2015, pp. 453-459).

Apéndice C. Manual del HPLC de la U.I.A.



Apéndice D. Hoja de cotejo sobre el conocimiento y las habilidades requeridas por el personal que está involucrado en la manipulación y uso del HPLC

Equipo: **Cromatógrafo líquido YL-Clarity®**

Encargado de la aplicación: _____

Estudiante _____ Profesor _____ Asistente de laboratorio _____ Otro usuario _____

Pregunta	SÍ	NO	Observaciones
¿Conoce el fundamento de la técnica de Cromatografía Líquida?			
¿Puede mencionar las partes del HPLC?			
¿Puede describir las funciones de cada parte del HPLC?			
¿Ha usado el HPLC del laboratorio?			
¿Maneja el software del HPLC de manera satisfactoria?			
¿Cree que puede mejorar su conocimiento y habilidades en el uso del HPLC?			

Observaciones: _____

Apéndice E. Hoja de cotejo 2

Equipo: **Cromatógrafo líquido YL-Clarity®**

Encargado de la aplicación: _____

Estudiante _____ Profesor _____ Asistente de laboratorio _____ Otro usuario _____

Indicador	SÍ	NO	Observaciones
Verifica que exista cantidad suficiente de solventes en las botellas.			
Verifica que los filtros estén sumergidos en los solventes.			
Verifica que exista columna cromatográfica en el compartimiento de columna del equipo.			
Enciende el equipo en el orden adecuado.			
Ingresa al software del equipo y accede la pantalla principal.			
Abre un método existente y revisa las condiciones.			
Logra ingresar a la pantalla de la purga.			
Abre una secuencia existente y revisa los parámetros.			
Simula que se envía a correr una secuencia.			
Abre un cromatograma existente.			
Le aplica la integración al cromatograma.			
Observa el reporte del cromatograma y lo envía a imprimir.			
Apaga el equipo en el orden adecuado.			

Observaciones: _____

Apéndice F. Proceso de limpieza del detector

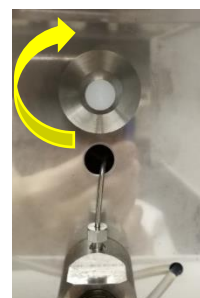
Purgar el canal de la fase móvil con agua purificada



Colocar una unión sustituyendo la columna en el compartimento



Cerrar la purga



Procurar que todo el sistema, incluyendo el detector, sea limpiado con agua purificada

Apéndice G. Mantenimiento mensual y rotación de canales

Procedimiento:

1. Si hubiera alguna columna puesta en el equipo retírela y coloque una unión que permita conectar la tubería de entrada a la columna con la tubería de salida de la columna, y que permita el paso de agua purificada caliente hasta la celda del detector.
2. Saque los filtros que están en la entrada de las tuberías de los canales para solventes.
3. Sonifique todos los filtros en agua purificada por 15 minutos y luego sonifique en agua purificada: metanol (50:50) por 15 minutos.
4. Caliente agua purificada hasta 70°C.
5. Enjuague los filtros con agua purificada y colóquelos nuevamente en la posición correcta.
6. Abra la llave de purga para evitar que un flujo alto genere un exceso de presión en la celda.
7. Pase a través de la tubería para el canal (A) agua purificada caliente, a un flujo de 2 mL/min, durante 5 minutos.
8. Repita el paso anterior para el resto de canales (B, C, y D).
9. Pase simultáneamente agua purificada caliente a un flujo de 1 mL/min por todas las tuberías (25% por cada canal) con el propósito de que la válvula de proporcionamiento abra y cierre, por 10 minutos.
10. Detenga el flujo de la bomba.
11. Filtre el agua purificada, el metanol para Cromatografía Líquida, el acetonitrilo para Cromatografía Líquida; llene las botellas correspondientes.
12. Coloque las tuberías de los canales en las botellas de los solventes (A, B, C, y D), de manera tal que se roten los canales, con el propósito de alternar el canal por el que va a pasar la fase móvil durante la semana.
13. Abra la llave de la purga.
14. Pase simultáneamente los solventes a un flujo de 2 mL/min por todas las tuberías (25% por cada canal) por 20 minutos, o si no purgue cada canal de cada solvente a un flujo de 2 mL/min por 5 minutos.
15. Asegúrese de cambiar la solución de Isopropanol al 10% de la bomba y del automuestreador, a fin de que esta solución no se sature de sales provenientes de fases móviles.

Nota: el propósito de rotar los solventes, semanalmente, es hacer que el desgaste de la válvula de proporcionamiento o de mezclado de solventes sea uniforme.

Apéndice H. Verificación del HPLC

Procedimiento:

***Nota aclaratoria:** Se toma como referencia interna de un laboratorio farmacéutico para éste procedimiento, la prueba de desempeño utilizando cafeína, según lo utilizado en el manual del fabricante del HPLC marca: Waters.

1. Preparación de soluciones:

- 1.1. Solución de cafeína (1): pese exactamente alrededor de 20 mg de cafeína estándar de referencia en un balón aforado de 100 mL; disuelva, afore con agua purificada y mezcle. Transfiera una alícuota de 25 mL de la solución anterior y llévela a un balón aforado de 500 mL; afore con agua purificada y mezcle. (Concentración: 10 µg/mL de cafeína).
- 1.2. Solución de cafeína (2): pese exactamente alrededor de 15 mg de cafeína estándar de referencia en un balón aforado de 10 mL; disuelva, afore con metanol y mezcle. (Concentración: 1500 µg/mL de cafeína).
- 1.3. Solución (3): transfiera una alícuota de 2 mL de la solución (2) y llévela a un balón aforado de 200 mL, afore con metanol y mezcle. (Concentración: 15 µg/mL de cafeína).
- 1.4. Curva de calibración: prepare una solución madre pesando exactamente alrededor de 50 mg de cafeína estándar de referencia en un balón aforado de 50 mL: afore con agua purificada, transfiera alícuotas de 0,1; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 mL y lleve a balones de 25 mL para preparar una curva de calibración.

2. Pruebas a realizar en la verificación de los equipos de Cromatografía Líquida:

Tabla 15. Verificación de Desempeño

MÓDULO	ATRIBUTOS	ESPECIFICACIÓN
Bomba	Exactitud de flujo.	±2%.
	Exactitud del gradiente.	±1,0%.
Inyector	Precisión.	<1% RSD.
	Linealidad.	$r^2 \geq 0,999$.
	Arrastre (Carryover).	<1%.
Detector	Linealidad.	$r^2 \geq 0,997$.
Compartimiento de la columna Horno	Exactitud de la temperatura.	±2°C.

Nota: Elaborado por la autora (marzo, 2019).

2.1. Bomba:

2.1.1. Determinación de exactitud del flujo:

- 2.1.1.1. Programe la bomba para un flujo de 1 mL/minuto, empleando como fase móvil una mezcla de metanol para Cromatografía Líquida y agua purificada (1:1).
- 2.1.1.2. Coloque el balón aforado en la tubería de entrada a la columna.
- 2.1.1.3. Utilizando un cronómetro calibrado, mida el tiempo que tarda en llenarse el balón aforado de 25 mL (calibrado), con la fase móvil filtrada.
- 2.1.1.4. Realice 5 repeticiones y promedie.
- 2.1.1.5. Proceda de la misma forma para el flujo de 2 mL/min.
- 2.1.1.6. Cálculos:

$$\text{Flujo: } \frac{\text{Volumen Balón}}{\text{Tiempo}_{\text{llenado}}}$$

2.1.1.7. Interpretación:

- 2.1.1.7.1. El flujo promedio obtenido debe estar entre $\pm 2\%$ de cada valor de flujo.
- 2.1.1.7.2. Para 1,0 mL/minuto (de 0,98 a 1,02) mL/minuto.
- 2.1.1.7.3. Para 2,0 mL/minuto (de 1,96 a 2,04) mL/minuto.

2.1.2. Determinación de exactitud del gradiente:

- 2.1.2.1. Utilice un conector de férulas (unión) en lugar de la columna, y una longitud de onda de 272 nm.
- 2.1.2.2. Realice una purga con agua purificada y filtrada, con una proporción de 25% para cada uno de los canales (A-B-C-D), por 20 minutos.
- 2.1.2.3. Coloque agua purificada y filtrada en el canal "A" y en los canales "B", "C", y "D"; coloque la solución (1) (filtrada).
- 2.1.2.4. Realice la purga a cada uno de los canales, con una proporción de 25% para cada uno de los canales (A-B-C-D) por 20 minutos.
- 2.1.2.5. Programe un flujo de 2,0 mL/min, con 100% del canal "A", y espere a que estabilice la línea base.
- 2.1.2.6. Coloque un vial con agua purificada filtrada y realice una inyección de 0,1 μL , una vez programado el gradiente de flujo.

- 2.1.2.7. Programe el perfil del gradiente de acuerdo con la tabla 16.
- 2.1.2.8. Repita los pasos del 2.1.2.2 al 2.1.2.7 con la combinación Canal A-Canal C, Canal A-Canal D.

Tabla 16. Gradiente de flujo

Paso	Tiempo (minutos)	Flujo (mL/minuto)	Solvente (canal A)	Solvente (canal B)
1	0-5,00	2	100	0
2	5,01-10,00	2	90	10
3	10,01-15,00	2	50	50
4	15,01-20,00	2	10	90
5	20,01-25,00	2	0	100
6	25,01-30,00	2	100	0

Nota: Elaborado por la autora (marzo, 2019).

- 2.1.2.9. Cálculos:

$$\% = \frac{\text{Altura del nivel de Conc} - \text{Altura del nivel 0\% de Conc}}{\text{Altura del nivel 100\% de Conc} - \text{Altura del nivel 0\% de Conc}} * 100$$

$$\text{Altura del nivel 100\% de Conc} - \text{Altura del nivel 0\% de Conc}$$

- 2.1.2.10. Donde:

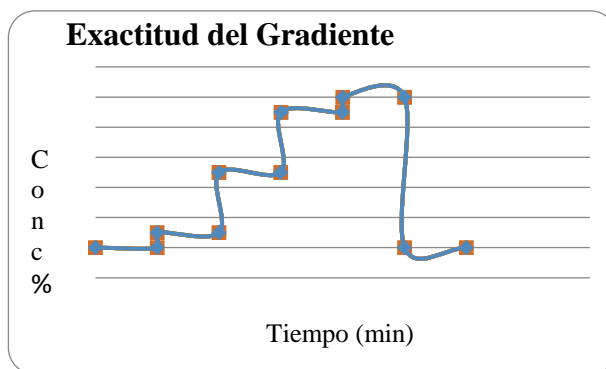
2.1.2.10.1. Altura del nivel de concentración= Altura de la línea base al nivel de concentración de interés (10%, 50%, 90% solución de cafeína).

2.1.2.10.2. Altura del nivel 0% de concentración= Altura de la línea base al nivel de concentración 0% solución de cafeína.

2.1.2.10.3. Altura del nivel 100% de concentración= Altura de la línea base al nivel de concentración 100% solución de cafeína.

- 2.1.2.11. Interpretación: la exactitud del gradiente tiene que encontrarse entre $\pm 1,0\%$ para cada nivel de concentración.

Figura 73. Gráfica de medición de exactitud del gradiente



Nota: Elaborado por la autora (marzo, 2019).

2.2. Inyector:

2.2.1. Condiciones analíticas:

2.2.1.1. Columna cromatográfica C18 150 * 4,6 mm, 10 µm.

2.2.1.2. Fase móvil: Agua purificada/Acetonitrilo para Cromatografía Líquida (85:15) v/v.

2.2.1.3. Flujo: 1,2 mL/minuto.

2.2.1.4. Volumen de Inyección: 20 µL.

2.2.1.5. Detección: 272 nm.

2.2.1.6. Temperatura: ambiente.

2.2.2. Determinación de arrastre:

2.2.2.1. Utilizando las condiciones analíticas establecidas, inyecte la solución (2).

2.2.2.2. Inyecte un blanco, utilizando metanol.

2.2.2.3. Determine el porcentaje que representa el área del pico de interés en el blanco con respecto a la respuesta del analito en la muestra concentrada.

2.2.2.4. Interpretación: el porcentaje encontrado debe ser menor al 1%.

2.2.3. Determinación de precisión:

2.2.3.1. Coloque la columna y establezca de acuerdo con las condiciones analíticas establecidas.

2.2.3.2. Programe el equipo, utilizando los instructivos de uso y limpieza.

- 2.2.3.3. Inyecte la solución (3), realizando 6 réplicas.
- 2.2.3.4. Calcule el porcentaje de la desviación estándar relativa de las áreas obtenidas y de los tiempos de retención.
- 2.2.3.5. Interpretación: el porcentaje de la desviación estándar relativa del tiempo de retención y áreas debe ser menor al 1%.

- 2.2.4. Determinación de linealidad:
 - 2.2.4.1. Utilizando la solución (3), inyecte: 5, 10, 20, 50, 100 μL .
 - 2.2.4.2. Grafique el área obtenida para cada volumen contra el volumen de inyección y calcule el coeficiente de correlación.
 - 2.2.4.3. Interpretación: el coeficiente de correlación debe ser mayor o igual a 0,999.

- 2.2.5. Detector (UV-VISIBLE):
 - 2.2.5.1. Linealidad de la respuesta:
 - 2.2.5.1.1. Con las condiciones analíticas establecidas, inyecte la curva preparada en el punto 1.4.
 - 2.2.5.1.2. Interpretación: el Coeficiente de correlación debe ser mayor o igual a 0,997.

- 2.2.6. Compartimiento de la columna (Horno):
 - 2.2.6.1. Coloque un termómetro digital con termocupla (calibrado) en el lugar donde se conecta la columna; cierre la puerta del compartimiento.
 - 2.2.6.2. Programe el equipo para una temperatura de 40° C, cuando el equipo marque que alcanzó la temperatura programada; espere a que se estabilice y anote la temperatura que está marcando el equipo medidor de temperatura.
 - 2.2.6.3. Proceda de la misma manera, pero programando 60° C.
 - 2.2.6.4. Interpretación: la diferencia de temperaturas obtenida entre la programada y la que marca el equipo medidor de temperatura debe ser $\pm 2^\circ \text{C}$ para 40° C y para 60° C.

