



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**“MANUALES E INSTRUCTIVOS PARA LA OPERACIÓN
DEL CROMATÓGRAFO DE LÍQUIDOS DE ULTRA
DESEMPEÑO Y ESPECTRÓMETRO DE MASAS”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A:
MIRIAM ITZEL SANCHEZ GARCIA

ASESORA: DRA. RAQUEL LÓPEZ ARELLANO

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE**

**ATN: M. EN A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO
Jefe del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Manuales e instructivos para la operación del Cromatógrafo de Líquidos de Ultra desempeño y Espectrómetro de Masas.

Que presenta la pasante: Miriam Itzel Sanchez Garcia
Con número de cuenta: 406034045 para obtener el Título de la carrera: Química Farmacéutico Biológica

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 08 de Septiembre de 2015.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	D.A.R. Juan José Díaz Esquivel	
VOCAL	Dra. Raquel López Arellano	
SECRETARIO	Q.B.P. Martha Elena García Corrales	
1er. SUPLENTE	M.I. Claudia Mariano Hernández	
2do. SUPLENTE	M. en C. Gabriela Rodríguez Patiño	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

IHM/mmgm*

AGRADECIMIENTOS.



Primeramente, quiero agradecer a Dios por existir y permitirme vivir en esta época.

Quiero darles las gracias a mis padres, a quienes les debo todo lo que soy, gracias por el amor y apoyo que me han brindado siempre. Esta es sólo una manera de agradecerles todo lo que han hecho por mí. Los quiero con todo mi corazón.

A mis amigos de la FES y del LEDEFAR. Gracias por su amistad, consejos, por su compañía y especialmente, por darme tan hermosos recuerdos.

A mi asesora de tesis. Dra. Raquel, mi admiración y gratitud por todo su apoyo, confianza, amistad y enseñanza. Muchas gracias por permitirme formar parte de su equipo de trabajo.

A mis sinodales. Quiero agradecerles por el apoyo que me brindaron para poder concluir este trabajo, gracias por sus consejos y por brindarme su amistad.

Gracias FES-Cuautitlán, por darme la oportunidad de formar parte de una gran institución.



ありがとう



CONTENIDO

Secciones	Pág.
I. ÍNDICE DE FIGURAS Y CUADROS	7
II. ABREVIATURAS	8
III. INTRODUCCIÓN	9
IV. MARCO TEÓRICO	11
IV.1. Documentación	11
IV.2. ¿Qué es un documento?	11
IV.3. Sistema de Documentación	12
IV.4. Control de Documentos	14
IV.5. Documentación Electrónica	15
IV.6. Procedimientos Normalizados de Operación (PNO)	16
IV.7. Manual de Operación	17
IV.7.1. Importancia y utilidad de un Manual Operativo	17
IV.7.2. Desarrollo del Manual Operativo	17
IV.8. Introducción a la cromatografía líquida de ultra desempeño	23
IV.8.1. ¿Qué es la UPLC?	23
IV.8.2. Beneficios de la UPLC	25
IV.9. Aplicación de la cromatografía líquida (UPLC) acoplada a la espectrometría de masas	26
IV.9.1. ¿Por qué el acoplamiento UPLC-MS?	26
IV.9.2. Espectrometría de masas	26
IV.9.3. Interfases de Ionización a Presión Atmosférica (API)	27
IV.9.4. Interfase de Electrospray (ESI)	28
IV.9.5. Interfase de Ionización Química a Presión Atmosférica (APCI)	31
V. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	34
VI. OBJETIVOS	35
VII. METODOLOGÍA	36
VII.1. Diagrama de flujo	36

VIII. RESULTADOS	37
VIII.1. Manuales de Operación (Formato establecido para los manuales de operación)	38
VIII.2. PNO's e Instructivos (Formato establecido para los PNO's e Instructivos de trabajo)	43
IX. ANÁLISIS DE RESULTADOS	54
X. CONCLUSIONES	56
XI. REFERENCIAS	57
XII. ANEXOS	60
XII.1. ANEXO A (resultados). Sistema ACQUITY UPLC Clase H	61
XII.1.A-1 Manual de Operación para el equipo ACQUITY UPLC Clase H.	62
XII.1.A-2 Procedimiento Normalizado de Operación para el sistema ACQUITY UPLC Clase H.	191
XII.1.A-3 Instructivos de trabajo para el sistema ACQUITY UPLC Clase H.	202
XII.2. ANEXO B (resultados). Sistema de espectrometría de masas Xevo TQ	209
XII.2.B-1 Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ.	210
XII.2.B-2 Instructivos de trabajo para el sistema de espectrometría de masas Xevo TQ.	367
XIII.3. ANEXO C (resultados).	374
XIII.3.C-1 Recomendaciones Generales para el mantenimiento de las columnas cromatográficas.	375
XIII.3.C-2 Troubleshooting. Resolución de Problemas Cromatográficos.	377

RESUMEN

La presente tesis permitió la obtención de dos manuales de Operación; uno para el sistema de cromatografía líquida ACQUITY UPLC Clase H y otro para el sistema de espectrometría de masas Xevo TQ ambos de la marca Waters; así como la elaboración de sus respectivos PNO's e instructivos de trabajo para el Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico LEDEFAR.

La finalidad de elaborar los manuales e instructivos se debe a la necesidad de brindar a los analistas químicos del LEDEFAR una herramienta que sirva de guía y capacitación que permita conocer el manejo y mantenimiento de cada uno de los sistemas para el desarrollo de sus actividades. Para ello se llevo acabo la recolección de la información a través de los cursos impartidos por el personal técnico de Waters, de las imágenes de las pantallas del software, así como de la experiencia de los usuarios que operan constantemente los sistemas.

En estos manuales e instructivos se definen todas las operaciones que se deben de llevar a cabo en actividades de rutina. Abarcan información relacionada con las características de cada sistema y manejo de los Software Empower y MassLynx respectivamente, asimismo se incluyen apéndices sobre la resolución de problemas y consideraciones generales sobre los solventes a utilizar.

El resultado de implementar estos manuales, PNO's e instructivos logró facilitar el desempeño de los analistas y permitió un mejor manejo en la operación de dichos sistemas.

ÍNDICE DE FIGURAS Y CUADROS

- Figura 1.** Modelo piramidal para la documentación ISO 9000.
- Figura 2.** Historia del tamaño de las partículas en la cromatografía líquida.
- Figura 3.** Comparación de separaciones cromatográficas utilizando partículas de 5.0 μm y 1.7 μm .
- Figura 4.** Diagrama de un proceso de espectrometría de masas.
- Figura 5.** Esquema de un proceso de análisis por espectrometría de masas con ESI.
- Figura 6.** Proceso de la formación de gotas cargadas por electrospray.
- Figura 7.** Proceso de Evaporización del solvente y Fisión de la gota.
- Figura 8.** Esquema del análisis por Ionización Química a Presión Atmosférica APCI.
- Figura 9.** Formato del encabezado de página desarrollado para los Manuales, PNO's e Instructivos de operación.
- Figura 10.** Formato de la portada para los manuales de operación.
- Figura 11.** Formato del cuadro elaborado para establecer el nombre de la(s) persona(s) que elaboro y revisaron los documentos.
- Figura 12.** Formato del cuadro elaborado para establecer el nombre de la(s) persona(s) que elaboro y revisaron los documentos.
- Figura 13.** Formato general para los procedimientos Normalizados de Operación.
- Figura 14.** Formato general para el contenido de los procedimientos Normalizados de Operación.
- Figura 15.** Formato general para la elaboración de los Instructivos.
- Cuadro 1.** Diferencias entre las interfases ESI y APCI.
- Cuadro 2.** Lista de los PNO's e Instructivos elaborados y su descripción.

ABREVIATURAS

m/z	masa/carga
μm	micrómetro
μM	micromoles
nm	nanómetro
APCI	Ionización química a presión atmosférica
API	Ionización a presión atmosférica
BPD	Buenas prácticas de documentación
BPM	Buenas prácticas de manufactura
CL	Cromatografía líquida
ESI	Ionización por electrospray
HETP	Altura equivalente a un plato teórico
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
MS	Espectrometría de masas
LEDEFAR	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico
PNO	Procedimiento normalizado de operación
UPLC	Cromatografía líquida de ultra desempeño
UPLC-MS	Cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, dentro de la industria farmacéutica se requieren profesionistas que desarrollen una gran gama de habilidades y conocimientos, como en este caso el manejo de técnicas de cromatografía líquida de ultra desempeño y espectrometría de masas; técnicas analíticas que son ampliamente utilizadas dada su elevada selectividad y sensibilidad en el campo de la investigación farmacéutica.

El laboratorio de ensayos de desarrollo farmacéutico (LEDEFAR) cuenta con un sistema de cromatografía líquida de ultra desempeño (UPLC), así como un sistema UPLC acoplado a un espectrómetro de masas, instrumentos que son manipulados en su mayoría por Tesistas y prestadores de Servicio Social quienes no cuentan con la experiencia del manejo de los mismos. Por tal motivo, requieren de una herramienta clara y específica que los capacite en la operación y mantenimiento de dichos instrumentos y que de este modo siempre esté disponible en el momento que el usuario la requiera.

Los Manuales e Instructivos, se consideran como un instrumento imprescindible para guiar y conducir en forma ordenada y detallada el desarrollo de las actividades, evitando errores y la duplicidad de esfuerzos, todo ello con la finalidad de optimizar el aprovechamiento de los recursos y agilizar las tareas que realiza el usuario.

En la elaboración de manuales e instructivos de operación, se debe de tener presente que toda información debe cumplir por lo menos los siguientes requisitos básicos:

- Debe ser Versado
- Debe ser Claro
- Debe ser Preciso
- Debe ser Ordenado

Por lo anterior, la presente tesis tiene como propósito dar a conocer los manuales e instructivos de operación para el sistema ACQUITY UPLC Clase H y el sistema de espectrometría de masas Xevo TQ ambos de la marca Waters, describiendo paso a paso las operaciones mínimas necesarias que se deben de llevar a cabo para el manejo y mantenimiento de los mismos.

Igualmente, estos manuales e instructivos servirán para implementar buenas prácticas de laboratorio (BPL) para asegurar que la calidad de los resultados obtenidos por los sistemas sean reproducibles y representativos, garantizando la validez y confiabilidad de los resultados en una prueba analítica.

Este trabajo se divide en tres partes, las cuales se presentan de la siguiente manera:

La primera parte de esta tesis hace referencia al sistema de documentación, la elaboración de PNO y la elaboración del manual de operación. Asimismo, se abarcan temas relacionados con la cromatografía líquida y la espectrometría de masas.

En la segunda parte se presentan los resultados, en los cuales se describe el formato para la elaboración de los manuales de operación, los procedimientos normalizados de operación y los instructivos.

Finalmente la tercera parte corresponde a los Anexos, en los cuales se muestran los manuales de operación de cada sistema y los PNO's e instructivos de trabajo elaborados.

MARCO TEÓRICO

— Documentación

La pieza fundamental de cualquier sistema de calidad que quiera tener cumplimiento de las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) es la documentación. La documentación es la principal evidencia para demostrar que se están llevando a cabo todas las actividades señaladas para la obtención de productos de calidad.

Las buenas prácticas de Documentación (BPD) han sido creadas para asegurar el empleo correcto y permanente de los documentos asociados con la elaboración de un medicamento; con la finalidad de garantizar que las operaciones farmacéuticas se llevaron a cabo de manera adecuada, permitir la rastreabilidad oportuna de la información y facilitar investigaciones en caso de requerirlas. (Perez, 2015)

Así las BPD permiten asegurar que:

- ▶ Se hace lo que se debe hacer
- ▶ Documentar lo que fue realizado (en tiempo y forma)
- ▶ Tomar acciones apropiadas si algo no se hace bien
- ▶ Realizar cambios de manera controlada

二 ¿Qué es un documento?

Las BPD describen a un documento como “a toda forma organizada de información (ya sea física o electrónica) para controlar actividades y operaciones para dar evidencia o prueba legal de algo”. (García, 2011)

Existen muchas maneras de presentar un documento, estas pueden ser en forma de papel, video, formas digitales, fotografías u otros. Las razones para documentar van desde facilitar la comunicación y hacerla más precisa y menos ambigua hasta ayudar a la toma de decisiones.

Una buena documentación puede responder a preguntas como ¿Qué hago?, ¿Por qué lo hago?, ¿Cómo lo hago? Es por ello que las BPD son consideradas como una herramienta de gran ayuda.

Estas son utilizadas en la industria para la creación y mantenimiento de procedimientos, formatos, registros y demás documentación que definan los controles que deben cuidarse a fin de prevenir errores y asegurar que todo el personal de la organización sigue los procedimientos correspondientes; así como también facilitar la trazabilidad de los productos.

Implementando un buen sistema de Buenas Prácticas de Documentación se debe no sólo lograr la rastreabilidad de los productos, si no estandarizar la forma en que se realizan las actividades ante el personal, se podrán disminuir costos, disminuir errores, disminuir tiempos muertos y se podrá aumentar la confiabilidad de las operaciones realizadas, aumentará la calidad de los productos fabricados, aumentará la producción y se logrará la satisfacción de los usuarios.

Los documentos por tanto, son el soporte de las actividades de mejora de la calidad, son una manera excelente de preservar la historia de cómo se realizaron las cosas, sustentan y justifican la toma de una decisión en particular.

≡ Sistema de Documentación

El objetivo de establecer un sistema de documentación confiable es reducir el error que puede cometerse al manejar la información de manera desorganizada y evitar confusiones, por lo que siempre se deben tener los documentos actualizados y en orden a fin de garantizar su correcta comprensión.

Dentro del sistema de documentación se encuentra el modelo piramidal (**Figura 1**), el cual está compuesto por cuatro niveles de requerimientos. Esta estructura jerárquica permite asegurar:

- a) Que en cada lugar, área o departamento de la empresa existan los documentos precisos y necesarios para la labor que se desempeña.
- b) La actualización de los documentos sea ágil, al poderse actualizar de modo individual.



Figura 1. Modelo piramidal para la documentación ISO 9000.

Nivel 1: Manual de Calidad

La política de calidad es el primer paso que debe desarrollar la empresa, forma parte del manual de calidad y su propósito es dar a conocer las intenciones de la empresa (misión, visión, objetivos estratégicos) y dar una visión general del sistema de calidad.

La política de calidad se define como “las intenciones globales y orientación de una organización relativas a la calidad tal como se expresan formalmente por la alta dirección”. (ISO, 9000. 2008)

El manual de calidad es un documento de política general, describe cómo enfoca la empresa los requerimientos de la norma ISO 9001, sección por sección. Este documento plantea, en términos generales los métodos usados por la empresa para asegurar la calidad.

Nivel 2: Los Procedimientos

Los procedimientos describen las actividades necesarias para poner en marcha los elementos del sistema de calidad en cada una de las áreas o departamentos de forma ordenada y definida.

Todo procedimiento debe cumplir con el propósito de la actividad, alcance de la actividad, responsabilidades (qué se debe hacer y quién debe hacerlo), procedimiento (cuándo, dónde y cómo debe hacerse), cuales materiales, equipos y documentos deben ser usados. Por lo general, se redactan con la ayuda de quienes ejecutan las operaciones del procedimiento.

Nivel 3: Instrucciones

Las instrucciones son documentos que responden a la pregunta ¿Cómo se hace el trabajo? Describen de forma detallada como una actividad debe ser ejecutada; generalmente incluyen actividades sencillas y puntuales dirigidas en su mayoría a nivel operativo. Entre ellos, podemos mencionar: instructivos, guías de trabajo, instrucciones, lineamientos etc. Es importante recalcar, que las instrucciones de trabajo tienen que estar disponibles y siempre visible físicamente junto al operario en su puesto de trabajo.

Nivel 4: Formatos y Registros

Los registros y formatos son considerados el sostén del sistema de calidad, sirven para recopilar evidencias objetivas de la ejecución y terminación de actividades o trabajos con apego a lineamientos o instrucciones descritas en los procedimientos o instrucciones de trabajo. Su razón de ser es dar fe de que el sistema se está implantando eficazmente.

IV Control de Documentos

El sistema de documentación debe establecer y mantener procedimientos de control para el acceso a los documentos, los cuales deben contar con mecanismos útiles que definan la manera correcta de implantar, actualizar, identificar, revisar, mantener, cancelar y eliminar todo documento propiedad de la empresa, con el propósito de prevenir el uso no autorizado de los mismos.

Un aspecto importante del control de documentos es la “correcta identificación de los mismos”. Básicamente un documento podrá ser identificado mediante un código definido, revisión y versión del mismo. El título es parte importante de la identificación de todo documento donde su distribución también debe ser controlada. (García, 2011)

En general existen 3 categorías de documentos:

- ▶ **Documento original.** Es la fuente primaria de información con todos los rasgos y características que permiten garantizar su autenticidad e integridad.
- ▶ **Copia controlada.** Se refiere a la copia de un documento aprobado sujeta a actualización y distribución, son utilizadas generalmente como consulta. Ostenta una impresión, con la leyenda “COPIA CONTROLADA”. Si esta copia se reproduce pierde validez.
- ▶ **Copia No controlada.** Documento sobre el cual no existe responsabilidad de comunicar sus cambios y actualizaciones. Ostenta una impresión, con la leyenda “COPIA NO CONTROLADA”.

五 Documentación Electrónica

El creciente uso de los sistemas computarizados para almacenar y distribuir documentos ha desplazado la publicación y almacenamiento de documentos impresos. Este sistema tiene algunas ventajas ya que permite una difusión más ágil y oportuna a todas las áreas involucradas de un establecimiento, aunque no necesariamente sea efectiva.

Es importante señalar que la información que se almacena en un servidor y se distribuye, corre peligro de sufrir modificaciones no autorizadas, y existe el riesgo de que sea alterado por personas ajenas a la compañía.

Algunas de las recomendaciones para el control de la documentación electrónica son el uso y cambio periódico de contraseñas, controles de acceso estructurados, así como el hecho de proteger los documentos de acceso abierto por medio de la designación “solo lectura”. Lo más común es el asignar atributos a los usuarios, es decir, quiénes son lectores, quiénes son revisores, quiénes son los que autorizan y quiénes son los administradores del sistema de documentación electrónico, esto garantizará que los cambios y actualizaciones de los documentos sean realizados conforme a lo establecido y que la distribución se realice a todos los usuarios.

六 Procedimientos Normalizados de Operación (PNO)

La Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-2013, Buenas prácticas de fabricación de medicamentos, define a los Procedimientos Normalizados de Operación o Procedimientos, como documentos que contienen las instrucciones necesarias para llevar a cabo de manera reproducible una operación.

Los PNO son un elemento importante en cualquier sistema de gestión de calidad y posibilitan que las tareas repetitivas se realicen siempre de la misma forma independientemente de la persona que las realiza, además toda persona involucrada en estas tareas a través de los PNO posee la información necesaria para un correcto proceder, sabiendo en todo momento lo que se tiene que hacer, cómo, cuándo y dónde.

Estos procedimientos son elaborados con los requisitos mínimos que se describen en los artículos 110 y 111 del Reglamento de Insumos para la Salud publicado por el diario Oficial de la Federación en 2015, los cuales indican lo siguiente:

Artículo 110. Los Procedimientos Normalizados de Operación contendrán la siguiente información:

1. **El objetivo;** Describe la finalidad por la que se escribe el procedimiento.
2. **El alcance;** Se coloca el personal, elementos, áreas o departamentos a los cuales se les aplicara el procedimiento.
3. **La responsabilidad;** Se indica al departamento o áreas responsables de verificar que se cumpla y se lleve a cabo el procedimiento.
4. **El desarrollo del proceso;** Describe la actividad, técnica o análisis a realizar paso a paso en forma enumerada, con vocabulario sencillo de manera que cualquier persona que lo lea sea capaz de desarrollar lo escrito en él.
5. **Las referencias bibliográficas;** Hace mención a la bibliografía consultada como apoyo en la elaboración del procedimiento.

Artículo 111. Los procedimientos a que se refiere el artículo anterior, se firmarán por las personas que los elaboren, revisen y serán autorizados por el responsable sanitario; asimismo deberán contener un número secuencial que refleje las actualizaciones que se realicen, la fecha de emisión o de actualización y la de aplicación y cumplir con lo que establezca la Norma correspondiente.

七 **Manual de Operación**

El manual de operación se define como aquel documento con fines didácticos, el cual debe describir de forma breve, entendible, directa y completa, las actividades a realizar en cada etapa de los procesos que se desarrollan en la empresa.

Contribuyen a la ejecución correcta y oportuna de las actividades encomendadas al personal. Propicia la uniformidad en el trabajo, el ahorro de tiempo, de esfuerzos y dinero.

a) Importancia y utilidad de un manual operativo

Este tipo de documentos constituyen una herramienta eficaz para la capacitación del personal operativo, contribuyendo de manera sustantiva a que la transmisión del conocimiento sea homogénea. (INEGI, 2013)

Los procedimientos, con sus actividades, tareas y responsabilidades por puesto, asentadas en el manual, deben proporcionarle al personal operativo todo el soporte necesario, considerando que dicho personal no contará con el respaldo de un supervisor o asesor durante todo el tiempo en que realice sus actividades.

El manual debe garantizar el cumplimiento de los procedimientos, además de proporcionar una guía sobre lo que hay que hacer en caso de que se presenten contingencias.

b) Desarrollo del Manual Operativo

La elaboración de un manual operativo, como todo proceso, requiere de una planeación en donde se determinan sus objetivos y alcances (que se hará), quienes serán los responsables de desarrollarlo, incluyendo elementos tanto

particulares como didácticos, puesto que debe permitir a los operarios, no sólo el conocimiento, sino su comprensión y aplicación.

La planeación resulta esencial antes de iniciar a escribir un documento, la cual consiste en delimitar los objetivos, generar ideas y organizarse para el inicio de la redacción. (INEGI, 2013)

En la planeación deben responderse las siguientes preguntas:

¿Por qué se hará?	> Justificación
¿Qué se quiere conseguir?	> Objetivos de aprendizaje
¿Quiénes lo harán?	> Responsabilidades
¿Cómo se hará?	> Procedimientos
¿Qué se necesita?	> Recursos
¿Cuándo se hará?	> Calendario
¿Cuánto costará?	> Presupuesto

La primera actividad que lleva a cabo el diseñador de un manual operativo, es redactar los objetivos del documento, el general y los específicos, tomando en cuenta las características básicas que debe comprender cada uno de ellos, como son el dar respuesta, en su redacción a las preguntas: qué, cómo, para qué o para quién, iniciando el texto con un verbo infinitivo.

Una idea alternativa para generar ideas para la definición de los objetivos, es plantearse preguntas como: ¿Qué se pretende lograr con el manual?, ¿A quién va dirigido?, ¿Qué problemas se pretende resolver con él?, ¿Qué aspectos específicos se cubren?, entre otras. El objetivo general debe determinar brevemente el propósito del documento y el efecto final que ha de tener en los usuarios.

Pueden redactarse además objetivos específicos para cada uno de los capítulos del manual, describiendo lo que se espera que los lectores sean capaces de hacer al finalizar.

Este tipo de objetivos engloban el total de los subtemas tratados en el documento, y contribuyen al logro del objetivo general del manual. Los objetivos específicos pueden redactarse una vez definida la estructura capitular del manual o bien simultáneamente.

Además de definir los objetivos, es conveniente delimitar sus alcances; en esta sección se bosquejara el área, instrumento, equipo, institución o personal al que se aplica el procedimiento.

c) Estructura Capitular del Manual de Operación

Antes de iniciar la redacción del manual, conviene acordar la estructura que se pretende cubrir. Esta estructura capitular puede estandarizarse con base a un modelo, que sea flexible según las características específicas que se deseen cubrir, y cuyo orden en que se presenten facilite su comprensión y estudio.

Para este trabajo se propone el siguiente modelo de estructura capitular para cada manual operativo:

- ▶ Portada. Contiene los datos de identificación como son: el nombre de la institución que emite el manual, título, número de código, número de revisión, fecha de aplicación y fecha de vencimiento.
- ▶ Quien elaboró, reviso y aprobó el manual, así como el lugar de localización del documento.
- ▶ Objetivo y Alcance.
- ▶ Índice. Contiene la lista ordenada de los procedimientos de operación, con indicación del lugar donde aparecen.
- ▶ Introducción. Presenta el contexto del manual, su objetivo, importancia y ámbito de aplicación.
- ▶ Glosario. Relación de todos los conceptos que se encuentran en el manual y su definición.
- ▶ Contenido. Se describen las actividades a desarrollar por parte del personal operativo de manera secuencial.
- ▶ Anexos. Información relativamente independiente para el desarrollo de un tema, que ayuda a su mejor comprensión y que permiten conocer más a fondo aspectos específicos que por su longitud o su naturaleza no conviene tratar dentro del cuerpo principal.

- ▶ Referencias Bibliográficas. Aquí se detallan otros documentos relacionados con las actividades. Dentro del procedimiento y que sirvan de apoyo para su fundamentación.

d) Redacción del contenido

La redacción del texto debe facilitar la comprensión de los procedimientos operativos planteados, se debe utilizar un lenguaje claro y sencillo. Los párrafos deben ser breves y guardar una secuencia lógica entre las distintas ideas y planteamientos, considerando el rango de importancia en lo que se desea destacar. (INEGI, 2013)

Para lograr una adecuada redacción se recomienda por lo menos cumplir con los siguientes requisitos básicos:

- ▶ ***El manual debe ser versado.*** Para cumplir este requisito se requiere que el autor tenga cierto grado de conocimiento o experiencia propia sobre el tema a tratar.

Mientras mayores sean los conocimientos que se tienen sobre el tema, tanto más versado y completo será el manual. Estos conocimientos pueden conseguirse de diferentes modos, a saber:

- ✓ Conocimientos anteriores del autor o experiencia propia, adquiridos a través de sus estudios y prácticas profesionales.
- ✓ Información obtenida a través de los manuales de los fabricantes.
- ✓ Estudio de los planos, diagramas y esquemas de los equipos.
- ✓ Estudio comparativo con equipos parecidos que ya son bien conocidos por el autor.
- ✓ Estudio de textos especializados o literatura técnica apropiada.

- ▶ **El manual debe ser claro.** Para cumplir con este requisito se debe:
 - ✓ Estar escrito en el idioma del país.
 - ✓ Emplear un lenguaje simple y moderado.
 - ✓ Ofrecer todas las ilustraciones, esquemas, dibujos, etc., que faciliten la explicación.

- ▶ **El manual debe ser preciso.** Para cumplir con este requisito el manual debe dedicarse exclusivamente al tema tratado, precisando:
 - ✓ Qué parte del equipo trata.
 - ✓ Cómo funciona o debe funcionar.
 - ✓ Qué se debe hacer para su buena instalación o funcionamiento.
 - ✓ Cómo se debe operar para obtener los resultados esperados.
 - ✓ Qué es lo que no se debe hacer o se debe evitar.
 - ✓ Qué peligros o medidas de seguridad se requiere observar.

- ▶ **El manual debe ser ordenado.** Para ello se deben tratar las partes según su importancia y relacionarlas de acuerdo a la función que desempeñan.

En lo posible se debe seguir el siguiente orden:

- ✓ En qué consiste el equipo.
- ✓ Para qué sirve.
- ✓ Cómo funciona.
- ✓ Por qué puede dejar de funcionar.
- ✓ Cómo mantenerlo.

e) Revisión y liberación del manual

Como se ha mencionado, la utilidad de los manuales operativos depende de la claridad con que se describan los procedimientos que deben desarrollar los operarios, por lo que en el proceso de revisión deben participar tanto el autor del manual como los usuarios interesados en realizar comentarios para la mejora del mismo.

Una vez revisados los comentarios se determinan cuales son aplicables y sobre cuales es necesario actuar. Nuevamente se distribuye el manual ya revisado a todos los usuarios interesados para recibir su aceptación.

Para obtener su aprobación, el manual debe ser verificado por la persona responsable designada y aprobado por el jefe del área antes de entregarlo para su uso.

Después de unas cuantas semanas se supervisa la puesta en práctica para verificar su efectividad y cumplimiento.

八 Introducción a la Cromatografía Líquida de Ultra Desempeño (UPLC)

¿Qué es la UPLC?

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es una técnica instrumental que ha evolucionado enormemente en los últimos años, principalmente a partir de la década de los 70's, representando una de las herramientas más versátiles ya que cumple con un amplio espectro de aplicaciones, excelente capacidad para el análisis de trazas, rapidez y adaptabilidad al análisis cuantitativo. Se puede emplear para la determinación de aminoácidos, herbicidas, pesticidas, tensoactivos, metabolitos de productos tóxicos, azúcares, productos petroquímicos, fármacos, etc.

La HPLC es un método, usado principalmente para la separación de los componentes de una muestra, en la cual los componentes se distribuyen en dos fases mutuamente inmiscibles, una de las cuales es estacionaria, mientras que la otra es móvil. Las dos fases se eligen de tal forma, que los componentes de la muestra se distribuyen de modo distinto entre la fase móvil y la fase estacionaria. Aquellos componentes que son fuertemente retenidos por la fase estacionaria se mueven lentamente con el flujo de la fase móvil; por el contrario, los componentes que se unen débilmente a la fase estacionaria, se mueven con rapidez. Como consecuencia de la distinta movilidad, los componentes de la muestra se separan en orden creciente de interacciones con la fase estacionaria.

La cromatografía líquida es en esencia una técnica de separación, que permite la purificación, identificación y cuantificación del analito deseado. La elección de la fase estacionaria y la fase móvil, del flujo al que se va a impulsar la fase móvil a través de la fase estacionaria e incluso de la temperatura a la que se va a realizar la cromatografía, permitirá una correcta separación del analito de otros compuestos.

El lanzamiento de la UPLC por sus siglas en inglés Ultra Performance Liquid Chromatography (Cromatografía líquida de ultra desempeño), ha sido uno de los avances más significativos en la ciencia de las separaciones en la última década.

Debido a las altas demandas en la industria para analizar más muestras, más rápidamente y con resultados más fiables, el rendimiento de la HPLC se vio limitado, por lo cual se llevo a cabo la introducción de una nueva tecnología que optimizara el rendimiento cromatográfico. Resultando nuevos diseños de columnas, inyectoras, bombas y detectores, que han logrado aumentar notablemente la resolución, la velocidad y la sensibilidad en comparación con los sistemas convencionales.

Según la teoría cromatográfica, a mayor eficiencia se obtiene mayor resolución. Esto hace de la eficiencia el impulso primario de la cromatografía líquida UltraPerformance.

Tal como se observa en la **Figura 2**, la utilización de partículas más pequeñas (menores a 2 μm de diámetro) mejoran la eficacia en un rango de velocidad lineal más amplio que las partículas tradicionales de 3 y 5 μm de diámetro, permitiendo mejorar la resolución y aumentar la velocidad de la separación en comparación con los sistemas convencionales.

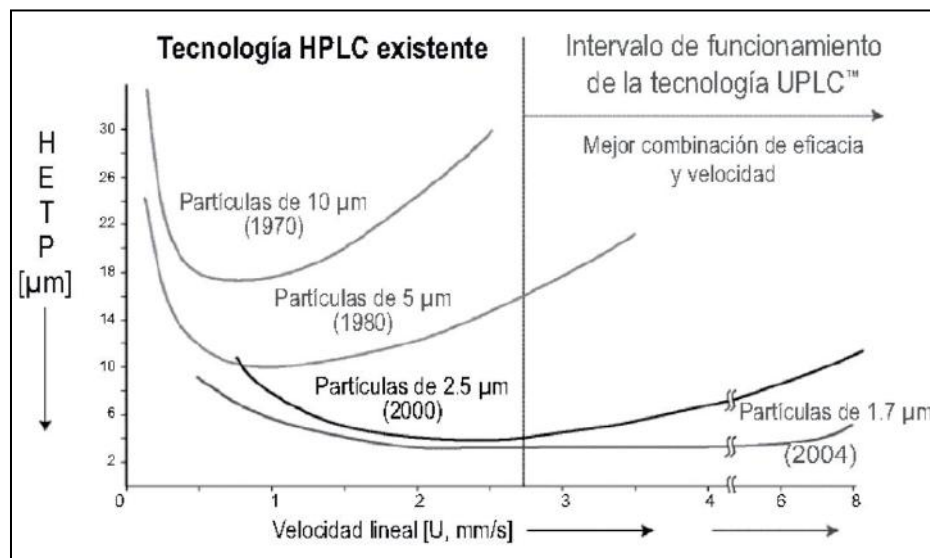


Figura 2. Historia del tamaño de las partículas en la cromatografía líquida.

A medida que disminuye el tamaño de partícula, la altura equivalente a un plato teórico (HETP) también disminuye aumentando la eficacia. Adicionalmente, el rango de velocidad lineal en el que se puede alcanzar una eficiencia máxima se hace más amplio con las partículas de 1.7 μm , lo cual permite aumentar la velocidad del análisis sin afectar el flujo.

Los beneficios de la UPLC

La UPLC fue diseñada para mejorar los principios cromatográficos maximizando la eficiencia y el poder resolutivo de la separación.

La utilización de partículas más pequeñas proporciona una eficiencia mayor con picos más estrechos y más concentrados, lo cual permite mantener la resolución y reducir los tiempos de ejecución (**Figura 3**). El beneficio real que ofrece la UPLC salta a la vista al observar la rapidez con que pueden realizarse las separaciones. (Waters, 2010)

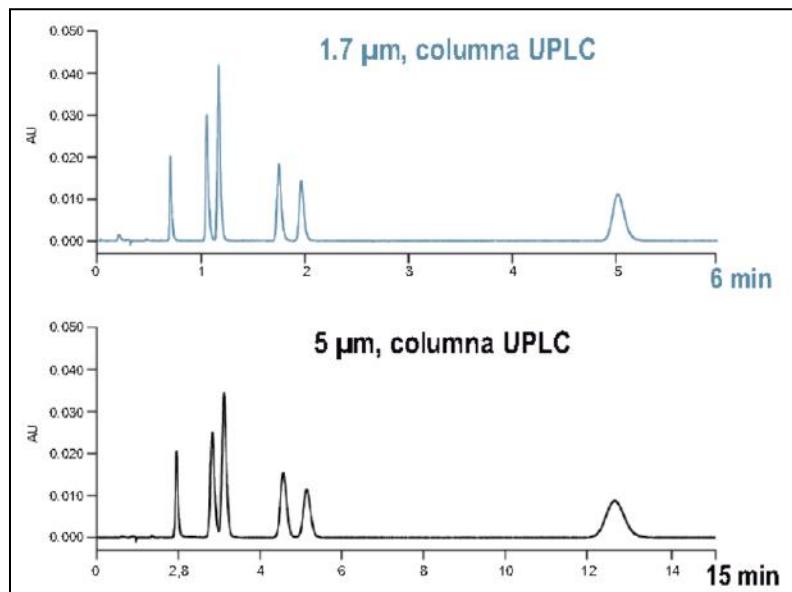


Figura 3. Comparación de separaciones cromatográficas utilizando partículas de 5.0 µm y 1.7 µm.

九 Aplicación de la Cromatografía Líquida (UPLC) acoplada a la espectrometría de masas.

¿Por qué el acoplamiento UPLC-MS?

La introducción de la espectrometría de masas (MS) ha supuesto un gran avance en las técnicas analíticas por su gran sensibilidad y su alto grado de fiabilidad. Su principal ventaja sobre otras técnicas de detección (visible-ultravioleta, fluorescencia, PDA) es, por un lado, su capacidad para suministrar información útil desde el punto de vista identificativo, de forma que el espectro de masas se presenta así como una prueba casi inequívoca de la identidad del compuesto a analizar. Por otro lado, se trata de un detector universal, basado en la separación de las especies cargadas de acuerdo con su relación masa/carga. La espectrometría de masas se presenta como uno de los métodos de detección más sensibles y específicos para el análisis molecular. (Ríos, s.f.)

El acoplamiento de la UPLC a la espectrometría de masas permite mejorar considerablemente la capacidad de detección, puesto que la reducción de anchura de pico provoca un aumento en la eficacia de la ionización, lo que conlleva una mejora en la sensibilidad del método analítico.

Espectrometría de Masas

Básicamente, un espectrómetro de masas es un instrumento que mide masas de moléculas individuales que han sido convertidas en iones. Para ello las moléculas se convierten en iones que deben entrar en el sistema en fase gaseosa, separándose en función de su relación masa/carga (m/z), obteniendo un espectro de masas. En la **Figura 4** se muestra un esquema del proceso.

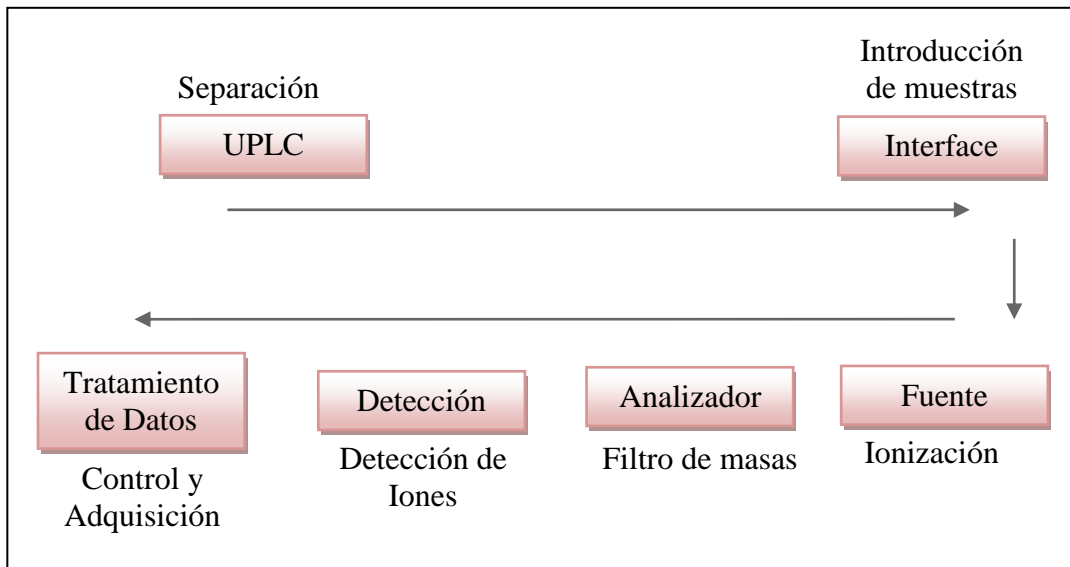


Figura 4. Diagrama de un proceso de espectrometría de masas.

Cuando se acopla un cromatógrafo de líquidos a un espectrómetro de masas, la forma más habitual de ionizar la muestra es la ionización a presión atmosférica (API) ya sea mediante ionización química a presión atmosférica (APCI) o mediante ionización por electrospray (ESI), siendo ESI más apropiada para la determinación de analitos polares y/o con pesos moleculares relativamente altos.

Interfase de Ionización a Presión Atmosférica (API)

Las interfases API constan de 4 elementos básicos:

- ▶ Un dispositivo de introducción de muestra.
- ▶ Una cámara de ionización, en donde se generan los iones mediante ionización a presión atmosférica.
 - Generalmente producen iones $[M+H]^+$ o $[M-H]^-$
- ▶ Un cono de muestreo, orificio de entrada de los iones formados a la región de presión intermedia.
 - Utilizan *alto voltaje* y *nebulización neumática* para producir iones en fase gaseosa.
 - Producen un poco de fragmentación.

- ▶ Un sistema de transferencia de iones hasta la región de alto vacío del analizador.
 - Técnicas muy sensibles.
 - Permiten la cuantificación.

Interfase de Electrospray (ESI)

En la ionización por electrospray ESI), la muestra líquida se introduce a través de un capilar al que se aplica un voltaje elevado. Bajo la influencia del campo eléctrico creado, los iones de la misma polaridad migran hacia el extremo del capilar donde el líquido comienza a formar un cono (cono de Taylor) a partir del que se generan pequeñas gotas altamente cargadas. (Ríos, s.f.) Las gotas que componen el aerosol resultante sufren una disminución de tamaño (evaporación del solvente). A medida que el solvente se evapora, la densidad de carga aumenta hasta que la superficie de las gotas libera iones (evaporación de iones). Estos iones pueden ser mono o multicargados.

En ESI, el pH de la fase móvil debe ser mayor en ± 1.5 unidades que el pKa del compuesto para favorecer la ionización del analito. Para ello, normalmente se añaden concentraciones bajas (0.1%) de ácido fórmico o acético, ó hidróxido de amonio.

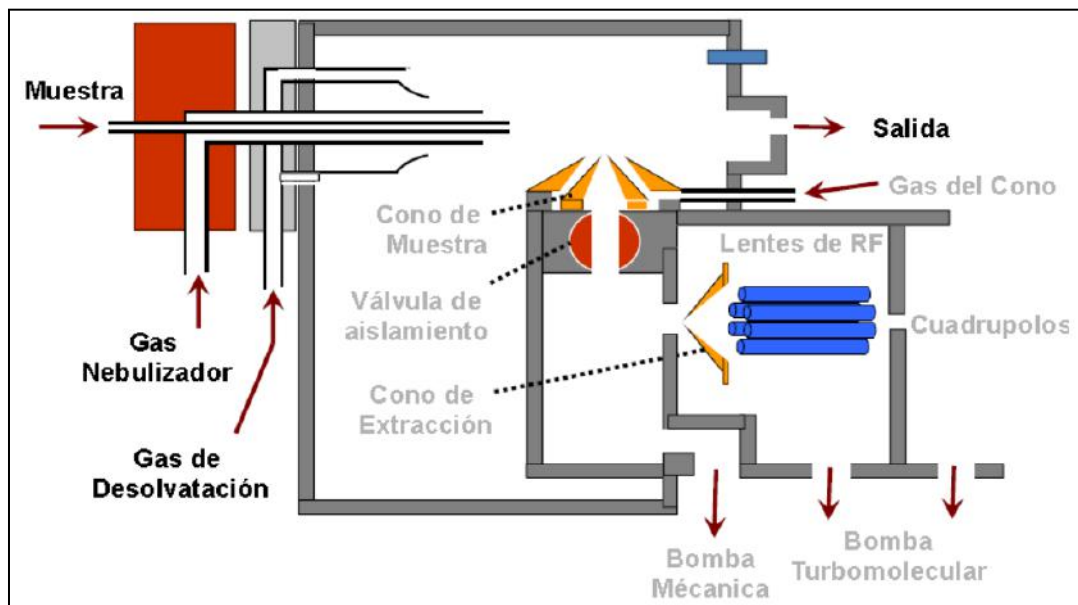


Figura 5. Esquema de un proceso de análisis por espectrometría de masas con ESI.

En la interfase ESI se puede trabajar en modo positivo o negativo (ESI⁺ ó ESI⁻), en función de la polaridad del voltaje aplicado en el capilar.

Así, la ionización por electro spray puede ser dividida en tres etapas:

- ▶ Formación de gotas cargadas
- ▶ Evaporación del solvente y fisión de la gota
- ▶ Formación de los iones en fase gaseosa

a) Formación de gotas cargadas

Cuando se aplica un voltaje positivo al capilar de electro spray, las gotas emitidas por el capilar llevan exceso de carga positiva, generada electroquímicamente (**Figura 6**), bien por la eliminación de los iones negativos por oxidación de algún componente de la solución (reacción 1), o por la adición de iones positivos por la oxidación del mismo capilar (reacción 2). (Salguero, 2009)

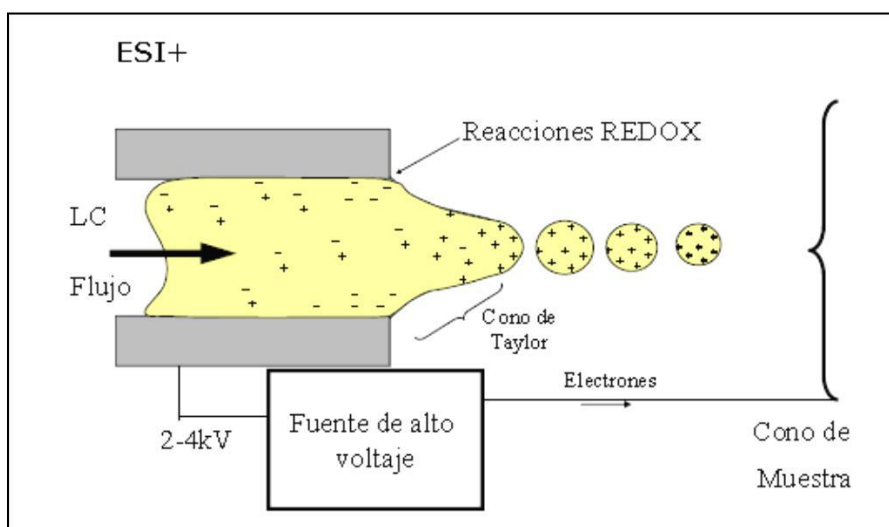
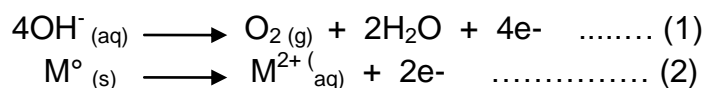


Figura 6. Proceso de la formación de gotas cargadas por electro spray.

Por el contrario, cuando se aplica un voltaje negativo al capilar del electrospray, las gotas emitidas por el capilar llevan un exceso de carga negativa,

b) Evaporación del solvente y fisión de la gota

Las gotas emitidas por el capilar de electrospray disminuyen su tamaño como consecuencia de la evaporización del disolvente mientras la carga de la gota permanece constante. La disminución del radio de la gota a carga constante supone un aumento de la repulsión de cargas en la superficie de la gota.

Para un radio dado, la repulsión de cargas supera la tensión superficial que mantiene la gota unida, y se produce la fisión de ésta. Esta secuencia se repite varias veces hasta formar gotas muy pequeñas (**Figura 7**). (Salguero, 2009)

c) Formación de los iones en fase gaseosa

A partir de gotas con radios $\leq 10\text{nm}$, la repulsión de cargas causa la evaporación de iones desde la superficie de la gota, en vez de fisión de la gota, por lo que los iones pasan de fase líquida a fase gaseosa.

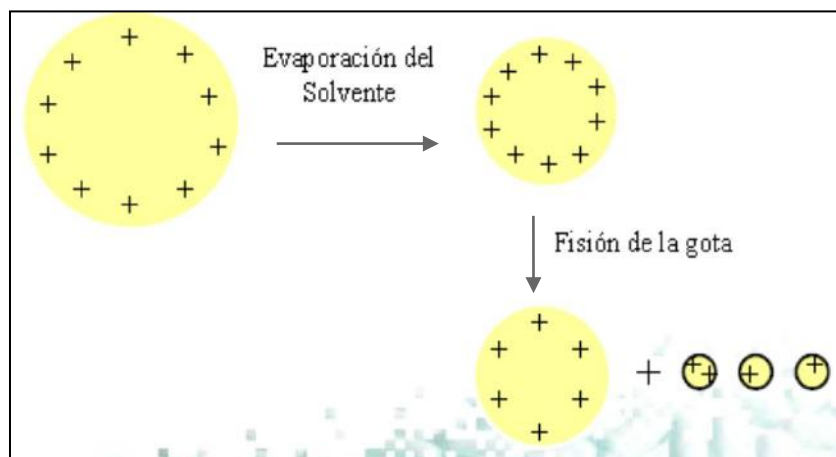


Figura 7. Proceso de Evaporización del solvente y Fisión de la gota.

Factores que afectan la respuesta al analito en ESI

- ▶ La **concentración del analito**. La liberación de los iones depende de la concentración. La saturación de la señal es debido al aglutinamiento en la superficie de la gota (saturación a $10\mu\text{M}$).
- ▶ El contenido de matriz **“Supresión Iónica”**. La respuesta del analito se ve disminuida con el incremento de la concentración de otros aditivos de la fase móvil o de la muestra. Los iones electrolíticos compiten con el analito por carga y espacio en la superficie de la gota.
- ▶ La **velocidad de flujo**. La respuesta de ESI disminuye con el incremento de la velocidad de flujo. El flujo de trabajo óptimo es de $200\text{-}600\ \mu\text{L}/\text{min}$.

Interfase de Ionización Química a Presión Atmosférica (APCI)

La interfase APCI, a diferencia de lo que ocurre en ESI, el proceso de evaporización y la ionización constituyen dos etapas distintas:

- ▶ La Vaporización rápida
- ▶ La Ionización Química en fase gaseosa

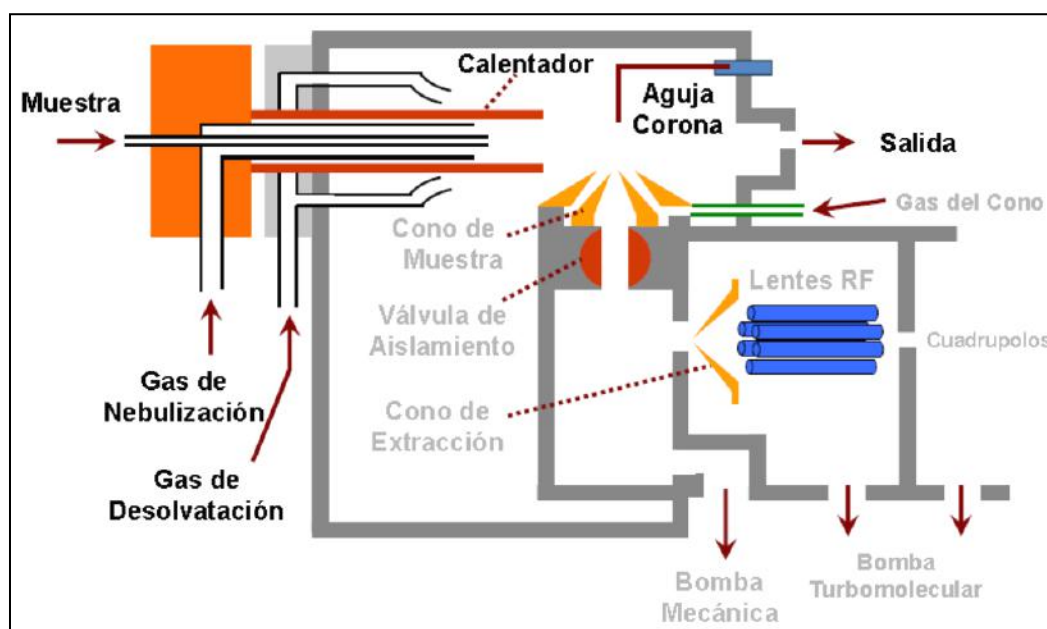


Figura 8. Esquema del análisis por Ionización Química a Presión Atmosférica APCI.

Utilizando la sonda de APCI el líquido que procede del CL es nebulizado y rápidamente evaporado por la acción de una temperatura elevada (300-500°C). Las altas temperaturas aplicadas y la acción de una corriente coaxial de nitrógeno N₂ provocan la nebulización y rápida evaporización del disolvente.

Para incrementar el proceso de ionización se suele aplicar una descarga en corona, del orden de 2-6kV, justo a la salida de la sonda de APCI en el spray. Esta descarga eléctrica no sólo ioniza las moléculas de analito, sino también las del disolvente de la fase móvil. Éstas a su vez pueden transferir su carga a las de los analitos en la fase gaseosa, de lo que resulta la ionización química de los mismos.

En modo iónico positivo, se forman moléculas protonadas y aductos con cationes. En modo negativo, se forma la especie desprotonada y la combinación con aniones o la captura electrónica. (Ríos, s.f.)

Generalmente la sonda APCI se utiliza para el análisis de moléculas de menos de 1000Da, con baja polaridad o moderada polaridad. Estos analitos deben poseer además cierta volatilidad y no ser excesivamente termolábiles. Ejemplos de aplicaciones son los pesticidas, numerosos fármacos y medicamentos, esteroides, etc.

Factores que afectan la respuesta al analito en APCI.

- ▶ **Concentración del analito.** Efecto de Saturación.
- ▶ **Contenido de Matriz.** Competencia por ionización.
- ▶ **Flujo de Nitrógeno.** Pobre nebulización del solvente.
- ▶ **Temperatura de la Punta.** Puede ocurrir degradación térmica y pobre nebulización del solvente.

Diferencias entre ESI y APCI

Cuadro 1. Diferencias entre las interfases ESI y APCI

ESI	APCI
⊕ Ionización en Solución	⊕ Ionización fase gaseosa
⊕ Fase Reversa o Fase Normal con modificaciones de solvente post columna	⊕ Fase Reversa y Normal
⊕ Ionización <ul style="list-style-type: none"> • Sonda sin calentamiento • Voltaje Capilar 	⊕ Ionización <ul style="list-style-type: none"> • Sonda con calentamiento • Aguja Corona
⊕ Fuerte efecto de la fase móvil (Los aditivos de la fase móvil pueden afectar la ionización)	⊕ Bajo efecto por la matriz (en caso de que se produzca da lugar al aumento de la señal)
⊕ Compuestos Polares	⊕ Compuestos menos polares
⊕ Compuestos Termolábiles	⊕ Permite utilizar flujos mayores de hasta 2.0 mL/min

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico (LEDEFAR) de la Fes-Cuautitlán, requiere para sus operadores (quienes son principalmente Tesistas y prestadores de Servicio Social), una herramienta clara y específica que sirva como guía para la capacitación del manejo y mantenimiento de los instrumentos de cromatografía líquida (ACQUITY UPLC Clase H) y espectrometría de masas (Xevo TQ), ya que debido a la falta de experiencia en el manejo de los mismos se han presentado diversos problemas que han afectado el desarrollo de sus actividades. Por lo tanto, la necesidad de un material de apoyo que los conduzca de manera ordenada y consecutiva en el desarrollo de sus actividades pretenderá evitar problemas de duplicidad de esfuerzos.

OBJETIVOS

▶ **Objetivo General.**

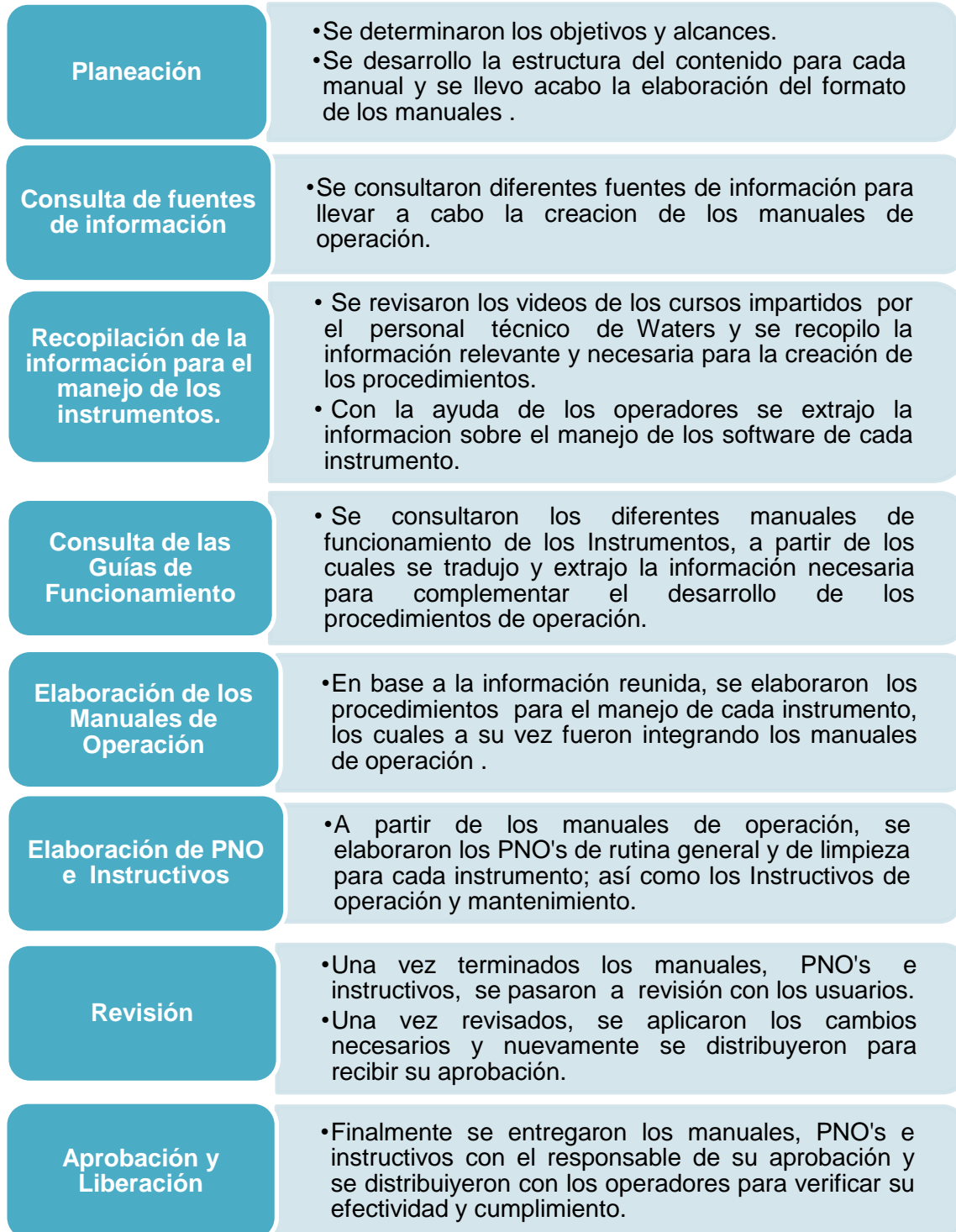
Elaborar los Manuales de Operación para los instrumentos de Cromatografía líquida de ultra desempeño (ACQUITY UPLC H-Class) y Espectrómetro de Masas (Xevo TQ), describiendo de manera ordenada las operaciones mínimas necesarias que se deben de llevar a cabo para el manejo de los mismos, con la finalidad de proporcionar al usuario una guía que sirva de capacitación para facilitar su uso.

▶ **Objetivos particulares.**

- ⊕ A partir de los manuales de operación de cada instrumento, elaborar los PNO's de limpieza y de rutina general.
- ⊕ Elaborar Instructivos de trabajo en los se describan las actividades a realizar para lograr la optimización de los resultados.
- ⊕ Dar a conocer a los operadores del LEDEFAR los videos relacionados con el manejo y mantenimiento de los sistemas de Cromatografía líquida ACQUITY UPLC Clase H y espectrometría de masas Xevo TQ con el fin de complementar su capacitación.

METODOLOGÍA

En el siguiente diagrama, se muestra la metodología ejecutada para la elaboración de los Manuales de Operación, PNO's e Instructivos para los sistemas de UPLC y UPLC MSMS.



RESULTADOS

MANUALES DE OPERACIÓN

Formato establecido para los Manuales de Operación.

A continuación, se muestra el formato elaborado para los manuales de operación. En todo su contenido se mostrará la siguiente información:

- ⊕ Un **encabezado de página**, en el que se establece el logotipo de la institución y del LEDEFAR, Título del documento, Nombre de la institución, Número de código, Número de revisión, Fecha de aplicación y Fecha de vencimiento (**Figura 9**).
- ⊕ Un **pie de página**, que incluye la leyenda “*Documento controlado, prohibida su reproducción parcial o total sin autorización*” el cual se escribió con letra Times New Roman tamaño 8 y el número de páginas con letra Times New Roman tamaño 9 siguiendo el formato Pág. 1 de ...



	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico TÍTULO DEL DOCUMENTO	Número de código:	
		Revisión:	
		Fecha de aplicación: Mes/Año	
		Fecha de vencimiento: Mes/Año	

Figura 9. Formato del encabezado de página desarrollado para los Manuales, PNO's e Instructivos de operación.

La información del encabezado se escribe con mayúsculas y minúsculas en letra Arial tamaño 10.5 resaltado en negritas y se llena de la siguiente manera:

- **Logotipo de la institución.** Se representa el distintivo de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, así como el distintivo del LEDEFAR.
- **Nombre de la institución.** Hace referencia al Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico.
- **Título del documento.** Especifica el propósito del Manual.

Para cada manual se designo el siguiente nombre:

- ✓ Para el sistema ACQUITY UPLC Clase H se nombró “**MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H**”.
- ✓ Para el sistema Xevo TQ se nombró “**MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO DE ESPECTROMETRÍA DE MASAS XEVO TQ**”.
- **Número de código**, Es la clave asignada al documento.

Se designo el código **MAN-OP-00**. Siendo las primeras cinco letras la referencia del tipo de documento (Manual - Operación), seguido del número designado.

Para el manual de operación del equipo ACQUITY UPLC Clase H se designo el código **MAN-OP-01** y para el manual de operación del equipo Xevo TQ se designo **MAN-OP-02**.

- **Revisión**. La revisión del documento demuestra las actualizaciones que se han llevado a cabo. Como es la primer versión, no cuenta con actualizaciones por ello se asigno el número **0** a cada manual.
- **Fecha de aplicación**. Corresponde a la fecha a partir del cual el manual de operación es aplicado en el área de trabajo. Se empleó el formato Nombre del **Mes** completo / **Año** con sus cuatro dígitos.
- **Fecha de vencimiento**. Corresponde a la fecha en la cual el manual de operación concluye su vigencia. Se empleó el formato Nombre del **Mes** completo / **Año** con sus cuatro dígitos.

▶ **Portada.**

En el contenido de la portada de cada manual se muestra el *encabezado de página*, el *título del documento*, el cual se escribió con letra Arial tamaño 28 en mayúsculas y resaltado en negritas.

El nombre del *Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico* con letra Arial tamaño 24 en mayúsculas, así como sus *siglas* en letra Arial 22 con negritas y finalmente el *pie de página* (**Figura 10**).



	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico TITULO DEL DOCUMENTO	Número de código:	
		Revisión:	
		Fecha de aplicación: Mes/Año	
		Fecha de vencimiento: Mes/Año	
<p>TÍTULO DEL DOCUMENTO</p> <p>LABORATORIO DE ENSAYOS DE DESARROLLO FARMACEUTICO</p> <p>LEDEFAR</p>			
<p>Documento controlado, prohibida su reproducción parcial o total sin autorización.</p>			

Figura 10. Formato de la portada para los manuales de operación.

- ▶ **Personas involucradas en la realización y revisión del manual.** Se elaboro un cuadro donde se establece quien realizo el documento, quien lo reviso y quien lo aprobó. Este estará escrito con letra Arial tamaño 11 y resaltando en negritas (**Figura 11**).
- **Elaboro.** Se coloco el nombre del profesionista experto en realizar el manual, su puesto, firma y fecha de elaboración.
- **Reviso.** Se coloco la firma, fecha, puesto y nombre del profesionista encargado de verificar que todos los procedimientos descritos sean correctos.
- **Aprobó.** Se coloco la firma, fecha, puesto y nombre del profesionista responsable del laboratorio quien verifico que este documento halla sido aprobado.
- **Localización del documento.** Se establece el nombre del área donde se localizan los equipos ACQUITY UPLC Clase H y Xevo TQ.

	Nombre	Puesto	Firma	Fecha
Elaboró:				
Revisó:				
Aprobó:				
Localización del documento:				

Figura 11. Formato del cuadro elaborado para establecer el nombre de la(s) persona(s) que elaboro y revisaron los documentos.

Redacción.

El contenido de los manuales de operación se escribió con letra Arial tamaño 11, con espacio de 1.5 entre cada renglón y entre cada párrafo.

El nombre de cada sección se escribió en negritas y siguiendo una enumeración consecutiva con números naturales.

- ▶ **INDICE.** Se establecieron las secciones que contendrá el manual, así como la página de localización.
- ▶ **INTRODUCCIÓN.** Se dio una explicación sobre el manual, su utilidad y los fines y propósitos para lo que se elaboro.
- ▶ **OBJETIVO.** Se describió el qué y para qué sirve el manual.
- ▶ **ALCANCE.** Se hizo referencia al sistema de cromatografía líquida ACQUITY UPLC Clase H y al sistema de espectrometría de masas Xevo TQ respectivamente, así como a quien va dirigido.
- ▶ **DEFINICIONES.** Se definieron las palabras o acciones que no se comprendan con facilidad.
- ▶ **CONTENIDO.** Se describieron los componentes de cada sistema, se describieron paso a paso los procedimientos de las actividades a realizar y se incluyeron imágenes de las pantallas del software y del cambio de componentes respectivamente para facilitar su comprensión.
- ▶ **ANEXOS.** Dentro de cada manual se incluyeron los anexos correspondientes: “Consideraciones Generales sobre los Solventes”, “Recomendaciones generales para el mantenimiento de las columnas cromatográficas” y “Resolución de problemas (Troubleshooting)”.
- ▶ **REFERENCIAS.** Se hizo referencia del material bibliográfico que se utilizo en la elaboración de los manuales.

Acotación:

- El Manual de Operación para el equipo ACQUITY UPLC Clase H consta de 19 procedimientos, un capítulo sobre “Recomendaciones generales para el mantenimiento de las columnas cromatográficas”, 3 Anexos y un total de 138 páginas (ver **Anexo A-1**).
- El Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ consta de 32 procedimientos, un capítulo sobre “Recomendaciones generales para el mantenimiento de las columnas cromatográficas”, 2 Anexos y un total de 167 páginas (ver **Anexo B-1**).

PROCEDIMIENTOS NORMALIZADOS DE OPERACIÓN E INSTRUCTIVOS

Formato establecido para los PNO's.

A partir de la obtención de los manuales de operación de cada sistema, se elaboraron los PNO's de rutina y de limpieza general utilizando la misma plantilla del encabezado de página de los manuales de operación en todas las páginas que componen el documento:

- ⊕ **Encabezado de página**, se establece el logotipo de la institución y del LEDEFAR, Título del documento, Nombre de la institución, Número de código, Número de revisión, Fecha de aplicación y Fecha de vencimiento (**Figura 9**).
- ⊕ **Pie de página**, se escribió con letra Times New Roman tamaño 8 la leyenda "*Documento controlado, prohibida su reproducción parcial o total sin autorización*", y el número de páginas con letra Times New Roman tamaño 9 siguiendo el formato Página 1 de ...
 - **Logotipo de la institución**. Se representa el distintivo de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, así como el distintivo del LEDEFAR.
 - **Nombre de la institución**. Hace referencia al Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico.
 - **Título del documento**. Especifica el propósito del PNO.
 - **Número de código**, Es la clave asignada al documento.

Se designo el código **PNO-TC-000**. Siendo las primeras cinco letras la referencia del tipo de documento PNO (Procedimiento Normalizado de Operación) – TC (Técnico), seguido del número designado.

- **Revisión**. La revisión del documento demuestra las actualizaciones que se han llevado a cabo. Como es la primer versión, no cuenta con actualizaciones por ello se asigno el número **0** a cada PNO elaborado.

- **Fecha de aplicación.** Corresponde a la fecha a partir del cual el PNO es aplicado en el área de trabajo. Se empleó el formato Nombre del **Mes** completo / **Año** con sus cuatro dígitos.
 - **Fecha de vencimiento.** Corresponde a la fecha en la cual el PNO concluye su vigencia. Se empleó el formato Nombre del **Mes** completo / **Año** con sus cuatro dígitos.
- **Personas involucradas en la realización y revisión del manual.** Se elaboro un cuadro donde se establece quien realizo el documento, quien lo reviso y quien lo aprobó. Este estará escrito con letra Arial tamaño 11 y resaltando en negritas (**Figura 12**).
- **Elaboro.** Se coloco el nombre del profesionista experto en realizar el manual, su puesto, firma y fecha de elaboración.
 - **Reviso.** Se coloco la firma, fecha, puesto y nombre del profesionista encargado de verificar que todos los procedimientos descritos sean correctos.
 - **Aprobó.** Se coloco la firma, fecha, puesto y nombre del profesionista responsable del laboratorio quien verifico que este documento halla sido aprobado.
 - **Copia controlada.** Se establecerá el número de copia controlada, este deberá ser escrito con letra Arial tamaño 12 y en color rojo.

Copia controlada No.: <<Insertar número de copia>>				
	Nombre	Puesto	Firma	Fecha
Elaboró:				
Revisó:				
Aprobó:				

Figura 12. Formato del cuadro elaborado para establecer el nombre de la(s) persona(s) que elaboro y revisaron los documentos.

Redacción.

El contenido de los procedimientos se escribió con letra Arial tamaño 11, con espacio de 1.5 entre cada renglón y entre cada párrafo.

El nombre de cada sección se escribió en mayúsculas y negritas, siguiendo una enumeración consecutiva con números naturales.

- ▶ **INDICE.** Se establecieron las secciones que contendrá el PNO, así como la página de localización.
- ▶ **OBJETIVO.** Se expreso en forma clara el propósito del procedimiento.
- ▶ **ALCANCE.** Se hizo referencia al sistema de cromatografía líquida ACQUITY UPLC Clase H y al sistema de espectrometría de masas Xevo TQ respectivamente, así como a quien va dirigido.
- ▶ **RESPONSABILIDADES.** Se Indico que personas son las responsables de la emisión, ejecución, revisión, verificación y supervisión de las actividades descritas en el procedimiento.
- ▶ **DEFINICIONES.** Se definieron las palabras o acciones que no se comprendan con facilidad.
- ▶ **PROCEDIMIENTO.** Se describió en forma clara y precisa las actividades paso a paso para realizar una operación.
- ▶ **REFERENCIAS.** Se indicaron los documentos utilizados para la elaboración del procedimiento.

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico TITULO DEL DOCUMENTO	Número de código:		
		Revisión:		
		Fecha de aplicación: Mes/Año		
		Fecha de vencimiento: Mes/Año		
TITULO DEL DOCUMENTO				
Copia controlada No.: <<Insertar número de copia>>				
	Nombre	Puesto	Firma	Fecha
Elaboró:		Analista		
Revisó:		Responsable Técnico		
Aprobó:		Responsable del Laboratorio		
Documento controlado, prohibida su reproducción parcial o total sin autorización. Página. _ de _				

Figura 13. Formato general para los procedimientos Normalizados de Operación.



	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico TITULO DEL DOCUMENTO	Número de código:	
		Revisión:	
		Fecha de aplicación: Mes/Año	
		Fecha de vencimiento: Mes/Año	
<p>INDICE</p> <p>1. OBJETIVO Y ALCANCE.</p> <p> 1.1 Objetivo.</p> <p> 1.2 Alcance.</p> <p>2. RESPONSABILIDADES</p> <p>3. DEFINICIONES</p> <p>4. PROCEDIMIENTO</p> <p>5. REFERENCIAS</p>			
<p>Documento controlado, prohibida su reproducción parcial o total sin autorización. Página _ de _</p>			

Figura 14. Formato general para el contenido de los procedimientos Normalizados de Operación.

Formato establecido para los Instructivos de trabajo.

Una vez obtenidos los PNO's correspondientes de cada sistema, se llevo acabo la redacción de los instructivos los cuales hacen referencia especialmente al mantenimiento de los sistemas.

Los instructivos igual que los manuales y PNO's llevan en todas las páginas del documento la misma plantilla del encabezado (**Figura 9**) y pie de página.

Para los instructivos se designo el código **INST-EQ-000**. Siendo las primeras cuatro letras la referencia del tipo de documento INST (Instructivo) y las dos siguientes referencia a quien aplica EQ (Equipo), seguido del número designado.

Redacción.

Las instrucciones se escribieron siguiendo una enumeración consecutiva con números naturales, fueron escritas con letra Arial tamaño 11, con espacio de 1.5 entre cada renglón y entre cada párrafo.

En los instructivos se incluyo un objetivo, el cual expresara el propósito de la actividad a realizar, así como las instrucciones a seguir descritas de manera clara y precisa.

A continuación, se muestra una tabla que enlista todos los PNO's e instructivos elaborados y su descripción.

Cuadro 2. Lista de los PNO's e Instructivos elaborados y su descripción.

Nombre del PNO / Instructivo	CLAVE	OBJETIVO	ALCANCE
Procedimiento de Operación para el equipo ACQUITY UPLC Clase H	PNO-TC-004	Describir de manera detallada las operaciones necesarias que se deben de llevar a cabo para el manejo del equipo ACQUITY UPLC Clase H que se encuentra localizado en el Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico (LEDEFAR).	Este procedimiento aplica al equipo ACQUITY UPLC Clase H propiedad del LEDEFAR y deberá ser aplicado por los usuarios que operan el equipo, localizado en el área UPLC UPLC/MS/MS del Laboratorio 5.

Continuación

Nombre del PNO / Instructivo	CLAVE	OBJETIVO	ALCANCE
Procedimiento de Limpieza para el equipo ACQUITY UPLC Clase H**	PNO-TC-005	Describir de manera detallada las operaciones necesarias que se deben de llevar a cabo para la limpieza del sistema ACQUITY UPLC Clase H que se encuentra localizado en el Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico (LEDEFAR).	Este procedimiento aplica al equipo ACQUITY UPLC Clase H propiedad del LEDEFAR y deberá ser aplicado por los usuarios que operan el equipo, el cual se encuentra localizado en el área UPLC UPLC/MS/MS
Procedimiento de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ**	PNO-TC-008	Describir de manera detallada las operaciones necesarias que se deben de llevar a cabo para el manejo del equipo de espectrometría de masas Xevo TQ que se encuentra localizado en el Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico	Este procedimiento aplica al equipo de espectrometría de masas Xevo TQ propiedad del LEDEFAR y deberá ser aplicado por los usuarios que operan el equipo, localizado en el área UPLC UPLC/MS/MS del Laboratorio 5.
Instructivo para el filtrado de soluciones y solventes	INST-EQ-001	Asesorar la manera de filtrar los solventes para prevenir fallas en la bomba y en el inyector.	-----
Instructivo para el filtrado de muestras	INST-EQ-002	Mostrar una forma de preparar las muestras antes de ser inyectadas al cromatógrafo para prevenir la obstrucción de la columna y evitar el mal funcionamiento del equipo, logrando obtener resultados mas uniformes y de mayor calidad.	-----

Continuación

Nombre del PNO / Instructivo	CLAVE	OBJETIVO	ALCANCE
Instrucciones para la creación del método de lavado de la columna en el equipo ACQUITY UPLC Clase H*	INST-EQ-003	Este instructivo tiene la finalidad de guiar al usuario en la creación de un método para el lavado de la columna y apagado del equipo para ser programado siempre que se necesite.	-----
Instructivo para la colocación de la unión para la conexión de columnas	INST-EQ-004	Describir los pasos para retirara la columna y colocar la mini unión de conexión de columnas.	-----
Instrucciones para Identificar e Integrar los datos en el software Empower*	INST-EQ-005	Guiar al usuario en la integración de los datos después de haber sido inyectadas las muestras en el cromatógrafo de líquidos.	-----
Instructivo para realizar la Cuantificación y el Reporte de los datos en el Software Empower*	INST-EQ-006	Guiar al usuario paso a paso para llevar a cabo la cuantificación y reporte de los datos.	-----
Instrucciones para el purgado de las líneas de flujo en casos de contaminación	INST-EQ-007	Describir la manera de purgar las líneas en caso de que alguna de estas presente contaminación.	-----
Instructivo para el lavado de los viales del equipo ACQUITY UPLC Clase H	INST-EQ-008	Describir una manera de lavar los viales utilizados en el equipo ACQUITY UPLC Clase-H.	-----

Continuación

Nombre del PNO / Instructivo	CLAVE	OBJETIVO	ALCANCE
Diagrama de flujo para el encendido del equipo ACQUITY UPLC Clase H*	INST-EQ-009	-----	-----
Instructivo de encendido para el equipo de espectrometría de masas XEVO TQ	INST-EQ-010	Describir de manera detallada las operaciones necesarias que se deben de llevar a cabo para el encendido del equipo de espectrometría de masas XEVO TQ después de haber sido venteado.	-----
Instructivo para el purgado del equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	INST-EQ-011	Describir los pasos que deben de llevarse a cabo para purgar el sistema de espectrometría de masas XEVO TQ.	-----
Instructivo para la creación de método de lavado de columnas en el sistema Xevo TQ*	INST-EQ-012	Este instructivo tiene la finalidad de guiar al usuario en la creación de un método para el lavado de la columna para ser programado siempre que se necesite.	-----
Instructivo para la creación de métodos en el software MassLynx del equipo Xevo TQ*	INST-EQ-013	Guiar al usuario en la creación de un Proyecto, un Método de Instrumento y el Método de Masas para especificar los parámetros de adquisición de datos, tales como la tasa de flujo, tiempo de la corrida, temperatura y presión.	-----

Continuación

Nombre del PNO / Instructivo	CLAVE	OBJETIVO	ALCANCE
Instructivo para la creación del método de procesamiento de datos en el software MassLynx del equipo Xevo TQ*	INST-EQ-014	Guiar al usuario en la integración y procesamiento de los datos después de haber sido inyectados en el equipo Xevo TQ.	-----
Instructivo para la realizar el Reporte de los datos por medio del software MassLynx en el equipo Xevo TQ*	INST-EQ-015	Crear el reporte de trabajo señalando algunas funciones para editarlo.	-----
Instructivo para la limpieza de los filtros de las columnas cromatográficas	INST-EQ-016	Mostrar el procedimiento de limpieza de los filtros de las columnas cromatográficas para eliminar las partículas adheridas en los filtros.	-----

*Se omite en este trabajo, ya que la información forma parte de los manuales de operación de cada instrumento.

**Se omite en este trabajo, solo se presenta un ejemplo.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

La base fundamental para el cumplimiento del sistema de gestión de calidad es la documentación, por tal motivo es importante que los operadores estén familiarizados con el cumplimiento de las buenas prácticas de documentación, puesto que al ir ejecutando de manera correcta y ordenada cada uno de los procedimientos e instrucciones de trabajo desarrollados (Manuales de Operación, Procedimientos Normalizados de Operación e Instructivos) e ir actualizando la información conforme se vaya requiriendo (actualización del software o integración de componentes), no solo se pretende evitar errores o la duplicidad de esfuerzos, si no también se intenta asegurar que la calidad de los procesos y en consecuencia de los resultados analíticos sean reproducibles y representativos.

Los Manuales de Operación, PNO's e Instructivos elaborados a partir de los criterios previamente señalados en este trabajo son realmente importantes, ya que al poseer la información necesaria para llevar a cabo una actividad específica de manera clara y sencilla para el operador, se ha conseguido optimizar el desempeño de los operarios y se ha obtenido una nueva forma de capacitación para los usuarios que requieren aprender el manejo y mantenimiento de los sistemas de cromatografía líquida (ACQUITY UPLC Clase H) y espectrómetro de masas (Xevo TQ) de la marca Waters.

Como recomendaciones, se sugiere que en la creación de cualquier documento se tomen en cuenta los siguientes aspectos:

- ▶ No sobre documentar. Hacer los documentos cortos y simples.
- ▶ Complementar la información con diagramas de flujo, imágenes, esquemas, etc. siempre y cuando esto ayude a un mejor entendimiento del documento.
- ▶ Usar formatos estandarizados.

- ▶ Separar las ideas en párrafos u oraciones individuales.
- ▶ Describir la información en forma comprensible. Pedir a otra persona que lo lea y que le explique lo que entendió.
- ▶ Escribir el texto en forma correcta gramáticamente.
- ▶ Revisar errores de puntuación.
- ▶ Tratar en lo posible que quien realice la actividad, participe en la elaboración y/o revisión del documento. Aunque esto pareciera obvio, es uno de los principales problemas. Se tiende a ignorar al usuario.
- ▶ Los documentos describirán la actividad real. Si esta actividad no es correcta, hay que modificarla.

CONCLUSIONES










Se elaboraron los Manuales de Operación para los instrumentos de Cromatografía Líquida de Ultra Desempeño ACQUITY UPLC Clase H, y Espectrometría de masas Xevo TQ ambos de la marca Waters; logrando obtener una herramienta de capacitación que ira guiando de manera clara y sencilla a los operadores en el manejo y mantenimiento de cada sistema.

A partir de los Manuales de Operación de cada sistema se elaboraron los Procedimientos Normalizados de Operación de rutina general y limpieza, generando documentos que faciliten realizar las operaciones repetitivas de manera reproducible.

Para facilitar la comprensión de los PNO's se elaboraron los instructivos de operación, asimismo se desarrollaron los instructivos de trabajo para el mantenimiento de los instrumentos y de las columnas cromatográficas lo que dio a la obtención de medidas más confiables.

Finalmente, como complemento para su capacitación, se dieron a conocer a los operarios del LEDEFAR los videos correspondientes a la manipulación de cada sistema.

REFERENCIAS

-  ACQUITY UPLC H-Class. Guía del sistema. Revisión B. Waters Corporation. (2010).
-  ACQUITY UPLC H-Class y el Sistema biológico H-Class. Especificaciones del sistema. Revisión B. Waters Corporation. (2010).
-  Alejandres Martínez Nancy. 2009. Elaboración de procedimientos normalizados de operación para el uso y mantenimiento de equipos e instalaciones dentro de la industria veterinaria. Tesis UNAM.
-  Chaves, Alvarado Rosario. ISO 9000 y el Control de los Documentos. Bibliotecas [en línea]. Vol. XXIII. No 1. Enero-Junio 2005. [Fecha de consulta: 12 de Abril de 2015]. Disponible en:
<http://www.revistas.una.ac.cr/index.php/bibliotecas/article/viewFile/447/388>
-  De Castro, Ríos Ana. (s. f.). Aplicación de la Cromatografía Líquida acoplada a la Espectrometría de Masas en Tándem a la Determinación de Antidepresivos en plasma y Fluido Oral. Universidad de Santiago de Compostela. [Fecha de consulta: 15 de Abril de 2015]. Disponible en:
<https://books.google.com.mx/books?id=Wwscs0ji10EC&printsec=frontcover&hl=es#v=onepage&q&f=false>
-  Detector de red de fotodiodos (PDA) y Detector de red de fotodiodos eλ para ACQUITY UPLC. Guía de mantenimiento y descripción general. Revisión A. Waters Corporation. (2010).
-  Empower Software. Data Acquisition and Processing. Revisión B. Waters Corporation. (2002).
-  Espectrómetro de masas Xevo TQ de Waters. Guía de Mantenimiento y descripción general. Revisión C. Waters Corporation. (2010).
-  García Rodríguez Karina. 2011. Las buenas prácticas de documentación y su importancia en la industria farmacéutica. Tesis UNAM.



- 📖 Guía de buenas prácticas de fabricación. Buenas prácticas de documentación. Comisión interinstitucional de buenas prácticas de fabricación. CIPAM. Monografía técnica No. 13. Segunda Edición. México, D.F. 2004.
- 📖 Guía de buenas prácticas de fabricación. Sistemas de documentación aplicables a la industria farmacéutica. Comisión interinstitucional de buenas prácticas de fabricación. CIPAM. Monografía técnica No.25. México, D.F. 2006.
- 📖 Guía técnica para elaborar manuales operativos. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. INEGI, México. 2013.
- 📖 Guía Técnica para la Elaboración de Manuales de Procedimientos de la Secretaría de Salud. Secretaría de Salud. Subsecretaría de Administración y Finanzas. México, D.F. 2004.
- 📖 Heras Salguero Andrea. 2009. Separación de Micotoxinas mediante Cromatografía de Líquidos de Ultra Presión acoplada a Espectrometría de Masas en Tándem. Universidad Almería.
- 📖 Instrucciones técnicas. ISO 9001 calidad. Sistemas de Gestión de Calidad según ISO 9000. (s.f.). Recuperado el 20 Enero de 2014, de <http://iso9001calidad.com/instrucciones-tecnicas-205.html>
- 📖 MassLynx Online Information System. Waters Corporation. (2009).
- 📖 Norma Mexicana IMNC. Sistemas de gestión de calidad. Fundamentos y vocabulario. Instituto Mexicano de Normalización y Certificación. ISO 9000:2005. NMX-CC-9000-IMNC-2008.
- 📖 Norma Mexicana IMNC. Sistemas de gestión de calidad. Requisitos. Instituto Mexicano de Normalización y Certificación. ISO 9001:2008. NMX-CC-9001-IMNC-2008.
- 📖 Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-2013. Buenas prácticas de fabricación de medicamentos.

- 📖 López, R. (2013).Curso de Espectrometría de Masas [Vídeo] LEDEFAR. UNAM.
- 📖 Pérez Carlos. Buenas Prácticas de Documentación. (2015). Recuperado el 12 de Abril de 2015, de http://www.academia.edu/9521296/Buenas_Practicas_de_Documentacion
- 📖 Proceso, Procedimiento y Procedimiento Documentado. ISO 9001 calidad. Sistemas de Gestión de Calidad según ISO 9000. (s.f.). Recuperado el 20 de Enero de 2014, de <http://iso9001calidad.com/instrucciones-tecnicas-205.html>
- 📖 Reglamento de Insumos para la Salud. Ultima Reforma DOF-14-03-2014.
- 📖 Ruiz Martínez Rosalia. 2009. Elaboración de procedimientos normalizados de operación para documentar de las actividades realizadas en la producción y análisis en un laboratorio de bromatología. Tesis UNAM.
- 📖 Sistema ACQUITY UPLC Guía de Funcionamiento. Revisión E. Waters Corporation. (2010).
- 📖 Voet, Voet, Pratt. 2007. Fundamentos de Bioquímica. La vida a nivel molecular. Segunda Edición. Editorial Médica Panamericana.

ANEXOS

ANEXO A (resultados). Sistema ACQUITY UPLC Clase H



Sección	Pág.
A-1 Manual de Operación para el equipo ACQUITY UPLC Clase H.	62
A-2 Procedimiento Normalizado de Operación para el sistema ACQUITY UPLC Clase H.	191
A-3 Instructivos de trabajo para el sistema ACQUITY UPLC Clase H.	202
A-3.1. Instructivo para el filtrado de soluciones y solventes.	202
A-3.2. Instructivo para el filtrado de muestras.	204
A-3.3. Instructivo para la colocación de la mini unión de conexión de columna.	205
A-3.4. Instrucciones para el purgado de las líneas de flujo en casos de contaminación.	206
A-3.5. Instructivo para el lavado de los viales del equipo ACQUITY UPLC Clase H.	208

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	

MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H



LABORATORIO DE ENSAYOS DE
DESARROLLO FARMACÉUTICO

LEDEFAR

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	



Manual de Operación para el equipo ACQUITY UPLC Clase H.

	Nombre	Puesto	Firma	Fecha
Elaboró:				
Revisó:				
Aprobó:				
Localización del documento:				

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	

ÍNDICE

Sección	Página
1. INTRODUCCIÓN	4
2. OBJETIVO Y ALCANCE	4
3. DEFINICIONES	4
4. COMPONENTES DEL SISTEMA	6
5. ENCENDIDO DEL EQUIPO Y PUESTA EN MARCHA DEL SISTEMA	9
Acondicionamiento y Puesta en Marcha del Sistema	12
6. ABRIR EMPOWER	18
7. CREAR UN PROYECTO	19
8. CREACIÓN DE UN MÉTODO SET	26
9. CREACIÓN DE UN SAMPLE SET	42
10. LAVADO DE LA COLUMNA Y APAGADO	46
11. ARRANQUE DE LA SECUENCIA	50
Indicación de los Paneles de Control	52
12. INTEGRACIÓN E IDENTIFICACIÓN	57
13. PUREZA DEL PICO	69
14. ADECUABILIDAD DEL SISTEMA	73
15. CUANTIFICACIÓN	76
16. REPORTE DE LOS DATOS	80
17. APAGADO DEL EQUIPO	85
18. COLOCACIÓN DE LA COLUMNA	88
19. COLOCACIÓN DE LA MINI UNIÓN DE CONEXIÓN	92
20. CAMBIO DE LOOP	93
21. CAMBIO DE LA JERINGA	97
22. CAMBIO DE LA AGUJA	101
22.11 Caracterizar el sello de la Aguja	104
22.14 Calibrar el eje Z de la Aguja	106
23. PURGADO DE LÍNEAS EN CASO DE CONTAMINACIÓN	109
24. RECOMENDACIONES GENERALES PARA EL MANTENIMIENTO DE LAS COLUMNAS CROMATOGRÁFICAS	111
ANEXOS.	114
A. Recomendaciones para el mantenimiento del equipo ACQUITY UPLC CLASS-H	114
B. Consideraciones Generales sobre los Solventes	115
C. TROUBLESHOOTING Resolución de Problemas	131
REFERENCIAS	138

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	

1. INTRODUCCIÓN.

El Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico (LEDEFAR) ha formulado el “Manual de Operación para el equipo ACQUITY UPLC Clase H”, cuyo objetivo es proveer información lo suficientemente técnica y lo más didáctica posible en el momento oportuno, permitiendo operar el sistema de cromatografía líquida de acuerdo a procedimientos establecidos de manera secuencial.

El presente Manual de Operación, integra la información correspondiente a los componentes del sistema ACQUITY UPLC Clase H, los procedimientos necesarios para operar el equipo y para cambiar accesorios e incluye la información sobre las recomendaciones generales para el mantenimiento de columnas cromatográficas y el sistema de cromatografía, finalmente se presentan los Anexos para la resolución de problemas y consideraciones generales sobre los solventes.

Es importante hacer notar que este manual no pretende ser un sustituto del manual del fabricante, sino por el contrario un complemento de él.

2. OBJETIVO Y ALCANCE.

Este manual de operación aplica al sistema ACQUITY UPLC Clase H y esta dirigido a los usuarios que operan dicho sistema.

El objetivo de este manual consiste en proporcionar una guía de trabajo la cual describa de manera general el manejo del instrumento, así como, realizar tareas de limpieza y mantenimiento.



3. DEFINICIONES.

Calibración. Operación que, bajo condiciones especificadas, en un primer paso, establece una relación entre los valores de las magnitudes con su incertidumbre de medición provista por patrones de medición y las indicaciones correspondientes con incertidumbres de medición asociadas y, en segundo paso, usa esta información para establecer una relación para obtener un resultado de medición de una indicación. [6]

Columna. Tubos rectos de acero inoxidable de longitudes entre 10 y 30 cm, acoplables, de diámetros variables, recubiertos con una capa delgada y porosa de distintos compuestos.

Empower. El software Empower presenta una interfaz de usuario-gráfica basada en iconos que permite adquirir, procesar, gestionar y almacenar datos cromatográficos, así como realizar informes sobre dichos datos. [4]

Ensayo/prueba. Determinación de una o más características de acuerdo con un procedimiento. [7]

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	

Horno de precalentamiento activo. El horno de columnas ACQUITY UPLC H-Class utiliza un precalentador para acondicionar el solvente a medida que entra en la columna. El horno de precalentamiento activo es una fuente de calor que aumenta la temperatura de la fase móvil entrante (y de la muestra inyectada) hasta la temperatura programada del compartimento de columnas. [1]

Inyector de flujo a través de aguja. El mecanismo de flujo a través de aguja aspira una muestra y la retiene en la aguja de muestras para preparar la inyección de la muestra en la columna. La aguja forma parte de la trayectoria del flujo de inyección cuando se inyecta la muestra en la columna. [1]

Método de informe. Sirve como una plantilla para organizar los datos, resultados, curvas de calibración, y los contenidos de los métodos en un informe generado. El método informe es independiente de los datos que contiene el informe. Un informe puede incluir datos procesados o sin procesar. [4]

Método de instrumento. Especifica los parámetros de adquisición de datos, tales como la tasa de flujo y la longitud de onda de control de instrumentos. Los instrumentos incluyen bombas, sistemas administradores de disolventes, detectores, inyectores automáticos, sistema administrador de muestras y cromatógrafos de gases o simplemente para recoger datos. [4]

Método de procesamiento. Contiene un conjunto de instrucciones que definen los procesos de Empower de un canal o un canal 2D extraído 3D. Puede seleccionar si desea procesar los datos mediante ApexTrack o integración tradicional. Además, para diferenciar los picos de ruido, aplicar nombres de los componentes, para resumir los picos del grupo con nombre, para realizar cálculos de idoneidad del sistema y así sucesivamente. [4]

Método SET. Es un conjunto de instrucciones para Empower. Debe contener instrucciones con respecto a la recogida de datos, el método de instrumento, y que también puede contener un método de procesamiento, un método de informe. [4]



Procedimiento. Forma especificada para llevar a cabo una actividad o un proceso. [7]

Proyecto. Es un conjunto definido por el usuario de los métodos, resultados, filtros de vista, campos personalizados y los datos brutos. En el espacio de tablas del proyecto se reserva un área dentro de la base de datos para los métodos, resultados, filtros de vista y campos personalizados. Un directorio aparte almacena los archivos de datos brutos. [6]

Sample set (conjunto de muestras). Es el nombre que da potencial los archivos de datos que obtiene después de ejecutar un método conjunto de la muestra. [4]

Sample set method (método conjunto de la muestra). Es una secuencia de instrucciones en forma de tabla que contiene la posición del vial, el volumen de inyección, el nombre de la muestra, y el nombre del conjunto de método. Puede contener otras instrucciones tales como el equilibrio y la calibración clara antes de una corrida y calibrar y cuantificar después de una corrida. [4]

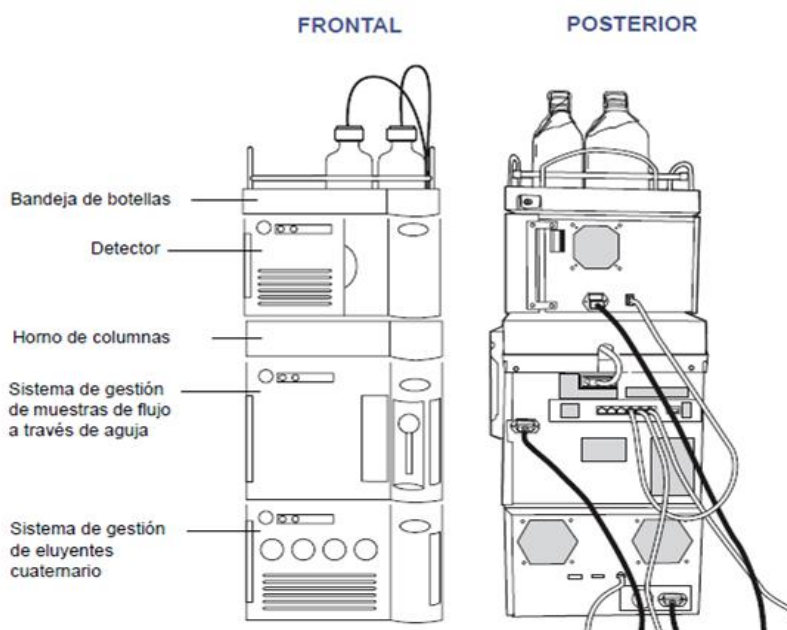
Solvente de lavado El sistema de lavado utiliza un solo solvente para limpiar la parte exterior de la aguja de muestras y cebar el sistema de lavado. El solvente no entra en la trayectoria del flujo de inyección. [1]

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	

Solvente de purga La función principal del solvente de purga es transportar la muestra a lo largo de la trayectoria de inyección. El solvente de purga ceba también la jeringa de muestras y la trayectoria de inyección. La inyección de solvente en la columna solo se produce durante la dilución automática, cuando se utiliza como el solvente de dilución. [1]



4. COMPONENTES DEL SISTEMA.

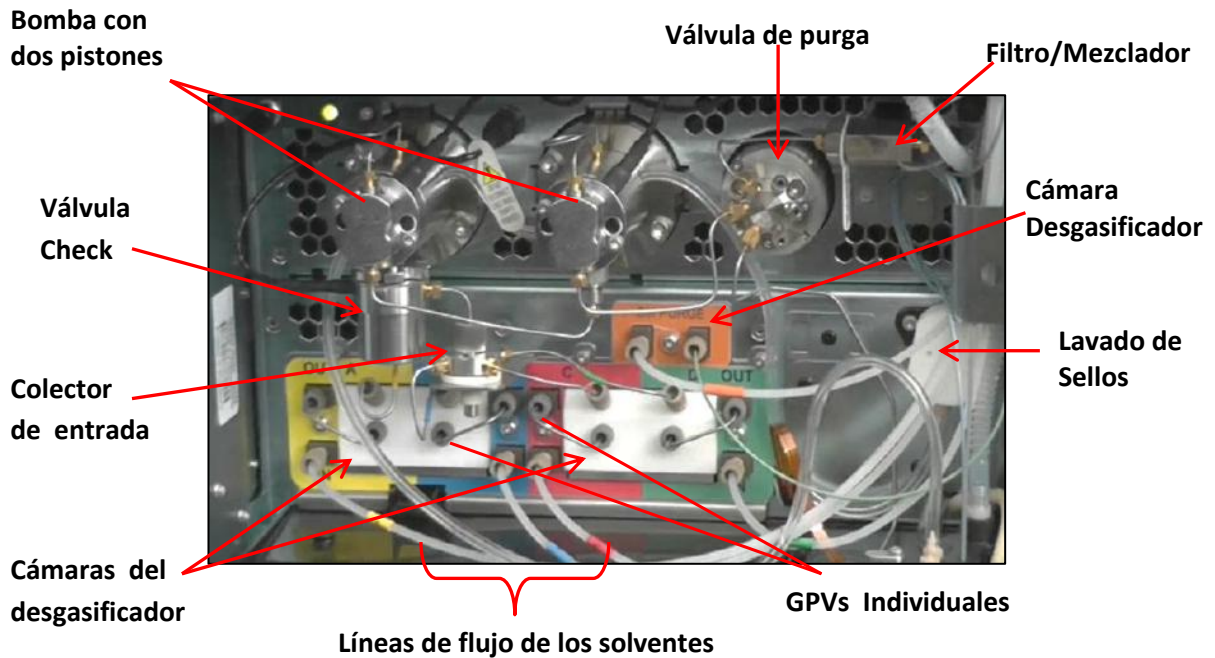
Los sistemas ACQUITY UPLC Clase H, son sistemas que logran un destacado incremento en la resolución, velocidad y sensibilidad en aplicaciones de cromatografía líquida, en comparación con los sistemas convencionales.



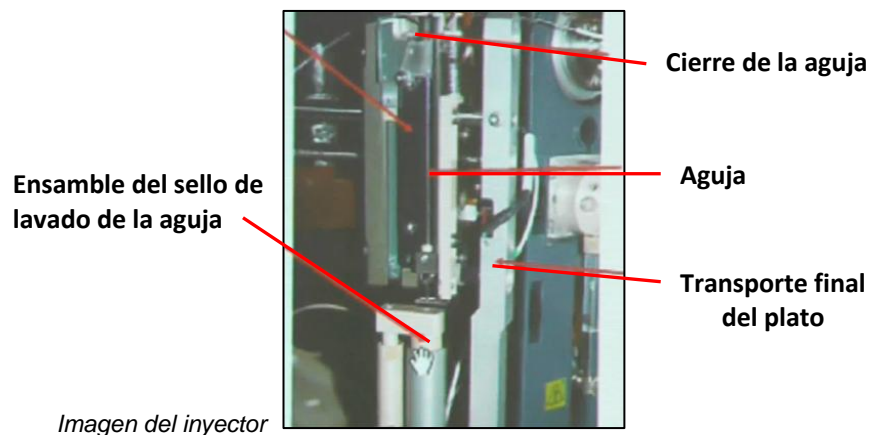
El sistema ACQUITY UPLC Clase H consiste de lo siguiente:



- Administrador cuaternario de solventes (Quaternary Solvent Manager QSM/ Bomba)
 - Mezclador de gradiente a baja presión para 4 solventes.
 - Soporte de presión UPLC. (Hace un premezclado a baja presión antes de entrar a los pistones)
 - Bajo volumen de retraso de gradientes. (Tiempo que tardar el sistema en hacer el cambio de una mezcla a otra)

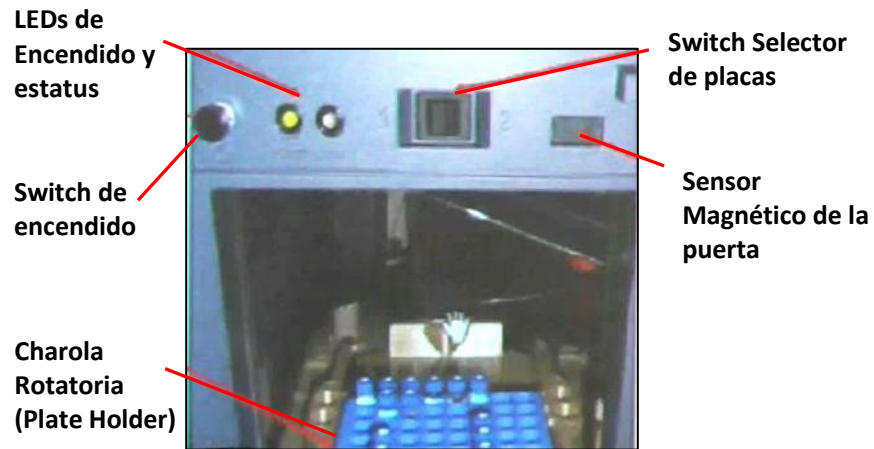
	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	



- Administrador de muestras – De flujo a través de la aguja (Sample Manager/ Inyector)
 - Un modo de inyección- tipo de inyección directa
 - Más simple – solo especificar el volumen de inyección
 - Excelente recobro y precisión.

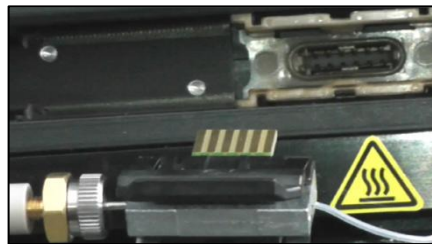


	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	



➤ HTCH-A



- Horno de columnas a alta temperatura con precalentamiento activo.



➤ Selección de detector normal

- TUV, PDA, PDAeλ
- Más opciones a ser adicionadas.

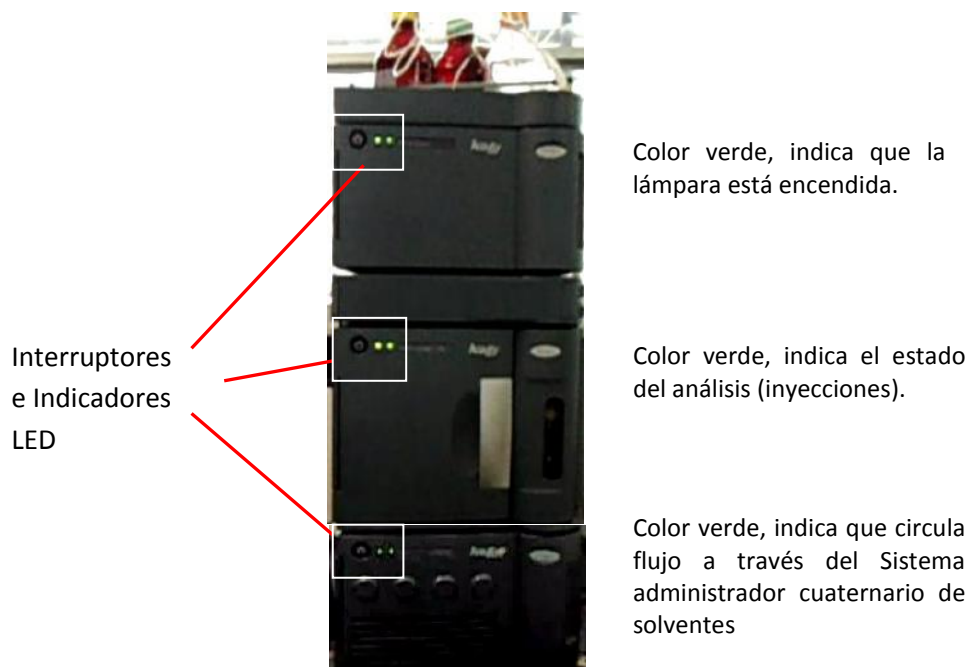



	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	



5. ENCENDIDO DEL EQUIPO Y ACONDICIONAMIENTO DEL SISTEMA.

El encendido del sistema conlleva la puesta en marcha de la estación de trabajo del Sistema ACQUITY UPLC H-Class, los módulos del sistema y el software del sistema de datos cromatográficos. Cada dispositivo o instrumento emite tres pitidos y realiza una serie de pruebas de inicialización.

- 5.1. Encender el Sistema administrador de muestras y el Sistema administrador cuaternario de solventes pulsando el interruptor de encendido situado en la parte superior izquierda de la puerta de cada dispositivo.
- 5.2. Cuando los indicadores LED del sistema administrador de muestras y el sistema administrador cuaternario de solventes se encienda de color verde fijo, pulsar el indicador de encendido situado en la parte superior izquierda del detector y enseguida encender la computadora.



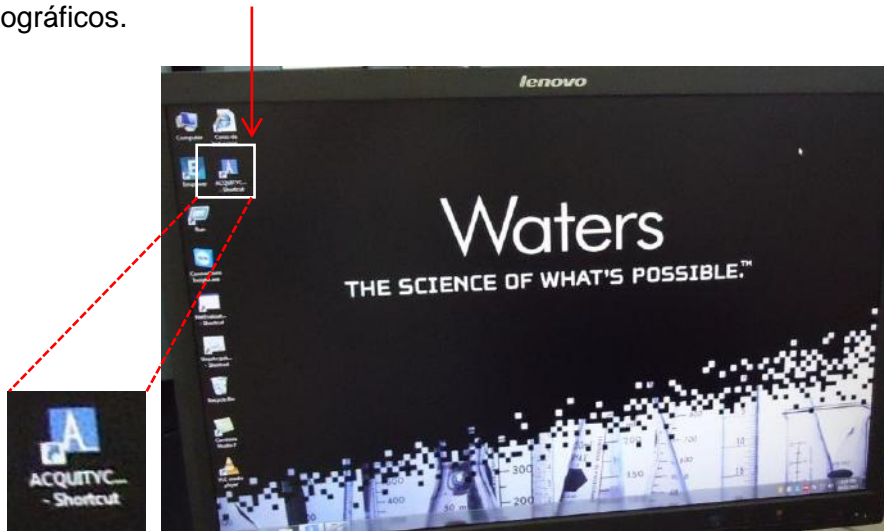
 **Indicación:** Esperar aproximadamente 2 minutos para que todos los dispositivos del equipo se enciendan completamente.



	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	

! **Precaución:** Si el color indicador LED es Rojo puede suceder lo siguiente:


Color del Indicador LED	Descripción
Rojo intermitente	Indica que un error ha detenido el instrumento o dispositivo. Consultar la Consola ACQUITY UPLC para obtener información sobre el error.
Rojo continuo	Indica que se ha producido un fallo en el módulo que impide seguir utilizándolo. Apague el módulo y después vuelva a encenderlo. Si el indicador LED continúa de color rojo continuo, ponerse en contacto con un representante del Servicio Técnico de Waters.

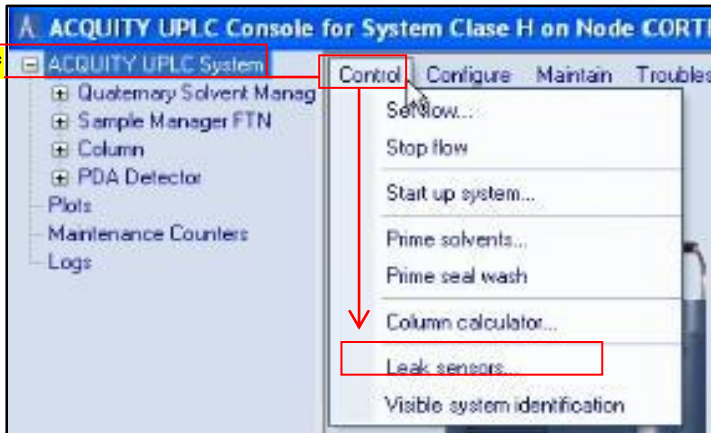
5.3. Dar clic al icono **ACQUITYC-Shortcut** e iniciar el software del sistema de datos cromatográficos.




	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	


5.4. Activar los sensores de fugas. En la consola **ACQUITY UPLC System**, seleccionar **Control > Leak Sensors** (Control > Sensores de fugas).

 **Indicación:**
 Verificar que este seleccionado el sistema ACQUITY UPLC.*





5.5. Para activar el sensor de fugas para un módulo concreto hacer clic en el estado ubicado a la izquierda de la descripción del módulo.

 **Indicación:** Para activar todos los sensores de fugas, hacer clic en **Enable All** (Activar todos).



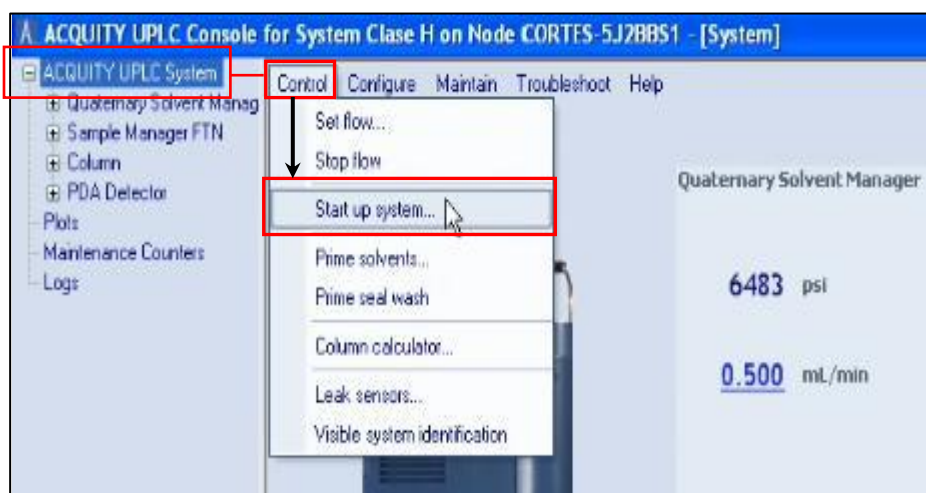
Hacer clic para activar o desactivar todos los señores de fugas del instrumento.


Hacer clic para activar o desactivar cada uno de los señores de fugas del instrumento.

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	

Acondicionamiento y Puesta en marcha del Sistema.



5.6. Para poner en marcha el sistema, en la consola **ACQUITY UPLC System** hacer clic en **Control** y enseguida dirigirse a **Start up system** (Control > Puesta en marcha del sistema).



 **Indicación:** Si se observa en la parte inferior izquierda de la consola ACQUITY UPLC que el estado del sistema (**System Status**) se encuentra en rojo indica que aun los dispositivos no están sincronizados, por lo tanto, resetear el o los módulos que no estén sincronizados. Espere unos segundos para que se sincronicen nuevamente.

Si los módulos se sincronizan correctamente, el estado del sistema se mostrará en color verde.



	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	



5.7. Una vez sincronizados los dispositivos en la pestaña **Prime Solvents** (preparar solventes) dirijase a «**SM**» **Sample Manager** (inyector) y seleccione las condiciones de lavado y purgado.



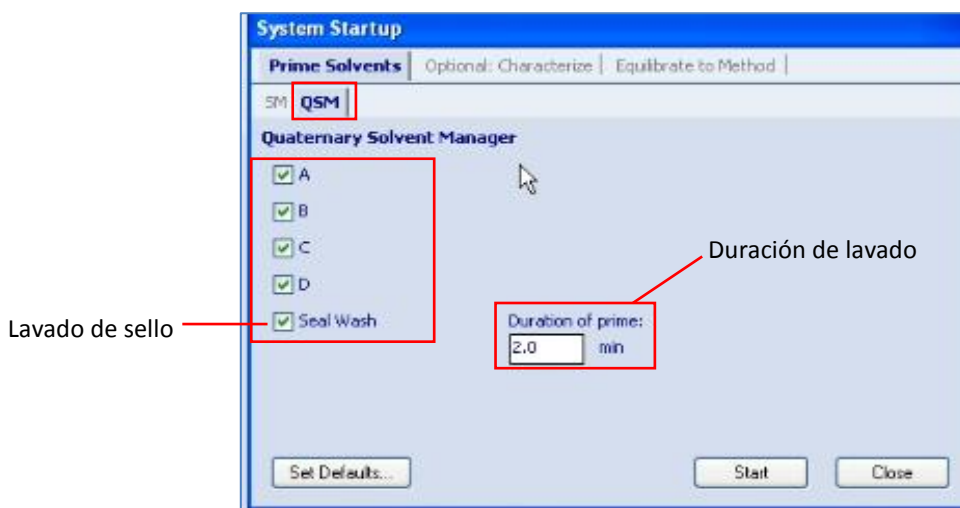
Valor predeterminado: el solvente de lavado durante 15 segundos y el solvente de purga durante 5 ciclos.

⚠ Indicación: Para definir el tiempo de lavado, siempre considere que la solución de lavado no se vaya a terminar en el tiempo establecido.

⚠ Indicación: Para volver a establecer los valores originales, hacer clic en **Set Defaults** (Valores predeterminados) en cualquier pestaña.

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	

5.8. Seleccione la pestaña «**QSM**» (Administrador cuaternario de solventes) y elija las líneas de flujo (**A/B/C/D**) que se deseen purgar así como la duración de lavado.





⚠ Advertencia: Siempre realizar el lavado de sellos para mantener los pistones en buen estado ya que de lo contrario estos se pueden rayar y originar fugas en el sistema.

! Recomendación: El valor mínimo de purgado es de 3 minutos para garantizar una buena limpieza.

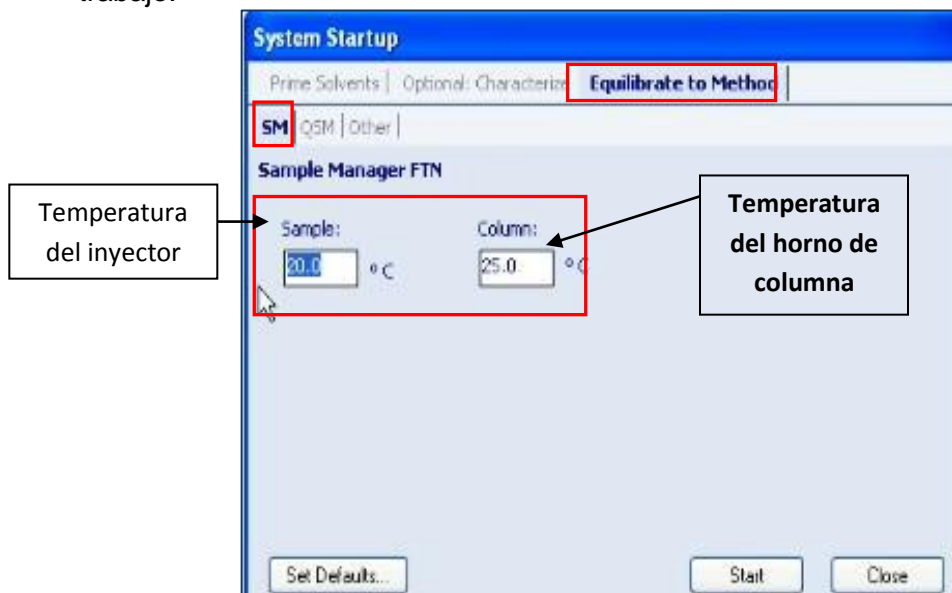
⚠ Indicación: Se pueden seleccionar o desmarcar todas o algunas de las líneas de flujo A/B/C/D. Se puede modificar la duración del proceso de lavado de las líneas de flujo de los solventes A - D introduciendo un número diferente en el campo **Duration of Prime** (Duración de lavado). Todas las líneas de solvente seleccionadas se lavarán durante el mismo tiempo.

Valores de los parámetros de lavado:

Intervalo	0.1 a 60 minutos
Predeterminado	Todas las líneas de flujo de solvente se lavan durante 2.0 minutos cada una.
Recomendado	Lavar durante 3 minutos.

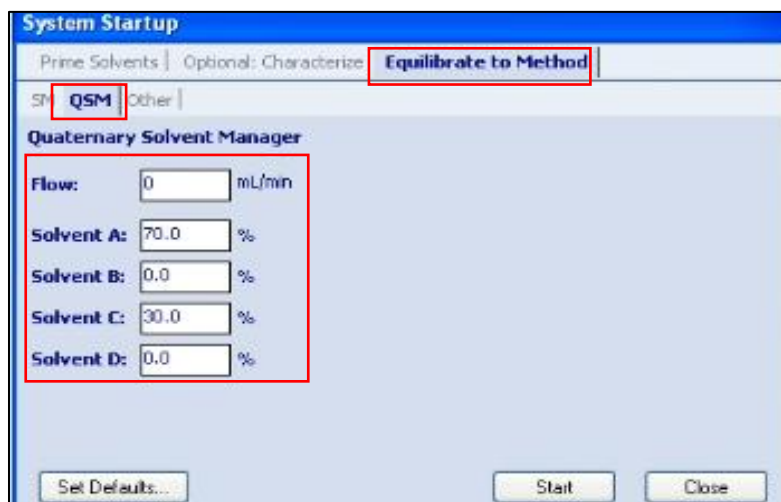
	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	



5.9. Seleccione la pestaña «**Equilibrate to Method**» (Equilibrar método), y en la opción «**SM**», ajuste los valores de acondicionamiento de la temperatura de trabajo.



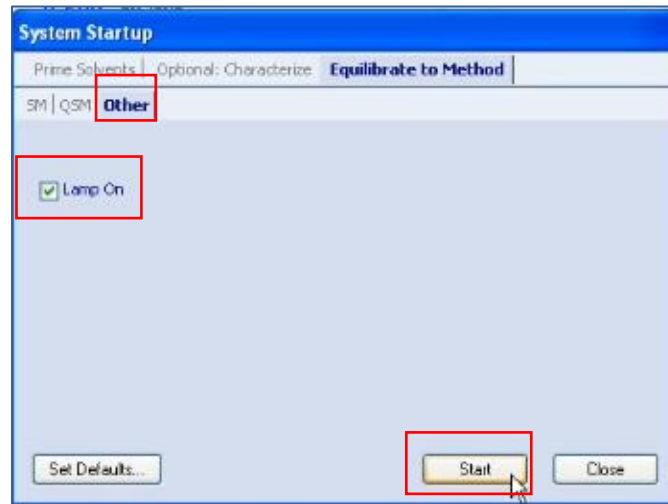
⚠ Indicación: La temperatura del inyector y la temperatura del horno de columna, dependen del método con el que se vaya a trabajar.

5.10. En la pestaña «**QSM**» seleccione las condiciones del flujo de trabajo de la bomba, así como las proporciones de fase móvil a utilizar.

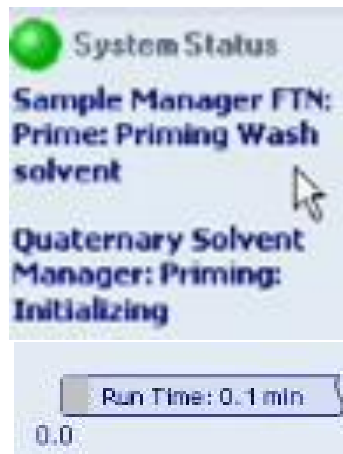




	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	

5.11. Diríjase a la opción «**Other**» (Otro) y encienda la lámpara seleccionando la opción «**Lamp On**», enseguida dar clic a la opción «**Start**» (Comienzo).



5.12. Si las condiciones programadas se guardaron correctamente aparecerá el siguiente mensaje en la parte inferior izquierda de la consola ACQUITY UPLC :




	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	





 En caso contrario volver a plantear las condiciones.

Valores de los parámetros de la pestaña Equilibrar el Método.

Parámetros de la puesta en marcha del sistema	Valores predeterminados	Valores permitidos
Flujo inicial del Método	0.500 mL/min*	De 0.1 a 2.0 mL/min
Composición de A, B, C y D (<u>la suma debe ser 100%</u>)	A, 100% B,C,D 0%	A; 0 a 100% B; 0 a 100% C; 0 a 100% D; de 0 a 100%
Temperatura de la columna	Off (Desconectado)	Depende del tipo de compartimento de columna
Temperatura de la muestra	On (Conectado)	Off (Desconectado), o de 4.0 a 40°C (de 39.2 a 104°F)
Lámpara	On (Conectado)	Encendida o apagada  Importante: <u>NO se debe conectar la lámpara del detector, ni trabajar con ella o encenderla si no existe flujo a través de la celda o si la celda de flujo está seca.</u>

* Revisar las especificaciones de la columna (Ver su respectivo Manual).

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	

6. ABRIR EMPOWER

6.1. Dar doble clic al icono «Empower» el cual se encuentra localizado en la pantalla del escritorio.



Icono del Software Empower

6.2. En el cuadro de texto, Inserte el nombre y contraseña. Dar clic en **Advanced»** (Avanzar)





Indicación: Para utilizar Empower, debe tener un nombre de usuario y contraseña. Nombre de usuario y la contraseña no se distingue entre mayúsculas y minúsculas.

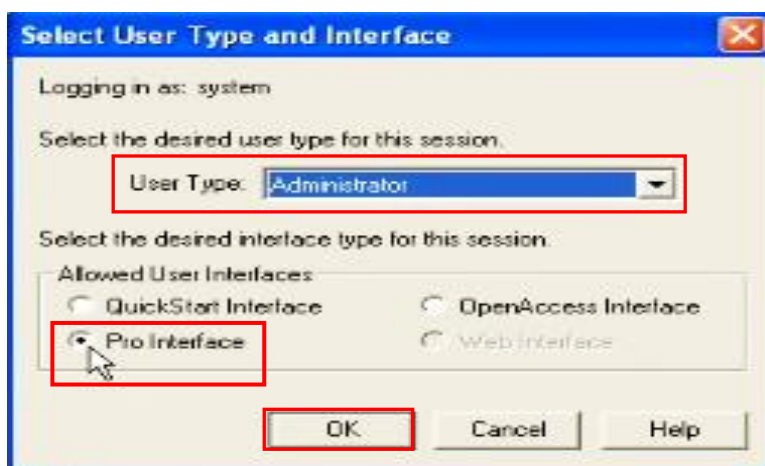
User Name: **system**
 Password: **manager**



Dar clic

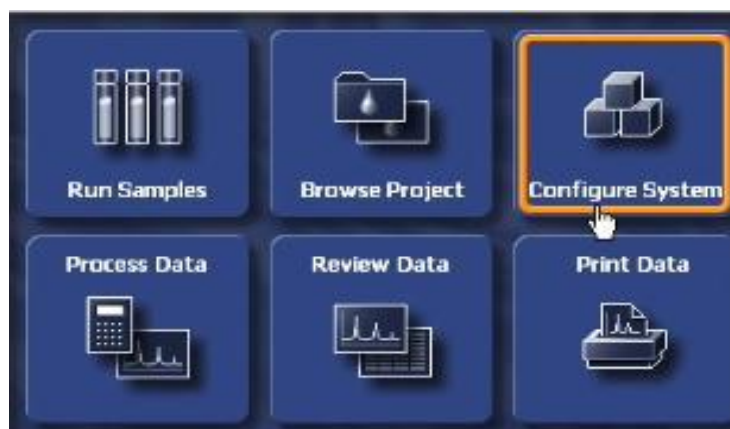
	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	



6.3. En la selección del tipo de usuario, elija **Administrator** (Administrador) y en la interfaz de usuario seleccionar «**Pro Interface**». Dar clic en **Ok**



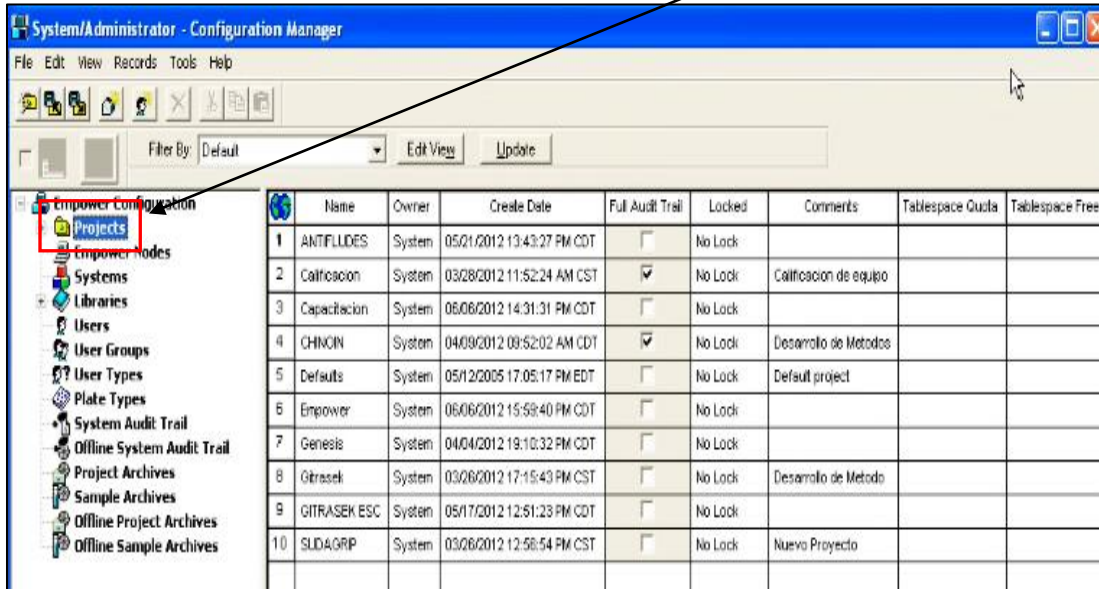
7. CREAR UN PROYECTO

7.1. Abrir el programa «**Empower**» y seleccione el icono «**Configure System**» (Configuración del sistema)

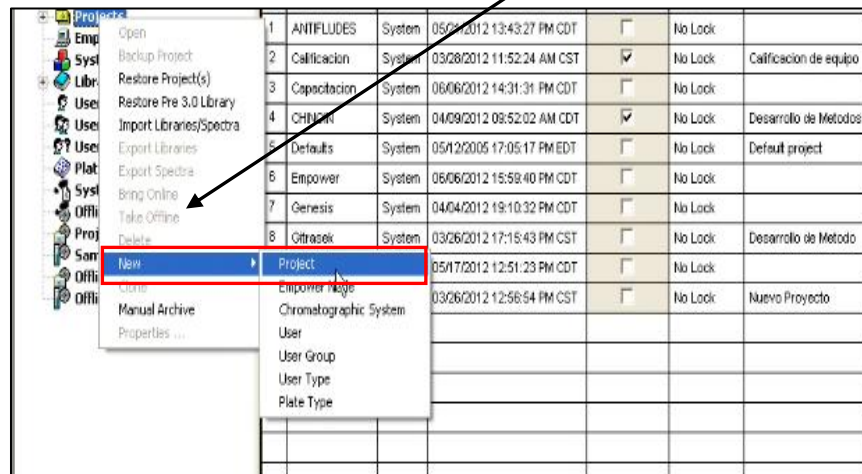




	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	

7.2. En la ventana **Configuration System** dirigirse a la carpeta «**Projects**» (proyectos) y dar clic derecho con el mouse.

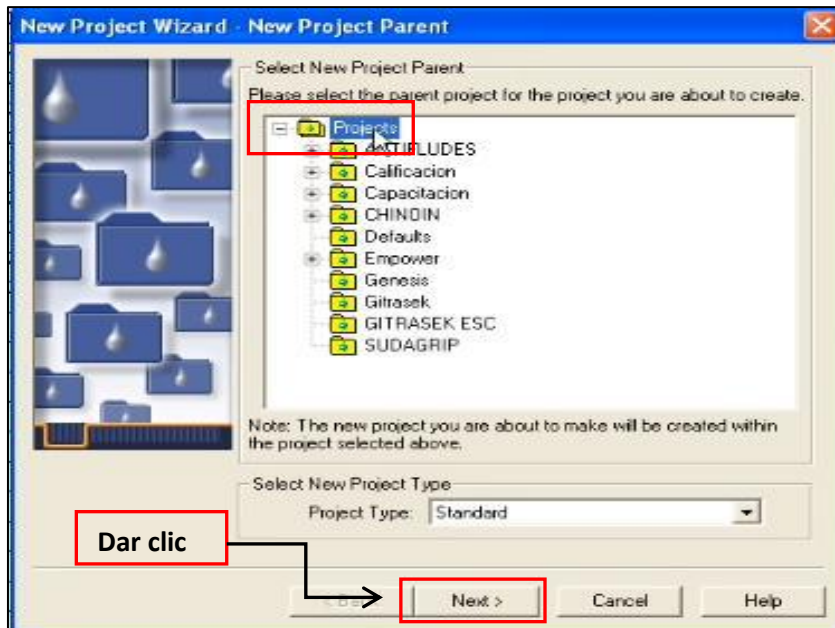


7.3. Para crear un nuevo proyecto; dirijase a la opción «**New**» (nuevo) y en seguida seleccione «**Project**» (proyecto).

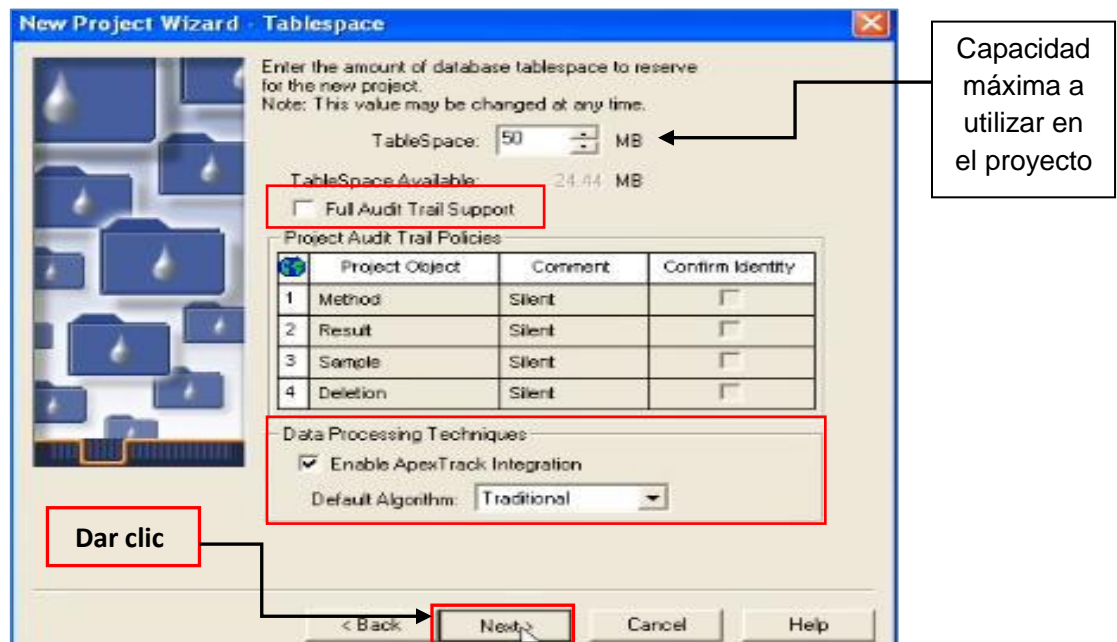




	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	

7.4. Guardar el nuevo proyecto en el directorio raíz «**Projects**» y dar clic en «**Next**».



7.5. En la ventana **New Project Wizard** (Asistente para nuevo proyecto), indique la capacidad (MB) a utilizar en el proyecto y seleccione el tipo de algoritmo de integración para el procesamiento de los datos.



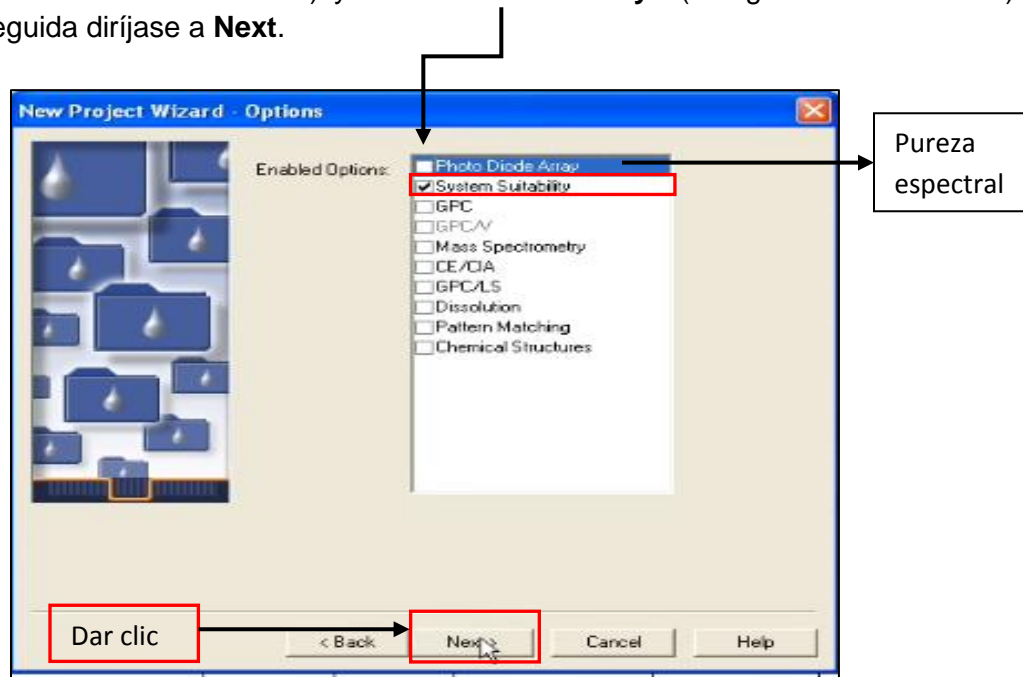
	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	

⚠ Indicaciones:



- Para saber la capacidad máxima que se requiere para el proyecto, el equipo al no poder procesar la información indicara que necesita mayor capacidad. Valores recomendados 100 MG para UV y 300 MG para cromatografía PDA.
- Puede activar o desactivar la opción **Full Audit Trail Support**. Desactívela siempre y cuando no requiera un sistema de Auditoria completa.
- En la opción **Default Algorithm**, seleccione el tipo de integración de datos que vaya a utilizar: **tradicional** (algoritmo general) o **Apex Track** (algoritmo mucho más sensible que integra datos más finos, van dirigidos asía el nivel de ruido.)

7.6. Una vez especificados los parámetros, seleccione «**Next**».

7.7. En la ventana Wizard. Options, active las opciones «**System Suitability**» (Adecuabilidad del Sistema) y «**Photo Diode Array**» (Arreglo de diodos PDA) enseguida dirijase a **Next**.

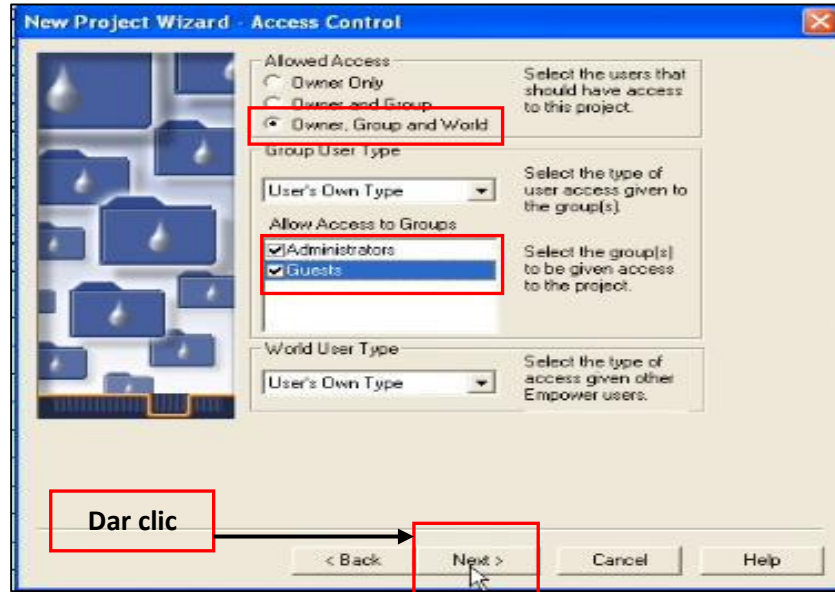


⚠ Indicación: Puede dejar seleccionada cualquier otra opción siempre y cuando se encuentre disponible en el software.

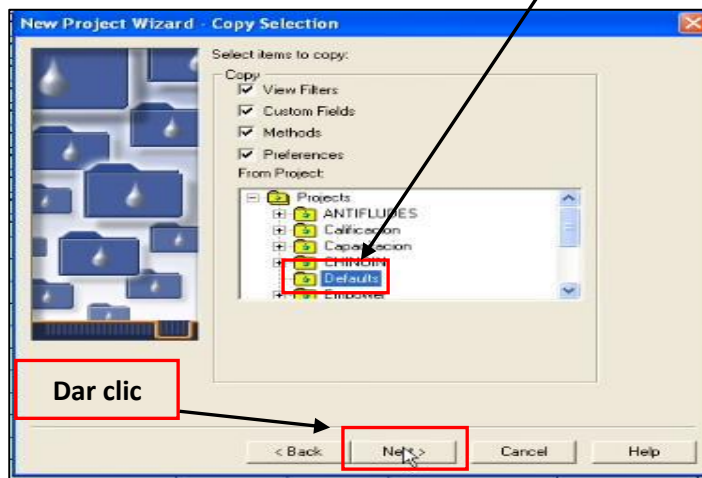
	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	



7.8. Active las opciones «**Owner. Group and World**» (Propietario, Grupo y Mundo), «**Administrators**» (Administradores) y «**Guests**» (Invitados) de la ventana **Wizard. Access Control**, enseguida diríjase a la opción **Next** ».

! **Indicación:** Seleccione las restricciones de acceso a la información, generalmente se dejan activadas las opciones recomendadas.



7.9. En la ventana **Wizard . Copy Selection**, seleccione la carpeta «**Defaults**» y de clic en la opción **Next**.





	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	

⚠ Aviso: Si cuenta con un proyecto que tenga el mismo método de instrumento y proceso cromatográfico que el proyecto nuevo a crear, entonces puede guardar el nuevo archivo en la carpeta del proyecto ya creado. En caso contrario seleccione la carpeta **Defaults**.

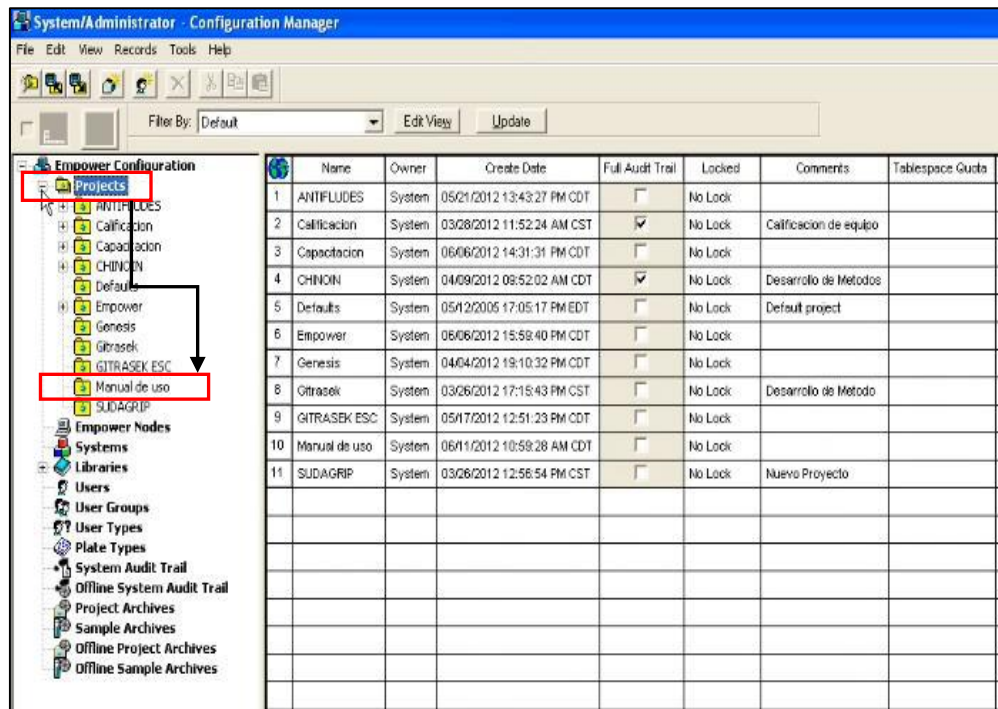
7.10. En la ventana **Wizard . Name Entry**, en la opción «**Project Name**», establezca el nombre del proyecto. Dar clic a la pestaña «**Finish**».





⚠ Indicación: Si desea puede agregar algún comentario respecto al proyecto a crear, dirigiéndose a la opción «**Project Comments**» de la misma ventana.

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	

7.11. Una vez creado el proyecto, diríjase a la carpeta «**Project**» y enseguida seleccione la carpeta con el nombre de su proyecto.



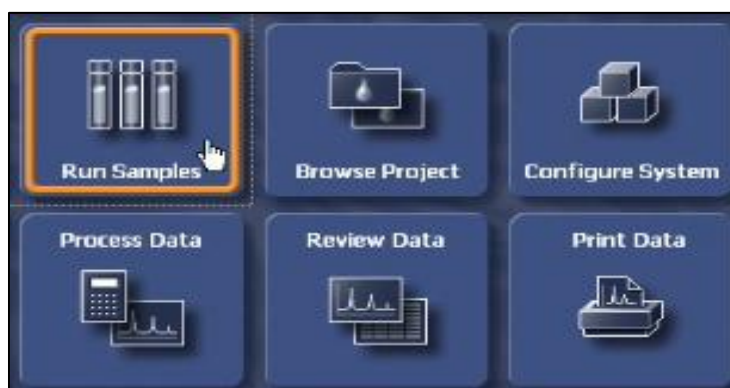
⚠ Indicación: Si lo desea puede crear subcarpetas en el mismo proyecto. Para ello, seleccionar el nombre de su proyecto dar clic derecho con el mouse y diríjase a la opción «**New**» (nuevo), en seguida seleccione «**Project**» (proyecto) y guarde la nueva carpeta.

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	

8. CREACIÓN DE UN MÉTODO SET

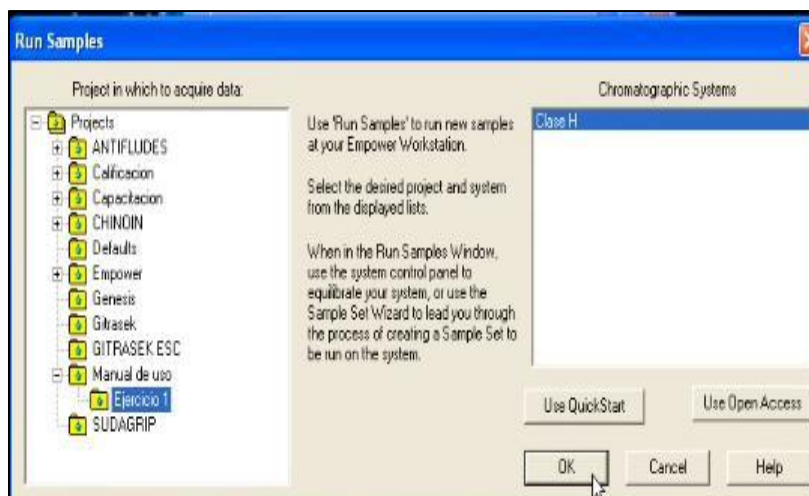
(Método de Instrumento, Proceso y Reporte)



8.1. Abrir el programa «**Empower**» y seleccione la opción «**Run Samples**» (Correr muestras).



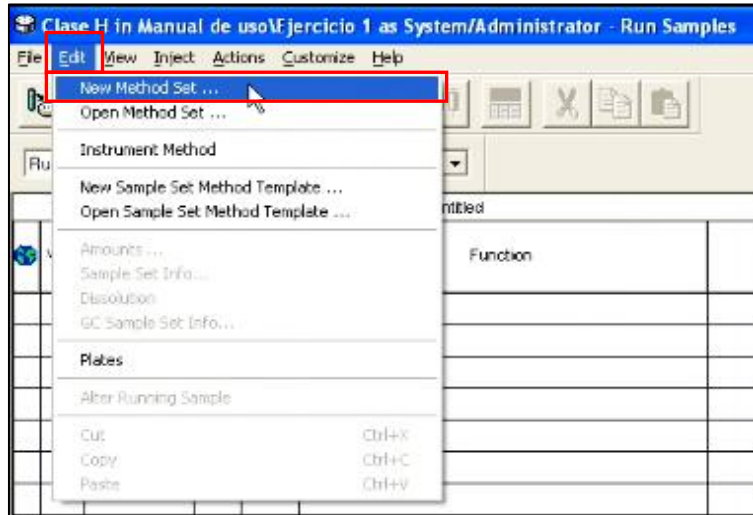
8.2. Seleccione la carpeta con el nombre de su proyecto.

8.3. Dar clic en «**Ok**».

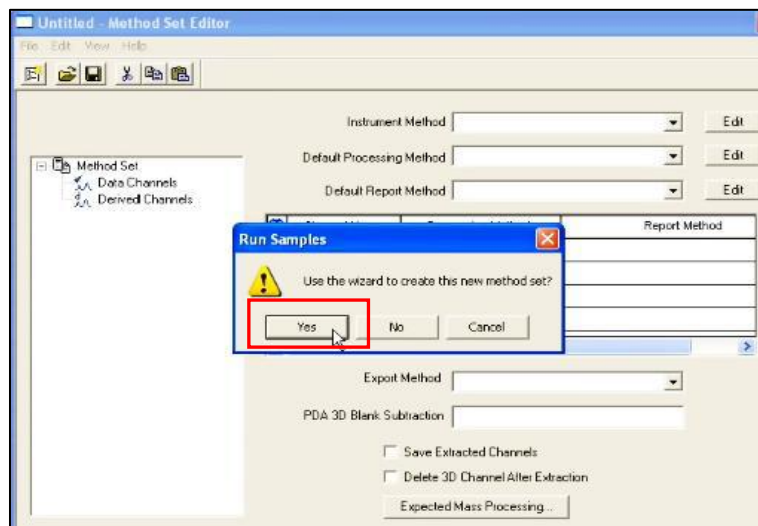




	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	

8.4. Para crear el Método Set, seleccione la pestaña «**Edit** » (Editar) y dar clic en la opción «**New Method Set....**» (Nuevo Método Set)

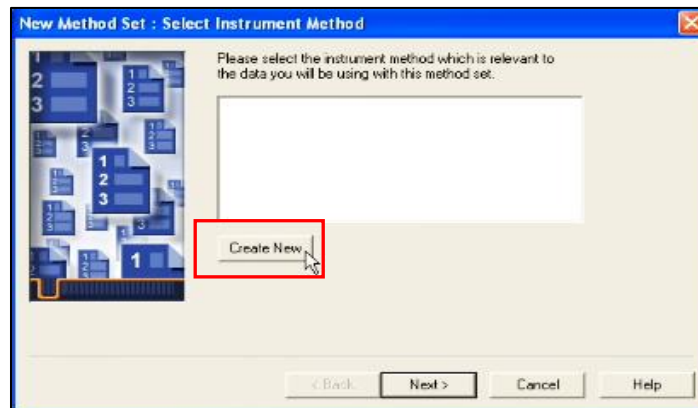


8.5. Seleccione la opción «**Yes**» para utilizar el *Wizard* en la creación del método set.



	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	



8.6. Seleccione el icono «**Create New**» (crear nuevo).



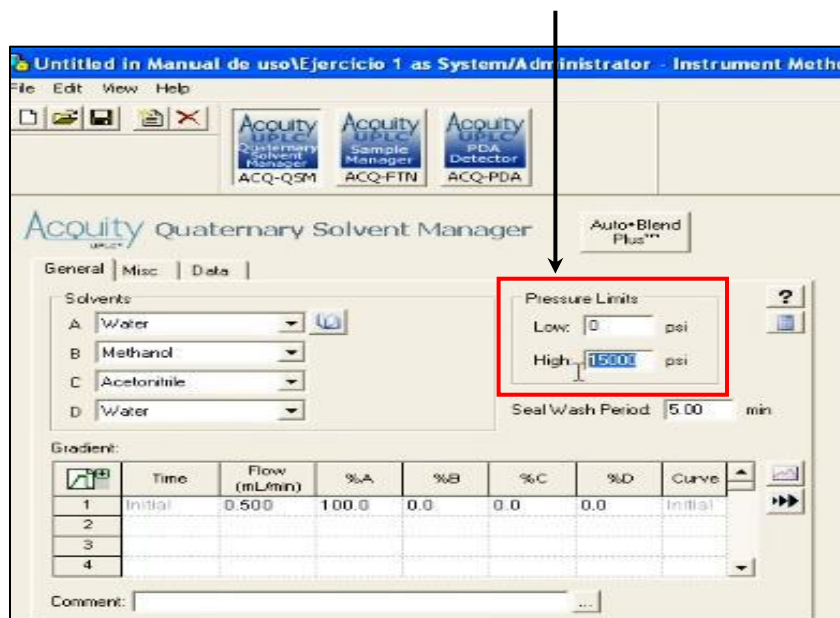
8.7. En la ventana del método de instrumento, en el icono **ACQUITY Quaternary Solvent Manager** , seleccione los **solventes** a utilizar.



 **Tomar en cuenta las especificaciones de la columna.** (Ver su respectivo Manual)



	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	

8.8. Seleccione los límites de presión de trabajo « psi ». **Low** (bajo), **High** (alto).

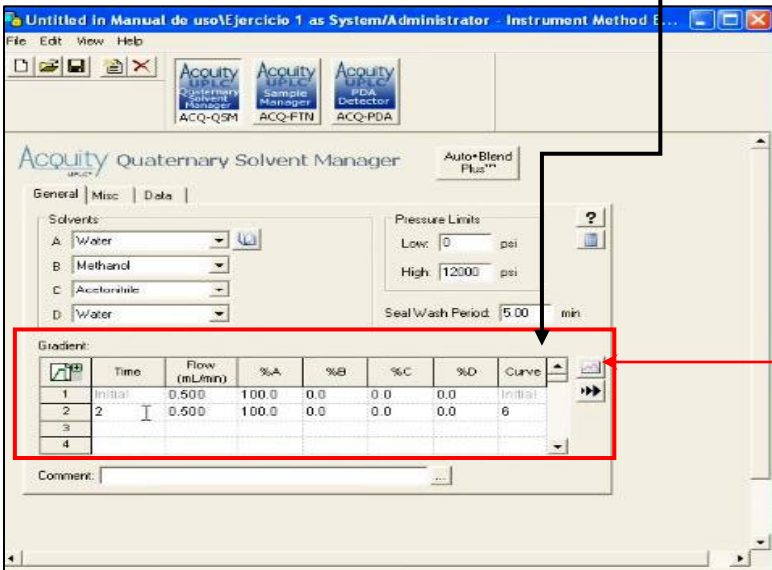


! Precaución:

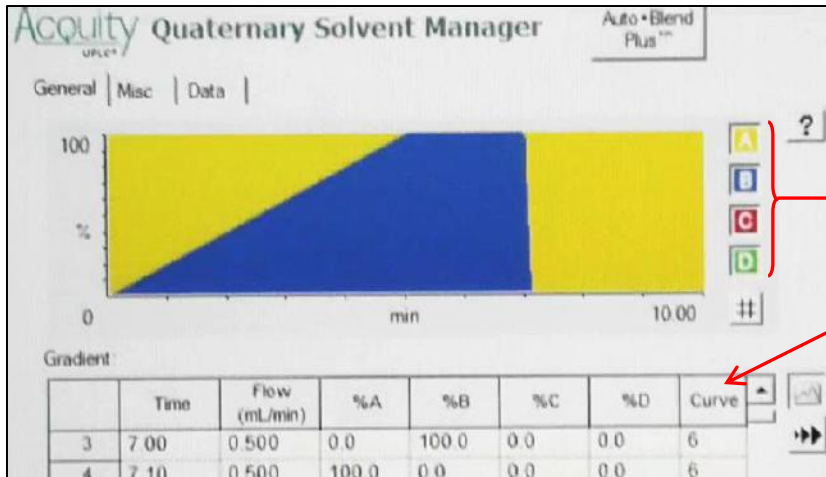
- **Revisar las especificaciones de la columna.** (Ver su respectivo Manual)
- Evite trabajar al nivel de presión máxima de la columna pues se puede fracturar el compuesto de relleno.
- Evite trabajar a una presión mínima de cero en el equipo, pues si se agota el solvente de la fase móvil el equipo no lo detecta pudiendo introducir aire a la columna, por lo tanto, se recomienda un valor mínimo de 100 psi, asegurando que en caso de existir una fuga o falla de solventes el equipo apague la bomba por seguridad.

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	

8.9. En la tabla de abajo, especifique las condiciones del modo de elución (tiempo, flujo, porcentajes de solvente y tipo de curva) que requiera para su ensayo.



	Time	Flow (mL/min)	%A	%B	%C	%D	Curve
1	Initial	0.500	100.0	0.0	0.0	0.0	Initial
2	2	0.500	100.0	0.0	0.0	0.0	6
3							
4							





Solventes

Tipo de Curva

	Time	Flow (mL/min)	%A	%B	%C	%D	Curve
3	7.00	0.500	0.0	100.0	0.0	0.0	6
4	7.10	0.500	100.0	0.0	0.0	0.0	6

⚠ Indicación: En la opción «Curve» (curva) seleccione el gradiente que requiera para su ensayo ya sea lineal, escalonado, cóncavo o convexo. Recuerde tomar en cuenta las especificaciones del flujo de la columna que utilice.

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	

Ejemplo: Cambiar el modo de elución por gradiente.

Línea 1: Modo de elución <i>Isocrático</i> Línea 2: Time (tiempo) 5,00 Flow (flujo) 1,00 Escriba %A 60 %B 40 Introduzca Curva 6 Línea 3: Time (tiempo) 6,00 Flow (flujo) 1,00 Escriba% A 100,0 Introduzca Curva 11	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Time</th> <th>Flow</th> <th>%A</th> <th>%B</th> <th>%C</th> <th>%D</th> <th>Curve</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>1.00</td> <td>100.0</td> <td>0.0</td> <td>0.0</td> <td>0.0</td> <td></td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>5.00</td> <td>1.00</td> <td>60.0</td> <td>40.0</td> <td>0.0</td> <td>6</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>6.00</td> <td>1.00</td> <td>100.0</td> <td>0.0</td> <td>0.0</td> <td>11</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	Time	Flow	%A	%B	%C	%D	Curve	1	1.00	100.0	0.0	0.0	0.0		2	5.00	1.00	60.0	40.0	0.0	6	3	6.00	1.00	100.0	0.0	0.0	11														
	Time	Flow	%A	%B	%C	%D	Curve																																				
	1	1.00	100.0	0.0	0.0	0.0																																					
	2	5.00	1.00	60.0	40.0	0.0	6																																				
3	6.00	1.00	100.0	0.0	0.0	11																																					

Elución por gradiente.

Las separaciones isocráticas usan la misma composición de la fase móvil a través de la separación (composición constante). Las eluciones isocráticas se usan cuando la mezcla a separar no es muy compleja o cuando los componentes de la mezcla tienen tiempos de retención muy diferentes.



Pero para separar mezclas de proteínas, generalmente se requiere de un gradiente de elución en el que la composición de la fase móvil cambie continuamente de forma que su fuerza vaya incrementando durante el tiempo de análisis.

El gradiente de elución se recomienda generalmente para:

- Muestras que tengan tiempos de retención semejantes.
- Muestras de peso molecular mayor a 1000.
- Muestras de origen biológico.

En cuanto a los tipos de gradiente, los hay lineales, convexos, cóncavos o escalonados.

Aún cuando se piense utilizar una elución isocrática, es recomendable hacer un primer análisis por gradiente para determinar el porcentaje del solvente más adecuado.

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	

Perfiles de una curva de gradiente [6]

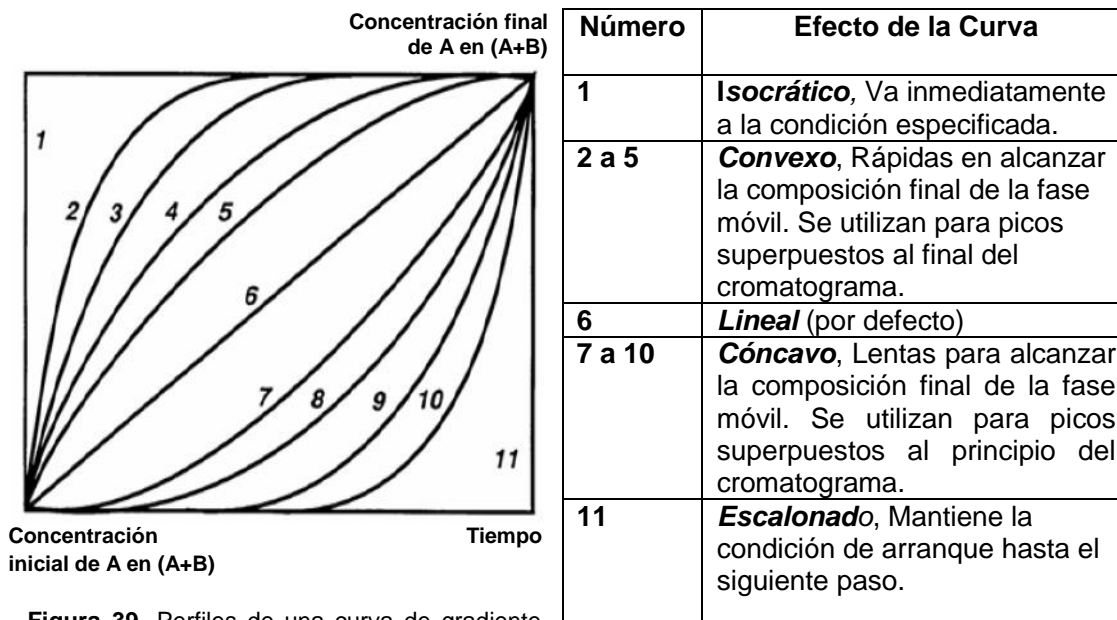
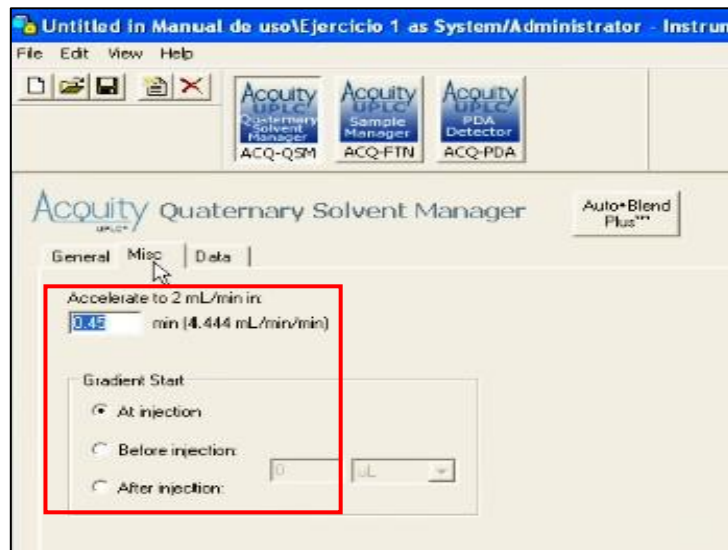




Figura 39. Perfiles de una curva de gradiente. Donde A, representa el disolvente más fuerte y B, el disolvente más débil en términos de fuerza de elución (ϵ°)

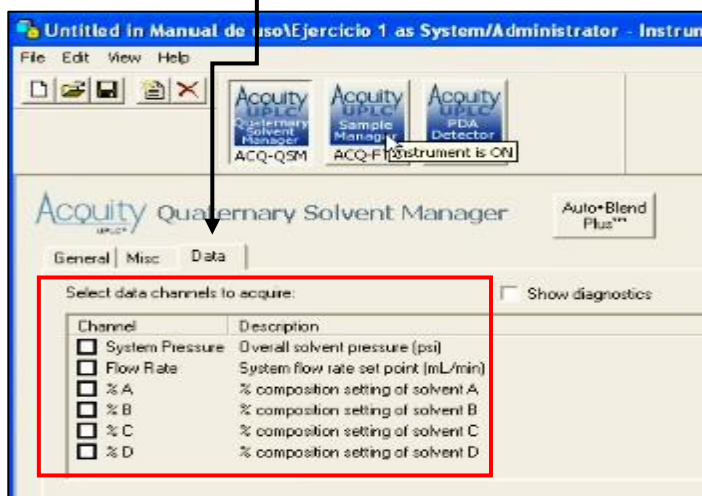
8.10. Diríjase a la opción « **Misc** » para establecer la velocidad del cambio de fase móvil. **At injection** (en la inyección), **Before injection** (antes de la inyección) o **After injection** (después de la inyección)



⚠ Aviso:
La aceleración depende de cuánto quiera separa o juntar los picos.


	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	

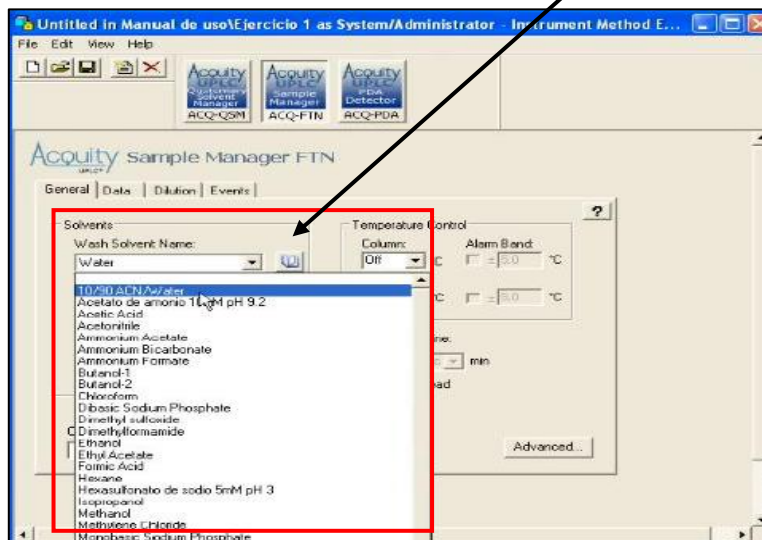
8.11. En la pestaña « **Data** » (Datos) verifique el monitoreo de la presión de la columna y de los solventes.





⚠ Aviso:


Si se sospecha de alguna falla en el equipo, active los canales del Auto-muestreador para observar cuál de los canales está fallando.

8.12. Dirigirse al icono **ACQUITY Sample Manager FTN**  y en la opción «**General**» seleccione las condiciones del inyector (solventes a utilizar para el lavado y purgado).

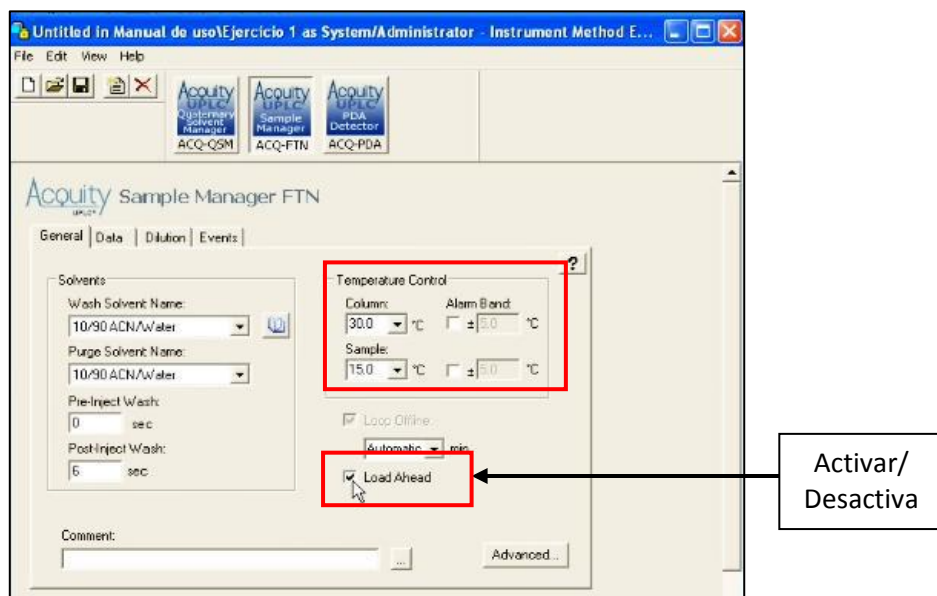


	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	

⚠ Indicaciones:



- El solvente de lavado y purga se selecciona dependiendo del tipo de muestra que se tenga.
- En caso de que no encuentre el nombre del solvente en la lista del programa, vaya al libro que se encuentra del lado derecho de la lista  y dar de alta el nuevo solvente.

8.13. Especifique el control de temperatura de la columna y del auto-muestreador. Active la opción « **Lead Ahead** » si desea utilizar un tiempo de ciclos más cortos.



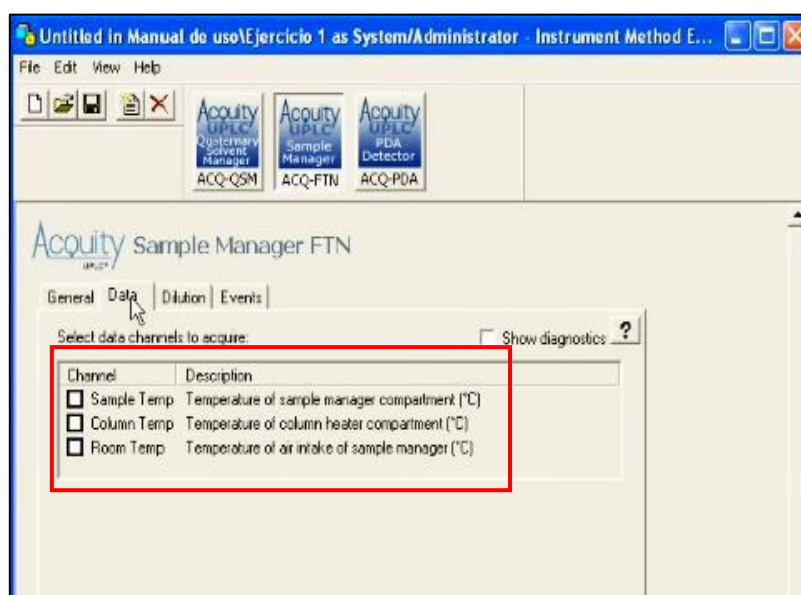
⚠ Indicaciones:

- En la opción **Alarm Band**, puede seleccionar una alarma que indique \pm que valor se le va a permitir variar a la temperatura antes de que entre el control de temperatura. En caso de no activar la alarma se mantendrá constante la temperatura indicada.
- Se recomienda realizar un lavado **Pre-Inject Wash** y **Post-inject Wash** cuando las muestras sean muy viscosas para asegurar que la aguja se limpie completamente.
- **Load Ahead** (precarga de la muestra de inyección a inyección), evita que la corrida de la muestra se prolongue por más tiempo del determinado.

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	



- **Loop Offline** (Desconexión del bucle), se utiliza generalmente cuando se tienen muestras viscosas o muy coloridas, ya que, se necesita una mayor retención de la muestra para asegurar una buena toma de está.

8.14. En la pestaña «**Data**» (Datos) se tienen los canales a monitorear.



⚠ Indicación: Si se sospecha de alguna falla del equipo, active los canales del Auto-muestreador para observar cual está fallando; observe sus respectivos gráficos:

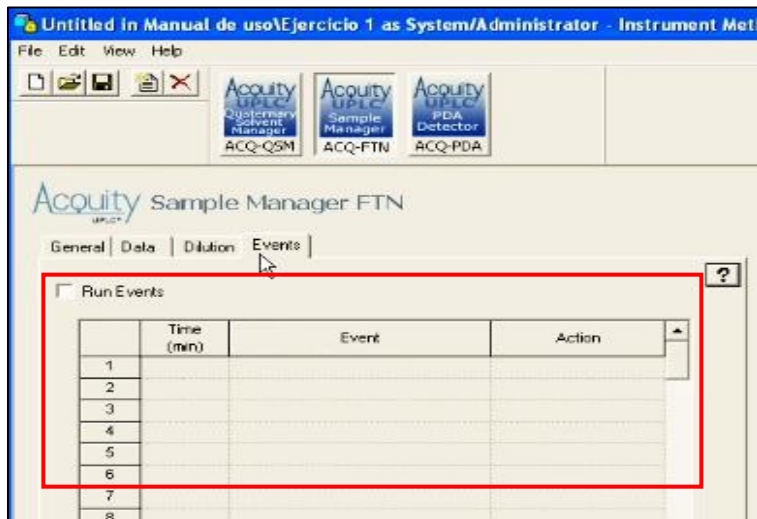
- Gráfico de temperatura del horno
- Gráfico de temperatura del sample manager
- Gráfico de temperatura del cuarto



	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	

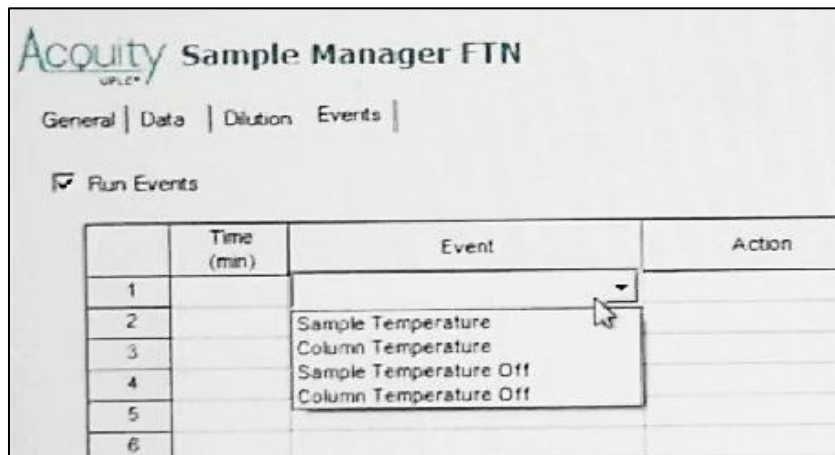
8.15. Si su método requiere diluciones, seleccione la pestaña «**Dilution**» (Dilución) y establezca sus condiciones de trabajo.




8.16. En la pestaña «**Events**» (Eventos) puede seleccionar el tiempo de monitoreo de la temperatura.

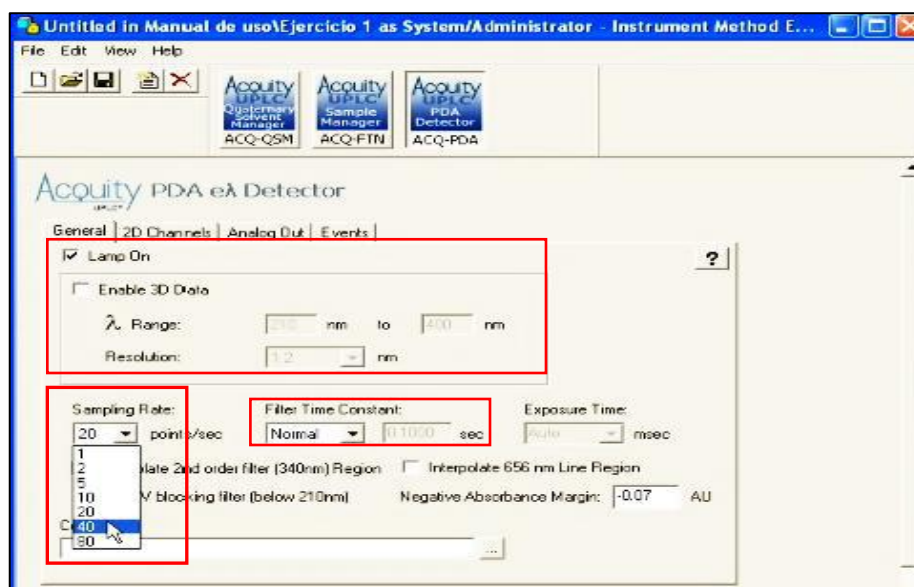




	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	



⚠ Indicación: Los eventos sirven para evaluar si el equipo está fallando o se encuentra en malas condiciones; monitorea el tiempo de la temperatura de la columna o la muestra.

8.17. Diríjase al icono **ACQUITY PDA eA Detector**  y elija las condiciones de la velocidad de muestreo en la pestaña « **Sampling Rate** » (Frecuencia de muestreo).

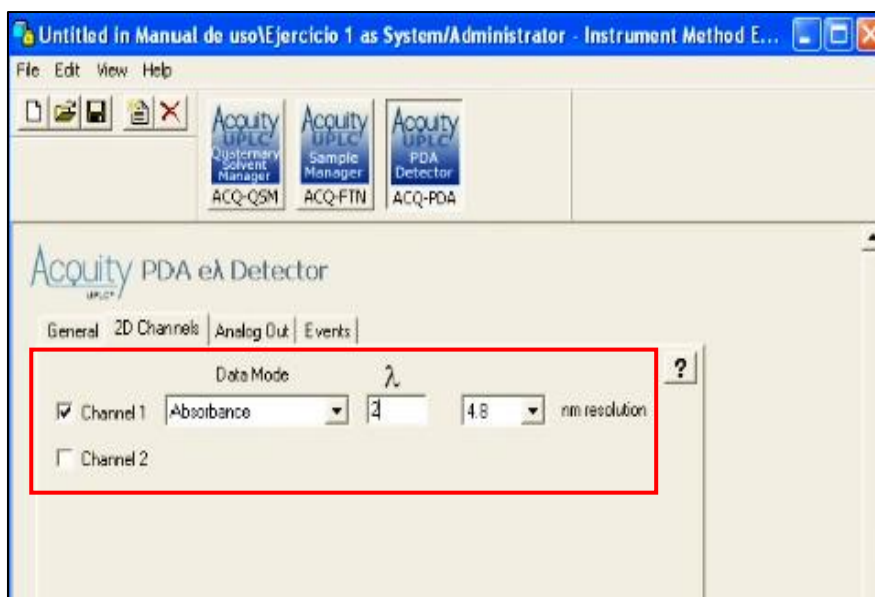


	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	



⚠ Indicaciones:

- Verifique que la lámpara se encuentre encendida. Apagar solo en métodos de lavado.
- Puede activar o desactivar el análisis espectral 3D en la opción **Enable 3D Data**, si lo activa especifique el rango de longitud de onda, así como, la Resolución.
- En la opción **Files Time Constant** (Archivos de tiempo Constante), establezca el tiempo con el que desea trabajar.
- Es muy importante especificar la velocidad con la que se está llevando a cabo la adquisición de datos de muestreo para obtener una mejor resolución en los picos.

8.18. Para monitorear una longitud de onda específica seleccione la pestaña **2D Channels**, active la(s) opción(es) «**Channel 1**, **Channel 2**» y establezca los rangos requeridos.



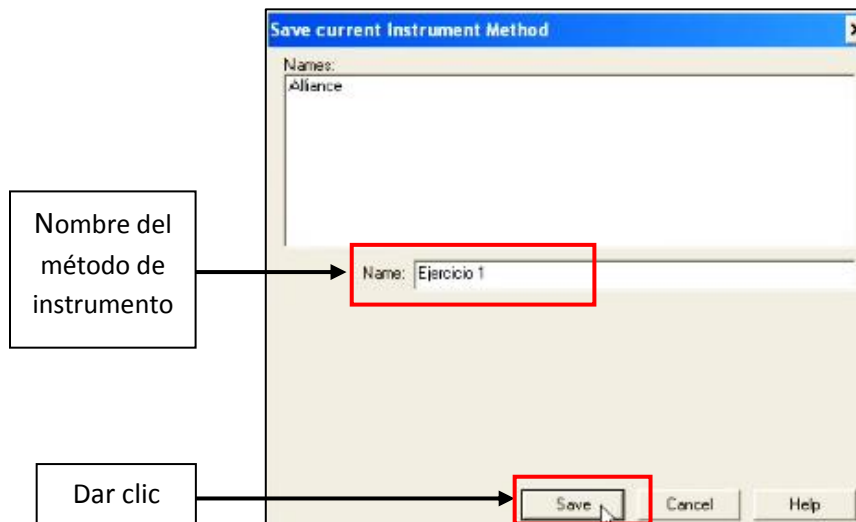
⚠ Aviso: Para la pureza espectral considere siempre la longitud de onda de corte de los solventes que utiliza (Rangos Cutoff)

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	



8.19. Guarde el archivo, diríjase a la opción « **File** » (Archivo) ubicada en la parte superior, lado izquierdo de la ventana y seleccione la opción « **Save As...** » (Guardar como..)



8.20. En la opción « **Name** » escriba el nombre del método y guárdelo dando clic en la opción «**Save**».



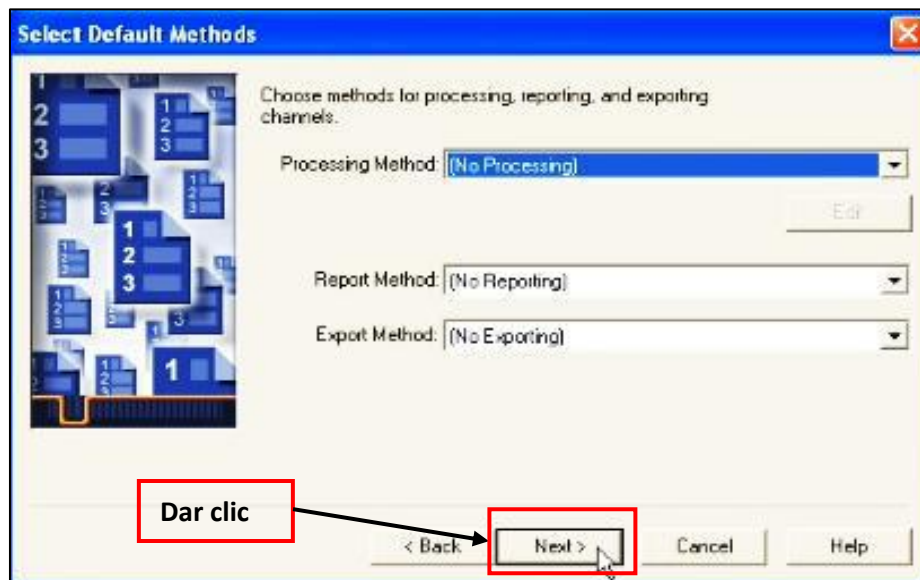
8.21. Cerrar la ventana.



	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	

8.22. En la ventana **Select Instrument Method** (Selección del método de instrumento), verificar que se encuentre seleccionado el método guardado y dar clic en « **Next** »

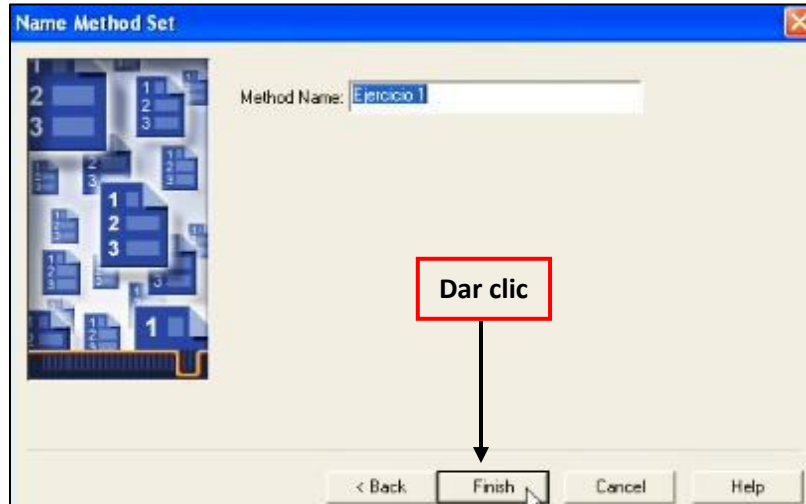


8.23. En la ventana **Select Default Methods** (Seleccionar métodos predeterminados), dar clic en « **Next** »

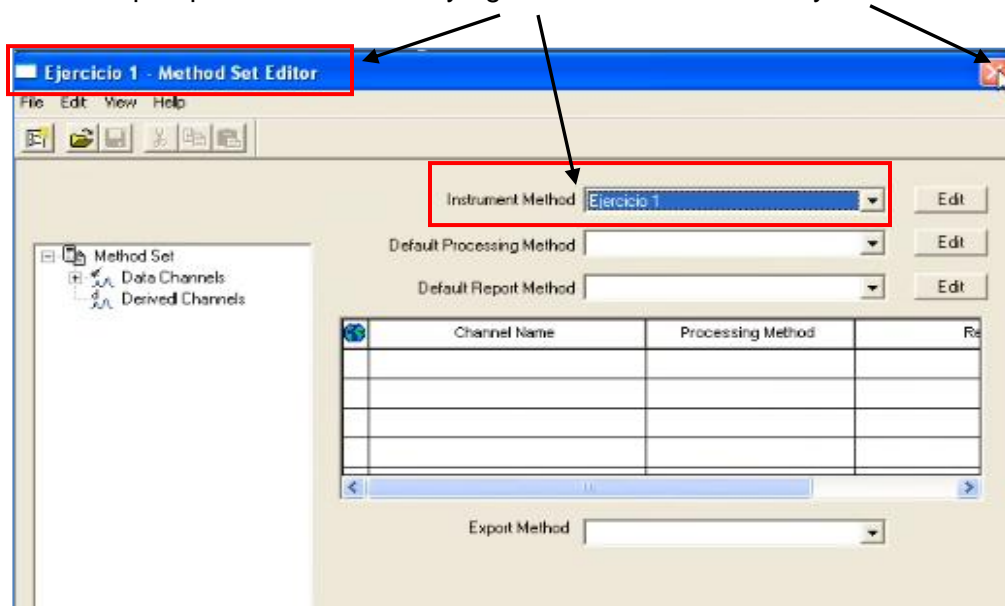




	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	

8.24. En la ventana **Name Method Set** (Nombre del Método Set) seleccione la opción «**Finish**» (finalizar).




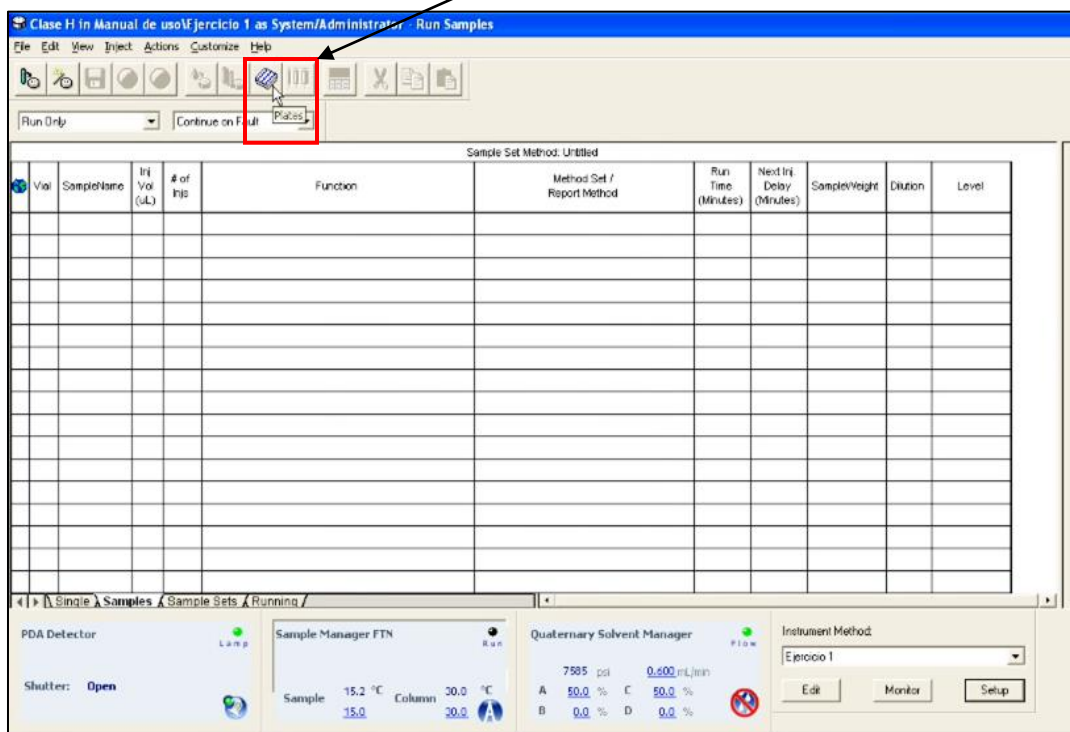
8.25. Verifiqué que el método se haya guardado correctamente y cierre la ventana.





	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	

9. CREACIÓN DE UN SAMPLE SET (Secuencia de inyecciones)

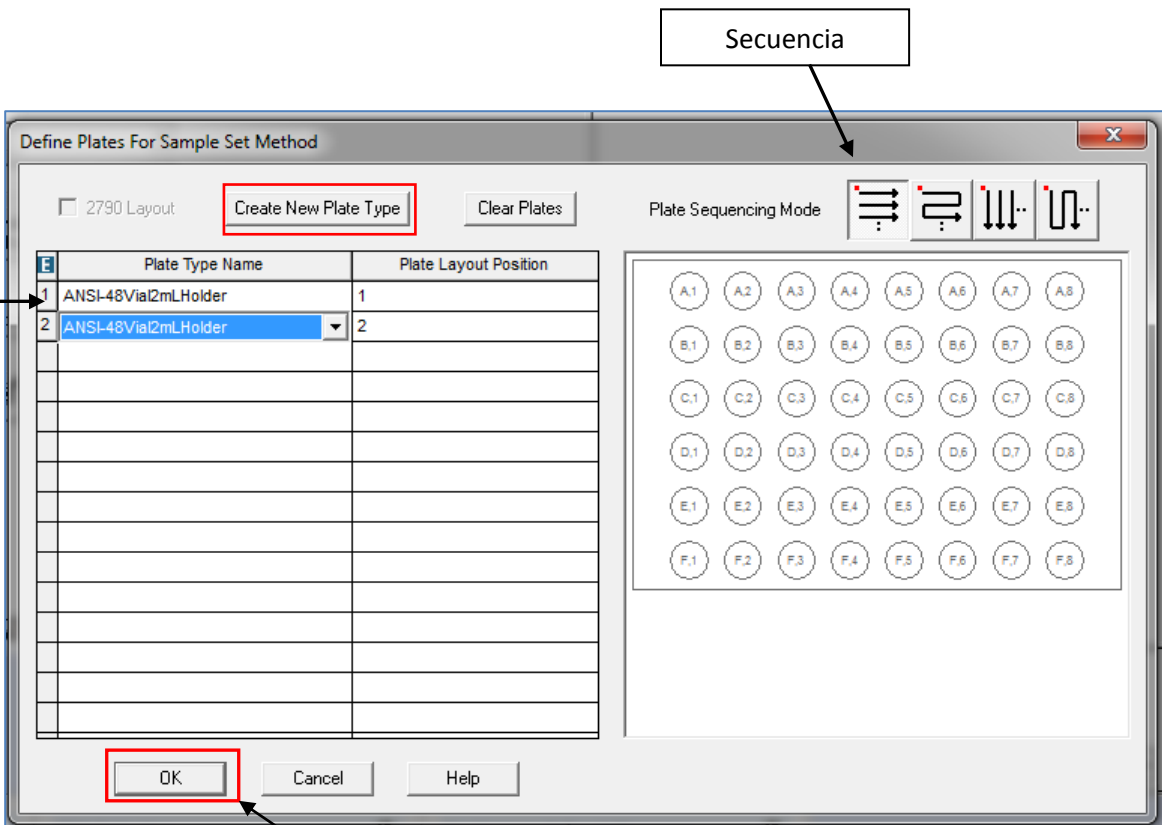
- 9.1. Abrir el programa «Empower» y seleccione el icono «Run Samples»
- 9.2. Seleccione la carpeta o subcarpeta del proyecto creado y de clic en «Ok»
- 9.3. Dirigirse a la opción configurar platos y dando clic en el icono «Plates» 



	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	

9.4. Dar clic en la pestaña **Create New Plate Type** (Crear nuevo tipo de plato), enseguida dar clic en la primer fila **Plate Type Name** (Nombre del tipo de plato) y especifique la configuración de los platos.

9.5. Seleccione la secuencia de muestreo.





Define Plates For Sample Set Method

2790 Layout **Create New Plate Type** Clear Plates Plate Sequencing Mode

E	Plate Type Name	Plate Layout Position
1	ANSI-48Vial2mLHolder	1
2	ANSI-48Vial2mLHolder	2

Grid of well positions: A.1 to F.8

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	

9.6. Para la secuencia de inyecciones dar clic en cada fila de la tabla (**Plate/Well**) y especifique en cada columna: **la posición del vial, el nombre de la muestra, volumen de inyección, número de inyecciones, Función, el Método Set de trabajo y el tiempo de la corrida.**

Dar clic

Especificaciones





	Plate/Well	Sample Name	Inj Vol (uL)	# of Inj	Function	Method Set / Report Method	Run Time (Minutes)	Next Inj. Delay (Minutes)	Sample Weight	Dilution	Level
1	1:A,1	Blanco	1.0	2	Inject Samples	Ejercicio 1	2.00	0.00	1.00000	1.00000	
2	1:A,2	Adecuabilidad	1.0	5	Inject Samples	Ejercicio 1	2.00	0.00	1.00000	1.00000	
3	1:A,3	Estandar	1.0	3	Inject Standards	Ejercicio 1	2.00	0.00	1.00000	1.00000	
											0%
											6%
											10%
											20%
											50%
											70%
											80%
											90%
											100%

⚠ Aviso:

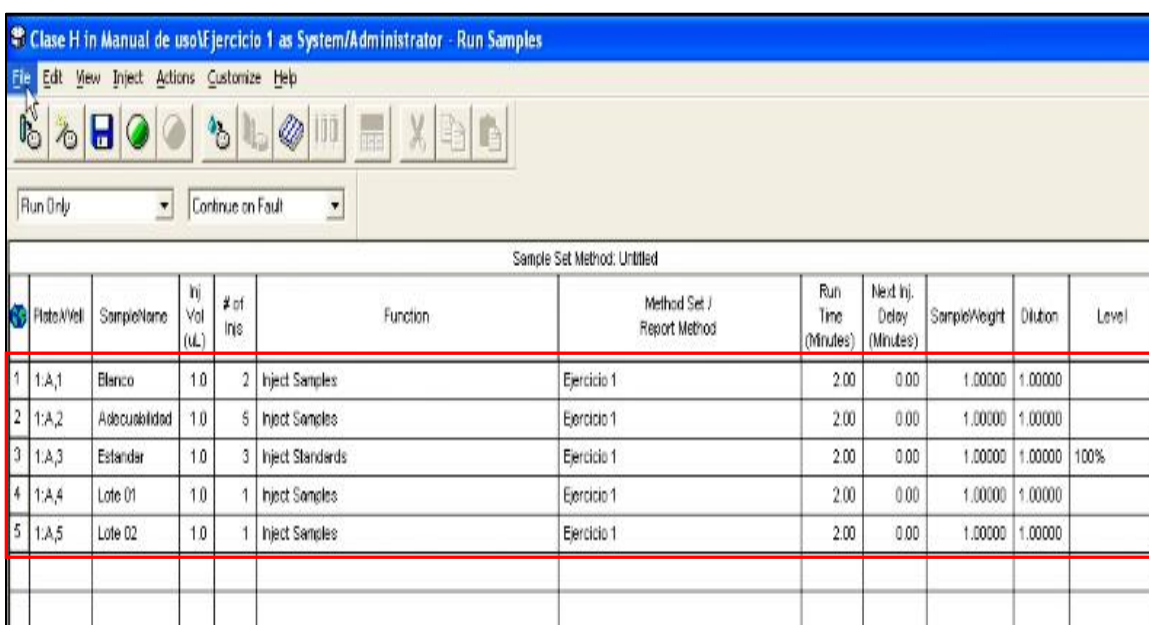
- Para el **Acondicionamiento de la columna**, revisar su respectivo Manual de uso.
- Antes de inyectar cualquier muestra o referencia, es necesario realizar la prueba de **Adecuabilidad del sistema** se recomienda *realizar* 6 inyecciones con la finalidad de verificar que el instrumento trabaje correctamente (UPLC y la columna).

⚠ Indicaciones:

- En la columna **Plate/Well** especificar el número de bandeja, fila y columna del vial.
- Si se realiza una dilución meter el factor de dilución en la opción **Dilution**.

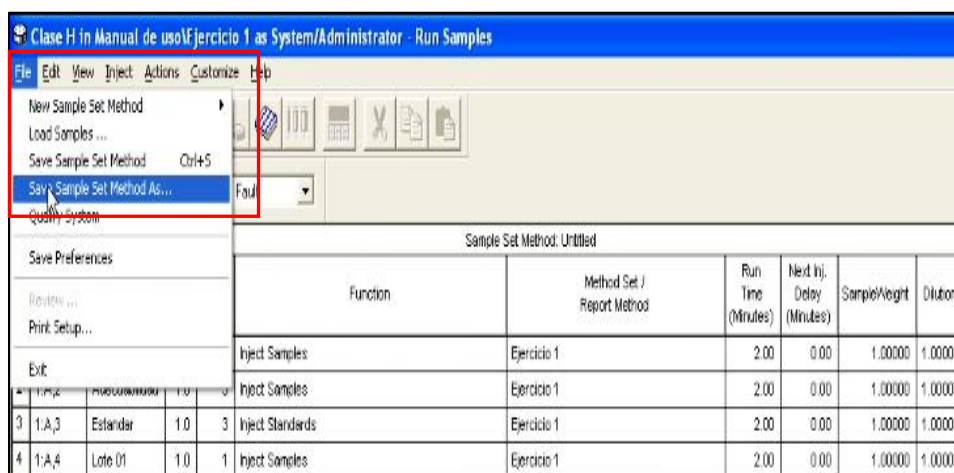
	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	

9.7. Aplicar el paso « 9.6 » para cada una de las muestras a inyectar.



Plate/Well	Sample Name	Inj Vol (uL)	# of Injs	Function	Method Set / Report Method	Run Time (Minutes)	Next Inj. Delay (Minutes)	Sample Weight	Dilution	Level
1: A,1	Blanco	1.0	2	Inject Samples	Ejercicio 1	2.00	0.00	1.00000	1.00000	
2: A,2	Autocualidad	1.0	5	Inject Samples	Ejercicio 1	2.00	0.00	1.00000	1.00000	
3: A,3	Estándar	1.0	3	Inject Standards	Ejercicio 1	2.00	0.00	1.00000	1.00000	100%
4: A,4	Lote 01	1.0	1	Inject Samples	Ejercicio 1	2.00	0.00	1.00000	1.00000	
5: A,5	Lote 02	1.0	1	Inject Samples	Ejercicio 1	2.00	0.00	1.00000	1.00000	

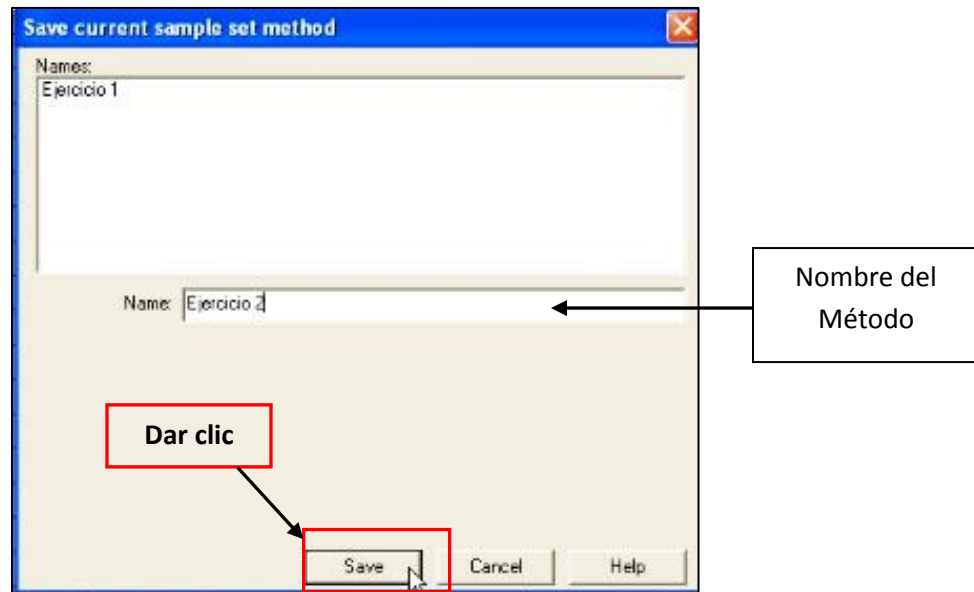
9.8. Dirigirse a **File** (Archivo) y guarde el Sample Set en la en la opción **Save Sample Set Method As...**



Function	Method Set / Report Method	Run Time (Minutes)	Next Inj. Delay (Minutes)	Sample Weight	Dilution
Inject Samples	Ejercicio 1	2.00	0.00	1.00000	1.00000
Inject Samples	Ejercicio 1	2.00	0.00	1.00000	1.00000
Inject Standards	Ejercicio 1	2.00	0.00	1.00000	1.00000
Inject Samples	Ejercicio 1	2.00	0.00	1.00000	1.00000

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	

9.9. Establecer un nombre de archivo y dar clic en **Save** (Guardar).





10. LAVADO DE COLUMNA Y APAGADO.

10.1. En la ventana de **Run Samples**, seleccionar la pestaña «**Edit** » (Editar) y dar clic en la opción «**New Method Set....**» (Nuevo Método Set)

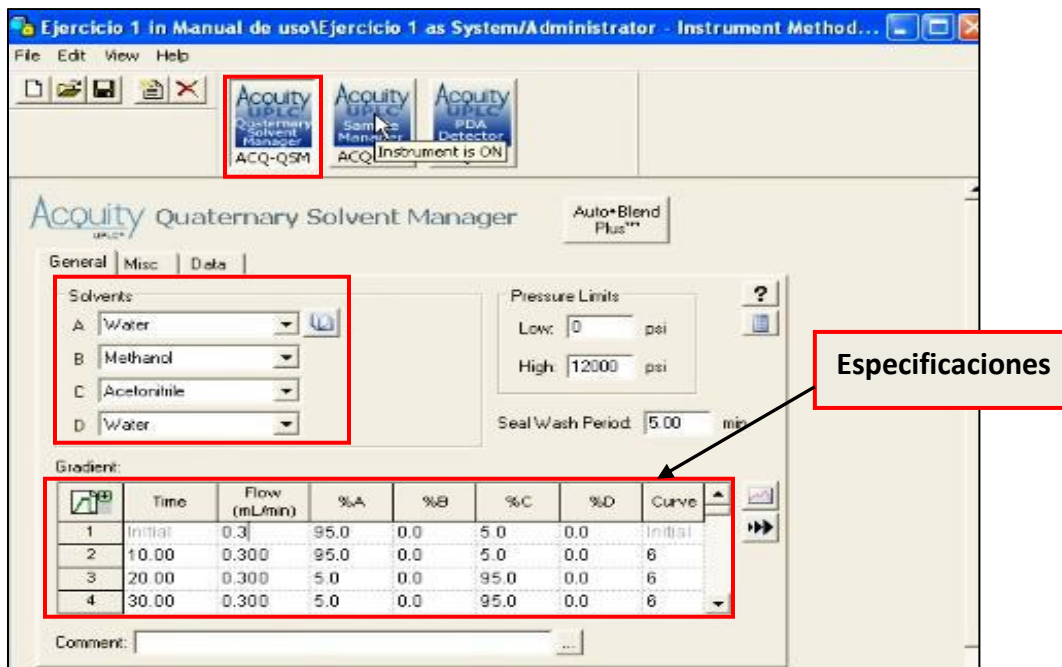


10.2. Seleccione la opción «**Yes**» para utilizar el *Wizard* en la creación del método set.

10.3. En la siguiente ventana, seleccionar el icono «**Create New**» (crear nuevo). Dar clic en **Next**.

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	

10.4. En la ventana del método de instrumento, seleccionar los solventes a utilizar, así como, programar las especificaciones de lavado y apagado (tiempo, flujo, % de solvente).





Especificaciones

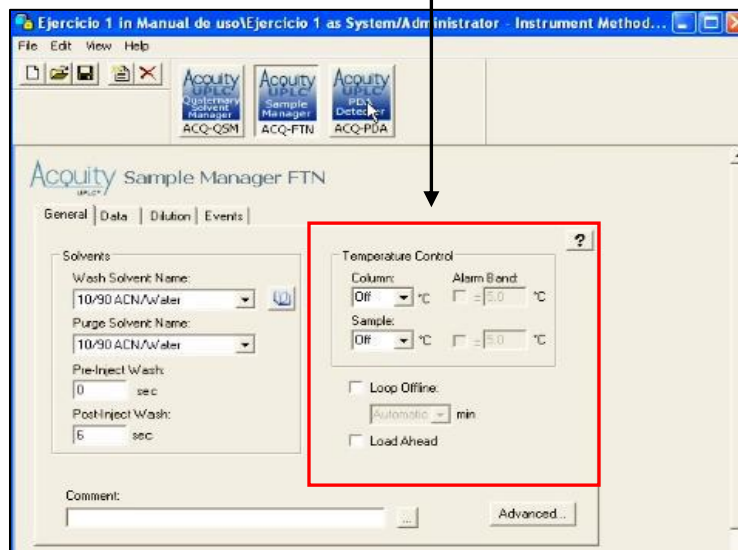
Time	Flow (mL/min)	%A	%B	%C	%D	Curve	
1	Initial	0.3	95.0	0.0	5.0	0.0	Initial
2	10.00	0.300	95.0	0.0	5.0	0.0	6
3	20.00	0.300	5.0	0.0	95.0	0.0	6
4	30.00	0.300	5.0	0.0	95.0	0.0	6

⚠ Indicación:

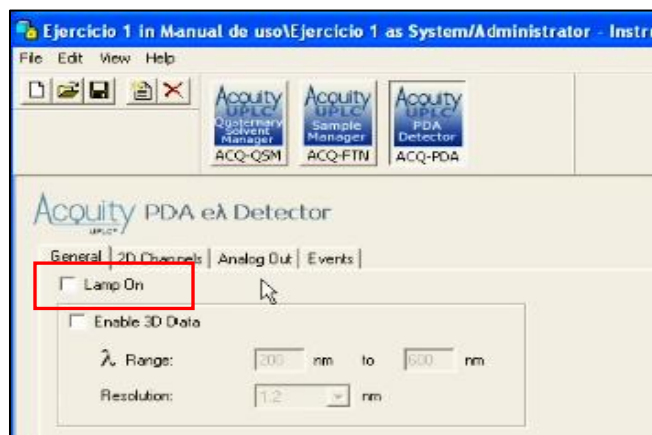
- Para saber que solventes utilizar en el lavado de la columna, revisar su respectivo manual.
- Para el apagado del equipo, es recomendable disminuir el flujo poco a poco hasta un flujo de cero.



	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	

- 10.5. Para apagar el lavado, dirigirse a la opción **ACQUITY Sample Manager** y desactive el control de la temperatura del horno y la columna «Of», así como las opciones « **Loop Offline** » y « **Load Ahead** »



- 10.6. Dirigirse al icono **ACQUITY PDA Detector** y desactive el encendido de la lámpara.

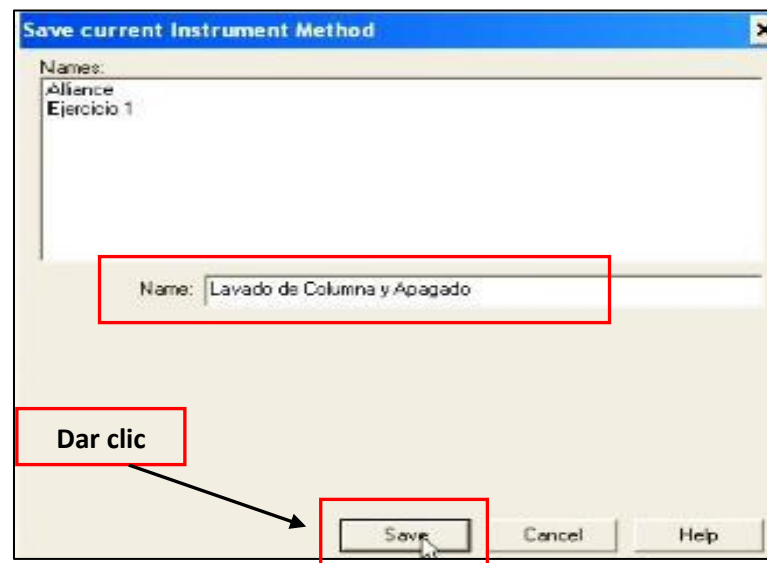


	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	



10.7. Para guardar los cambios dirigirse a «File» y en seguida a la opción «Save As»



10.8. Escriba un nombre para guardar el archivo (**Lavado de Columna y apagado**).
Dar clic en «Save»



10.9. Cerrar la ventana.

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	

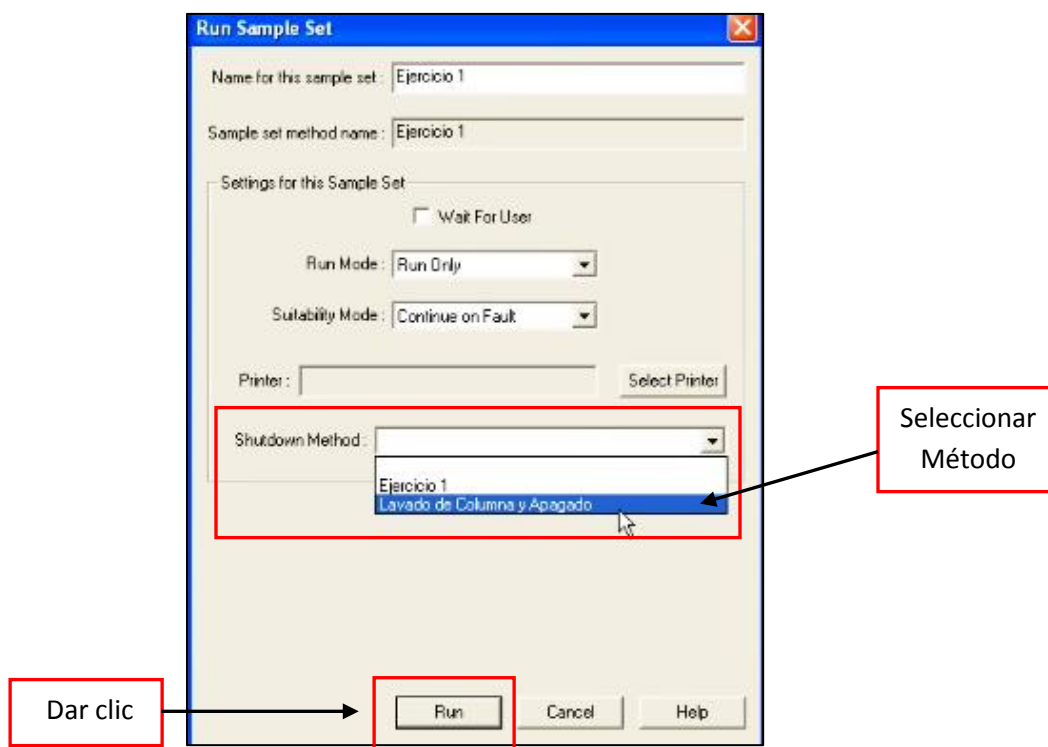
11. ARRANQUE DE LA SECUENCIA



11.1. En la ventana método de instrumento, seleccione el icono «Run»



11.2. En la siguiente ventana **Run Sample Set**, seleccione el método que desee arrancar.

11.3. Dar clic en «Run»



	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	

11.4. Una vez que comience la corrida esta se indicara por un cambio de color rojo. Para ver el arranque de la secuencia dar doble clic sobre ella.

Clase H in Manual de uso\Ejercicio 1 as System/Administrator - Run Samples

File Edit View Inject Actions Customize Help



Run Only Continue on Fault

Active sample set: Ejercicio 1

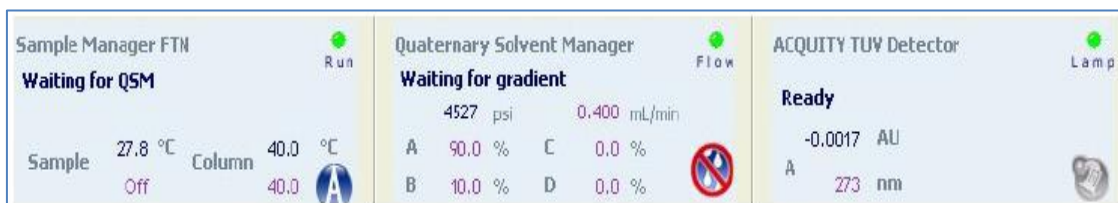
Plate/Vol	SampleName	Inj Vol (uL)	# of Inj	Function	Method Set / Report Method	Run Time (Minutes)	Next Inj. Delay (Minutes)	SampleWeight	Dilution	Level
1	1:A,1	2.0	2	Inject Samples	Ejercicio 1	1.00	0.00	1.00000	1.00000	
2	1:A,2	2.0	5	Inject Samples	Ejercicio 1	1.00	0.00	1.00000	1.00000	
3	1:A,3	2.0	3	Inject Standards	Ejercicio 1	1.00	0.00	1.00000	1.00000	100%



 Si se desea parar la corrida dar clic en el icono Run 

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	

INDICACIONES DE LOS PANELES DE CONTROL





➤ Panel de control del Sistema administrador de muestras.




Regla: El panel de control del sistema administrador de muestras indica las temperaturas programadas y reales en el compartimento de muestras y en el horno de columnas. Estos valores se pueden modificar cuando el sistema está inactivo, haciendo clic en el valor marcado. En cambio, los valores programados del sistema administrador de muestras no se pueden modificar durante el análisis de muestras.

⚠ Indicaciones:

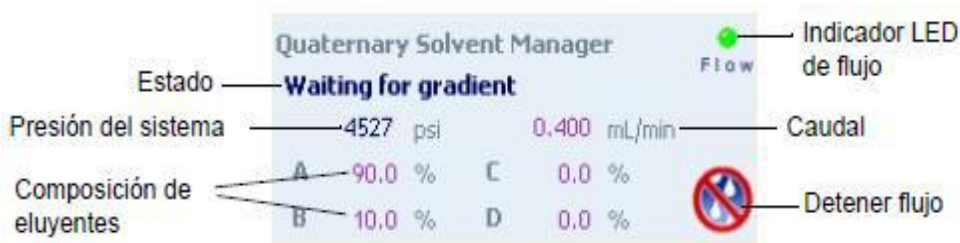
- Para mantener el compartimento de muestras a una temperatura constante, abrir la puerta sólo cuando sea necesario.
- Los ventiladores del Sistema administrador de muestras dejan de proyectar aire cuando se abre la puerta del compartimento de muestras.



	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	

Elementos del panel de control del Sistema administrador de muestras:

Elemento del panel de control	Descripción
Indicador LED de análisis	Muestra el indicador LED de análisis real en el panel frontal, a menos que se produzca una pérdida de comunicaciones.
Estado	Muestra el estado de funcionamiento actual.
Temperatura actual del compartimento de muestras	Muestra la temperatura actual del compartimento de muestras con una resolución de 0.1°C, aunque esté deshabilitado el control de temperatura activo.
Valor programado del compartimento de muestras	Muestra el valor programado actual del compartimento de muestras con una resolución de 0.1°C. Cuando el control de temperatura activo está deshabilitado, este campo muestra "Off" (Desactivado).
Temperatura actual del horno de columnas	Muestra la temperatura actual del horno de columnas con una resolución de 0.1°C, aunque esté deshabilitado el control de temperatura activo.
Valor programado del horno de columnas	Muestra el valor programado actual del horno de columnas con una resolución de 0.1°C. Cuando el control de temperatura activo está deshabilitado, este campo muestra "Off" (Desactivado).
 (Pantalla de la consola)	Muestra la Consola ACQUITY UPLC.


➤ **Panel de control del Sistema Administrador cuaternario de solventes**



	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	



Regla: El panel de control del sistema administrador cuaternario de solventes muestra el estado del flujo, la presión del sistema, el caudal total y la composición del solvente. Estos parámetros se pueden modificar cuando el sistema está inactivo, haciendo clic en el valor marcado. Los parámetros del sistema administrador cuaternario de solventes no se pueden modificar durante el análisis de muestras.

Elementos del panel de control del sistema administrador cuaternario de solventes:

Elemento del panel de control	Descripción
Indicador LED de flujo	Muestra el LED de flujo real situado en el panel frontal del sistema administrador cuaternario de solventes, a menos que se haya perdido la comunicación con el sistema administrador cuaternario de solventes.
Estado	Muestra el estado de funcionamiento actual.
Presión del sistema	Muestra la presión del sistema en kPa, bar o psi. Las unidades de presión se pueden personalizar mediante la Consola ACQUITY UPLC.
Caudal	Muestra el flujo del solvente que pasa por todas las líneas del sistema administrador cuaternario de solventes, de 0.000 a 2.000 mL/min en condiciones de funcionamiento normales y de 0.000 a 4.000 mL/min cuando se realiza el purgado.
Composición del solvente	Muestra el porcentaje de solvente que se va a extraer de los conductos de solventes (A a D). Los valores de la composición oscilan entre 0.0% y 100.0%.
 (Detener flujo)	Detiene inmediatamente todo el flujo procedente del sistema administrador cuaternario de solventes.

Se puede acceder a estas funciones adicionales haciendo clic con el botón derecho del ratón en cualquier lugar del panel de control del sistema administrador cuaternario de solventes:

Funciones adicionales del panel de control	Descripción
Start up system (Poner en marcha el sistema)	Pone el sistema en funcionamiento después de un período de inactividad prolongado o cuando se cambia a un solvente distinto.



	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	

Prime solvents (Preparación de solventes)	Muestra el cuadro de diálogo Prime Solvents (Preparación de solventes).
Prime seal wash (Preparación del lavado de sello)	Inicia la preparación del lavado de sellos.
Lavar émbolos	Inicia la secuencia de lavado del émbolo, que llena y luego vacía lentamente las cámaras primaria y del acumulador (con la composición de solvente utilizada) mientras se realiza el lavado de sellos de alta velocidad/volumen elevado. De esta manera se evita la formación de precipitados en los émbolos de la bomba, los cuales pueden dañar los pistones de alta presión.
Launch ACQUITY UPLC Console (Ejecutar la Consola ACQUITY UPLC)	Ejecuta la Consola ACQUITY UPLC
Reset QSM (Reiniciar el QSM)	Reinicia el sistema administrador cuaternario de solventes tras un error.
Ayuda	Muestra la ayuda en línea de la Consola ACQUITY UPLC.



➤ **Panel de control del Detector**



Regla: El panel de control del Detector TUV muestra las unidades de absorbancia y los valores de longitud de onda, parámetros que se pueden modificar cuando el sistema se encuentra en inactivo haciendo clic en el valor marcado. No obstante, los parámetros del detector no se pueden modificar durante el análisis de muestras.



	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	

Elementos del panel de control del Detector TUV:

Elemento del panel de Control	Descripción
Indicador LED de la lámpara (encendida/apagada)	Muestra el LED de encendido/apagado de la lámpara situado en el panel frontal del detector, a menos que se haya perdido la comunicación con el detector.
Estado	Muestra el estado de funcionamiento actual.
UA	Muestra las unidades de absorbancia.
nm	Muestra el valor de la longitud de onda A, en nm. Si el detector se encuentra en el modo de longitud de onda doble, también aparece el valor de la longitud de onda B.
 (Encender lámpara)	Enciende la lámpara del detector.
 (Apagar lámpara)	Apaga la lámpara del detector.

Se puede acceder a funciones adicionales descritas en la siguiente tabla haciendo clic con el botón derecho del ratón en cualquier lugar del panel de control del detector:

Funciones adicionales del panel de control	Descripción
Auto Zero (Puesta a cero automática)	Restablece el valor de absorbancia en 0.
Reset TUV (Reiniciar el Detector de absorbancia programable [UV variable])	Reinicia el detector, si está presente, tras un error.

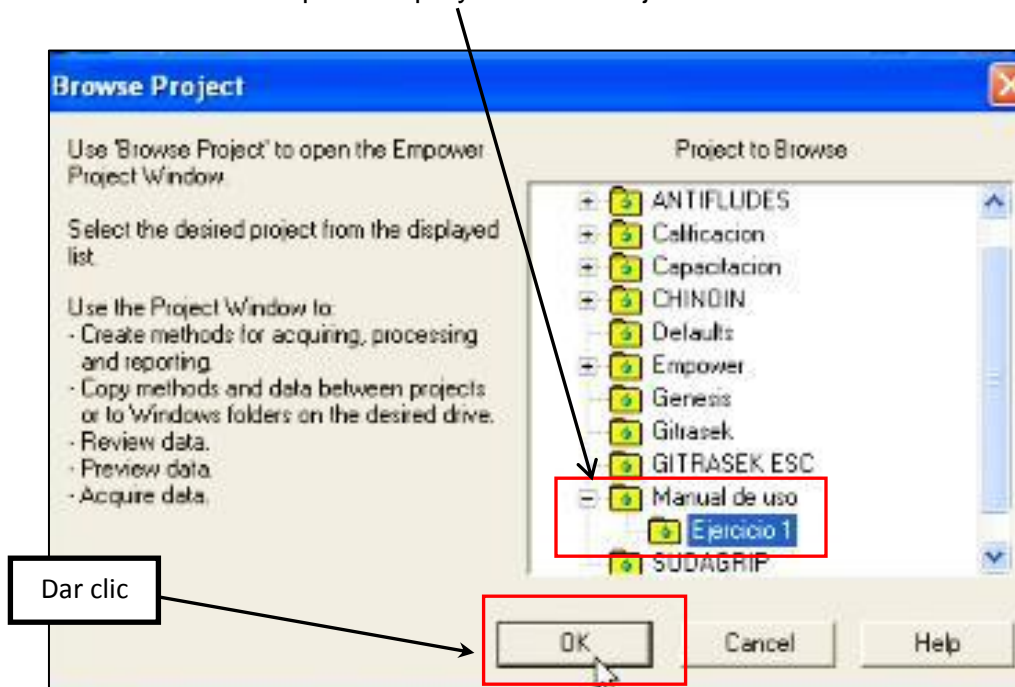
	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	



12. INTEGRACIÓN E IDENTIFICACIÓN

12.1. Abrir el programa de **Empower** y seleccione la opción «**Browse Project**» (Examinar Proyecto).

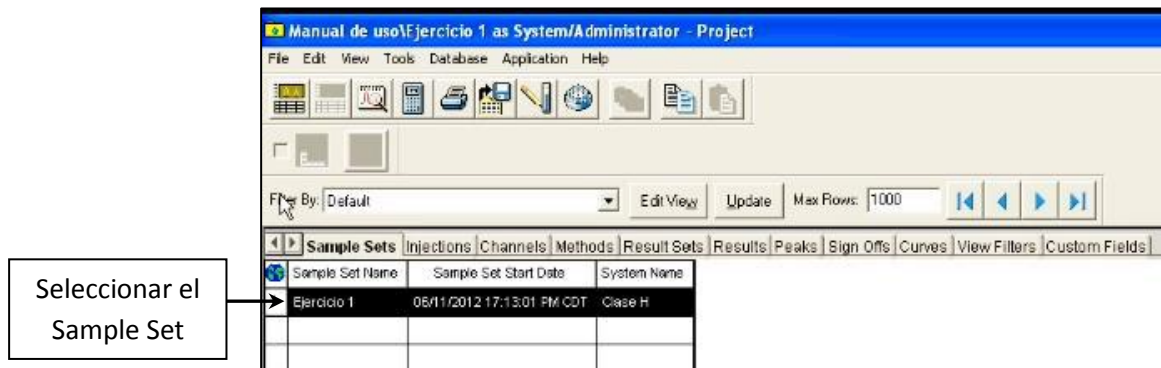


12.2. Seleccione la carpeta del proyecto de trabajo. Dar clic en «**Ok**»

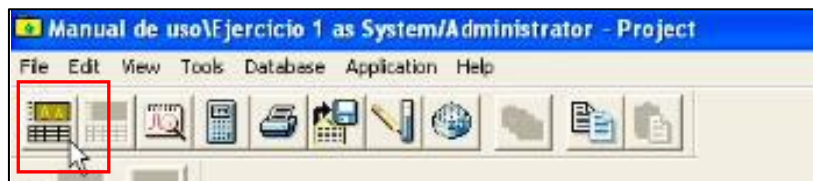



	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	

12.3. En la pestaña «**Sample Sets**» (conjunto de muestras), seleccione el Sample Set creado.





12.4. Dirigirse al icono **Review**  para observar los picos.

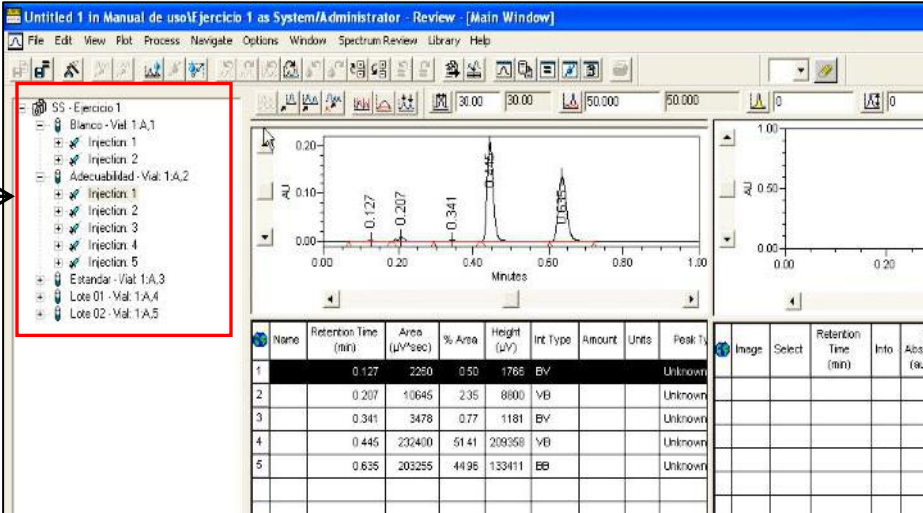


12.5. Seleccione la opción «**Next Injection**» (Siguiete inyección)  dando varios clics para observar el número de inyecciones efectuadas.



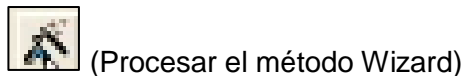
	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	

Numero de inyecciones →

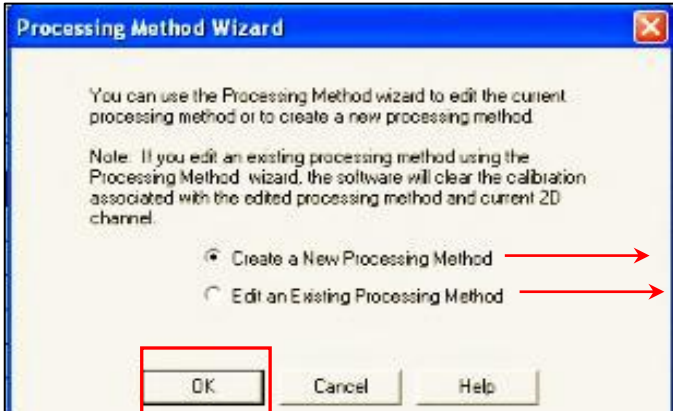


Name	Retention Time (min)	Area (µV*sec)	% Area	Height (µV)	Int. Type	Amount	Units	Peak Ty.
1	0.127	2250	0.50	1768	BV			Unknown
2	0.207	10645	2.35	8800	VB			Unknown
3	0.341	3478	0.77	1181	BV			Unknown
4	0.445	232400	51.41	209358	VB			Unknown
5	0.635	203255	44.95	133411	BB			Unknown

12.6. Para procesar los datos seleccione el icono «**Processing Method Wizard**»



12.7. Seleccionar el método de procesamiento y dar clic en la opción «**Ok**»





You can use the Processing Method wizard to edit the current processing method or to create a new processing method.

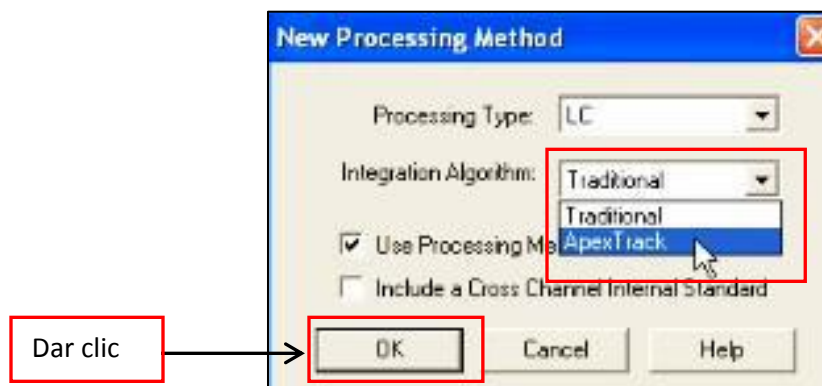
Note: If you edit an existing processing method using the Processing Method wizard, the software will clear the calibration associated with the edited processing method and current 2D channel.

Create a New Processing Method → Crear un nuevo método de procesamiento
 Edit an Existing Processing Method → Editar un método de procesamiento ya existente

OK Cancel Help

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	

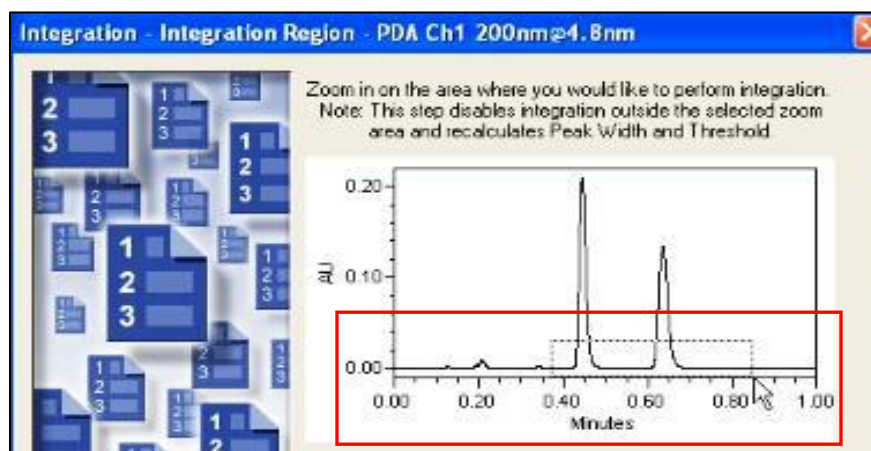
12.8. Seleccione el tipo de proceso así como el algoritmo que requiera. Dar clic en «Ok»





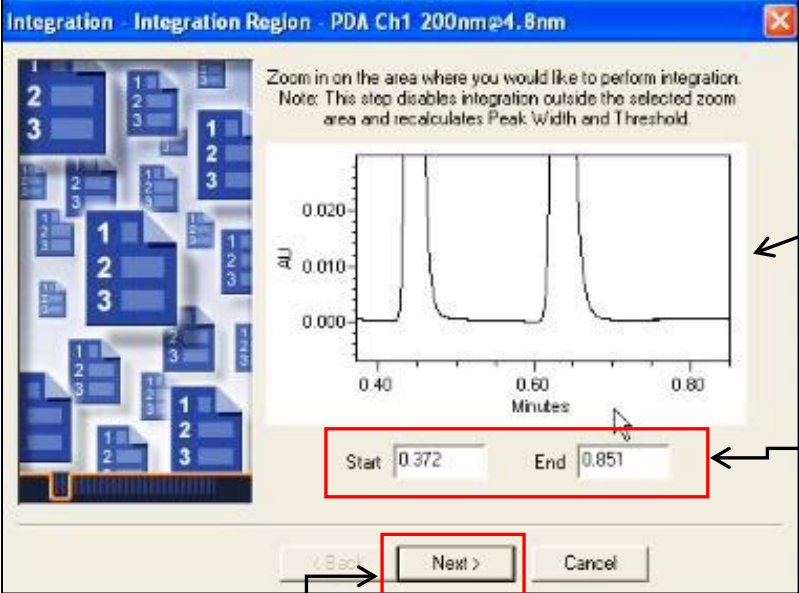
⚠ Indicaciones:

- Recuerde seleccionar el tipo de integración de datos que vaya a utilizar; **tradicional** (algoritmo general) o **Apex Track** (algoritmo mucho más sensible, integra datos más finos (para picos pequeños), va dirigido a hacia el nivel de ruido).
- En la opción **Processing Type** (tipo de procesamiento), seleccionar **LC** para un proceso de cromatografía de líquidos y **PDA** para observar la pureza del pico.

12.9. Realice un Zoom en el área del intervalo donde se encuentre el pico ó los picos a integrar.



	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	

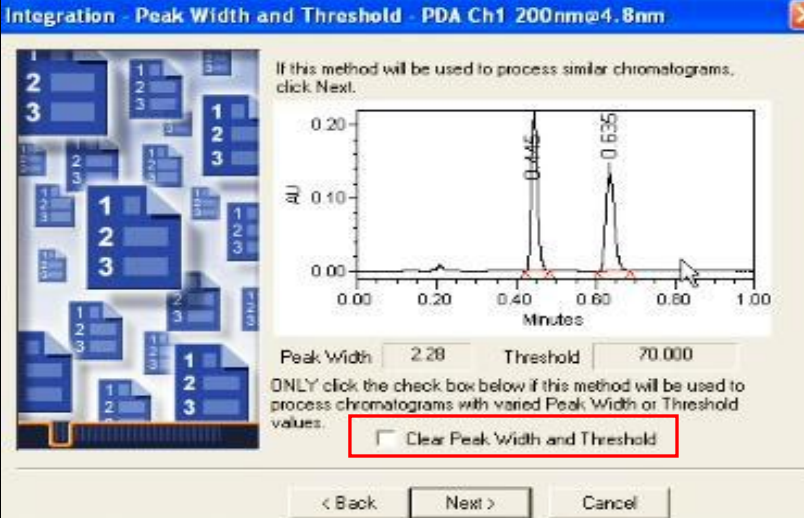


Vista Zoom



Intervalo de Área a integrar

12.10. Dar clic en «Next»

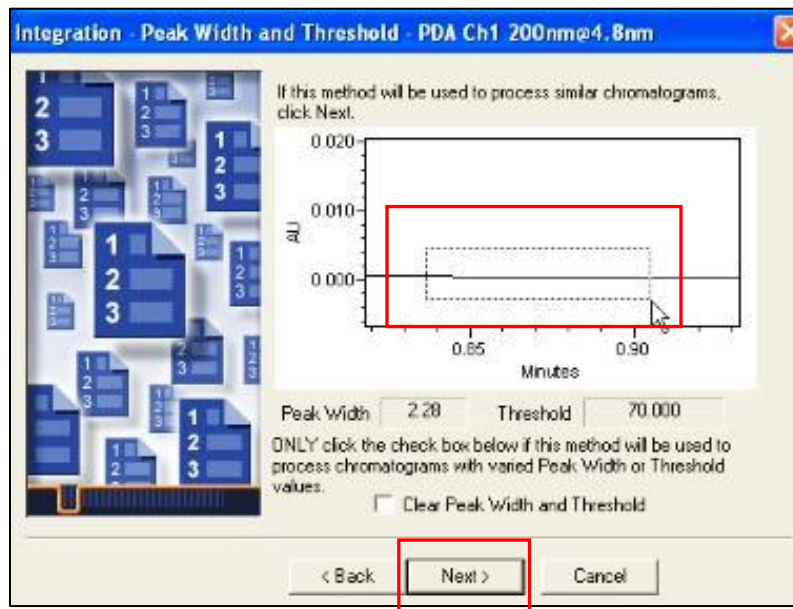
12.11. Observar la integración de los picos seleccionados.



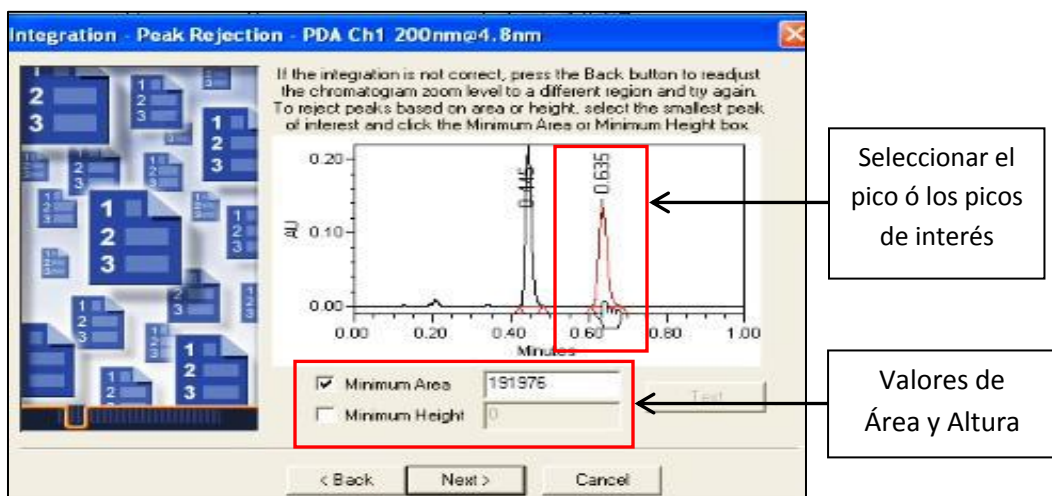
⚠ Indicación: En caso de que la integración no sea satisfactoria, activar la opción **Clear Peak and Threshold** (Aclarar el Pico y el comienzo).



	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	

12.12. Vuelva a seleccionar el intervalo de área y seleccione un intervalo de línea base para blanquearla. Dar clic en «Next»



12.13. Seleccione el Área mínima o altura mínima de los picos cromatográficos de interés.

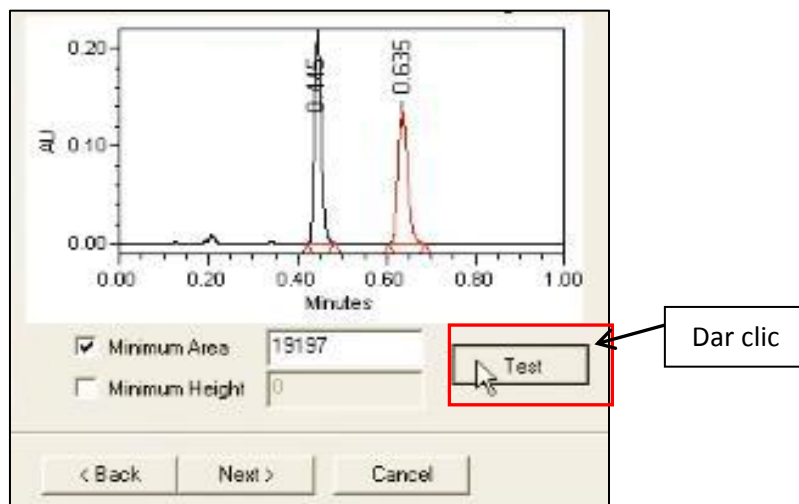


	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	



 **Indicaciones:**

- Es recomendable quitar los dos decimales finales en los valores de altura y área mínima para observar mejor la integración del pico.
- El valor que especifique en la altura o en el área mínima será para quitar la integración de los picos que se encuentren por debajo del valor de interés.
- Otra opción para ver la altura o área mínima es dar un zoom en el pico de interés, seleccionarlo para que automáticamente el sistema de los valores de la integración.

12.14. Para ver los diferentes valores de integración active la opción «**Test**».

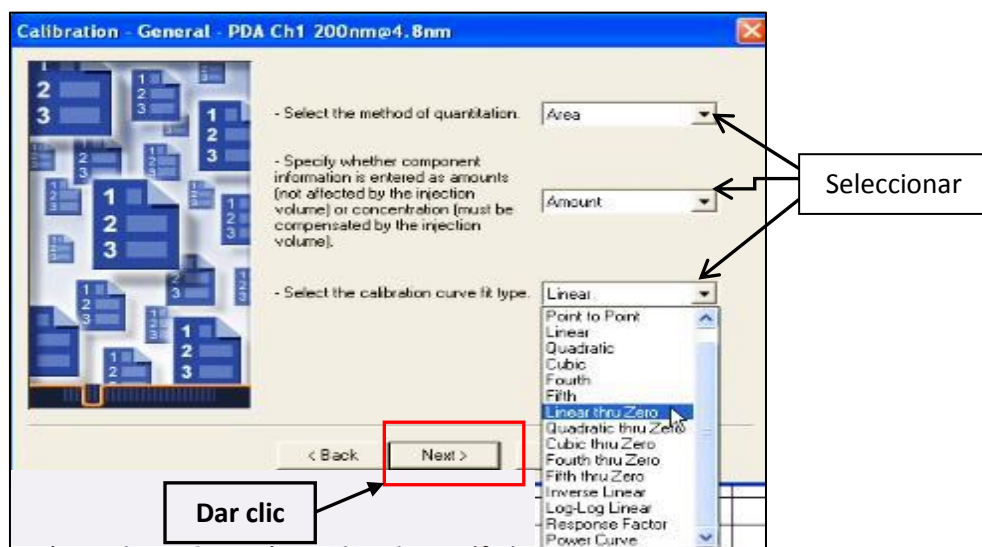


12.15. Una vez designado el pico de integración, dar clic en «**Next**»

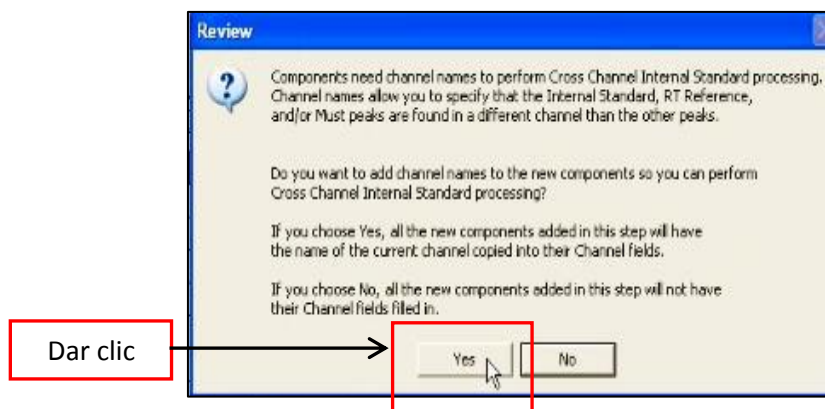
	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	



12.16. En la ventana **Calibration** (Calibración), seleccione el método de cuantificación a emplear, el tipo de concentración a manejar, así como, la curva de calibración a trabajar.

12.17. Dar clic en «**Next**»

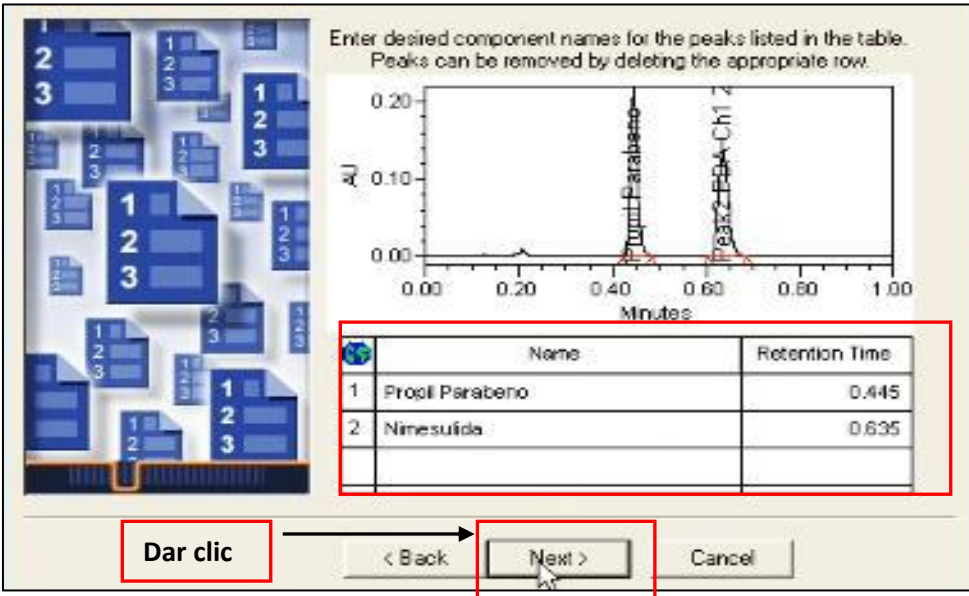


12.18. Dar clic en la opción «**Yes**»



	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	

12.19. Especificar el nombre de cada uno de los picos y dar clic en «Next»

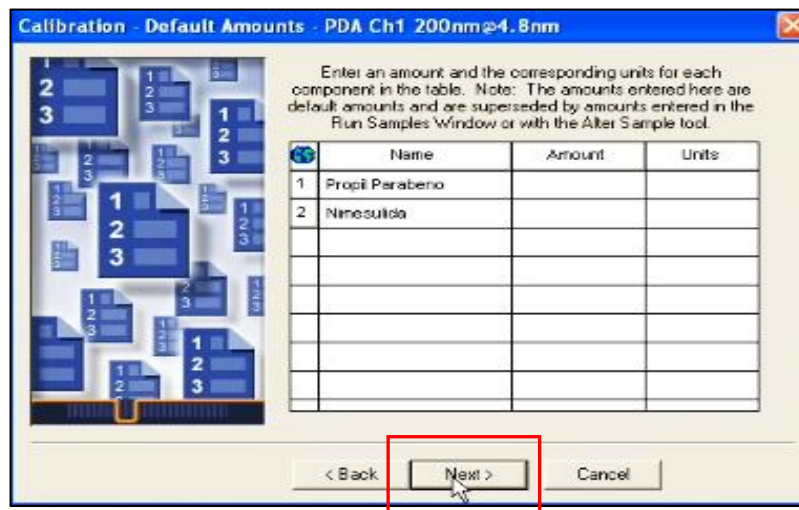


Enter desired component names for the peaks listed in the table. Peaks can be removed by deleting the appropriate row.

Name	Retention Time
1 Propil Parabeno	0.445
2 Nimesulida	0.635

Dar clic → **Next >**



12.20. En la siguiente tabla escriba la concentración de cada una de las sustancias y sus unidades de concentración. Dar clic en «Next»



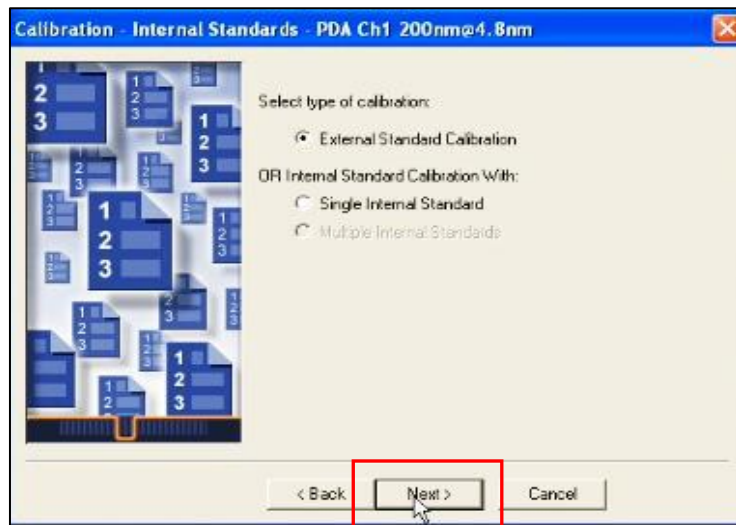
Enter an amount and the corresponding units for each component in the table. Note: The amounts entered here are default amounts and are superseded by amounts entered in the Run Samples Window or with the Alter Sample tool.

Name	Amount	Units
1 Propil Parabeno		
2 Nimesulida		

Next >



	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	

12.21. Seleccione el tipo de Calibración del Estándar (Externo o Interno). Dar clic en «Next» (Siguiente)

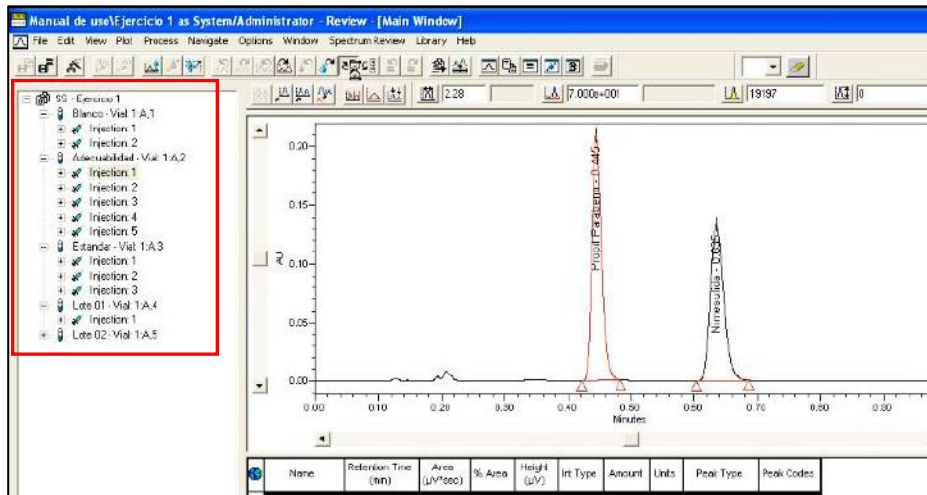


12.22. Escriba en la opción «Method Name» el nombre del método y dar clic en «Finish» (Finalizar)



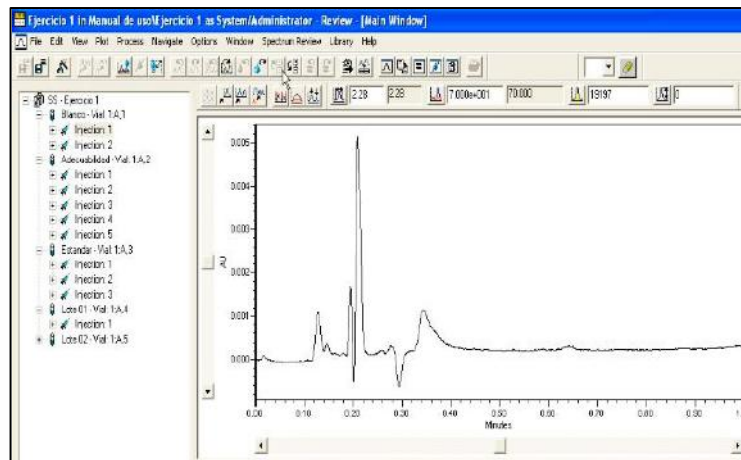
	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	



12.23. Para observar el comportamiento de cada inyección, dirigirse del lado derecho de la ventana y elija cualquiera de las inyecciones.

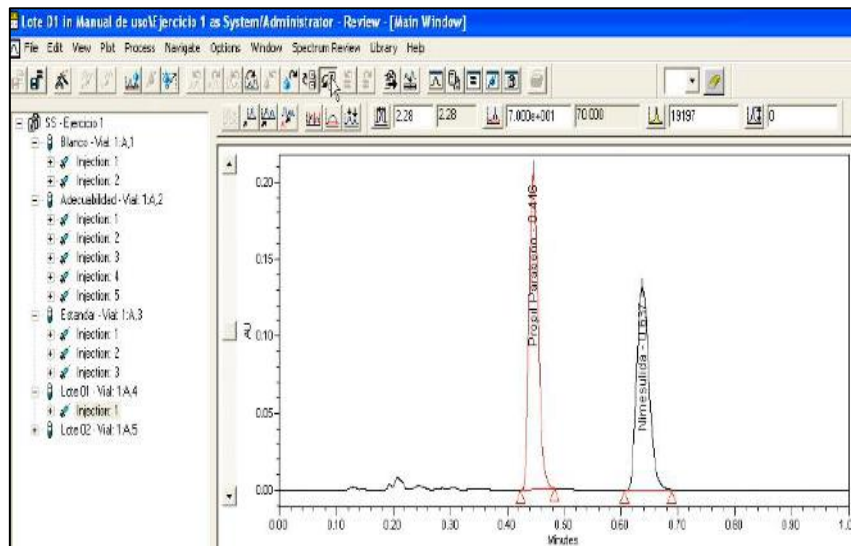


⚠ Indicación: Para ampliar el pico seleccione la parte inferior del mismo y arrastre el mouse asía abajo y a su derecha.





12.24. Para ir observando por canal dar clic al icono «**Previous injection**» (Inyección anterior) o bien «**Next injection**» (Próxima inyección).





	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	



Next Injection

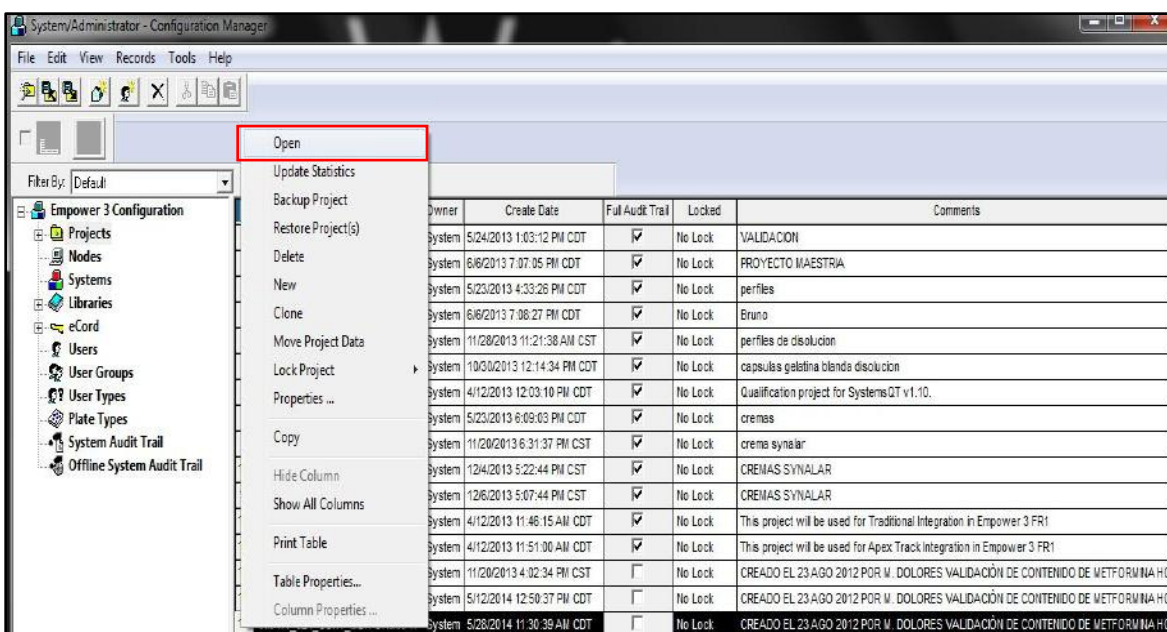
 **Indicación:** Cuando el sistema no integre alguna de las inyecciones diríjase al icono «**Processing Method**»  para modificar el procesamiento de los datos y en la opción **Integración** (Integración) cambie el área o la altura, regrese al cromatograma  e integre dando clic en el icono 

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	

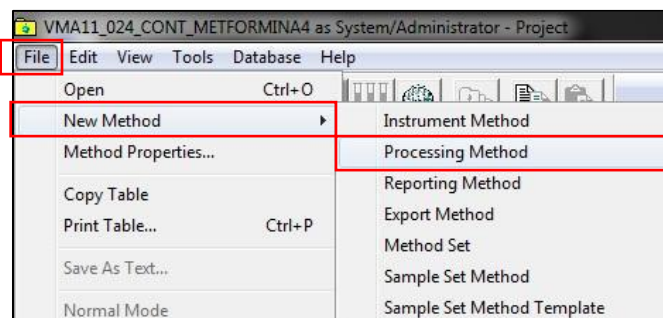
13. PUREZA DEL PICO



⚠ Advertencia: Si la opción de **PDA** no se indica desde la creación del Método Set, los datos de la pureza del pico no podrán ser procesados y no se observarán en el reporte correspondiente, por eso, es importante su indicación. Para procesar los datos edite el método de procesamiento.

13.1. Seleccionar el **Método set**, enseguida dar clic derecho con el mouse y seleccionar **Open**.

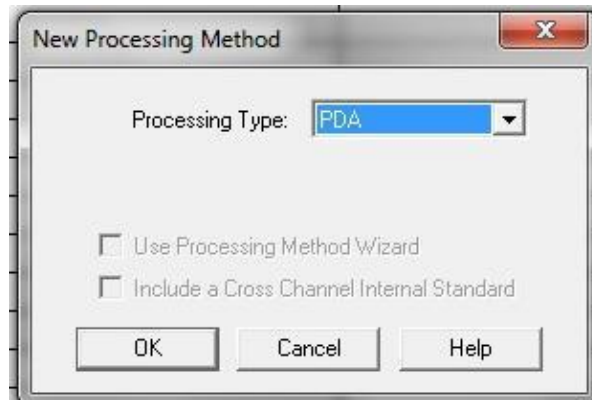


13.2. Dirigirse al icono **File**, seleccionar **New Method** (nuevo método) y dar clic en **Processing Method** (método de procesamiento).

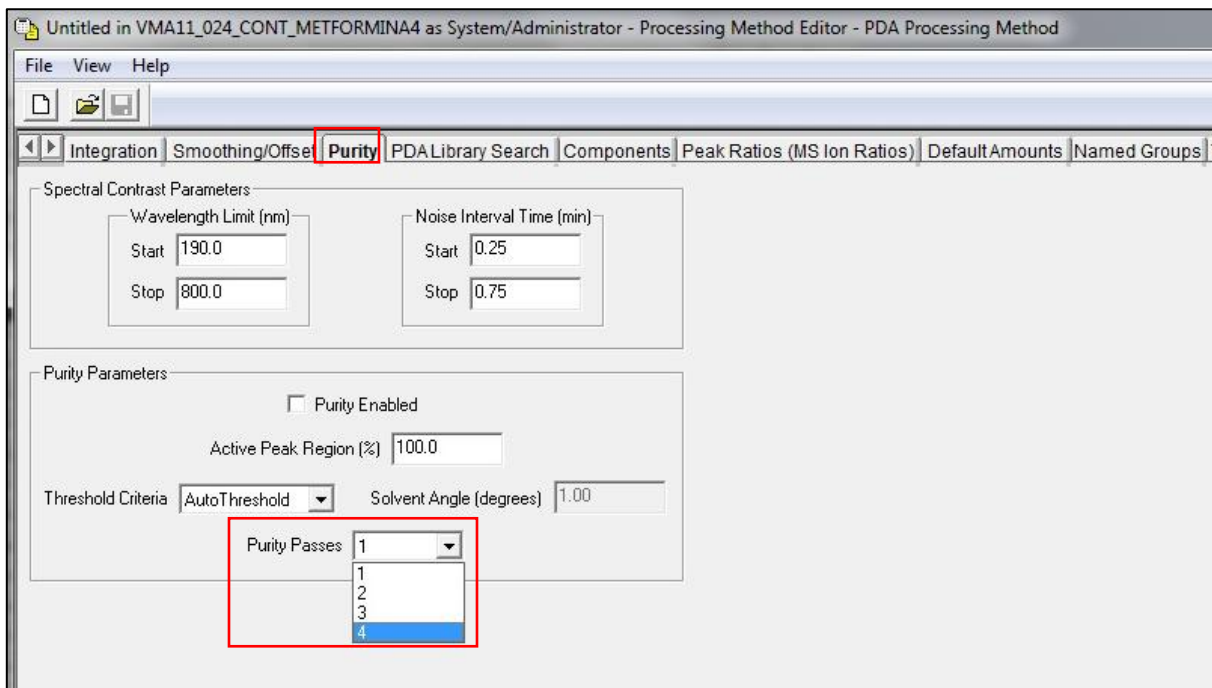




	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	

13.3. En tipo de Procesamiento, seleccionar la opción **PDA** y dar clic en **Ok**.



13.4. Dirigirse a la pestaña **Purity** y active los pases de pureza para que puedan ser observados en el reporte.

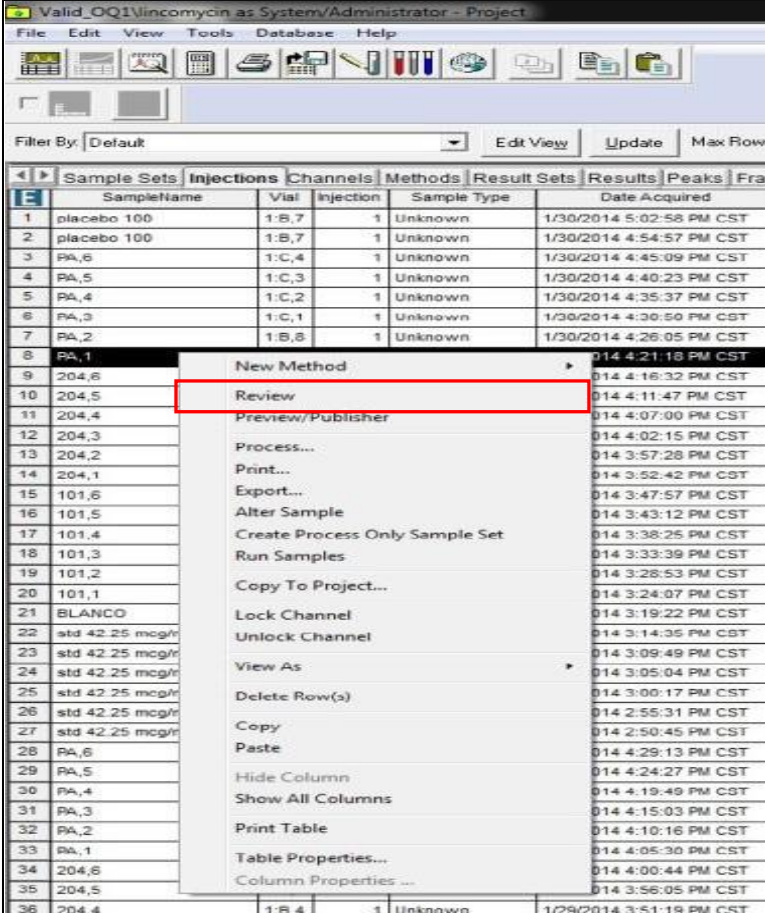


	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	

13.5. Para observar la pureza del pico de una inyección, diríjase y seleccione con el botón secundario del mouse la muestra de interés y de clic en **Review** (revisión).





O bien seleccionar la muestra y dar clic al icono Review

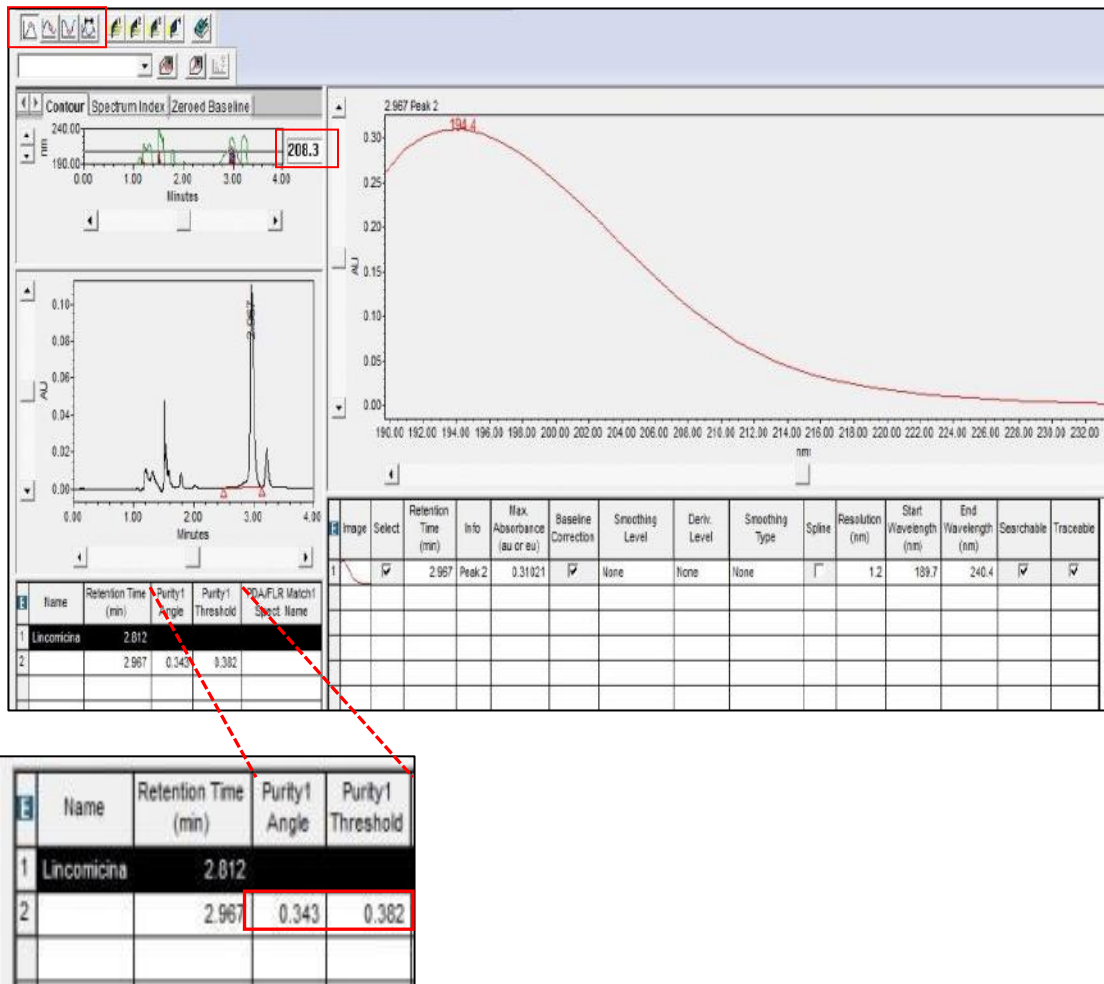


The screenshot shows a software window titled "Valid_OQ1\incomycin.as System/Administrator - Project". The main area contains a table with columns: SampleName, Vial, Injection, Sample Type, and Date Acquired. A context menu is open over the table, with the "Review" option highlighted by a red rectangle. Other menu options include "New Method", "Process...", "Print...", "Export...", "Alter Sample", "Create Process Only Sample Set", "Run Samples", "Copy To Project...", "Lock Channel", "Unlock Channel", "View As", "Delete Row(s)", "Copy", "Paste", "Hide Column", "Show All Columns", "Print Table", "Table Properties...", and "Column Properties...".



SampleName	Vial	Injection	Sample Type	Date Acquired
1 placebo 100	1:B,7	1	Unknown	1/30/2014 5:02:58 PM CST
2 placebo 100	1:B,7	1	Unknown	1/30/2014 4:54:57 PM CST
3 PA,6	1:C,4	1	Unknown	1/30/2014 4:45:09 PM CST
4 PA,5	1:C,3	1	Unknown	1/30/2014 4:40:23 PM CST
5 PA,4	1:C,2	1	Unknown	1/30/2014 4:35:37 PM CST
6 PA,3	1:C,1	1	Unknown	1/30/2014 4:30:50 PM CST
7 PA,2	1:B,8	1	Unknown	1/30/2014 4:26:05 PM CST
8 PA,1				014 4:21:16 PM CST
9 204,6				014 4:16:32 PM CST
10 204,5				014 4:11:47 PM CST
11 204,4				014 4:07:00 PM CST
12 204,3				014 4:02:15 PM CST
13 204,2				014 3:57:28 PM CST
14 204,1				014 3:52:42 PM CST
15 101,6				014 3:47:57 PM CST
16 101,5				014 3:43:12 PM CST
17 101,4				014 3:38:25 PM CST
18 101,3				014 3:33:39 PM CST
19 101,2				014 3:28:53 PM CST
20 101,1				014 3:24:07 PM CST
21 BLANCO				014 3:19:22 PM CST
22 std 42.25 mcg/r				014 3:14:35 PM CST
23 std 42.25 mcg/r				014 3:09:49 PM CST
24 std 42.25 mcg/r				014 3:05:04 PM CST
25 std 42.25 mcg/r				014 3:00:17 PM CST
26 std 42.25 mcg/r				014 2:55:31 PM CST
27 std 42.25 mcg/r				014 2:50:45 PM CST
28 PA,6				014 4:29:13 PM CST
29 PA,5				014 4:24:27 PM CST
30 PA,4				014 4:19:49 PM CST
31 PA,3				014 4:15:03 PM CST
32 PA,2				014 4:10:16 PM CST
33 PA,1				014 4:05:30 PM CST
34 204,6				014 4:00:44 PM CST
35 204,5				014 3:56:05 PM CST
36 204,4	1:B,4	1	Unknown	1/29/2014 3:51:19 PM CST

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	

13.6. Especificar el valor de longitud de onda y observar la pureza espectral del pico así como los valores de **Purity Angle** (ángulo de pureza) y **Purity Threshold** (umbral de pureza).



⚠ Indicación: Para garantizar la pureza del pico, no debe sobreponerse otro espectro sobre el pico de la muestra de interés, así como, el valor de **Purity Angle** debe de ser menor que el valor de **Purity Threshold** de lo contrario modificar las condiciones de flujo, temperatura, concentración, etc. según convenga.

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	

14. SYSTEM SUITABILITY (ADECUABILIDAD DEL SISTEMA)

14.1. Para modificar e identificar los componentes del sistema dar clic en la opción

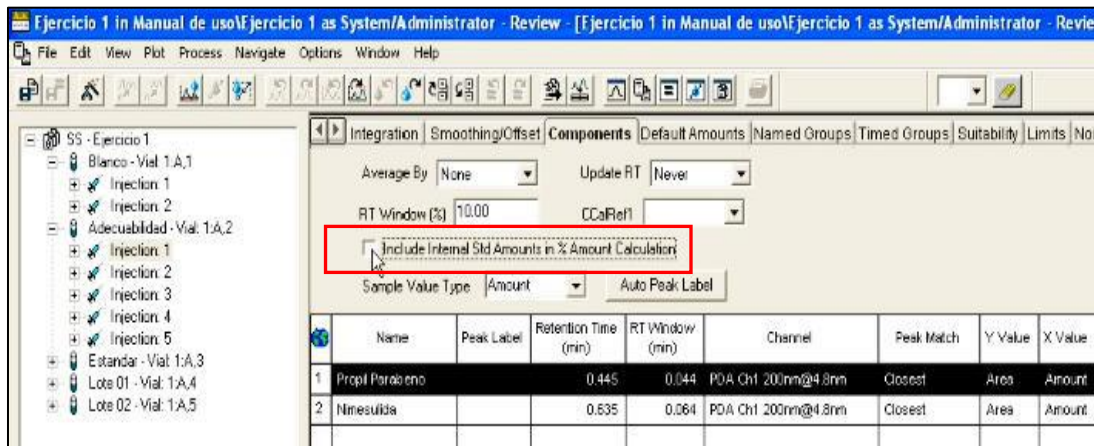
«**Processing Method**»  ubicado en la ventana [Review]





14.2. Enseguida seleccione la opción «**Components**»

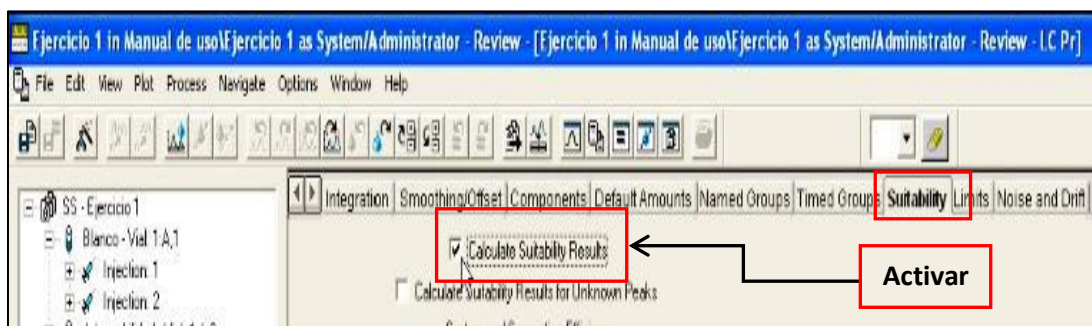


14.3. Desactive la opción «**Include Internal Std Amounts**» si no se está trabajando con un estándar interno.

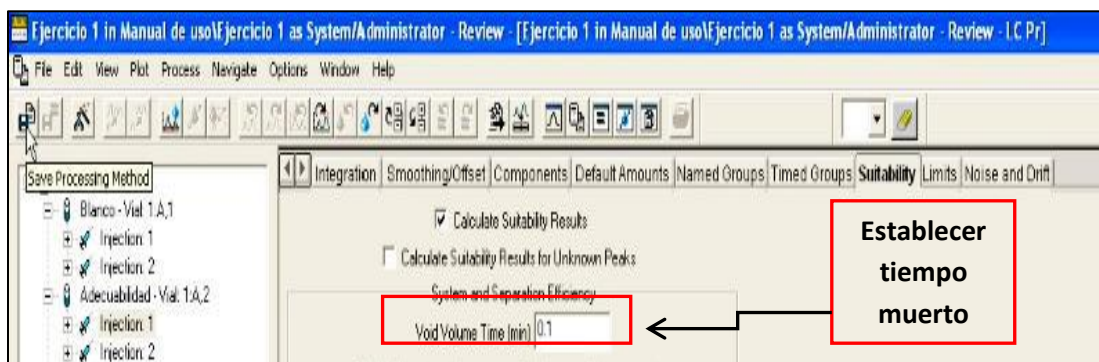


	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	

14.4. Para la Adecuabilidad del sistema, dirigirse al icono «**Suitability**» (Adecuabilidad) y active la opción «**Calculate Suitability Results**» (Cálculo de los Resultados de Adecuabilidad)



14.5. Establezca el tiempo de muerto.



⚠ Indicación. Recuerde que el tiempo muerto lo puede obtener directamente de la columna (*ver su respectivo Manual*); si trabaja con un flujo diferente al especificado en la columna realice una inyección con 10µL de acetona en 2mL de Fase móvil o bien realice un cálculo de una regla de tres inversa o utilice la siguiente formula: $t_m = Ld^2 / 2F$



Forma matemática.

$$t_m = \frac{Ld^2}{2F}$$

L= longitud de la columna en cm

d= diámetro de la columna en cm

F= caudal en mL/min

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	

Por ejemplo:

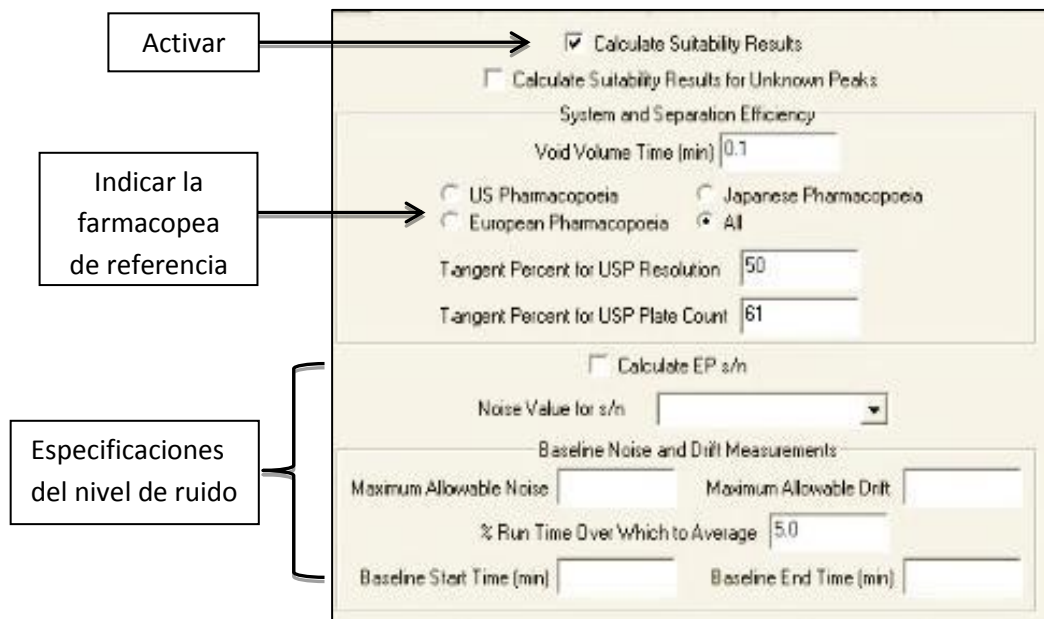
Para 0.6mL/min

$$t_m = \frac{(10\text{cm})(0.46\text{cm})^2}{2(0.6\text{mL/min})} = 1.7633 \text{ min}$$

Para 0.5mL/min

$$t_m = \frac{(10\text{cm})(0.46\text{cm})^2}{2(0.5\text{mL/min})} = 2.116\text{min}$$

14.6. Elegir la farmacopea de referencia.





⚠ Advertencia: Si la opción del **system suitability** se encuentra desactivada el factor de coeio o los platos teóricos no podrán ser calculados y no se observaran en el reporte correspondiente por eso es importante su indicación.

14.7 Para guardar el método de procesamiento de datos, dar clic en la opción «**Save Processing Method**» (Guardar método de procesamiento).



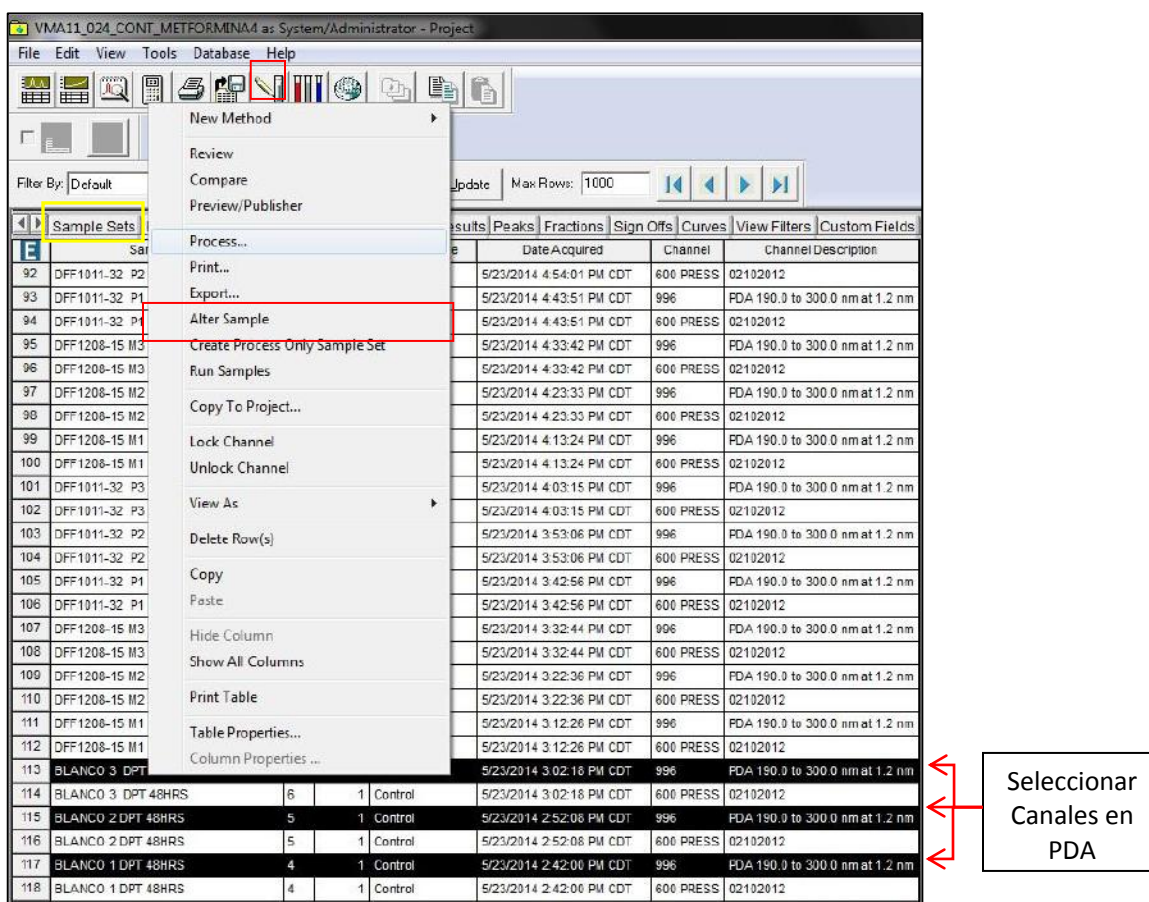
14.8 Dar clic en la opción **Yes** y cerrar la ventana.

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	

15. CUANTIFICACIÓN

15.1. Para procesar las muestras, ir a la pestaña **Sample Set** ó **Channels** (Canales) y seleccione la(s) secuencia(s) de interés a procesar (canales en PDA). Enseguida

dar clic derecho y seleccionar **Alter Sample** (o dar clic al icono ).





The screenshot shows the software interface with a right-click context menu open over a table. The menu options include: New Method, Review, Compare, Preview/Publisher, Process..., Print..., Export..., **Alter Sample** (highlighted with a red box), Create Process Only Sample Set, Run Samples, Copy To Project..., Lock Channel, Unlock Channel, View As, Delete Row(s), Copy, Paste, Hide Column, Show All Columns, Print Table, Table Properties..., and Column Properties... The table below shows the data rows.


Results	Peaks	Fractions	Sign Offs	Curves	View Filters	Custom Fields
Date Acquired	Channel	Channel Description				
5/23/2014 4:54:01 PM CDT	600 PRESS	02102012				
5/23/2014 4:43:51 PM CDT	996	FDA 190.0 to 300.0 nm at 1.2 nm				
5/23/2014 4:43:51 PM CDT	600 PRESS	02102012				
5/23/2014 4:33:42 PM CDT	996	FDA 190.0 to 300.0 nm at 1.2 nm				
5/23/2014 4:33:42 PM CDT	600 PRESS	02102012				
5/23/2014 4:23:33 PM CDT	996	FDA 190.0 to 300.0 nm at 1.2 nm				
5/23/2014 4:23:33 PM CDT	600 PRESS	02102012				
5/23/2014 4:13:24 PM CDT	996	FDA 190.0 to 300.0 nm at 1.2 nm				
5/23/2014 4:13:24 PM CDT	600 PRESS	02102012				
5/23/2014 4:03:15 PM CDT	996	FDA 190.0 to 300.0 nm at 1.2 nm				
5/23/2014 4:03:15 PM CDT	600 PRESS	02102012				
5/23/2014 3:53:06 PM CDT	996	FDA 190.0 to 300.0 nm at 1.2 nm				
5/23/2014 3:53:06 PM CDT	600 PRESS	02102012				
5/23/2014 3:42:56 PM CDT	996	FDA 190.0 to 300.0 nm at 1.2 nm				
5/23/2014 3:42:56 PM CDT	600 PRESS	02102012				
5/23/2014 3:32:44 PM CDT	996	FDA 190.0 to 300.0 nm at 1.2 nm				
5/23/2014 3:32:44 PM CDT	600 PRESS	02102012				
5/23/2014 3:22:36 PM CDT	996	FDA 190.0 to 300.0 nm at 1.2 nm				
5/23/2014 3:22:36 PM CDT	600 PRESS	02102012				
5/23/2014 3:12:26 PM CDT	996	FDA 190.0 to 300.0 nm at 1.2 nm				
5/23/2014 3:12:26 PM CDT	600 PRESS	02102012				
5/23/2014 3:02:18 PM CDT	996	FDA 190.0 to 300.0 nm at 1.2 nm				
5/23/2014 3:02:18 PM CDT	600 PRESS	02102012				
5/23/2014 2:52:08 PM CDT	996	FDA 190.0 to 300.0 nm at 1.2 nm				
5/23/2014 2:52:08 PM CDT	600 PRESS	02102012				
5/23/2014 2:42:00 PM CDT	996	FDA 190.0 to 300.0 nm at 1.2 nm				
5/23/2014 2:42:00 PM CDT	600 PRESS	02102012				

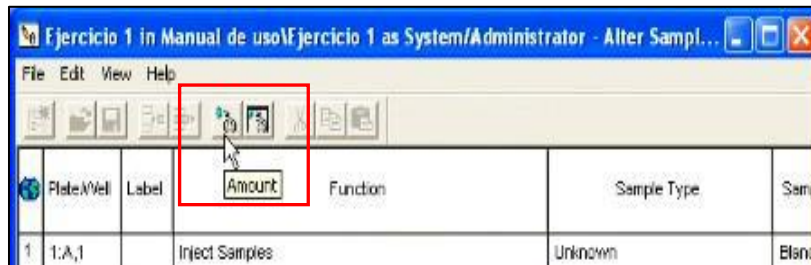
15.2. En la tabla especificar el valor teórico de la cantidad de muestra a pesar (**Dilution**) y el valor real de la cantidad pesada (**Sample Weight**).

15.2.1. Para la Adecuabilidad, dejar en blanco las opciones Dilution y Sample Weight. Dar clic en el icono **Save** (Guardar cambios).

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	

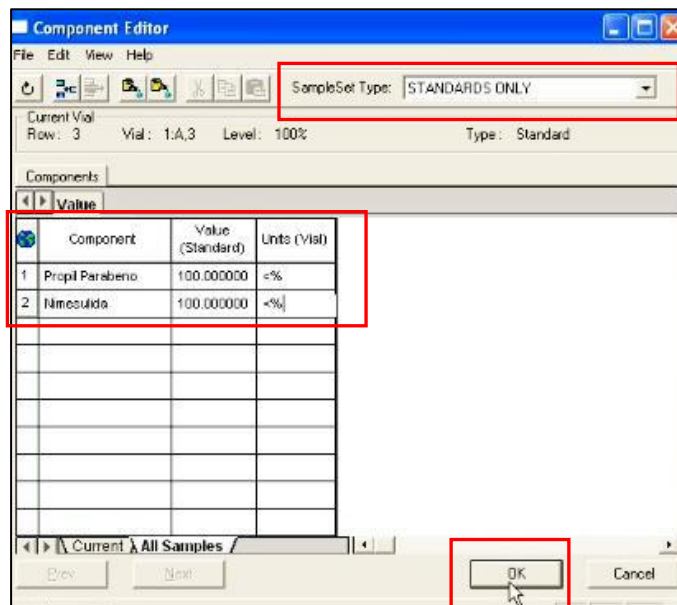
15.2.2. Para las Referencias y Estándares, en las opciones Sample Weight y Dilution escribir el valor de 1 en todas las muestras y dirigirse a la opción


Amount dando clic al icono .





15.2.2.1. En la siguiente ventana indique el nombre del componente (**Component**), el valor del estándar (**Value Standard**) y unidades de concentración de cada componente (**Units**). En la opción **SampleSet Type** indique a que muestras se aplicará, STANDARDS ONLY (Solamente estándares) ó STANDARDS & UNKNOWNNS (Estándares y desconocidos).

15.2.2.2. Dar clic en OK.



 **Aviso.** En la columna **Units (Vial)** (Unidades), siempre colocar el símbolo “menor que” < antes de la unidad de medición.

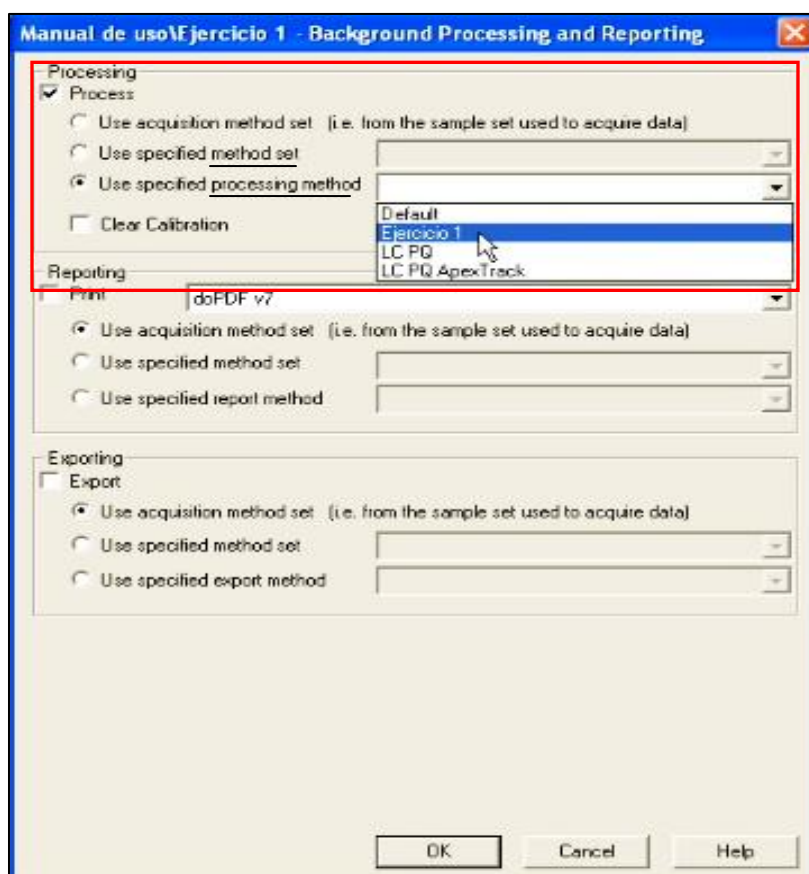
	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	


15.2.2.3. Para guardar los cambios, seleccione el icono **Save**.



15.2.3. Para las Muestras, escribir en la columna correspondiente y en todas las muestras la cantidad real de muestra pesada (Sample Weight) y el valor teórico de la muestra a pesar (Dilution). Para guardar los cambios, seleccione el icono **Save**.

15.3. Regresar a la pestaña **Channels**, seleccionar nuevamente las secuencias de interés y enseguida dar clic en **Process** (procesar).

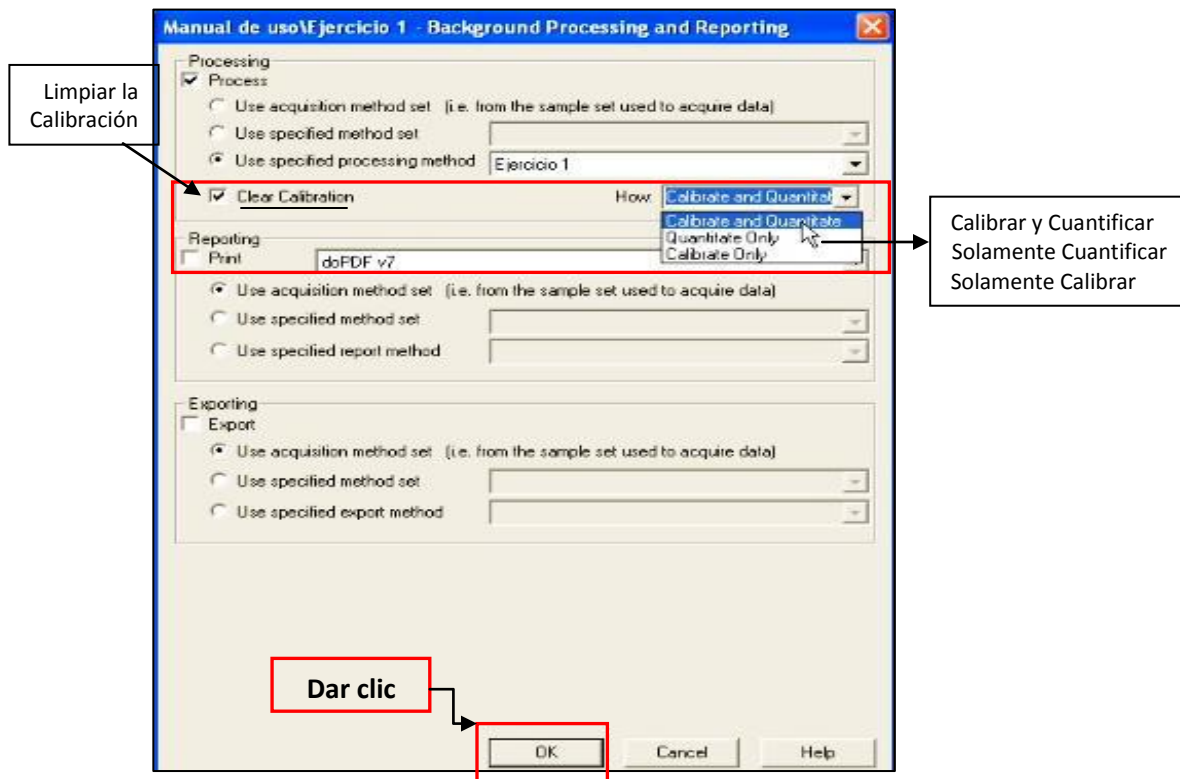
15.4. En la siguiente ventana seleccione el método de procesamiento.



 **IMPORTANTE.** El proceso de los datos debe llevarse a cabo con el mismo método, ya sea, Método Set o método de proceso.

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	

15.5. Indicar al sistema el tipo de cuantificación o calibración que requiera. Dar clic en «Ok»





! **Indicación.** Si desea borrar la calibración pasada, active la opción **Clear Calibration** (limpiar calibración).

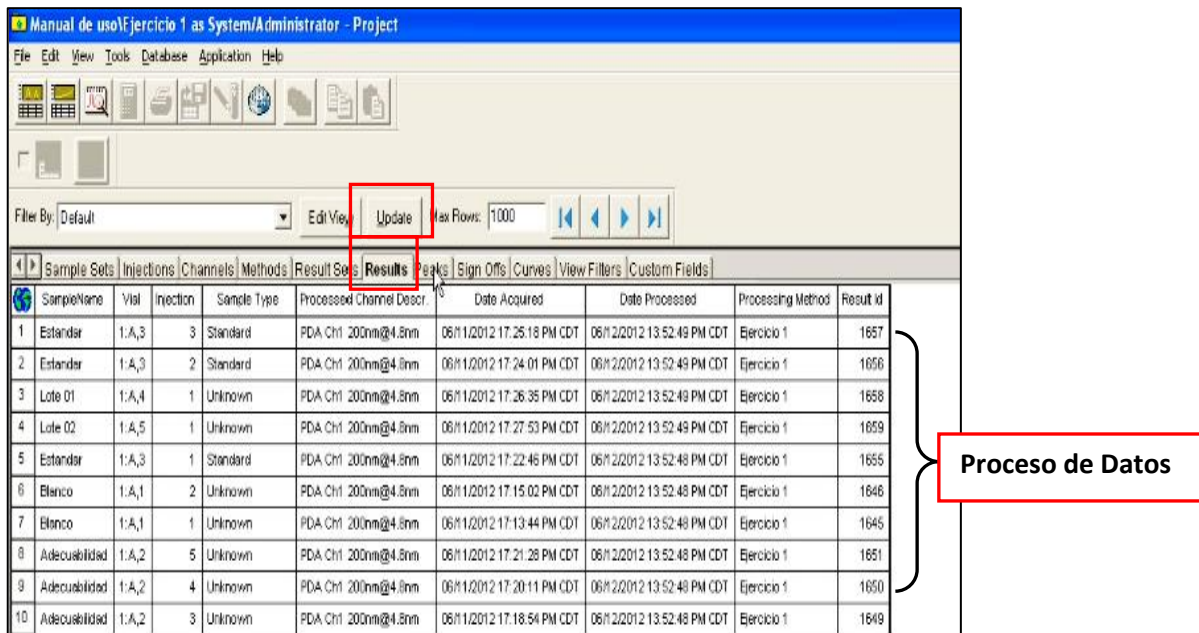
! **IMPORTANTE:** Siempre procese las muestras después de las referencias, ya que de lo contrario la calibración que tomará el software para procesarlas será la de la Adecuabilidad.

- **Seguir el orden de procesamiento de datos siguiente:**

- 1) Seleccionar las muestras de Adecuabilidad y activar las funciones Calibrar y cuantificar, así como Limpiar la calibración.
- 2) En seguida procesar las Referencias, en este caso seleccionar Solamente Calibrar y Limpiar la Calibración.
- 3) Por último las Muestras, solamente seleccionar Cuantificar.

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	

15.6. Seleccione la pestaña **Result** (Resultados) y enseguida de clic en **Update** (Actualización) para ver todo el proceso de datos.



Manual de uso/Ejercicio 1 as System/Administrator - Project

File Edit View Tools Database Application Help

Filter By: Default Edit View Update Max Rows: 1000

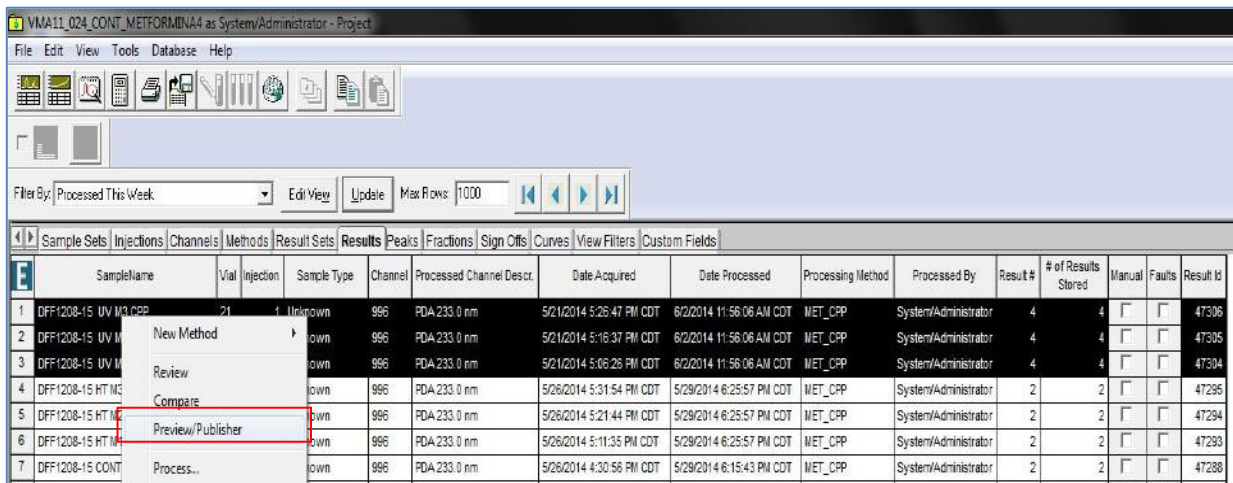
Sample Sets Injections Channels Methods Result Sets **Results** Peaks Sign Offs Curves View Filters Custom Fields

SampleName	Vial	Injection	Sample Type	Processed Channel Descr.	Date Acquired	Date Processed	Processing Method	Result Id
1 Estándar	1.A,3	3	Standard	PDA.Ch1 200nm@4.8nm	06/11/2012 17:25:18 PM CDT	06/12/2012 13:52:48 PM CDT	Ejercicio 1	1657
2 Estándar	1.A,3	2	Standard	PDA.Ch1 200nm@4.8nm	06/11/2012 17:24:01 PM CDT	06/12/2012 13:52:48 PM CDT	Ejercicio 1	1656
3 Lote 01	1.A,4	1	Unknown	PDA.Ch1 200nm@4.8nm	06/11/2012 17:26:35 PM CDT	06/12/2012 13:52:48 PM CDT	Ejercicio 1	1658
4 Lote 02	1.A,5	1	Unknown	PDA.Ch1 200nm@4.8nm	06/11/2012 17:27:53 PM CDT	06/12/2012 13:52:48 PM CDT	Ejercicio 1	1659
5 Estándar	1.A,3	1	Standard	PDA.Ch1 200nm@4.8nm	06/11/2012 17:22:46 PM CDT	06/12/2012 13:52:48 PM CDT	Ejercicio 1	1655
6 Blanco	1.A,1	2	Unknown	PDA.Ch1 200nm@4.8nm	06/11/2012 17:15:02 PM CDT	06/12/2012 13:52:48 PM CDT	Ejercicio 1	1646
7 Blanco	1.A,1	1	Unknown	PDA.Ch1 200nm@4.8nm	06/11/2012 17:13:44 PM CDT	06/12/2012 13:52:48 PM CDT	Ejercicio 1	1645
8 Adecuabilidad	1.A,2	5	Unknown	PDA.Ch1 200nm@4.8nm	06/11/2012 17:21:28 PM CDT	06/12/2012 13:52:48 PM CDT	Ejercicio 1	1651
9 Adecuabilidad	1.A,2	4	Unknown	PDA.Ch1 200nm@4.8nm	06/11/2012 17:20:11 PM CDT	06/12/2012 13:52:48 PM CDT	Ejercicio 1	1650
10 Adecuabilidad	1.A,2	3	Unknown	PDA.Ch1 200nm@4.8nm	06/11/2012 17:18:54 PM CDT	06/12/2012 13:52:48 PM CDT	Ejercicio 1	1649

Proceso de Datos

16. REPORTE DE LOS DATOS

16.1. En la pestaña **Results**, seleccione la(s) secuencia(s) que requiera reportar. Dar clic derecho y seleccionar **Preview/Publisher** (Vista previa/editor).





VMA11_024_CONT_METFORMINA4 as System/Administrator - Project

File Edit View Tools Database Help

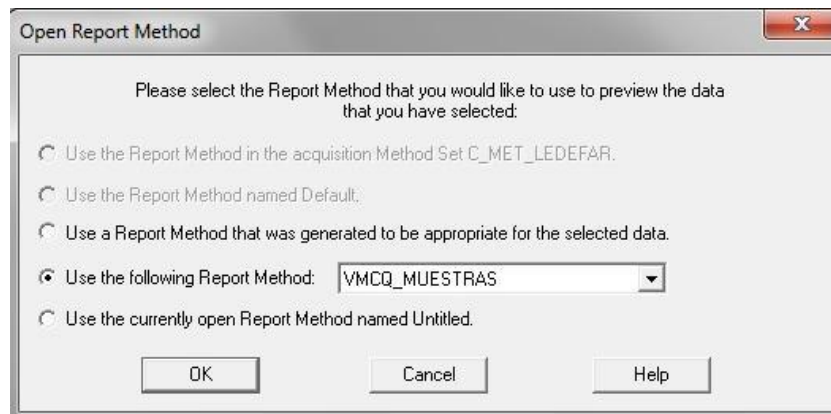
Filter By: Processed This Week Edit View Update Max Rows: 1000

Sample Sets Injections Channels Methods Result Sets **Results** Peaks Fractions Sign Offs Curves View Filters Custom Fields

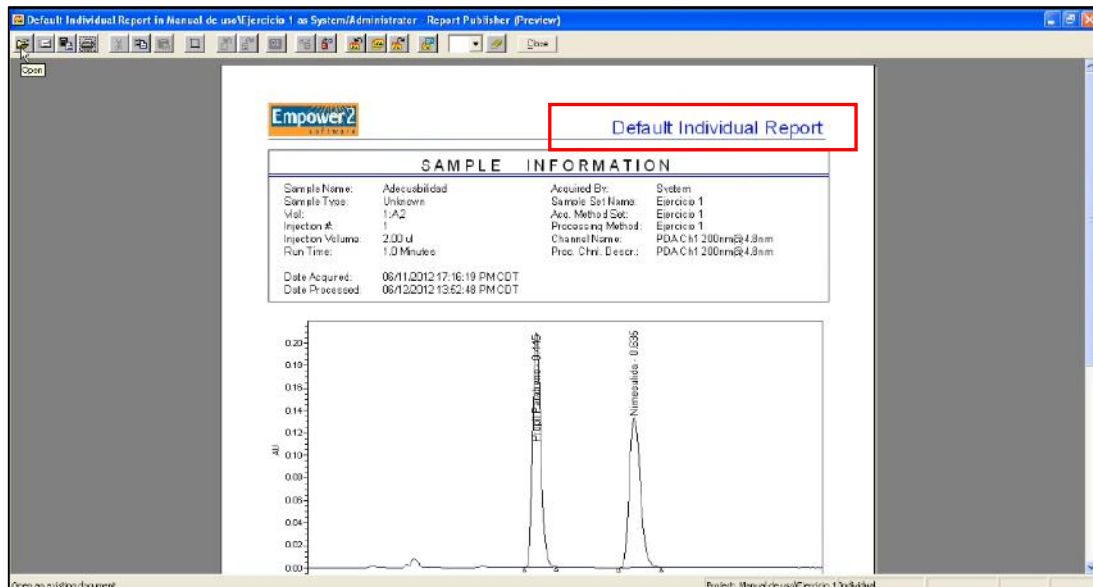
SampleName	Vial	Injection	Sample Type	Channel	Processed Channel Descr.	Date Acquired	Date Processed	Processing Method	Processed By	Result #	# of Results Stored	Manual	Faults	Result Id
1 DFF1208-15 UV M3.CPP	21	1	Unknown	966	PDA 233.0 nm	5/21/2014 5:26:47 PM CDT	6/2/2014 11:56:06 AM CDT	MET_CPP	System/Administrator	4	4	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	47306
2 DFF1208-15 UV M3.CPP	New Method	1	Unknown	966	PDA 233.0 nm	5/21/2014 5:16:37 PM CDT	6/2/2014 11:56:06 AM CDT	MET_CPP	System/Administrator	4	4	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	47305
3 DFF1208-15 UV M3.CPP	Review	1	Unknown	966	PDA 233.0 nm	5/21/2014 5:06:26 PM CDT	6/2/2014 11:56:06 AM CDT	MET_CPP	System/Administrator	4	4	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	47304
4 DFF1208-15 HT M3.CPP	Compare	1	Unknown	966	PDA 233.0 nm	5/26/2014 5:31:54 PM CDT	5/29/2014 6:25:57 PM CDT	MET_CPP	System/Administrator	2	2	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	47295
5 DFF1208-15 HT M3.CPP	Preview/Publisher	1	Unknown	966	PDA 233.0 nm	5/26/2014 5:21:44 PM CDT	5/29/2014 6:25:57 PM CDT	MET_CPP	System/Administrator	2	2	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	47294
6 DFF1208-15 HT M3.CPP	Process...	1	Unknown	966	PDA 233.0 nm	5/26/2014 5:11:35 PM CDT	5/29/2014 6:25:57 PM CDT	MET_CPP	System/Administrator	2	2	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	47293
7 DFF1208-15 CONT		1	Unknown	966	PDA 233.0 nm	5/26/2014 4:30:56 PM CDT	5/29/2014 6:15:43 PM CDT	MET_CPP	System/Administrator	2	2	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	47288

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	

16.2. Indicar el método de reporte y dar clic en OK.



16.3. En seguida aparecerá el reporte seleccionado.





Laboratorio de Ensayos de
Desarrollo Farmacéutico

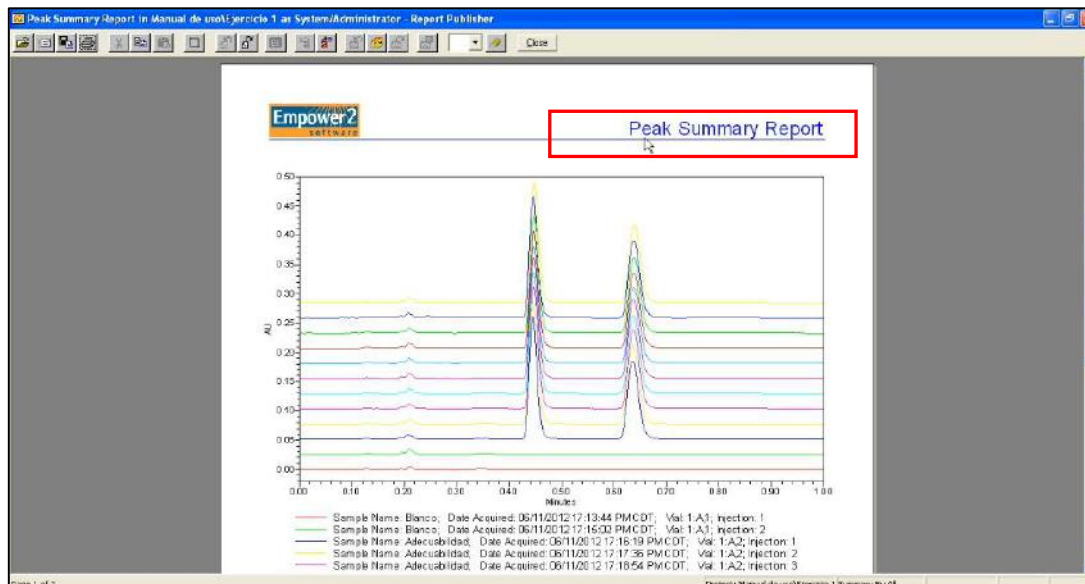
MANUAL DE OPERACIÓN
PARA EL EQUIPO
ACQUITY UPLC CLASE H

Número de código:
MAN-OP-01

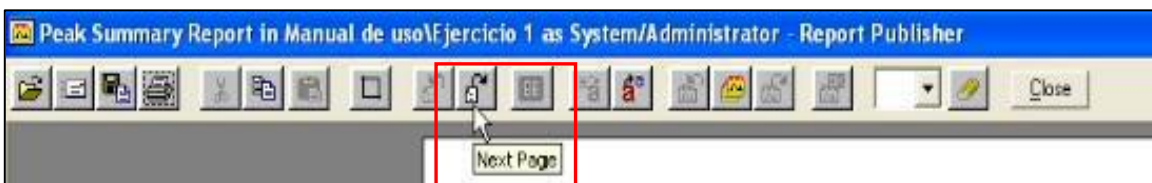
Revisión: 0

Fecha de aplicación:
Enero-2015

Fecha de vencimiento:
Enero-2018



16.4. Para observar las secuencias dentro del reporte, seleccione el icono «Next Page»





Peak Summary with Statistics
Name: Nimesulida

Sample Name	Val	Inj	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	Height	Amount	Units	
5	Adecuabilidad	1	A2	1	Nimesulida	0.435	202000	46.98	133270	
6	Adecuabilidad	1	A2	5	Nimesulida	0.537	201547	46.98	133278	
7	Adecuabilidad	1	A2	9	Nimesulida	0.630	202000	46.98	134087	
8	Estándar	1	A2	1	Nimesulida	0.537	194244	46.98	125069	100.0 %
9	Estándar	1	A2	2	Nimesulida	0.537	192942	46.94	121907	100.0 %
10	Estándar	1	A2	9	Nimesulida	0.630	134100	47.01	120200	100.0 %
11	Lote 01	1	A4	1	Nimesulida	0.537	201379	46.97	131291	102.7 %
12	Lote 02	1	A5	1	Nimesulida	0.630	198992	46.99	131596	102.5 %
Mean					0.630					
Std. Dev.					0.001					
% RSD					0.19					

Peak Summary with Statistics
Name: Propil Paribeno

Sample Name	Val	Inj	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	Height	Amount	Units	
5	Blanco	1	A1	1	Propil Paribeno	0.445				
6	Blanco	1	A1	2	Propil Paribeno	0.445				
9	Adecuabilidad	1	A2	4	Propil Paribeno	0.445	229566	53.03	207101	
4	Adecuabilidad	1	A2	2	Propil Paribeno	0.445	228572	52.99	206532	
5	Adecuabilidad	1	A2	1	Propil Paribeno	0.445	230000	53.00	206923	
6	Adecuabilidad	1	A2	5	Propil Paribeno	0.447	229773	53.04	206707	
7	Adecuabilidad	1	A2	3	Propil Paribeno	0.447	228194	53.02	207867	
8	Estándar	1	A2	1	Propil Paribeno	0.447	215412	52.04	184638	100.0 %
9	Estándar	1	A2	3	Propil Paribeno	0.447	218920	52.98	191060	100.0 %
10	Estándar	1	A2	5	Propil Paribeno	0.447	229444	53.04	206900	100.0 %

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	

16.5. Para editar el reporte dar clic en **Closed** (cerrar), seleccionar de la lista la función deseada y arrastrar la tabla hasta el reporte para que pueda ser copiada.





16.6. Para insertar una imagen, ir a la función **Drawing Object**, dar clic derecho en la función **Graphycs >> New Graphic** y dar clic en **Ok**. Seleccionar **Load Graphic**, y buscar la carpeta donde se encuentra la imagen. (sólo se admiten los formatos de imagen de tipo bmp, gif o emf).

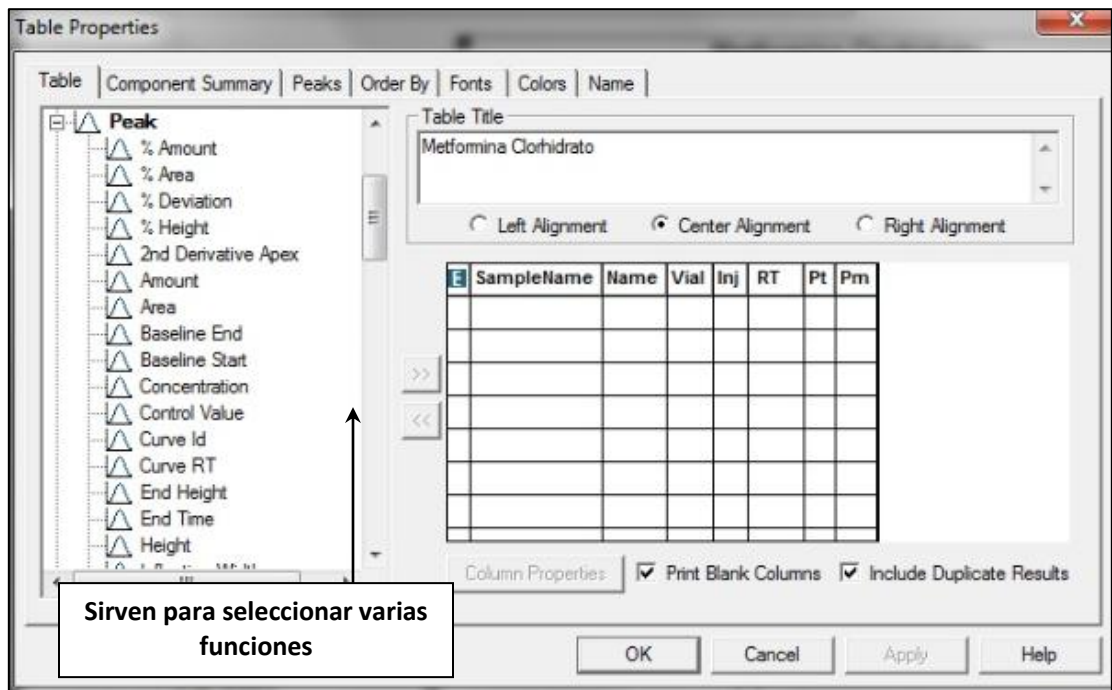
16.7. Para editar las tablas, dar clic derecho y seleccionar Propiedades de la tabla (**Table Properties**), seleccionar las funciones deseadas, y dar clic en Ok.



16.8. Para editar cada columna de la tabla, dar clic derecho y seleccionar propiedades de la columna (**Column Properties**).



16.9. Para observar las secuencias dentro del reporte, seleccione el icono «**Next Page**» o «**Previous page**» (pagina siguiente o anterior).

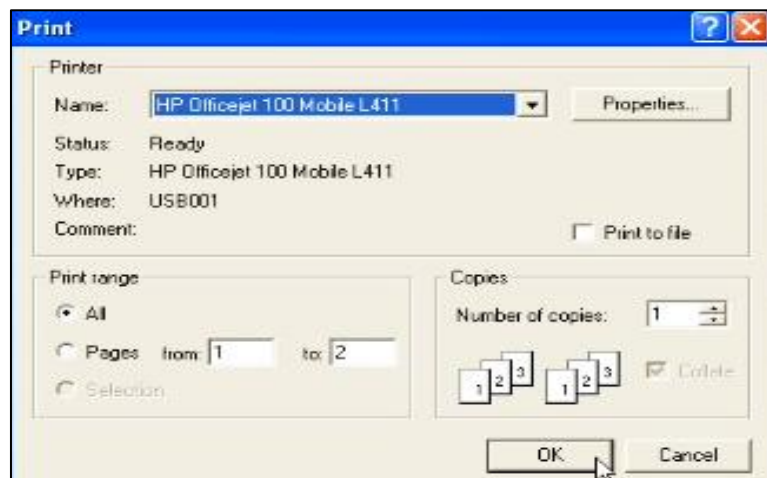
	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	

16.10. Para ver el reporte dar clic en el icono 




16.11. Una vez listo el reporte, dar clic en el icono **Save** (Guardar)  y **Print**  para imprimir el reporte.

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	





17. APAGADO DEL EQUIPO.

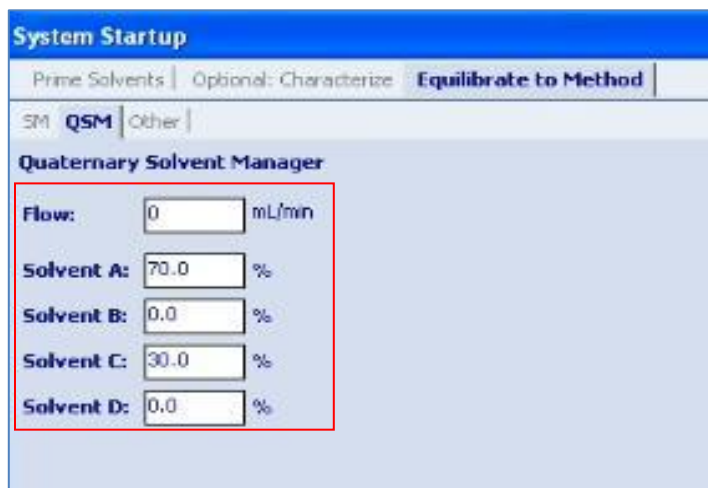
 **Indicación:** El equipo se puede apagar de manera automática programando este al término de la sesión de trabajo, para ello es necesario elaborar un método set de Apagado (Ver *Lavado y Apagado*).

- 17.1. En la consola **ACQUITY UPLC System** hacer clic en **Control** y enseguida dirigirse a **Start up system** (Control > Puesta en marcha del sistema).



- 17.2. En la pestaña **Equilibrate to Method** (Equilibrar el método), ir a «**QSM**» y disminuir poco a poco las condiciones del flujo de trabajo de la bomba hasta un flujo de cero.



	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	



17.3. Seleccione la pestaña «**SM**», y desactive las condiciones de la temperatura de trabajo.



17.4. Diríjase a la opción «**Other**» y apague la lámpara desactivando la opción «**Lamp On**», enseguida dar clic a la opción «**Start**»

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	



17.5. Cerrar la ventana de la consola **ACQUITY UPLC System**.



17.6. Pulsar el indicador de encendido/apagado situado en la parte superior izquierda del detector.

17.7. Apagar el Sistema administrador cuaternario de solventes y el Sistema administrador de muestras pulsando el interruptor de encendido/apagado situado en la parte superior izquierda de la puerta de cada dispositivo.


17.8. Apagar el CPU y monitor.

⚠ Indicación: Con el fin de proporcionar una ventilación adecuada, los ventiladores del Sistema administrador de muestras funcionan de manera continua, incluso cuando el interruptor de encendido se encuentra en la posición "off" ("desconectado").

⊕ Observación: Los ventiladores solamente se apagan cuando el cable de alimentación se desconecta de la parte trasera del instrumento.

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	

18. COLOCACIÓN DE LA COLUMNA.



 **Advertencia.** Para la colocación o cambio de una columna es necesario siempre utilizar guantes libres de polvo mientras se realiza este procedimiento.

18.1. Abrir la compuerta de la columna, la cual se encuentra ubicada en la parte superior del Administrador de muestras.

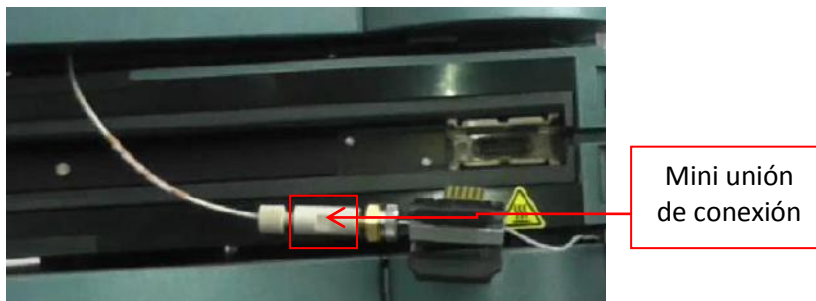


18.2. Con mucho cuidado retirar el control electrónico de la temperatura.



	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	



18.3. **Quitar la mini unión de conexión.** Con las manos desenroscar la tuerca de acero inoxidable seguida del conector de acero en chapa de oro y enseguida desenroscar el conector del otro extremo del tiempo muerto (plástico).



⚠ Advertencia: Tener cuidado de no perder el **peek** que se encuentra en la punta del conector de acero en chapa de oro, ya que este evita las fugas en la columna.

! Precaución: Para evitar que se caiga el **peek** del conector se recomienda colocar el control electrónico de la temperatura en su lugar antes de colocar la columna.

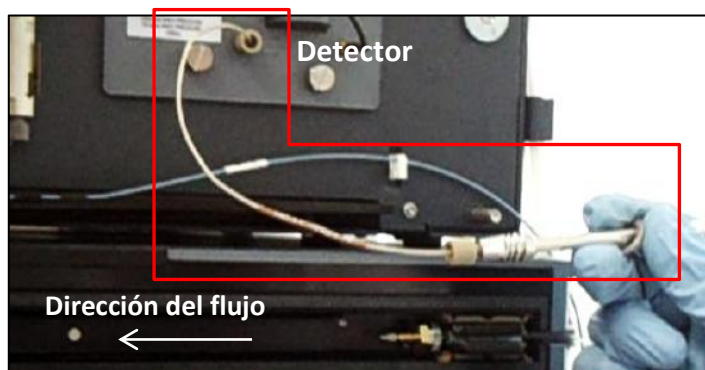


	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	

18.4. Para colocar la columna primero se deben de retirar los conectores de ambos extremos de la columna.





18.5. Con las manos, colocar la columna siempre fijándose que la dirección del flujo se dirija del muestreador hacia el detector. (La dirección del flujo aparece marcada en la columna)



18.6. Colocar el otro extremo de la columna en el conector de acero en chapa de oro y ajustar la distancia.



⚠ Advertencia: Siempre que se vaya a colocar una columna hay que desenroscar la tuerca de acero inoxidable para marcar la distancia de la columna y así evitar posibles fugas.

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	

18.7. Una vez ajustada la distancia de la columna, asegurar esta con la tuerca de acero inoxidable.



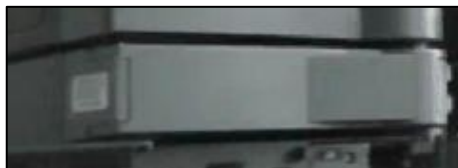
18.8. Situar el control electrónico de la temperatura en su lugar y acomodar la columna.





18.9. Colocar el chip controlador de inyecciones en la parte lateral derecha del instrumento.





18.10. Cerrar la compuerta.



	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	


19. COLOCACIÓN DE LA MINI UNIÓN DE CONEXIÓN.


 **Advertencia.** Cuando no se trabaje con el equipo hay que proceder a retirar la columna y colocar la mini unión de conexión.

 **Precaución.** Para la colocación la unión de conexión, es necesario siempre utilizar guantes libres de polvo mientras se realiza este procedimiento.

- 19.1. Abrir la compuerta donde se encuentra ubicada la columna.
- 19.2. Con mucho cuidado retirar el control electrónico de la temperatura.
- 19.3. **Quitar la columna.** Con las manos desenroscar primeramente la tuerca de acero inoxidable seguida del conector de acero en chapa de oro, finalmente desenroscar el conector de plástico ubicado en el otro extremo de la columna.



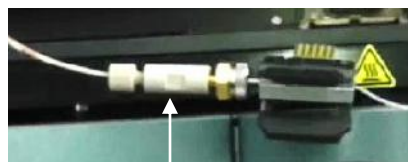
 **Advertencia:** Tener cuidado de no perder el **peek** que se encuentra en la punta del conector de acero en chapa de oro, ya que este evita las fugas en la columna.



 **Precaución:** Para evitar que se caiga el **peek** del conector se recomienda colocar el control electrónico de la temperatura en su lugar antes de colocar la mini unión.

- 19.4. **Colocar la mini unión de conexión** Con las manos enroscar el conector de acero en chapa de oro en uno de los extremos de la mini unión y enseguida asegurar este con la tuerca de acero inoxidable, finalmente con las manos enroscar el otro extremo de la mini unión en el conector de plástico.



Mini unión de conexión



	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	

20. CAMBIO DE LOOP

Cuando se requieran hacer inyecciones con un volumen más grande es necesario instalar un dispositivo de extensión.

! **Precaución:** El equipo tiene un loop de 10 μ l si se le coloca un extended loop de 50 μ l entonces el volumen total será de 50 μ l. Por lo tanto, el volumen del extended loop es el volumen total del inyector.

! **Advertencia:** El volumen del loop no debe sobrepasar el volumen de la jeringa, de ser así, realizar un cambio de jeringa.



! **Advertencia:** Es necesario siempre utilizar guantes limpios y libres de polvo mientras se realiza este procedimiento.

20.1. Abrir la puerta de seguridad del inyector.

20.2. Desconectar la conexión 4 de la válvula para poder colocar el **extended loop** a la entrada de esta.



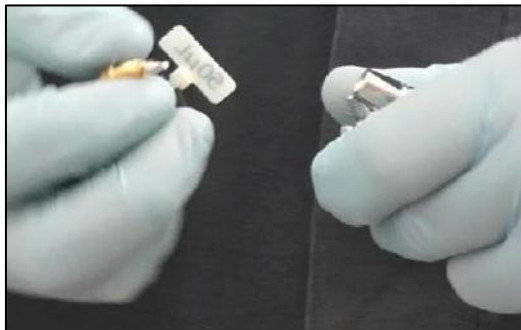
20.3. Quitar con mucho cuidado el empaque negro que posee el extended loop.

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	

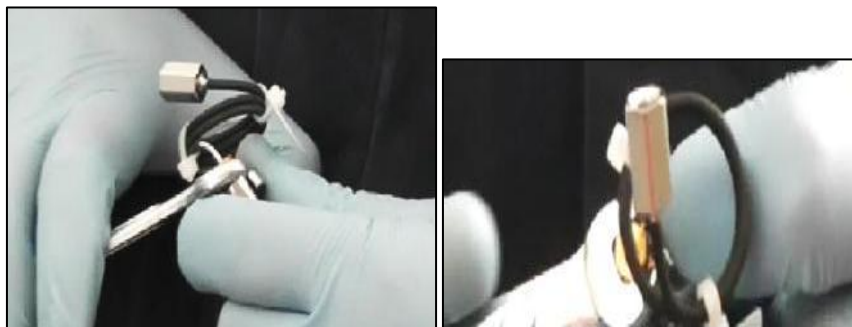
20.4. Utilizando una columna, apretar el conector de acero en chapa de oro del extended loop.





20.5. Retirar la columna del extended loop.



20.6. Utilice una llave para asegurar que el extended loop quede bien apretado.

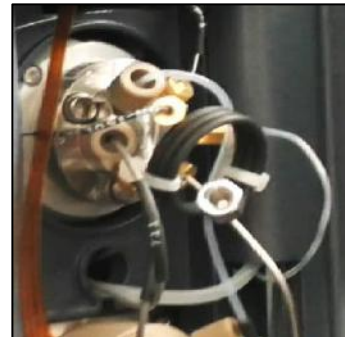


	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	

20.7. Verificar que el conector de acero en chapa de oro no se desplace libremente.





20.8. Colocar el **extended loop** en la conexión 4 de la válvula.



20.9. Utilizando una llave, asegurar que quede bien sujeto la entrada del **extended loop** en la válvula.

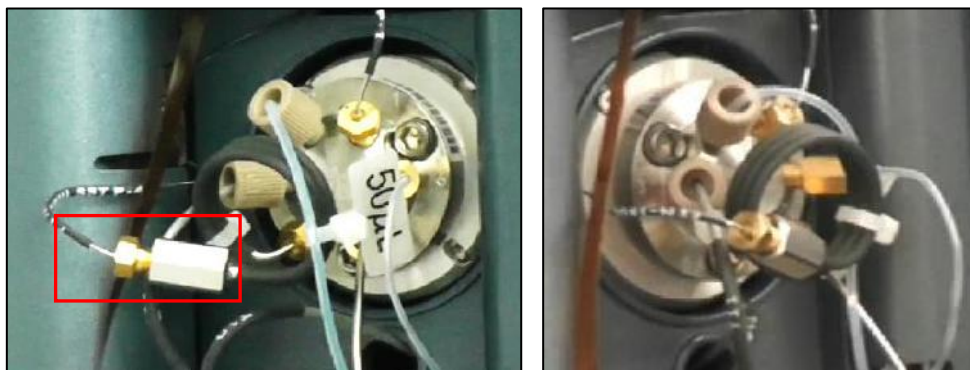


	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	

20.10. Colocar el tubo de inyección en la entrada del **extended loop**.





20.11. Utilice una llave para sujetar el **extended loop** con el tubo del inyector.





20.12. En la consola **ACQUITY UPLC System** seleccionar **Sample Manager** (Sistema administrador de muestras).

20.13. Hacer clic en **Maintain > Calibrate System Volume** (Mantenimiento > Calibrar volumen del sistema) para caracterizar los volúmenes del sistema nuevo.

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	

21. CAMBIO DE LA JERINGA

 **Advertencia:** Dependiendo del tipo de loop que se vaya a utilizar se debe verificar si hay que cambiar o no el tamaño de la jeringa o la aguja.


 **Advertencia:** Es necesario siempre utilizar guantes limpios y libres de polvo mientras se realiza este procedimiento.



21.1. En la consola **ACQUITY UPLC**, seleccionar **Sample Manager** (Sistema de gestión de muestras) en el esquema del sistema.

21.2. Hacer clic en **Maintain > Replace > Sample syringe** (Mantenimiento > Reemplazo > Jeringa de muestra). Esto activa un asistente que desplaza la jeringa a la posición más baja.

21.3. Extraer el tornillo estriado que sujeta la jeringa de muestras al soporte del montaje de la jeringa.




 **Indicación:** En caso de que esté muy apretada la jeringa, ayúdese con unas pinzas y con un trapo para quitarlo.

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	


21.4. Retirar la jeringa del equipo.





 **Precaución:** Tener cuidado de no doblar el émbolo al sacar la jeringa.

21.5. Rellenar la jeringa con un solvente orgánico de preferencia metanol grado HPLC.



 **Advertencia:** Nunca llenar la jeringa con 100% de agua ya que se puede contaminar y a su vez, habrá más formación de burbujas.

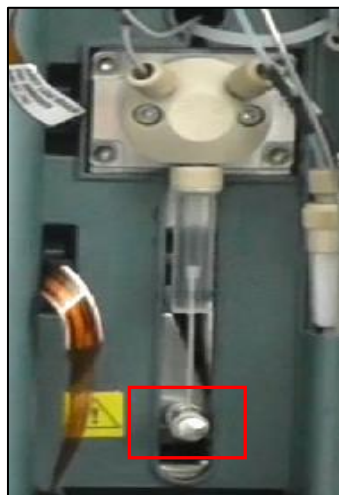
21.6. Succionar varias veces hasta eliminar las burbujas de aire.


	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	



21.7. Instalar la jeringa en su lugar cuidando de NO apretar la jeringa, solo hasta el tope.



- 21.8. Limpiar el solvente que caiga con un trapo seco y limpio.
- 21.9. Verificar que no haya fugas.
- 21.10. Colocar el tornillo de soporte.

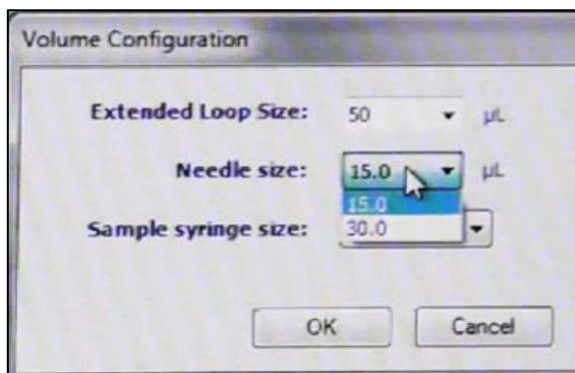


 **Indicación:** En caso de que se pase el movimiento de la jeringa se deberá hacer una purga de la misma para eliminar las burbujas.

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	

21.11. Ir a la consola **ACQUITY UPLC System** y en la ventana **Volume Configuration** (Configuración de volumen), especificar los cambios realizados.

21.12. Dar clic en «Ok».



21.13. Dirigirse a **Control** y enseguida seleccione la opción **Reset SM** (Reajustar SM)

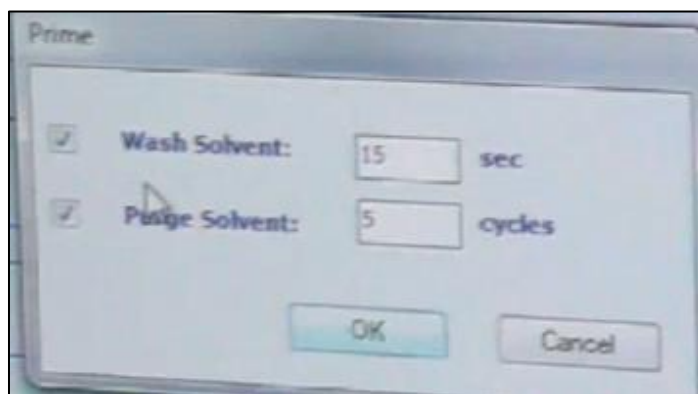
21.14. Observar hasta que la luz del equipo deje de parpadear.





21.15. Dirigirse a **Control** y luego seleccione la opción «Prime» (Principal).

21.16. Especifique los cambios de lavado y purgado del inyector y dar clic en «Ok».

Se recomienda realizar un lavado de 5 ciclos de 15 segundos cada uno.



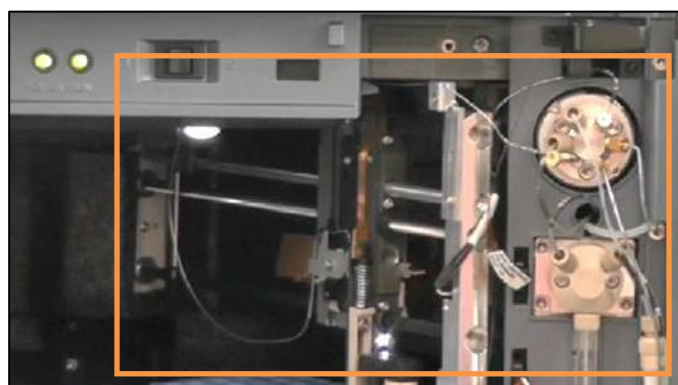
	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	



22. CAMBIO DE LA AGUJA

- 22.1. En la Consola ACQUITY UPLC, hacer clic en **Sample Manager** (Sistema de gestión de muestras), en el panel izquierdo.
- 22.2. Seleccionar **Maintain > Change needle** (Mantener > Cambiar aguja). Aparecerá un mensaje que solicitará la extracción de la placa de muestras de la derecha del compartimento del sistema administrador de muestras.
- 22.3. Abrir la puerta del sistema administrador de muestras. Tirar hacia fuera de la bandeja derecha y extraer la placa de muestras, en su caso.
- 22.4. Tras extraer la placa de muestras de la bandeja, hacer clic en OK en la ventana de mensajes de la Consola ACQUITY UPLC.

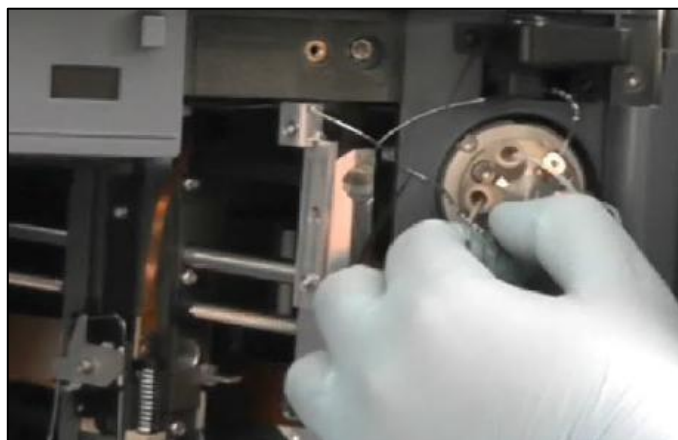


! **Precaución:** Fijarse muy bien en la posición en las que se encuentran las vías, ya que de lo contrario la aguja se puede atorar al tomar la muestra.



	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	



22.5. Desconectar la entrada de la aguja de la válvula.



! **Precaución:** Cuidar que todas las partes retiradas queden en el lugar que correspondan al final del cambio.

22.6. Quitar con mucho cuidado la aguja.



	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	

22.7. Con una lupa ver si la aguja no tiene partículas visibles.





22.8. Para colocar la aguja observar un sello color beige por donde debe de pasar la aguja, y seguir el camino que está marcado por cada ranura.



22.9. Colocar la tapa de seguridad.

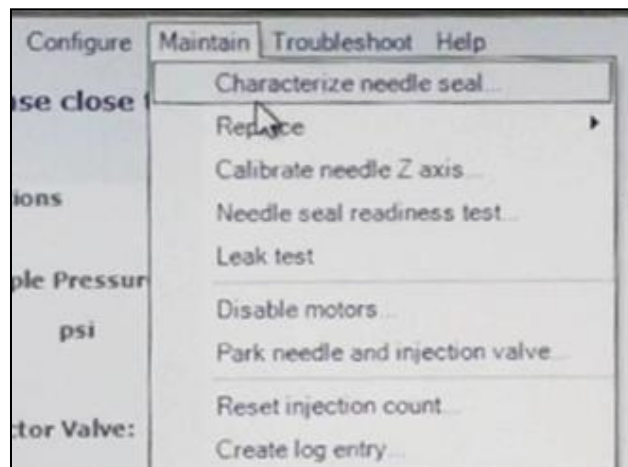
22.10. Verificar en el software si la jeringa fue colocada correctamente.

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	

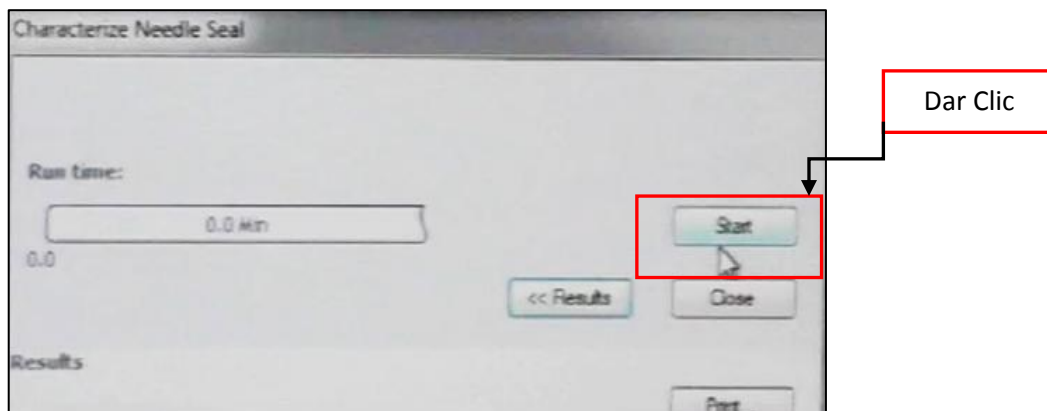
22.11. CARACTERIZAR EL SELLO DE LA AGUJA.



Calibrar la aguja para verificar que el volumen que teóricamente tiene sea el correcto.

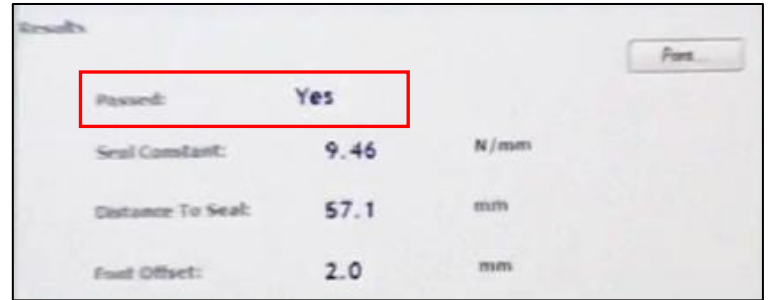
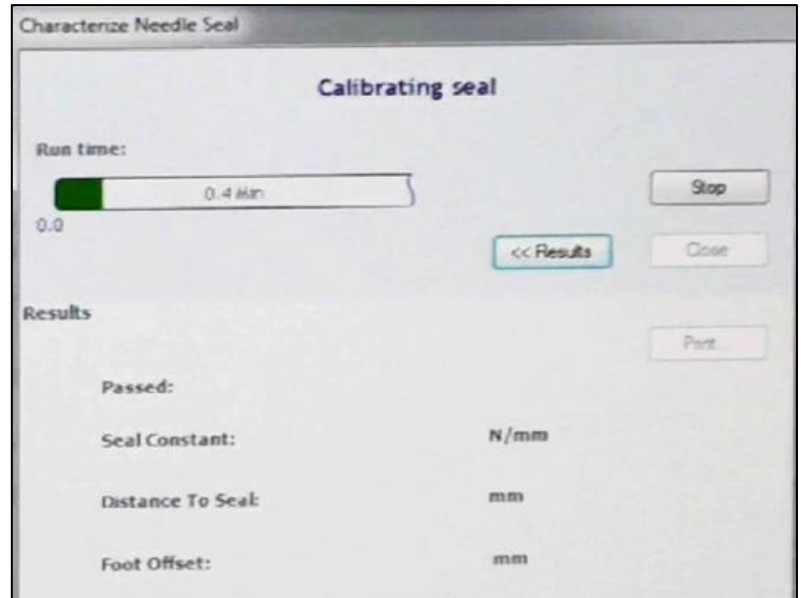
22.12. Dirigirse a la pestaña **Maintain** y en seguida seleccione la opción «**Characterize needle Seal**»





22.13. Dar clic en la opción **Start**, esperar que termine la corrida y observar el mensaje de si pasa o no pasa la aguja. Si no pasa vuelva a colocar la aguja.



	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	



	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	

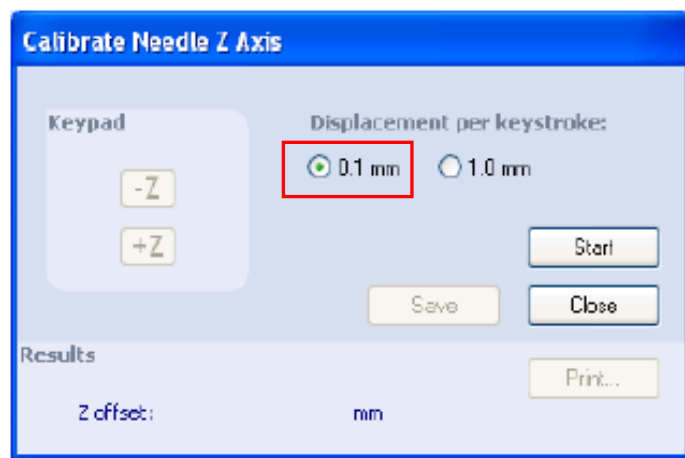
22.14. CALIBRAR EL EJE Z DE LA AGUJA



22.15. Retirar los platos del equipo.

22.16. Utilizar una *tarjeta* pequeña para calibrar la posición de la aguja, y colocarla en la posición donde van los platos.

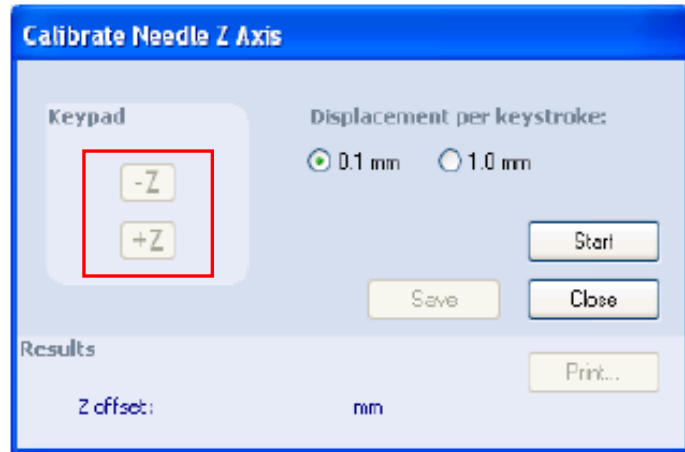


22.17. En seguida indicar al software la calibración del eje Z, para ello abrir la ventana **Calibrate Needle Axis** y seleccionar el desplazamiento de la aguja de 0.1mm.



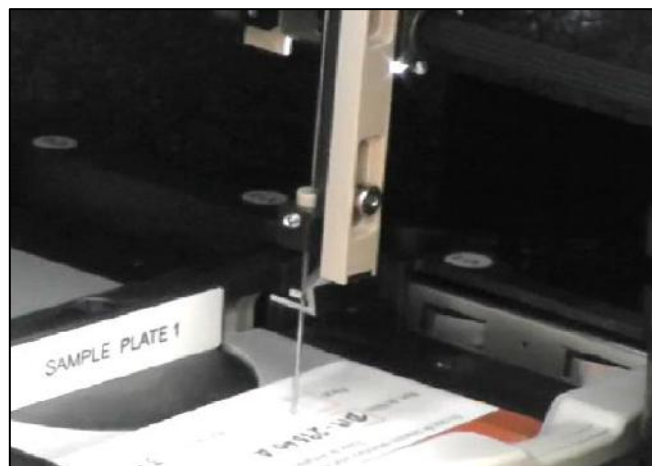
	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	



22.18. Ir moviendo la aguja hacia abajo o hacia arriba milímetro a milímetro por medio de los iconos (+Z) (-Z) hasta el nivel de la tarjeta.



! **Precaución:** Tener cuidado de no exceder el nivel de la tarjeta, ya que, la aguja se puede doblar.

22.19. Mover la aguja de 0.1mm en 0.1mm hacia abajo por medio del icono (-Z) hasta el tope de la tarjeta.

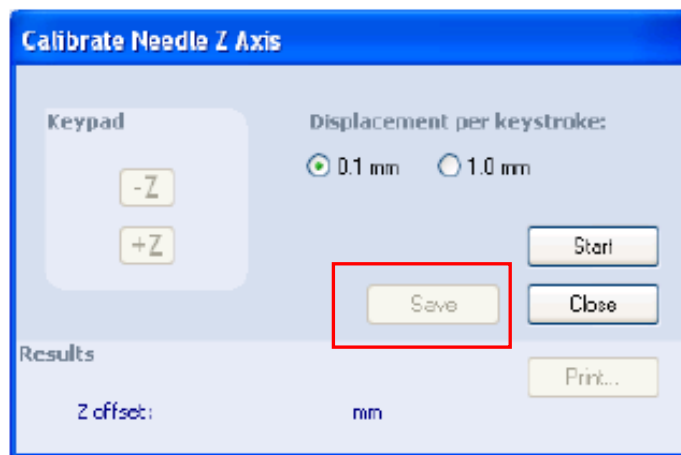


	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	

22.20. Detener hasta cuando se sienta que la tarjeta no se desplaza libremente.

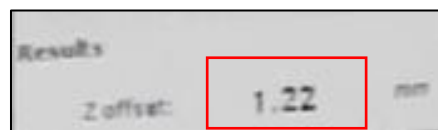
22.21. Con el icono (+Z), subir de 0.1mm en 0.1mm hasta que se sienta que la tarjeta se desplaza libremente.

22.22. Regresar al software y guarde la altura; para ello dar clic a la opción «**Save**»





22.23. Seleccione la opción **Yes**.

22.24. Verificar que la altura este entre 2mm que es la altura equivalente a la del fondo del vial y la aguja.



22.25. Cerrar la ventana.

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	

23. PURGADO DE LAS LINEAS EN CASOS DE CONTAMINACIÓN.

⚠ Advertencia. Este procedimiento es únicamente para casos de contaminación, ya que el purgado del equipo se realiza de manera automática.

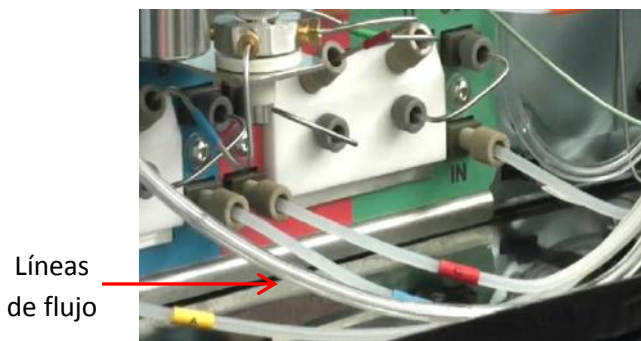
Cuidados del Sistema Administrador Cuaternario de Solventes.



- Siempre hay que realizar un *Lavado de sellos* antes de utilizar el equipo.
- Verificar que no haya contaminación en los solventes (filtrado recomendable con filtro de 0.21 micras para evitar el tapado de las columnas)
- Verificar antes y después de usar el equipo que siempre el sensor este encendido.

! Precaución: Para evitar la contaminación de las líneas, columna, etc. Es necesario primordialmente antes de empezar a trabajar verificar las condiciones de los solventes todos los días (revisar que no haya contaminación: microbiana, precipitación)

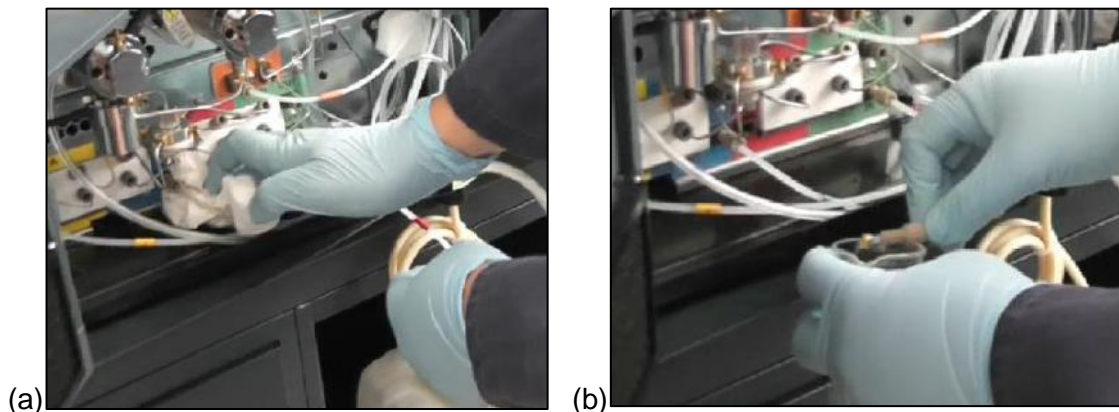
⚠ Advertencia. Los componentes pueden estar contaminados con materiales peligrosos y/o tóxicos. Siempre use guantes limpios, sin talco y resistentes a compuestos químicos, mientras se realiza este procedimiento.

- 23.1. Abrir la caja de seguridad de la bomba.
- 23.2. Sacar el filtro del frasco contenedor de la línea que se desea purgar.
- 23.3. Con las manos quitar la línea contaminada.



	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	

23.4. Colocar un trapo limpio y un vaso debajo de la línea para que caigan los residuos de solvente.





23.5. Utilizando una jeringa succionar la línea contaminada.

23.6. Colocar el filtro en el frasco del solvente y succionar con la jeringa la línea contaminada las veces necesarias hasta observar que no haya contaminación.



23.7. Finalmente colocar la línea en su lugar.



	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	

! Precaución: Tenga cuidado de no apretar mucho la línea al momento de colocarla, solo al tope ya que de lo contrario pueden aflojarla y causar fugas.

! Precaución: Cuando se va hacer un cambio de solvente por otro que no sea el mismo, es necesario lavar el filtro con agua antes de meterlo en el frasco con el nuevo solvente.

! Precaución: Cuando se va hacer un cambio de fases de una normal a una reversa, es necesario primero hacer un lavado con un disolvente miscible; por ejemplo, metanol en vez de agua para evitar la contaminación de la muestra o la precipitación de la misma.

ANEXO A

RECOMENDACIONES PARA EL MANTENIMIENTO DEL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASS-H



1.- Lavar el sistema con metanol o acetonitrilo de grado HPLC filtrado y desgasificado.

! Indicación: sólo se deben utilizar solventes de grado HPLC completamente desgasificados. Si hubiera gas disuelto en la fase móvil podría formar burbujas en la celda de flujo e impedir que el detector efectúe correctamente la prueba de diagnóstico de Reference Energy (Energía de referencia).

2.- Bombear fase móvil durante 15 minutos por lo menos.



3.- Comprobar que la celda del detector esté llena de solvente y verificar que no tenga burbujas.

! Precaución: si la celda contiene aire, el detector no se pondrá en marcha correctamente. Para evitar dañar la celda de flujo con el paso de luz, no se debe encender la lámpara del detector cuando no hay solvente en la celda o cuando esté seca.

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	


Se deben seguir estas recomendaciones generales a la hora de realizar un análisis UPLC:

- Utilizar solventes, soluciones bufér y aditivos de alta calidad (específicos para HPLC o MS).
- Utilizar agua de alta calidad (específica para HPLC o MS).
- Los solventes acuosos se deben de cambiar diario y los solventes orgánicos se deben cambiar mínimo cada semana.
- Filtrar diario los solventes para minimizar el crecimiento microbiano.
- Se deben utilizar siempre filtros de solventes en los tubos de las botellas de solventes.
- Filtrar las soluciones bufér de preferencia con un filtro de membrana de 0.2 µm.
- Almacenar las soluciones concentradas y utilizarlas para preparar las soluciones de trabajo.
- No añadir solución bufér nueva a la vieja, ya que esto puede favorecer el crecimiento microbiológico.
- No bloquear la línea de purga del desgasificador; recortar el tubo si es necesario.
- No se deben sumergir en líquidos los conductos de evacuación de desechos y del desgasificador.
- Lavar las soluciones bufér del sistema con agua inmediatamente después de utilizarlas.
- Utilizar un solvente orgánico al 70-80% en agua como solvente de "almacenamiento", si el sistema va a permanecer inactivo durante un periodo de tiempo prolongado (más de 72 horas).
- Mantener el conducto del lavado de líneas llenado.
- Llenar los conductos de solvente durante la puesta en marcha del sistema.
- Supervisar el nivel de desechos para garantizar que nunca llegue a niveles demasiado altos.
- Iniciar los gradientes con algo de contenido orgánico (0.1%, por ejemplo) para lograr la formación de un gradiente más homogéneo y predecible que cuando se inicia sin contenido orgánico.
- Utilizar la opción **Load Ahead** (Precarga) si se desea utilizar un tiempo de ciclos más corto.
- No utilizar la opción **Load Ahead** (Precarga) o **Loop offline** (Desconexión del bucle) cuando se solucionan problemas de arrastre.
- Al instalar o retirar una columna, mantener en su sitio en todo momento el control electrónico de la temperatura del horno de precalentamiento activo.

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	

ANEXO B

CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE LOS SOLVENTES.

 **Advertencia:** Para evitar los riesgos implícitos a la manipulación de compuestos químicos, se recomienda cumplir siempre con las buenas prácticas de laboratorio cuando se trabaje con el sistema, se manipulen solventes o se cambien tubos. Leer las hojas de datos sobre seguridad de materiales referentes a los solventes que se van a utilizar.

1. Solvente de lavado


El sistema de lavado utiliza un solo solvente para limpiar la parte exterior de la aguja de muestras y rellenar el sistema de lavado. El solvente no entra en la trayectoria del flujo de inyección.

2. Solvente de purga

La función principal del solvente de purga es transportar la muestra a lo largo de la trayectoria de inyección. El solvente de purga rellena también la jeringa de muestras y la trayectoria de inyección. La inyección de solvente en la columna solo se produce durante la dilución automática, cuando se utiliza como el solvente de dilución.



3. Acondicionamiento activo del solvente

Las aplicaciones de HPLC y UPLC se benefician del calentamiento de la fase móvil antes de que llegue a la columna, lo que mejora las separaciones cromatográficas. El horno de columnas ACQUITY UPLC H-Class utiliza un precalentador para acondicionar el solvente a medida que entra en la columna. El horno de precalentamiento activo es una fuente de calor que aumenta la temperatura de la fase móvil entrante (y de la muestra inyectada) hasta la temperatura programada del compartimento de columnas.

 **Indicación:** el precalentamiento activo es la configuración predeterminada del sistema ACQUITY UPLC H-Class. Se puede utilizar un estabilizador de columnas pasivo opcional para los métodos cromatográficos existentes que no admitan el precalentamiento activo.

4. Solventes limpios

Los solventes limpios proporcionan resultados reproducibles y permiten un mantenimiento mínimo de los módulos.

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	

Los solventes sucios pueden producir ruido en la línea base, pueden obstruir los filtros del recipiente de solventes, los filtros de entrada y los conductos capilares.

5. Calidad de los solventes

Para obtener los mejores resultados posibles se deben utilizar solventes de calidad HPLC/MS, el requisito mínimo es calidad HPLC. Es necesario filtrar los solventes a través de un filtro de membrana apropiado.

! Recomendación: comprobar que el solvente seleccionado es compatible con las recomendaciones del fabricante o el proveedor del filtro de membrana.

6. Preparación de los solventes

Mediante una preparación adecuada de los solventes, principalmente mediante filtración, se pueden evitar muchos problemas de bombeo.

! Recomendación: siempre se debe utilizar material de vidrio ámbar para inhibir el crecimiento microbiano.

7. Agua



Se recomienda utilizar únicamente agua procedente de un sistema de purificación de agua de alta calidad. Si el sistema de agua no proporciona agua filtrada, se debe filtrar con un filtro de membrana de 0.2 µm antes de utilizarla.

! Precaución: el uso de agua al 100% puede producir crecimiento microbiano. Se recomienda cambiar las soluciones que contengan agua al 100% cada día. Si se añade una pequeña cantidad de solvente orgánico (~10%) se evita el crecimiento microbiano.

8. Utilizar soluciones bufér

Ajustar el pH de los bufér acuosos. Filtrarlos para eliminar el material insoluble y, a continuación, mezclarlos con los modificadores orgánicos adecuados. Tras utilizar un bufér, se debe enjuagar la bomba mediante un rellenado en húmedo de, al menos, cinco volúmenes del sistema con agua destilada o desionizada de calidad HPLC.

Si la bomba ha estado parada durante más de un día, debe enjuagarse con una solución de metanol/agua al 20% para evitar el desarrollo de microorganismos.

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	

! Precaución: algunas soluciones bufér pueden ser incompatibles con los espectrómetros de masas. Se recomienda consultar la documentación que acompaña al instrumento para conocer las soluciones bufér compatibles.

! Indicación: para evitar las precipitaciones salinas, la concentración de las soluciones tampón no volátiles no debe ser superior a **100 mM**.

9. Solventes bufér

Al utilizar un bufér, se deben elegir reactivos de buena calidad y filtrarlos a través de un filtro de membrana de 0.2 µm.

! Recomendación: para evitar el crecimiento microbiano, se debe cambiar el 100 % de la fase móvil acuosa cada día.

Recomendaciones sobre los solventes

! Indicación: es posible utilizar algunos solventes de fase normal en el sistema si se llevan a cabo las modificaciones apropiadas.



10. Directrices generales sobre los solventes

Se deben seguir siempre las siguientes directrices generales sobre solventes:

- Utilizar material de vidrio ámbar para inhibir el crecimiento microbiano.
- Filtrar los solventes. Las partículas pequeñas pueden bloquear los conductos capilares del sistema. Filtrar los solventes también mejora el rendimiento de la válvula de retención.

11. Solventes recomendados

- Acetonitrilo
- Mezclas de acetonitrilo/agua
- Isopropanol
- Metanol
- Mezclas de metanol/agua
- Agua

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	

12. Otros solventes

Se pueden utilizar los solventes siguientes. Sin embargo, se debe tener en cuenta que estos solventes pueden reducir el tiempo de vida útil del instrumento. Si se utilizan habitualmente los solventes de esta lista, se recomienda instalar el kit de compatibilidad con hexano/THF.

- Tetrahidrofurano (THF)
- Hexano
- Acetona
- Acetato de etilo
- Hexafluoroisopropanol (HFIP)

Notas:

- 1-4% de soluciones acuosas de HFIP para aplicaciones de oligonucleótidos.
- El HFIP no se debe utilizar nunca junto con eluyentes de lavado.



Al cambiar los solventes de fase reversa habituales se debe tener en cuenta la polaridad del solvente. Aclarar el sistema con un solvente de polaridad intermedia (como isopropanol) antes de introducir solventes no polares como el THF o el hexano.

13. Aditivos/modificadores


- Ácido etilendiaminotetraacético al 0.1% (EDTA)
- Ácido heptafluorobutírico al 0.1%
- Trietilamina (TEA) al 0.1 %
- Ácido trifluoroacético (TFA) al 0.1 %
- Ácido fórmico al 0.2%
- Ácido acético al 0.3%
- 10 mM de bicarbonato de amonio
- 10 mM de tampón fosfato
- 50 mM de acetato amónico
- 50 mM de hidróxido de amonio

14. Disolventes de la muestra

- Acetonitrilo
- Mezclas de acetonitrilo/agua
- Cloroformo
- Dimetilformamida (DMF)
- Dimetilsulfóxido (DMSO)

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	

- Iso-octano
- Isopropanol
- Metanol
- Mezclas de metanol/agua
- Diclorometano
- Agua

 **Recomendación:** no utilizar soluciones bufér para lavar las agujas.



15. Agentes de limpieza

- Ácido fosfórico ($\leq 30\%$)
- Hidróxido de sodio ($\leq 1M$)
- Ácido fórmico ($\leq 10\%$)

16. Solventes NO permitidos

Se deben evitar los siguientes solventes:

- Solventes que contengan halógenos: flúor, bromo o yodo.
- Ácidos fuertes. (Utilizarlos sólo con una concentración baja, $< 5\%$, a menos que sea como agentes de limpieza. Evitar utilizar ácidos como fases móviles cuando su pH sea < 1.0 .)
- Los compuestos peroxidables como los éteres de calidad UV, THF no estabilizado, dioxano y diisopropiléter. (Si se tienen que utilizar compuestos peroxidables, es necesario comprobar que se filtran a través de óxido de aluminio seco para adsorber los peróxidos que se han formado.)
- Soluciones que contengan concentraciones elevadas de agentes complejantes como el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA).
- Por lo general, no es recomendable utilizar cloroformo, diclorometano, solventes halogenados ni tolueno en los sistemas ACQUITY UPLC HClass.
- No obstante, se pueden utilizar estos solventes en disoluciones débiles ($< 10\%$) como aditivos, disolventes de la muestra o modificadores.
- Cuando se utiliza THF o hexano, se deben instalar tubos de acero inoxidable y minimizar el uso de los componentes de PEEK™.
- Los solventes acuosos no deben permanecer en un sistema cerrado ya que se utilizan como substrato para las colonias microbianas. Los microbios pueden obstruir los filtros del sistema y los conductos capilares. *Para evitar su proliferación, se debe*

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	

agregar una pequeña cantidad (~10%) de un solvente orgánico tales como acetonitrilo o metanol.

- No se recomienda utilizar ácido metanosulfónico en los sistemas ACQUITY UPLC H-Class.

17. Recomendaciones sobre el sistema administrador cuaternario de solventes.

- El sistema de lavado de las líneas no debe secarse nunca, especialmente durante las separaciones que utilizan una fase móvil polar.
- El alcohol isopropílico o las mezclas de metanol y agua, como un 20% de metanol/agua, son solventes de lavado de las líneas efectivas para las mezclas de solventes de THF.
- Para las aplicaciones de fase reversa, utilizar soluciones de lavado de las líneas acuosas con un componente orgánico débil (por ejemplo: metanol/agua en una proporción de 1:9).
- No utilizar soluciones de lavado de las líneas orgánicas al 100%.

18. Recomendaciones sobre el sistema administrador de muestras



- No utilizar concentraciones de THF o hexano superiores al 10% como solvente de purga.
- Se admite el uso de disolventes orgánicos de la muestra habituales como el dimetilsulfóxido (DMSO) y la dimetilformamida (DMF).

19. Recomendaciones sobre el detector

Para transportar una celda de flujo a temperaturas por debajo de los 5 °C, se debe llenar con alcohol.



20. Propiedades de los solventes comunes

La siguiente tabla contiene una lista con las propiedades de algunos de los solventes de uso común en cromatografía.

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	



Propiedades de los solventes (Eluyentes) comunes:

Eluyente	Presión de vapor mm Hg (Torr)	Punto de ebullición (°C)	Punto de inflamación (°C)
Acetona	184.5 a 20 °C	56.29	-20
Acetonitrilo	88.8 a 25 °C	81.6	6
Acetato de <i>n</i> -butilo	7.8 a 20 °C	126.11	22
Alcohol <i>n</i> -butílico	4.4 a 20 °C	117.5	37
Cloruro de <i>n</i> -butilo	80.1 a 20 °C	78.44	-9
Clorobenceno	8.8 a 20 °C	131.69	28
Cloroformo	158.4 a 20 °C	61.15	
Ciclohexano	77.5 a 20 °C	80.72	-20
Ciclopentano	400 a 20 °C	49.26	-7
<i>o</i> -diclorobenceno	1.2 a 20 °C	180.48	66

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	

Continuación

Eluyente	Presión de vapor mm Hg (Torr)	Punto de ebullición (°C)	Punto de inflamación (°C)
Diclorometano	350 a 20 °C	39.75	
Dimetilacetamida	1.3 a 25 °C	166.1	70
<i>N,N</i> -dimetilformamida	2.7 a 20 °C	153.0	58
Dimetilsulfóxido	0.6 a 25 °C	189.0	88
1,4-dioxano	29 a 20 °C	101.32	12
Acetato de etilo	73 a 20 °C	77.11	-4
Alcohol etílico	43.9 a 20 °C	78.32	15
Éter etílico	442 a 20°C	34.55	-45
Dicloruro de etileno	83.35 a 20 °C	83.48	13
Heptano	35.5 a 20 °C	98.43	-4
Hexano	124 a 20 °C	68.7	-22
Iso-octano	41 a 20 °C	99.24	-12
Alcohol isobutílico	8.8 a 20 °C	107.7	28
Alcohol isopropílico	32.4 a 20 °C	82.26	12
Miristato de isopropilo	<1 a 20 °C	192.6	164
Metanol	97 a 20 °C	64.7	11
Éter metil- <i>t</i> -butílico	240 a 20 °C	55.2	-28
Metiletilcetona	74 a 20 °C	79.64	-9
Metilisobutil cetona	16 a 20 °C	117.4	18
<i>N</i> -metilpirrolidona	0.33 a 25 °C	202.0	86
Pentano	420 a 20 °C	36.07	-49
Alcohol <i>n</i> -propílico	15 a 20 °C	97.2	23
Carbonato de propileno		241.7	135
Piridina	18 a 25 °C	115.25	20
Tetrahidrofurano	142 a 20 °C	66.0	-14
Tolueno	28.5 a 20 °C	110.62	4
1,2,4-triclorobenceno	1 a 20 °C	213.5	106

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	

Continuación



Eluyente	Presión de vapor mm Hg (Torr)	Punto de ebullición (°C)	Punto de inflamación (°C)
Trietilamina	57 a 25 °C	89.5	-9
Ácido trifluoroacético	97.5 a 20 °C	71.8	-3
Agua	17.54 a 20 °C	100.0	
<i>o</i> -xileno	6 a 20 °C	144.41	17

21. Miscibilidad de los solventes

Antes de cambiar los solventes, se debe consultar la tabla siguiente para determinar su miscibilidad. Se deben tener en cuenta los efectos siguientes:

- Los cambios en los que se empleen dos solventes miscibles se pueden realizar de manera directa. Los cambios en los que estén involucrados dos solventes que no sean totalmente miscibles (por ejemplo, de cloroformo a agua), requieren un solvente intermedio, como el *n*propanol.
- La temperatura puede afectar a la miscibilidad de los solventes. Si se está trabajando con una aplicación a alta temperatura, se debe tener en cuenta el efecto de la temperatura sobre la solubilidad del solvente.
- Las soluciones bufér disueltas en agua se pueden precipitar cuando se mezclan con solventes orgánicos.

Cuando se cambia de una solución bufér fuerte a un solvente orgánico, se debe enjuagar a fondo el sistema con agua destilada antes de incorporar el solvente orgánico.

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	

Miscibilidad de los solventes:



Índice de polaridad	Eluyente	Viscosidad cP, 20 °C (@1 atm)	Punto de ebullición en °C (1 atm)	Número de miscibilidad (M)	Valor de corte λ (nm)
0.0	N-hexano	0.313	68.7	29	—
1.8	Trietilamina	0.38	89.5	26	—
4.2	Tetrahidrofurano (THF)	0.55	66.0	17	220
4.3	1-propanol	2.30	97.2	15	210
4.3	2-propanol	2.35	117.7	15	—
5.2	Etanol	1.20	78.3	14	210
5.4	Acetona	0.32	56.3	15, 17	330
5.5	Alcohol bencílico	5.80	205.5	13	—
5.7	Metoxietanol	1.72	124.6	13	—
6.2	Acetonitrilo	0.37	81.6	11, 17	190
6.2	Ácido acético	1.26	117.9	14	—
6.4	Dimetilformamida	0.90	153.0	12	—
6.5	Dimetilsulfóxido	2.24	189.0	9	—
6.6	Metanol	0.60	64.7	12	210
9.0	Agua	1.00	100.0	—	—

22. Utilización de los valores de miscibilidad (números M)

Los valores de miscibilidad (números M) se deben utilizar para predecir la miscibilidad de un líquido con un solvente estándar.

Para predecir la miscibilidad de dos líquidos, se debe restar el valor M más pequeño del valor M más grande.

- Si la diferencia entre los dos valores M es de 15 o menos, los dos líquidos son miscibles en todas las proporciones a 15 °C.
- Una diferencia de 16 indica una temperatura de solución crítica entre 25 y 75 °C, con 50 °C como temperatura óptima.

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	

- Si la diferencia es de 17 o más, los líquidos son inmiscibles o su temperatura de solución crítica se encuentra por encima de los 75 °C.

Algunos solventes son inmiscibles con los solventes que se encuentran en cualquiera de los extremos de la escala de lipofilidad. Estos solventes reciben un valor M doble.

- El primer valor, siempre menor que 16, indica el grado de miscibilidad con solventes muy lipofílicos.
- El segundo valor se aplica al extremo opuesto de la escala. Una gran diferencia entre estos dos valores indica un rango limitado de miscibilidad.

Por ejemplo, algunos fluorocarburos son inmiscibles con todos los solventes estándar y presentan números M de 0 a 32. Dos líquidos con números M dobles son generalmente miscibles entre sí.

Un líquido se clasifica en el sistema de valores M mediante pruebas de miscibilidad con una serie de solventes estándar. Luego se suma o se resta un término de corrección de 15 unidades del punto de corte de la miscibilidad.



23. Estabilizadores de solventes

No se debe dejar que se sequen los solventes que contengan estabilizadores, como THF con hidroxitolueno butilado (BHT) en la trayectoria de flujo del sistema. Si la trayectoria de flujo, incluida la celda de flujo del detector, está seca, se puede contaminar con los residuos de los estabilizadores, por lo que deberá someterse a una limpieza profunda para recuperar las condiciones iniciales.

24. Viscosidad de los solventes

Por lo general, la viscosidad no es importante cuando se trabaja con un solo solvente o con una presión baja. No obstante, con una cromatografía en gradiente, los cambios de viscosidad que tienen lugar cuando se mezclan los solventes en distintas proporciones pueden producir cambios de presión durante el análisis. Por ejemplo, una mezcla de agua/metanol 1:1 produce una presión dos veces mayor que el agua o el metanol por separado.

Si no se conoce hasta qué punto afectarán al análisis, los cambios de presión se debe controlar la presión durante el proceso.

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	

25. Selección de la longitud de onda

Las tablas de esta sección proporcionan los valores límite de UV para:

- Solventes comunes
- Fases móviles mezcladas comunes

26. Valores de corte de UV para solventes comunes

En la tabla siguiente se muestran los límites de UV para algunos solventes cromatográficos habituales (se trata de la longitud de onda a la que la absorbancia del solvente es igual a 1 UA). El funcionamiento a una longitud de onda cercana o por debajo del valor límite aumenta el ruido de la línea base debido a la absorbancia del solvente.



Longitudes de onda del valor de corte de UV para solventes cromatográficos comunes:

Eluyente	Valor de corte de UV (nm)
Acetona	330
Acetonitrilo	190
Dietilamina	275
Etanol	210
Isopropanol	205
Éter isopropílico	220
Metanol	205
n-Propanol	210
Tetrahidrofurano (THF)	230

27. Fases móviles mezcladas

La tabla siguiente contiene los valores de longitud de onda límite aproximados para otros solventes, soluciones bufér, detergentes y fases móviles. Las concentraciones de solventes representadas son las que se utilizan con más frecuencia.

Si se desea utilizar una concentración diferente, se puede determinar la absorbancia aproximada utilizando la ley de Beer, ya que la absorbancia es proporcional a la concentración.



	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	

Valores de corte de la longitud de onda para diferentes fases móviles:

Fase móvil	Valor de corte de UV (nm)	Fase móvil	Valor de corte de UV (nm)
Ácido acético, 1%	230	Cloruro de sodio, 1 M	207
Acetato de amonio, 10 mM	205	Citrato sódico, 10 M	225
Bicarbonato amónico, 10 mM	190	Duodecilsulfato de sodio	190
Polioxietileno (35) lauril éter (BRIJ 35), 0.1%	190	Formiato sódico, 10 mM	200
3-[(3-colamidopropil)-dimetilamonio]-1-propanosulfonato (CHAPS) 0.1%	215	Trietilamina, 1%	235
Fosfato diamónico, 50 mM	205	Ácido trifluoroacético, 0.1%	190
(Etilendiamina) sal disódica del ácido tetraacético (EDTA disódico), 1 mM	190	TRIS HCl, 20 mM, pH 7.0, pH 8.0	202, 212
4-(2-hidroxietilo)-1-ácido piperazinaetanosulfónico (HEPES), 10 mM, pH 7.6	225	Triton™ X-100, 0.1%	240
Ácido clorhídrico, 0.1%	190	Reactivo A PIC® de Waters, 1 vial/litro	200
Ácido morfolinoetanosulfónico (MES), 10 mM, pH 6.0	215	Reactivo B-6 PIC de Waters, 1 vial/litro	225

Valores de corte de la longitud de onda para diferentes fases móviles: (cont.)

Fase móvil	Valor de corte de UV (nm)	Fase móvil	Valor de corte de UV (nm)
Fosfato potásico, monobásico, 10 mM	190	Reactivo B-6 PIC de Waters, UV baja, 1 vial/litro	190
dibásico, 10 mM	190		
Acetato sódico, 10 mM	205	Reactivo D-4 PIC de Waters, 1 vial/litro	190

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	

28. Absorbancia de la fase móvil



En esta sección se muestran las absorbancias a diferentes longitudes de onda para las fases móviles más utilizadas. La fase móvil se debe elegir con precaución para reducir el ruido de la línea base.

La mejor fase móvil para una aplicación determinada es la que es transparente en las longitudes de onda de detección elegidas. Una fase móvil de estas características garantiza que cualquier absorbancia se deba únicamente a la muestra. La absorbancia de la fase móvil también reduce el rango dinámico lineal del detector en la cantidad de absorbancia que se sustrae en la puesta a cero automática. La longitud de onda, el pH y la concentración de la fase móvil repercuten en su absorbancia. En la tabla siguiente se pueden ver ejemplos de diferentes fases móviles.

Las absorbancias que se muestran en la tabla siguiente se basan en una longitud de la trayectoria de 10 mm.



Absorbancia de la fase móvil medida con referencia a aire o agua:

	Absorbancia en la longitud de onda especificada (nm)									
	200	205	210	215	220	230	240	250	260	280
Eluyentes										
Acetonitrilo	0.05	0.03	0.02	0.01	0.01	<0.01	—	—	—	—
Metanol (no desgasificado)	2.06	1.00	0.53	0.37	0.24	0.11	0.05	0.02	<0.01	—
Metanol (desgasificado)	1.91	0.76	0.35	0.21	0.15	0.06	0.02	<0.01	—	—
Isopropanol	1.80	0.68	0.34	0.24	0.19	0.08	0.04	0.03	0.02	0.02
Tetrahidrofurano no estabilizado (THF, reciente)	2.44	2.57	2.31	1.80	1.54	0.94	0.42	0.21	0.09	0.05
Tetrahidrofurano no estabilizado (THF, no reciente)	>2.5	>2.5	>2.5	>2.5	>2.5	>2.5	>2.5	>2.5	2.5	1.45
Ácidos y bases										
Ácido acético, 1%	2.61	2.63	2.61	2.43	2.17	0.87	0.14	0.01	<0.01	—
Ácido clorhídrico, 0.1%	0.11	0.02	<0.01	—	—	—	—	—	—	—
Ácido fosfórico, 0.1%	<0.01	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Ácido trifluoroacético	1.20	0.78	0.54	0.34	0.22	0.06	<0.02	<0.01	—	—
Fosfato diamónico 50 mM	1.85	0.67	0.15	0.02	<0.01	—	—	—	—	—
Trietilamina, 1%	2.33	2.42	2.50	2.45	2.37	1.96	0.50	0.12	0.04	<0.01

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	



Absorbancia de la fase móvil medida con referencia a aire o agua: (cont.)

	Absorbancia en la longitud de onda especificada (nm)									
	200	205	210	215	220	230	240	250	260	280
Tampones y sales										
Acetato de amonio, 10 mM	1.88	0.94	0.53	0.29	0.15	0.02	<0.01	—	—	—
Bicarbonato de amonio, 10 mM	0.41	0.10	0.01	<0.01	—	—	—	—	—	—
Ácido etilendinitrilo tetraacético, sal sódica (EDTA disódico), 1 mM	0.11	0.07	0.06	0.04	0.03	0.03	0.02	0.02	0.02	0.02
4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinetanosulfonato (HEPES), 10 mM, pH 7.6	2.45	2.50	2.37	2.08	1.50	0.29	0.03	<0.01	—	—
Ácido morfolinoetanosulfónico (MES), 10 mM, pH 6.0	2.42	2.38	1.89	0.90	0.45	0.06	<0.01	—	—	—
Fosfato potásico, monobásico (KH ₂ PO ₄), 10 mM	0.03	<0.01	—	—	—	—	—	—	—	—
Fosfato potásico, dibásico, (K ₂ HPO ₄), 10 mM	0.53	0.16	0.05	0.01	<0.01	—	—	—	—	—
Acetato sódico, 10 mM	1.85	0.96	0.52	0.30	0.15	0.03	<0.01	—	—	—
Cloruro sódico, 1 M	2.00	1.67	0.40	0.10	<0.01	—	—	—	—	—
Citrato sódico, 10 mM	2.48	2.84	2.31	2.02	1.49	0.54	0.12	0.03	0.02	0.01
Formiato sódico, 10 mM	1.00	0.73	0.53	0.33	0.20	0.03	<0.01	—	—	—
Fosfato sódico, 100 mM, pH 6.8	1.99	0.75	0.19	0.06	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	<0.01
Tris HCl, 20 mM, pH 7.0	1.40	0.77	0.28	0.10	0.04	<0.01	—	—	—	—
Tris HCl, 20 mM, pH 8.0	1.80	1.90	1.11	0.43	0.13	<0.01	—	—	—	—

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	



Absorbancia de la fase móvil medida con referencia a aire o agua: (cont.)

	Absorbancia en la longitud de onda especificada (nm)									
	200	205	210	215	220	230	240	250	260	280
Reactivos PIC® de Waters										
PIC A, 1 vial/L	0.67	0.29	0.13	0.05	0.03	0.02	0.02	0.02	0.02	<0.01
PIC B6, 1 vial/L	2.46	2.50	2.42	2.25	1.83	0.63	0.07	<0.01	—	—
PIC B6, UV baja, 1 vial/L	0.01	<0.01	—	—	—	—	—	—	—	—
PIC D4, 1 vial/L	0.03	0.03	0.03	0.03	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.01
Detergentes										
BRIJ 35, 1%	0.06	0.03	0.02	0.02	0.02	0.01	<0.01	—	—	—
3-[(3-col-amidopropil)-dimetilamonio]-1-propanosulfonato (CHAPS), 0.1%	2.40	2.32	1.48	0.80	0.40	0.08	0.04	0.02	0.02	0.01
Dodecil sulfato de sodio (SDS), 0.1%	0.02	0.01	<0.01	—	—	—	—	—	—	—
4-octilfenolpolietoxilato (Triton™ X-100), 0.1%	2.48	2.50	2.43	2.42	2.37	2.37	0.50	0.25	0.67	1.42
Polioxietilensorbitan monolaurato (Tween™ 20), 0.1%	0.21	0.14	0.11	0.10	0.09	0.06	0.05	0.04	0.04	0.03

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: MAN-OP-01	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Enero-2015	
		Fecha de vencimiento: Enero-2018	

REFERENCIAS.



- 1) ACQUITY UPLC H-Class. Guía del sistema. Revisión B. Waters Corporation. (2010).
- 2) ACQUITY UPLC H-Class y el Sistema biológico H-Class. Especificaciones del sistema. Revisión B. Waters Corporation. (2010).
- 3) Detector de red de fotodiodos (PDA) y Detector de red de fotodiodos eλ para ACQUITY UPLC. Guía de mantenimiento y descripción general. Revisión A. Waters Corporation. (2010).
- 4) Empower Software. Data Acquisition and Processing. Revisión B. Waters Corporation. (2002).
- 5) López, R. (2013). Curso de Espectrometría de Masas [Vídeo] LEDEFAR. UNAM.
- 6) Norma Mexicana IMNC. Sistemas de gestión de calidad. Fundamentos y vocabulario. Instituto Mexicano de Normalización y Certificación. ISO 9000:2005. NMX-CC-9000-IMNC-2008.
- 7) VIM: 2008, International vocabulary of metrology – Basic and general concepts and associated terms.

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Procedimiento de Operación para el equipo ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: PNO-TC-004	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

Procedimiento de Operación para el equipo ACQUITY UPLC CLASE H

LABORATORIO DE ENSAYOS DE
DESARROLLO FARMACEUTICO



LEDEFAR

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Procedimiento de Operación para el equipo ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: PNO-TC-004	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

**PNO-TC-004 Procedimiento de Operación para el equipo
ACQUITY UPLC CLASE H**



Copia controlada No. : <<Insertar número de copia>>

	Nombre	Puesto	Firma	Fecha
Elaboró:				
Revisó:				
Aprobó:				

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Procedimiento de Operación para el equipo ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: PNO-TC-004	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

ÍNDICE

Sección	Página
1. OBJETIVO Y ALCANCE.	4
1.1 Objetivo.	4
1.2 Alcance.	4
2. RESPONSABILIDADES	4
2.1 Coordinador General	4
2.2 Responsable Técnico.	4
2.3 Analista Químico	4
3. DEFINICIONES	4
4. PROCEDIMIENTO	6
Colocación de la columna	7
Acondicionamiento y puesta en marcha del sistema	8
Arranque de la secuencia	9
Lavado de la Columna y Apagado del equipo	10
Identificación, Integración y Adecuabilidad del Sistema	10
Cuantificación y Reporte	11
Calibración del Equipo	11
5. REFERENCIAS	11

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Procedimiento de Operación para el equipo ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: PNO-TC-004	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

1. OBJETIVO Y ALCANCE.

1.1 Objetivo.

Describir de manera detallada las operaciones necesarias que se deben de llevar a cabo para el manejo del equipo ACQUITY UPLC Clase H que se encuentra localizado en el Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico (LEDEFAR).

1.2 Alcance.

Este procedimiento aplica al equipo ACQUITY UPLC Clase H propiedad del LEDEFAR y deberá ser aplicado por los usuarios que operan el equipo, localizado en el área UPLC UPLC/MS/MS del Laboratorio 5.

2. RESPONSABILIDADES.

2.1 Responsable del laboratorio.

Aprobación del presente procedimiento.

2.2 Responsable Técnico.

Revisar y asegurar el cumplimiento del procedimiento, así como, la actualización del mismo.

2.3 Analista Químico.

Cumplir con los lineamientos descritos en el presente procedimiento, así como, reportar cualquier anomalía detectada en la aplicación del mismo.



3. DEFINICIONES

Adecuabilidad del sistema. Verificación de que el sistema opera con base a criterios que permitan asegurar la confiabilidad de los resultados de un método analítico. [2]

Calibración. Operación que, bajo condiciones especificadas, en un primer paso, establece una relación entre los valores de las magnitudes con su incertidumbre de medición provista por patrones de medición y las indicaciones correspondientes con incertidumbres de medición asociadas y, en segundo paso, usa esta información para establecer una relación para obtener un resultado de medición de una indicación. [5]

Empower. El software Empower presenta una interfaz de usuario-gráfica basada en iconos que permite adquirir, procesar, gestionar y almacenar datos cromatográficos, así como realizar informes sobre dichos datos. [1]

Ensayo/prueba. Determinación de una o más características de acuerdo con un procedimiento. [4]

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Procedimiento de Operación para el equipo ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: PNO-TC-004	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

Método analítico. Descripción de la secuencia de actividades, materiales y parámetros que se deben cumplir para llevar a cabo el análisis de un componente específico de la muestra. [3]

Método de informe. Sirve como una plantilla para organizar los datos, resultados, curvas de calibración, y los contenidos de los métodos en un informe generado. El método informe es independiente de los datos que contiene el informe. Un informe puede incluir datos procesados o sin procesar. [3]

Método de instrumento. Especifica los parámetros de adquisición de datos, tales como la tasa de flujo y la longitud de onda de control de instrumentos. Los instrumentos incluyen bombas, sistemas administradores de disolventes, detectores, inyectoros automáticos, sistema administrador de muestras o simplemente para recoger datos. [3]

Método de procesamiento. Contiene un conjunto de instrucciones que definen los procesos de Empower de un canal o un canal 2D extraído 3D. Puede seleccionar si desea procesar los datos mediante ApexTrack o integración tradicional. Además, para diferenciar los picos de ruido, aplicar nombres de los componentes, para resumir los picos del grupo con nombre, para realizar cálculos de idoneidad del sistema y así sucesivamente. [3]

Método SET. Es un conjunto de instrucciones para Empower. Debe contener instrucciones con respecto a la recogida de datos, el método de instrumento, y que también puede contener un método de procesamiento, un método de informe. [3]



Muestra. Porción del material a evaluar. [5]

Procedimiento. Forma especificada para llevar a cabo una actividad o un proceso. [5]

Proyecto. Es un conjunto definido por el usuario de los métodos, resultados, filtros de vista, campos personalizados y los datos brutos. En el espacio de tablas del proyecto se reserva un área dentro de la base de datos para los métodos, resultados, filtros de vista y campos personalizados. Un directorio aparte almacena los archivos de datos brutos. [3]

Sample set (conjunto de muestras). Es el nombre que da potencia a los archivos de datos que obtiene después de ejecutar un método conjunto de la muestra. [3]

Sample set method (método conjunto de la muestra). Es una secuencia de instrucciones en forma de tabla que contiene la posición del vial, el volumen de inyección, el nombre de la muestra, y el nombre del conjunto de método. Puede contener otras instrucciones tales como el equilibrio y la calibración clara antes de una corrida y calibrar y cuantificar después de una corrida. [3]

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Procedimiento de Operación para el equipo ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: PNO-TC-004	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

4. PROCEDIMIENTO

4.1. Antes de iniciar la operación del equipo deberá llevar a cabo las siguientes indicaciones:

- Sólo se deben utilizar solventes de grado HPLC completamente desgasificados.
- Utilizar agua de alta calidad (Milli-Q)
- Los solventes acuosos se deberán cambiar diario y los solventes orgánicos mínimo cada semana.
- Filtrar diario los solventes para minimizar el crecimiento microbiano.
- Utilizar guantes libres de polvo mientras se aplica este procedimiento.

 **Indicación.** Seguir las instrucciones del filtrado de solventes de acuerdo al instructivo con el número de código **INST-EQ-01**

4.2. Una vez filtrados los solventes, colocar los frascos en la bandeja de botellas del cromatógrafo.

4.3. Encender el sistema administrador de muestras y el sistema administrador cuaternario de solventes pulsando el interruptor de encendido situado en la parte superior izquierda de la puerta de cada dispositivo.

4.4. Cuando los indicadores LED de los sistemas administradores se iluminen de color verde fijo, pulsar el indicador de encendido situado en la parte superior izquierda del detector.



4.5. A continuación, prenda la computadora.

NOMBRE DE USUARIO Y CONTRASEÑA DE LA COMPUTADORA.

User Name: **administrator** *Password:* **waters**

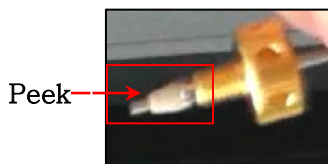
4.6. Dar clic al icono **ACQUITYC-Shortcut** que se encuentra localizado en la pantalla del escritorio e iniciar el software del sistema de datos cromatográficos.

4.7. Para activar los sensores de fugas. En la consola **ACQUITY UPLC System**, seleccionar **Control > Leak Sensors** (Control > Sensores de fugas), dar clic en **Enable All** (Activar todos).

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Procedimiento de Operación para el equipo ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: PNO-TC-004	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

COLOCACIÓN DE LA COLUMNA.

- 4.8. Abrir la compuerta de la columna, la cual se encuentra ubicada en la parte superior del sistema administrador de muestras.
- 4.9. Con mucho cuidado retirar el control electrónico de la temperatura.
- 4.10. *Quitar la mini unión de conexión.* Con las manos desenroscar los conectores ubicados en ambos extremos del tiempo muerto (conector en chapa de oro y plástico).



⚠ Advertencia: Tener cuidado de no perder el **peek** que se encuentra en la punta del conector en chapa de oro, ya que este evita las fugas en la columna.

! Precaución: Para evitar que se caiga el **peek** del conector se recomienda colocar el control electrónico de la temperatura en su lugar antes de colocar la columna.

- 4.12. Para colocar la columna, primero se deben de retirar los conectores de ambos extremos de la columna.



! Precaución: Para evitar que se pierdan los conectores pertenecientes a la columna, enroscar estos en los extremos de la mini unión de conexión.

- 4.13. Con las manos, colocar la columna siempre fijándose que la dirección del flujo se dirija del muestreador hacia el detector. *(La dirección del flujo viene indicada en la columna)*

- 4.14. Desenroscar la tuerca de acero inoxidable para poder marca la distancia de la columna y así evitar posibles fugas, enseguida enrosque el conector en chapa de oro.


- 4.15. Una vez ajustada la distancia de la columna, asegurar esta con la tuerca de acero inoxidable.

- 4.16. Situar el control electrónico de la temperatura en su lugar y acomodar la columna.

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Procedimiento de Operación para el equipo ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: PNO-TC-004	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

4.17. Colocar el chip controlador de inyecciones en la parte lateral derecha del instrumento.

4.18. Cerrar la compuerta.

 Para visualizar mejor el procedimiento de colocación de la columna, revisar la sección 17 “Colocación de la Columna” en el Manual de operación con número de código **MAN-OP-01**

ACONDICIONAMIENTO Y PUESTA EN MARCHA DEL SISTEMA.

4.19. Para poner en marcha el sistema, en la consola **ACQUITY UPLC System** hacer clic en **Control** y enseguida dirigirse a **Start up system** (Control > Puesta en marcha del sistema).

4.20. Una vez sincronizados los dispositivos en la pestaña **Prime Solvents** (preparar solventes) diríjase a **Sample Manager** (inyector) «**SM**» y seleccione el tiempo de lavado y ciclos de purgado.


4.21. Seleccione la pestaña «**QSM**» (Administrador cuaternario de solventes), active el lavado de sellos y elija las líneas de flujo de solvente (**A/B/C/D**) que se deseen purgar así como la duración de lavado.



4.22. Seleccione la pestaña «**Equilibrate to Method**» (Equilibrar método), y en la opción «**SM**», ajuste los valores de acondicionamiento de la temperatura de trabajo.


4.23. En la pestaña «**QSM**» seleccione las condiciones del flujo de trabajo de la bomba, así como las proporciones de fase móvil a utilizar.

 **Indicación:** Siempre utilizar en **Solvent A**>> Acetonitrilo, **Solvent B**>> Fase móvil, **Solvent C**>> Metanol y **Solvent D**>> Aqua.

4.24. Diríjase a la opción «**Other**» (Otro) y encienda la lámpara seleccionando la opción «**Lamp On**», enseguida dar clic a la opción «**Start**» (Comienzo).

 **Indicación.** Observar en la parte inferior izquierda de la consola ACQUITY UPLC que el estado del sistema (**System Status**) corra correctamente.


	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Procedimiento de Operación para el equipo ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: PNO-TC-004	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

 Para ver los parámetros de acondicionamiento, revisar el Manual de operación con número de código **MAN-OP-01**


ARRANQUE DE LA SECUENCIA

4.25. Dar doble clic al icono «**Empower**» el cual se encuentra localizado en la pantalla del escritorio.

4.26. En el cuadro de texto, Inserte el nombre y contraseña. Dar clic en **Advanced** (Avanzar)

 **Indicación.** El Nombre de usuario y la contraseña no se distingue entre mayúsculas y minúsculas. *User Name: system Password: manager*

4.27. Si se va a inyectar por primera vez una muestra, es necesario la creación previa de un Proyecto, un Método Set y un Sample set.

 Seguir las indicaciones descritas en el Manual de Operación con número de serie **MAN-OP-01** para la creación del Proyecto, del Método Set y del Sample Set.

4.28. Seleccione la opción «**Run Samples**» y diríjase a la carpeta con el nombre de su proyecto. Dar clic en Ok.

4.29. Diríjase al icono «**Plates**»  para configurar los platos.



4.30. Dar clic en la pestaña **Create New Plate Type** (Crear nuevo tipo de plato), enseguida dar clic en la primer fila **Plate Type Name** (Nombre del tipo de plato) para especificar la configuración de los platos, según corresponda.

 **Indicación.** Elegir la configuración **ANSI-48Vial2mLHolder**; ya que, es el tipo de plato con el que cuenta el laboratorio.

4.31. Seleccione la secuencia de muestreo. Dar clic en Ok.

4.31.1. Antes de inyectar las muestras al cromatógrafo, es necesario filtrar las muestras problema para poder ser inyectadas.

 **Indicación.** Ver instructivo de filtrado de muestras **INST-EQ-02**

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Procedimiento de Operación para el equipo ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: PNO-TC-004	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

4.31.2. Ordenar los viales en el plato de acuerdo a la secuencia de muestreo y adaptar el plato en el sistema administrador de muestras.

4.32. Para la secuencia de inyecciones dar clic en cada fila de la tabla (**Plate/Well**) y especifique en cada columna: **la posición del vial, el nombre de la muestra, volumen de inyección, número de inyecciones, Función, el Método Set** de trabajo y el **tiempo de la corrida**.

 **Indicación.** En la columna **Plate/Well** especificar el número de bandeja, fila y columna del vial.

4.32.1. Realizar la prueba de **Adecuabilidad del sistema** de acuerdo a las guías de validación de métodos analíticos.


4.33. Seleccione el icono «**Run**» para arrancar las secuencias de inyecciones.

 **Aviso**

- Si desea correr un método Sample Set guardado, en la ventana **Run Sample Set**, seleccione el método que desee arrancar y de clic en Run.
- Para ver el arranque de la secuencia dar doble clic sobre ella.

LAVADO DE LA COLUMNA Y APAGADO DEL EQUIPO



4.34. Al final de la secuencia de inyecciones, programar el método de Lavado de la columna y Apagado del equipo, de acuerdo a las características de la muestra y de la columna.

 **Indicación.** Ver instructivo con número de código **INST-EQ-03** Para la creación del método de “Lavado de la columna y apagado del equipo”.

4.35. Una vez terminado el lavado de la columna proceder a colocar la mini unión de conexión. Revisar el Instructivo con número de código **INST-EQ-04**.

IDENTIFICACIÓN, INTEGRACIÓN Y ADECUABILIDAD DEL SISTEMA.

4.36. Para realizar la identificación e integración de los datos, así como, la Adecuabilidad del Sistema, ver instructivo con número de código **INST-EQ-05**.

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Procedimiento de Operación para el equipo ACQUITY UPLC CLASE H	Número de código: PNO-TC-004	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

CUANTIFICACIÓN Y REPORTE.



4.37. Revisar instructivo con número de código **INST-EQ-06**.

CALIBRACIÓN DEL EQUIPO

4.38. El método de calibración deberá ser efectuado por el personal técnico del proveedor del instrumento (WATERS), el cual se llevará a cabo anualmente.

5. REFERENCIAS

- 1) Empower Software. Data Acquisition and Processing. Revisión B. Waters Corporation. (2002).
- 2) Guía de Validación de Métodos Analíticos (2002). Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México, A. C.
- 3) Manual de Operación para el equipo ACQUITY UPLC Clase H. (2015). MAN-OP-01.
- 4) Norma Mexicana IMNC. Sistemas de gestión de calidad. Fundamentos y vocabulario. Instituto Mexicano de Normalización y Certificación. ISO 9000:2005. NMX-CC-9000-IMNC-2008.
- 5) VIM: 2008, International vocabulary of metrology – Basic and general concepts and associated terms.

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Instructivo para el filtrado de solventes	Número de código: INST-EQ-001	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	


OBJETIVO. Indicar la forma de filtrar los solventes para prevenir fallas en la bomba y en el inyector.

1. Antes de filtrar los solventes se deberán tener en cuentas las siguientes indicaciones:



- Siempre utilizar solventes de grado HPLC y agua de alta calidad (milli-Q).
- Siempre enjuagar los filtros de las líneas con agua milli-Q antes de ser depositados en el frasco con solvente.
- Nunca dejar los filtros de las líneas sin solvente (depositar los filtros en un frasco con agua milli-Q).
- Siempre tener un frasco de residuos previamente etiquetado.
- Los solventes acuosos cambiarlos diariamente.
- Sonicar los solventes por lo menos 10 minutos.
- Utilizar guantes libres de polvo mientras se aplica este procedimiento.

2. Montar el equipo de filtración.




 **Aviso.** Colocar la membrana millipore utilizando unas pinzas.

3. Instalar la manguera de vacio.


	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Instructivo para el filtrado de solventes	Número de código: INST-EQ-001	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

4. Siempre comience filtrando agua milli-Q antes que cualquier otro solvente (aprox. 400mL), esto con la finalidad de limpiar el equipo y asegurar que no queden restos de algún otro solvente si es que el equipo ya se encontraba montado.
5. Enjuagar y desechar mínimo 2 veces el agua del paso anterior.
6. Una vez limpio el equipo, filtrar la cantidad requerida de solvente acuoso.
7. Antes de trasvasar el filtrado al frasco correspondiente, enjuagar con un poco de agua milli-Q.



 **Aviso.** Se recomienda lavar los frascos de los solventes con un poco de jabón diluido para evitar la contaminación de los mismos, enjuagar con abundante agua.

8. Enjuagar el frasco con un poco de la solución filtrada y desecharla.
9. Trasvasar la solución filtrada en el frasco del solvente y tapar para evitar la contaminación.

FILTRADO DE SOLVENTES ORGÁNICOS Y FASES MÓVILES.

 **Aviso.** Cada que se filtre un nuevo solvente o fase móvil, primero enjuagar el kitasato con agua Milli-Q para asegurar que no quede restos del solvente anterior.

10. Filtrar un poco de solvente (aprox. 5mL) y enjuagar el kitasato.
11. Desechar el filtrado.
12. Filtrar la cantidad requerida de solvente.
13. Repetir los pasos 7 al 9.
14. Cuando se terminen de filtrar todos los solventes, enjuagar el kitasato con abundante agua.



	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Instructivo para el filtrado de Muestras	Número de código: INST-EQ-002	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

OBJETIVO: Mostrar una forma de preparar las muestras antes de ser inyectadas al cromatógrafo para prevenir la obstrucción de la columna y evitar el mal funcionamiento del equipo, logrando obtener resultados mas uniformes y de mayor calidad.


 **Aviso.**


- **La preparación de la muestra se lleva a cabo de acuerdo a las indicaciones descritas en el protocolo de validación.**
 - La filtración por membrana ayuda a eliminar las partículas contaminantes de las muestras, disolventes y fases móviles, aumentando la vida de la columna, reduciendo al mínimo la contrapresión, y la prevención de fallo del sistema.
1. Tomar un poco de la muestra con la jeringa.
 2. Enjuagar la jeringa y desechar la muestra.
 3. Con la jeringa tomar un volumen considerado de la muestra.
 4. Situar el filtro con membrana en la jeringa y desechar los primeros mililitros del filtrado.
 5. Depositar dentro del vial una pequeña cantidad del filtrado, enjuagar y desechar la muestra.
 6. Trasvasar el filtrado hasta el cuello del vial.
 7. Tapar el vial con un tapón/septum y etiquetar.
 8. Repetir los pasos 1 al 7 para cada muestra a inyectar en el cromatógrafo.



	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Instrucciones para la Colocación de la unión para conexión de columnas	Número de código: INST-EQ-004	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	


OBJETIVO. Describir los pasos para retirara la columna y colocar la mini unión de conexión de columnas.


 **Advertencia.** Cuando no se trabaje con el equipo hay que proceder a retirar la columna y colocar una mini unión de conexión.

 **Precaución.** Para la colocación de la mini unión de conexión, es necesario siempre utilizar guantes libres de polvo mientras se realiza este procedimiento.

1. Abrir la compuerta donde se encuentra ubicada la columna.
2. Con mucho cuidado retirar el control electrónico de la temperatura.
3. **Quitar la columna.** Con las manos desenroscar primeramente la tuerca de acero inoxidable seguida del conector en chapa de oro, finalmente desenroscar el conector de plástico ubicado en el otro extremo de la columna.



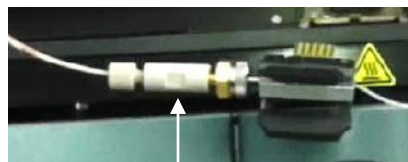
 **Advertencia:** Tener cuidado de no perder el **peek** que se encuentra en la punta del conector en chapa de oro, ya que este evita las fugas en la columna.



 **Precaución:** Para evitar que se caiga el **peek** del conector se recomienda colocar el control electrónico de la temperatura en su lugar antes de colocar el tiempo muerto.

4. **Colocar la mini unión de conexión.** Con las manos enroscar el conector en chapa de oro en uno de los extremos de la unión y enseguida asegurar este con la tuerca de acero inoxidable, finalmente con las manos enroscar el otro extremo de la unión con en el conector de plástico.





Mini unión de conexión



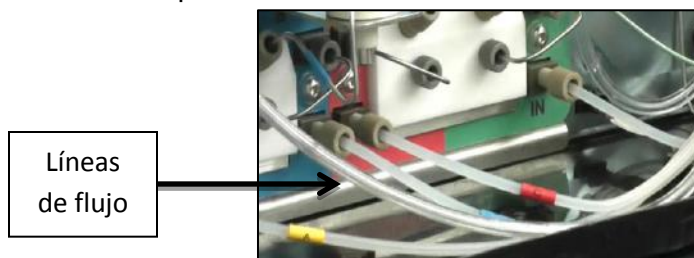
	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Instrucciones para el purgado de las líneas de flujo en casos de contaminación	Número de código: INST-EQ-007	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

OBJETIVO. Describir la manera de purgar las líneas en caso de que alguna de estas presente contaminación.

 **Precaución:** Para evitar la contaminación de las líneas, columna, etc. Es necesario primordialmente antes de empezar a trabajar verificar las condiciones de los solventes todos los días (revisar que no haya contaminación: microbiana, precipitación)



 **Advertencia.** Los componentes pueden estar contaminados con materiales peligrosos y/o tóxicos. Siempre use guantes limpios, sin talco y resistentes a compuestos químicos, mientras se realiza este procedimiento.

1. Revisar los solventes y los filtros de las líneas.
 - 1.1. En caso de que el problema de contaminación se produzca desde los solventes, lavar el frasco, sustituir el solvente y lavar los filtros (Ver *paso 9 "Lavado de los filtros"*).
2. Abrir la caja de seguridad de la bomba.
3. Sacar el filtro del frasco contenedor de la línea que se desea purgar.
4. Con las manos quitar la línea contaminada.



5. Colocar un trapo limpio y un vaso debajo de la línea para que caigan los residuos de solvente.
6. Utilizando una jeringa succionar la línea contaminada. Desechar el solvente.



	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Instrucciones para el purgado de las líneas de flujo en casos de contaminación	Número de código: INST-EQ-007	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

7. Colocar el filtro en el frasco del solvente y succionar con la jeringa la línea contaminada las veces necesarias hasta observar que no haya contaminación.



8. Finalmente colocar la línea en su lugar.

! **Precaución:** Tenga cuidado de no apretar mucho la línea al momento de colocarla, solo al tope ya que de lo contrario pueden aflojarla y causar fugas.



LIMPIEZA DE LOS FILTROS DE LAS LINEAS

9. Quitar los filtros de las líneas y depositarlos en un vaso con agua caliente.


! **Aviso.** Utilizar agua milli-Q.
Calentar el agua a una temperatura aproximada de 50°C.
Nunca dejar las líneas sin solvente.

10. Sonicar los filtros durante 10 minutos.
11. Pasado el tiempo, desechar el agua y enjuagar los filtros con agua milli-Q.
12. Sonicar nuevamente los filtros con agua milli-Q por 10 minutos.

! **Precaución:** Se recomienda lavar los filtros 1 vez al mes para garantizar la limpieza de los mismos, sobre todo, cuando se trabaja con soluciones amortiguadoras.

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Instrucciones para el lavado de los viales del Equipo ACQUITY UPLC CLASE H”	Número de código: INST-EQ-008	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	



OBJETIVO. Describir una manera de lavar los viales utilizados en el equipo ACQUITY UPLC Clase-H.

 **Aviso.** La forma de limpieza puede variar, la finalidad es asegurar que los viales queden completamente limpios para su uso posterior.

1. Desechar las muestras de los viales en el frasco de residuos.
2. Colocar los viales en un frasco y posteriormente adicionar abundante agua con un poco de jabón diluido.
3. Sonicar durante 15 minutos.
4. Desechar el agua y enjuagar mínimo 2 veces con abundante agua.
5. Adicionar agua Milli-Q y sonicar durante 10 minutos.
6. Desechar el agua y enjuagar los viales con agua Milli-Q.
7. Enjuagar de uno por uno los viales con agua Milli-Q.
8. Secar los viales.

ANEXO B (resultados). Sistema de espectrometría de masas Xevo TQ



Sección	Pág.
B-1 Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ.	210
B-2 Instructivos de trabajo para el sistema de espectrometría de masas Xevo TQ.	367
B-2.1. Instructivo de encendido para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ.	367
B-2.2. Instructivo para el purgado del sistema Xevo TQ.	369
B-2.3. Instrucciones para la limpieza de los filtros de las columnas cromatográficas	371

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

MANUAL DE OPERACIÓN PARA EL EQUIPO DE ESPECTROMETRÍA DE MASAS XEVO TQ



LABORATORIO DE ENSAYOS DE
DESARROLLO FARMACÉUTICO

LEDEFAR

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	



Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ

	Nombre	Puesto	Firma	Fecha
Elaboró:				
Revisó:				
Aprobó:				
Localización del documento:				



	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

ÍNDICE



	Sección	Pág.
1. INTRODUCCIÓN		6
2. OBJETIVO Y ALCANCE		6
3. TERMINOLOGÍA Y DEFINICIONES		6
2.1 Abreviaturas y Terminología		6
2.2 Definiciones		7
4. COMPONENTES DEL SISTEMA		9
Componentes principales del sistema ACQUITY UPLC		10
Principales componentes del sistema XEVO TQ		11
5. RECORRIDO DE LOS IONES		13
Modos de funcionamiento de MS		14
Modos de funcionamiento MS/MS		15
Modo de iones producto		15
Modo de iones precursores		16
Modo de monitorización de varias reacciones		16
Modo de pérdida constante de fragmentos neutros		17
Modo de barrido de iones producto ScanWane		17
6. ENCENDER EL EQUIPO		18
Desactivar el Standby		21
Solución de problemas para la sincronización de los sistemas		23
Solución I		23
Solución II		24
Puesta en marcha del sistema		25
Precauciones para el purgado del sistema		29
7. CREAR DE UN PROYECTO		31
8. OPTIMIZAR CONDICIONES (ION PADRE, ION FRAGMENTO)		33
Optimizar el valor de la masa		36
Ajuste del capilar		37
Ajuste del cono		38
Analizar los cuadrupolos		38
Ancho del pico		39
Infusionar		42
Fragmentación		44
Regla para buscar fragmentos		50
9. EXPLORACIÓN AUTOMÁTICA INTELLISTART		53
10. CREACIÓN DE MÉTODOS		58
Creación del método de instrumento		58

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

Método de masas MRM	66
Método de identificación MS Scan	69
Método de identificación SIR	70
Método de lavado de la columna	71
11. COLOCACIÓN DE LAS MUESTRAS Y ARRANQUE DE LA SECUENCIA	73
Carga de las placas de muestras en el sistema administrador de muestras	73
Pantalla opcional contra luz del sistema administrador de muestras	75
Arranque de la secuencia	76
Función RADAR	82
Correr método SIR	83
Suspender el Método	83
Tipos de cromatogramas	83
Pasos para mostrar los diferentes cromatogramas	84
Funciones para procesar los espectros	86
12. CREACIÓN DEL MÉTODO DE PROCESAMIENTO DE LOS DATOS	87
Procesamiento de los datos de muestras estándar	91
Procesamiento de los datos de muestras	95
13. CREACIÓN DEL REPORTE	96
14. STANDBY PUESTA EN ESPERA DEL INSTRUMENTO	98
15. PURGADO DEL SISTEMA XEVO TQ	100
16. VENTEAR EL EQUIPO	102
17. COLOCACIÓN DE LA COLUMNA	103
18. CAMBIO DE LOOP	105
19. CAMBIO DE LA JERINGA	108
Sustitución de las jeringas de lavado	110
Modificación de los parámetros de configuración de la jeringa de muestras	111
20. CAMBIO DE LA AGUJA	112
Instalar el dispositivo de inyección	115
Caracterizar el sello de la aguja	119
Calibrar el eje Z de la aguja	120
21. SONDA ESI	121
Extraer la sonda ESI	121
Instalar la sonda ESI	123
22. SONDA APCI	126
Instalar la sonda APCI	126
Extracción de la sonda APCI	127
23. LIMPIEZA DEL CONO	128

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

Desmontaje del cono	128
Limpieza del cono	132
Montaje del cono de muestra	135
Ajustar el conjunto del cono de muestras a la fuente	135
24. AGUJA CORONA	137
Instalar la aguja corona	137
Extraer la aguja corona	138
25. TRANSFERENCIA DE MÉTODOS HPLC A UPLC	139
26. RECOMENDACIONES GENERALES PARA EL MANTENIMIENTO DE LAS COLUMNAS CROMATOGRÁFICAS	143
27. SIMBOLOS DE ADVERTENCIA Y PRECAUCIÓN	146
28. Anexo A. Consideraciones Generales sobre los Solventes	147
29. Anexo B. TROUBLESHOOTING Resolución de Problemas	160
30. REFERENCIAS	167

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

1. INTRODUCCIÓN.

El Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico (LEDEFAR) presenta el “Manual de operación para el sistema de espectrometría de masas Xevo TQ”, el cual a sido desarrollado con el fin de apoyar en la comprensión de los requerimientos técnicos relacionados al manejo, instalación de accesorios y mantenimiento del instrumento.

En este manual encontrará información relacionada con los componentes del sistema Xevo TQ, el modo de recorrido de los iones a través del espectrómetro de masas, los procedimientos para operar el sistema a través del software MassLynx y la consola ACQUITY UPLC, procedimientos para el cambio de accesorios e incluye la información sobre el mantenimiento de las columnas cromatográficas, así como anexos sobre las consideraciones generales sobre los solventes y la resolución de problemas.

Es importante hacer notar que este manual no pretende ser un sustituto del manual del fabricante, sino por el contrario un complemento de él.

2. OBJETIVO Y ALCANCE.

Este manual de operación aplica al sistema de espectrometría de masas Xevo TQ y está dirigido a los usuarios que operan dicho sistema.

El objetivo de este manual consiste en proporcionar una guía de trabajo la cual describa de manera general el manejo del instrumento, así como, realizar tareas de limpieza y mantenimiento.

3. TERMINOLOGÍA Y DEFINICIONES.

3.1. Abreviaturas y Terminología.

Analito. Ion en fase gaseosa.

API. Ionización a Presión Atmosférica

APCI. Ionización Química a Presión Atmosférica

APPI. Foto-Ionización a Presión Atmosférica



CID. Disociación Inducida por Colisión

ESI. Ionización por Electropray

Ion Hijo. Ion Fragmento

Ion Padre. Ion Precursor

Ion Partícula. (Molécula o Átomo) con carga eléctrica

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

Isótopo. Átomo del mismo elemento con masa diferente

LC. Cromatografía de líquidos

LC/MS/MS. Cromatografía de líquidos, masas, masas

Masa Nominal. Formula empírica calculada usando los números enteros de masa de los isotopos más abundantes de cada elemento.

Masa Exacta. Formula empírica calculada usando la masa exacta del isotopo más abundante de cada elemento.

Masa Promedio. Basado en la masa isotópica promedio.

Iones electrolíticos. Compiten con el analito por carga y espacio en la superficie de la gota.

MRM. Monitorización de múltiples reacciones

MS. Espectrometría de masas

MS/MS. Espectrometría de masas, masas

Pico Base (base peak). Ion más intenso

SIR. Monitorización de iones seleccionados

Transición. Fragmentación definida

3.2. Definiciones.

Calibración. Operación que, bajo condiciones especificadas, en un primer paso, establece una relación entre los valores de las magnitudes con su incertidumbre de medición provista por patrones de medición y las indicaciones correspondientes con incertidumbres de medición asociadas y, en segundo paso, usa esta información para establecer una relación para obtener un resultado de medición de una indicación.



Conjunto del cono de muestreo. Componente conformado por el cono de la muestra y el inyector de gas del cono.

Cono de la muestra. Espacio donde se lleva a cabo la fragmentación de iones.

Cubierta de la fuente. Espacio donde se localiza la fuente de iones.

Ensayo/prueba. Determinación de una o más características de acuerdo con un procedimiento.

Horno para columnas de alta temperatura. El horno para columnas de alta temperatura calienta el compartimento de columnas hasta una temperatura entre 5 °C (9 °F) por encima de la temperatura ambiente y 90 °C (194 °F). El calor se produce en un elemento de calentamiento pelicular, aislado para minimizar el consumo de energía eléctrica y facilitar la estabilidad térmica, que está conectado a la bandeja. Un estabilizador de columna pasivo, situado dentro de la bandeja, reduce la sensibilidad a los cambios en la temperatura ambiente y minimiza el ensanchamiento de la banda.

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

Ionización por electrospray (ESI). En la ionización por electrospray (ESI), se aplica una fuerte carga eléctrica al solvente a medida que emerge de un nebulizador. Las gotas que componen el aerosol resultante sufren una disminución de tamaño (evaporación del solvente). A medida que el solvente se evapora, la densidad de carga aumenta hasta que la superficie de las gotas libera iones (evaporación de iones). Estos iones pueden ser mono o multicargados.

Ionización por electrospray combinada con ionización química a presión atmosférica (ESCI). La ionización por electrospray combinada con ionización química a presión atmosférica (ESCI) se suministra como equipamiento estándar en el espectrómetro de masas. En la ESCI, se utiliza la sonda ESI estándar junto con un electrodo de descarga en corona para poder alternar la adquisición de los datos de ionización ESI y APCI y, de este modo, obtener un alto rendimiento y mayor cobertura de compuestos.

Ionización química a presión atmosférica (APCI). La APCI produce moléculas con una carga eléctrica protonada o desprotonada única para una amplia gama de analitos no volátiles. La interfaz APCI está compuesta por la cubierta ESI/APCI/ESCI con un electrodo de descarga en corona y una sonda APCI.

Llave de extracción. Herramienta que sirve para la extracción de cono.

Manija de la válvula de aislamiento. Seguro que mantiene firme el conjunto del cono de muestreo.



Procedimiento. Forma especificada para llevar a cabo una actividad o un proceso.

Sistema administrador de muestras (SM). El sistema de gestión de muestras ACQUITY UPLC inyecta las muestras tomadas de las placas microtiter o de los viales en la columna cromatográfica. Un mecanismo de localización utiliza una sonda para acceder a las distintas posiciones de las muestras y extraerlas.

Sistema administrador de solventes binario (BSM). El sistema administrador de solventes binario consta de una bomba de alta presión que impulsa el solvente por el sistema. Proporciona un flujo estable de solvente (sin pulsos) a los caudales de análisis. El sistema de gestión de solventes binario puede bombear dos solventes simultáneamente.

Software IntelliStart. Ajusta y calibra la masa del espectrómetro de masas automáticamente y muestra lecturas del proceso.

Software MassLynx. Proporciona una plataforma fundamental para la adquisición, el análisis, la administración y el intercambio de información de espectrometría de masas. MassLynx controla de forma inteligente cualquier sistema de espectrometría de masas, desde los sistemas de gestión de solventes y muestras, hasta los espectrómetros de masas y los detectores auxiliares. El software MassLynx puede adquirir los datos de masa nominal, masa exacta, MS/MS y MS/MS de masa exacta. Mantiene y consolida los datos de todas las muestras. Desde la lista de muestras se inician también todas las actividades relacionadas con la muestra. Este enfoque

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

"centrado en la muestra" simplifica la interacción con el sistema de LC/MS o GC/MS, los datos adquiridos y los resultados del proceso.

Supresión iónica. Respuesta al analito, disminuye con incremento de concentración de otros aditivos de la fase móvil o de la muestra.

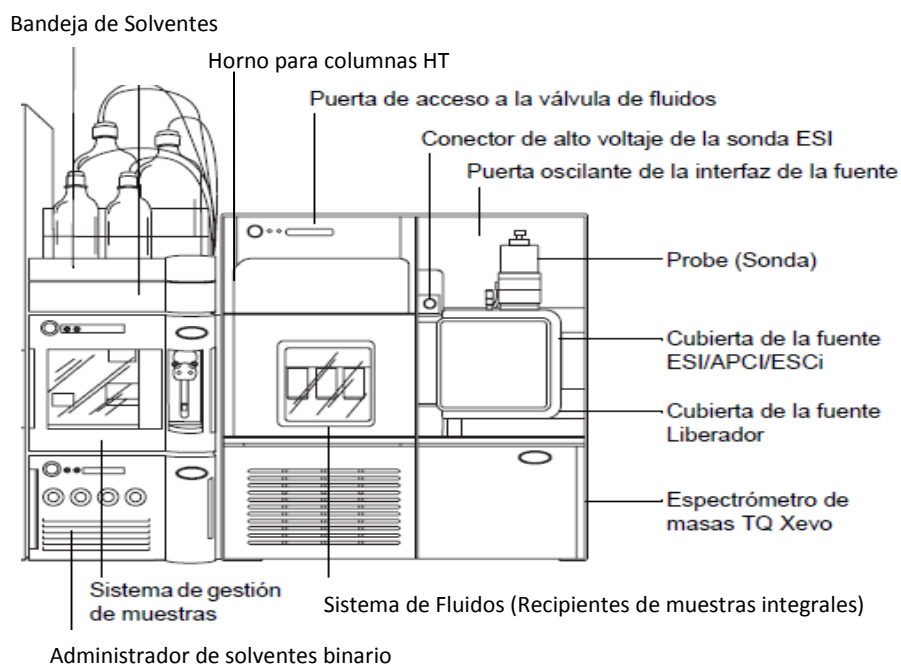
Técnicas API. Las técnicas API, son técnicas muy sensibles que utilizan **alto voltaje** y **nebulización neumática** para producir iones en fase gaseosa, generalmente producen iones $(M+H)^+$ o $(M-H)^-$. Producen un poco de fragmentación. Permiten cuantificación.



4. COMPONENTES DEL SISTEMA.

Los sistemas ACQUITY UPLC incluyen un sistema administrador binario de solventes, un sistema administrador de muestras, un horno de columnas y una columna ACQUITY UPLC especial.

El espectrómetro de masas Xevo™ TQ es un espectrómetro de masas de ionización a presión atmosférica (API) con cuadrupolos en tándem. Está diseñado para análisis sistemáticos de UPLC/MS/MS para aplicaciones cuantitativas y cualitativas.

El Espectrómetro de masas TQ Xevo está equipado con la fuente de ionización por electrospray (ESI).

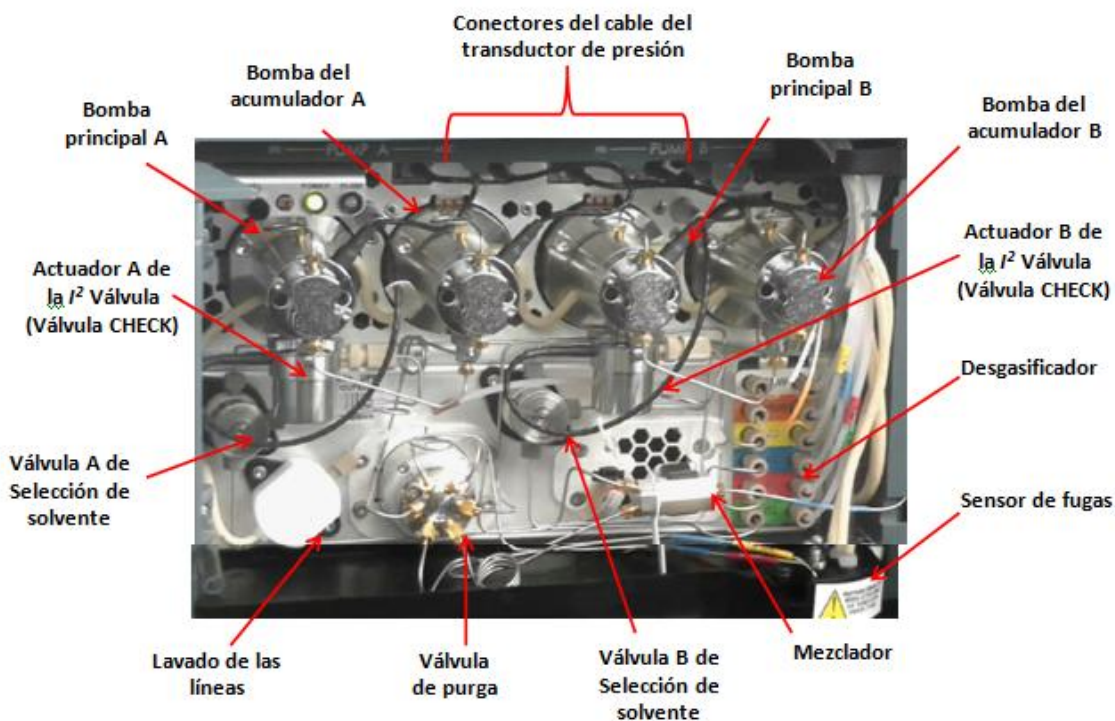


	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

COMPONENTES PRINCIPALES DEL SISTEMA ACQUITY UPLC



➤ Administrador de solventes binario (BSM).

- Bombas independientes de alta presión que impulsan el solvente por el sistema (puede bombear dos solventes simultáneamente)
- Proporciona un flujo estable de solvente (sin impulsos)
- Puede mantener presiones de hasta 15 000 psi y generar gradientes de alta presión con un retraso de gradiente mínimo.



➤ Administrador de muestras – Sample Manager (SM)

- Un mecanismo de localización utiliza una sonda para acceder a las distintas posiciones de las muestras y extraerlas.
- Puede realizar una inyección en aproximadamente 15 segundos.
- El sistema de gestión de muestras puede conservar las muestras a cualquier temperatura entre los 4 °C y los 40 °C (39.2 °F a 104 °F) en condiciones ambientales de 25 °C (77 °F) o menos.
- Excelente recobro y precisión.

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	



➤ **Estabilizador de columna**

- Estabilizador de columna pasivo, situado dentro de la bandeja, reduce la sensibilidad a los cambios en la temperatura ambiente y minimiza el ensanchamiento de la banda.





PRINCIPALES COMPONENTES DEL SISTEMA XEVO TQ

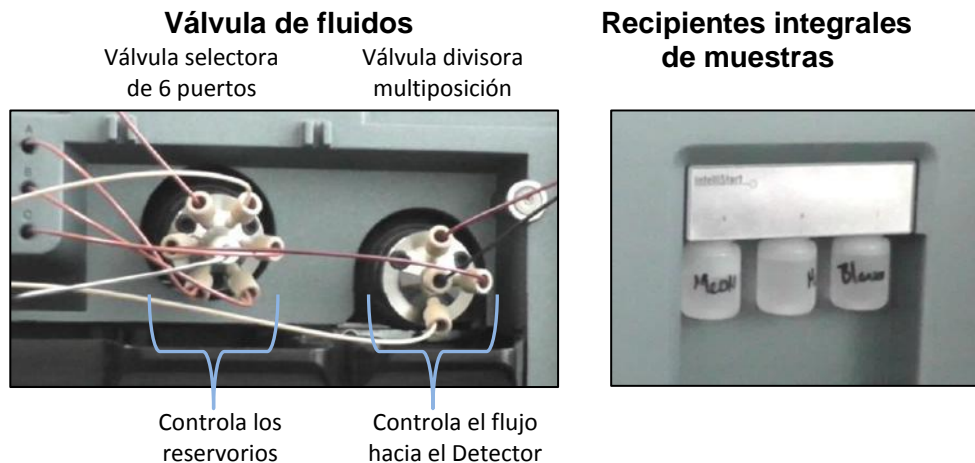
➤ Sistema de Fluidos.

El **sistema de fluidos IntelliStart** es un sistema de administración de solventes integrado por una *válvula selectora de 6 puertos*, una *válvula divisora multiposición*, una *bomba* y *tres recipientes de muestras*. Transporta la muestra directamente a la sonda MS de una de estas tres maneras:

- Desde la columna de LC.
- Desde tres recipientes integrales.
- Desde un recipiente de lavado que contenga solvente para el lavado automatizado del sistema de suministro de solvente del instrumento.

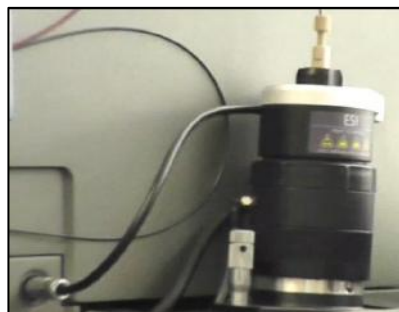
	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

⚠ Indicación: Los recipientes integrales, también pueden transportar la muestra a través de una infusión directa o combinada con el fin de optimizar el funcionamiento del instrumento a los caudales de análisis.





⚠ Recomendación: Utilizar el recipiente **A** para la solución de calibración, el recipiente **B** para los compuestos de ajuste y el recipiente **C** para la solución de Analito/optimización.

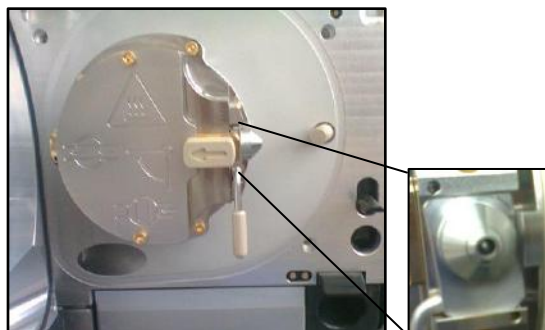
- Sonda. Permite la formación y liberación de iones.



ESI Ionización por electrospray

- Fuente de iones.
El voltaje del cono de muestra controla: la transmisión de iones y la fragmentación de iones que entran al analizador de masas.

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	





- Bomba de vacío mecánica (residuos de carbono).



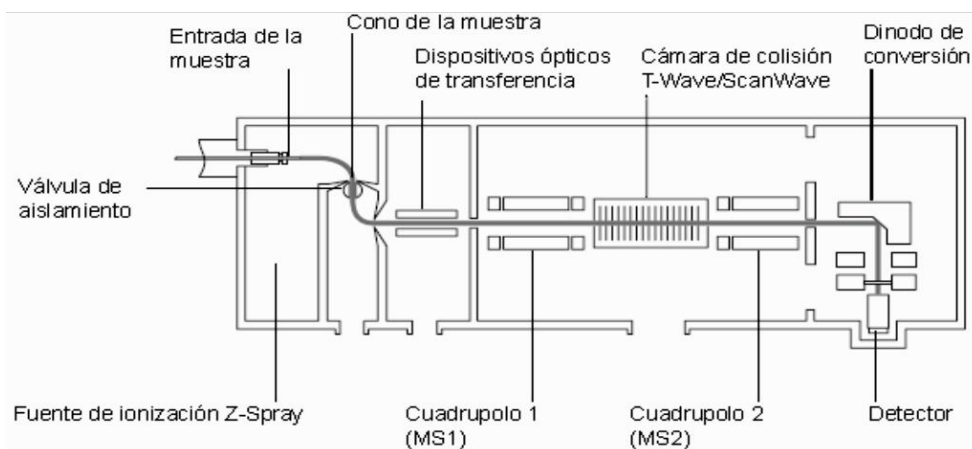
5. RECORRIDO DE LOS IONES ^[5]

El recorrido de los iones del espectrómetro de masas funciona del modo siguiente:

- I. Las muestras del sistema de LC se introducen a presión atmosférica en la fuente de ionización.
- II. Los iones pasan a través del cono de la muestra al sistema de vacío.
- III. Los iones pasan a través de los dispositivos ópticos de transferencia al primer cuadrupolo, donde se filtran según su relación masa/carga (m/z).
- IV. Los iones separados en función de su masa pasan a la cámara de colisión, donde se produce una disociación inducida por colisión (CID) o pasan al segundo cuadrupolo. A continuación, las masas de los posibles iones producto se analizan en el segundo cuadrupolo.
- V. El sistema de detección con fotomultiplicador detecta los iones transmitidos.
- VI. La señal se amplifica, se digitaliza y se envía al software de espectrometría de masas MassLynx.

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

Recorrido de los Iones





MODOS DE FUNCIONAMIENTO DE MS ^[5]

Modo de funcionamiento	MS1	Cámara de colisión	MS2
MS	Deja pasar todas las masas		Resolución (barrido)
SIR	Deja pasar todas las masas		Resolución (estática)

En el modo MS, el instrumento puede adquirir datos con velocidades de barrido hasta 10 000 Da/s. Este modo se utiliza para el ajuste y la calibración del instrumento antes del análisis MS/MS.

Utilizar el modo de funcionamiento de monitorización de iones seleccionados (SIR) para la cuantificación cuando no se puede hallar un ión producto adecuado para realizar un análisis más específico de monitorización de múltiples reacciones (MRM).

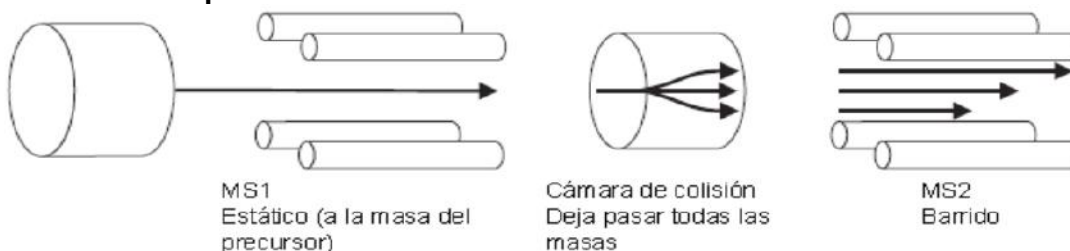
Nota: En los modos SIR y MRM no se realiza ningún barrido en los cuadropolos, por lo que no se produce ningún espectro (intensidad contra masa). Los datos obtenidos mediante los análisis SIR o MRM se derivan del gráfico del cromatograma (intensidad de masa especificada contra tiempo).

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

MODOS DE FUNCIONAMIENTO MS/MS

Modo de funcionamiento	MS1	Cámara de colisión	MS2
Espectro de iones producto	Estático (a la masa del precursor)	Deja pasar todas las masas	Barrido
Espectro de iones precursores	Barrido		Estático (a la masa del producto)
MRM	Estático (a la masa del precursor)		Estático (a la masa del producto)
Espectro de pérdida constante de fragmentos neutros	Barrido (sincronizado con MS2)		Barrido (sincronizado con MS1)
Barrido de iones producto ScanWave	Estático (a la masa del precursor)	ScanWave activado	Barrido (sincronizado con la cámara de colisión)



Modo de iones producto



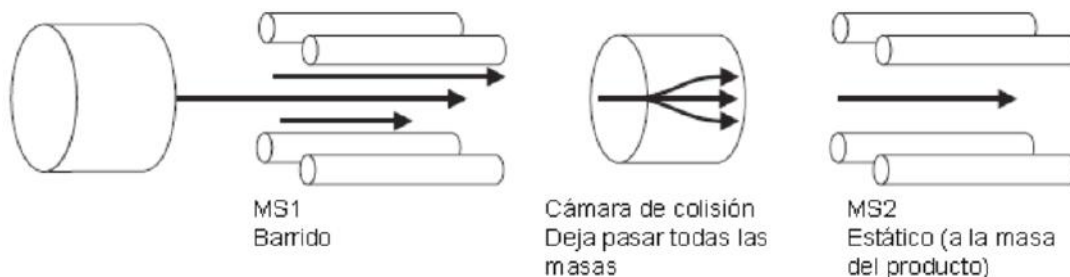
El modo de iones producto es el modo de funcionamiento MS/MS más utilizado. Se puede especificar un ion de interés para su fragmentación en la cámara de colisión, generando así información estructural.

El modo de iones producto se emplea normalmente para las siguientes aplicaciones:

- Desarrollo de métodos para estudios de MRM:
 - Identificación de iones producto para su utilización en transiciones MRM.
 - Optimización de las condiciones para el ajuste de la CID, con el fin de maximizar la producción de un ion producto específico que se utilizará en un análisis MRM.
- Caracterización de estructuras (por ejemplo, secuencias peptídicas).

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

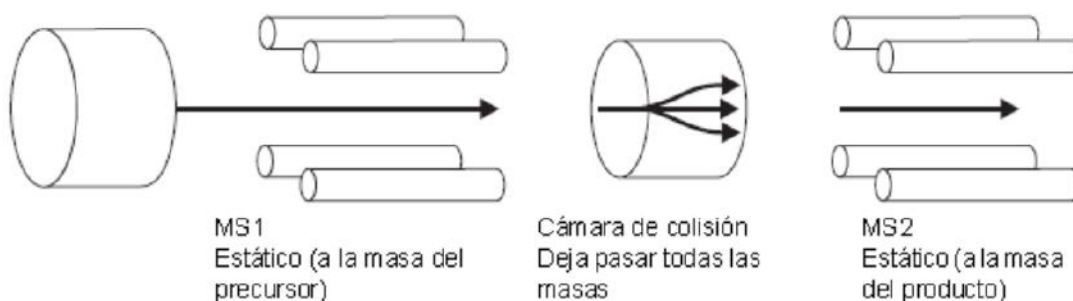
Modo de iones precursores



El modo de iones precursores se utiliza habitualmente para la caracterización estructural, esto es:

- Para complementar o confirmar datos de barrido de productos
- Efectuando barridos para todos los precursores de un ion producto común.

Modo de monitorización de varias reacciones





El modo MRM es un equivalente MS/MS altamente selectivo del SIR. Como tanto MS1 como MS2 son estáticos, se puede obtener mayor tiempo de residencia de los iones de interés y por lo tanto, se logra más sensibilidad en comparación con el MS/MS en modo de barrido. Es el modo de adquisición más utilizado para el análisis cuantitativo, ya que permite aislar el compuesto de interés del ruido químico de fondo.

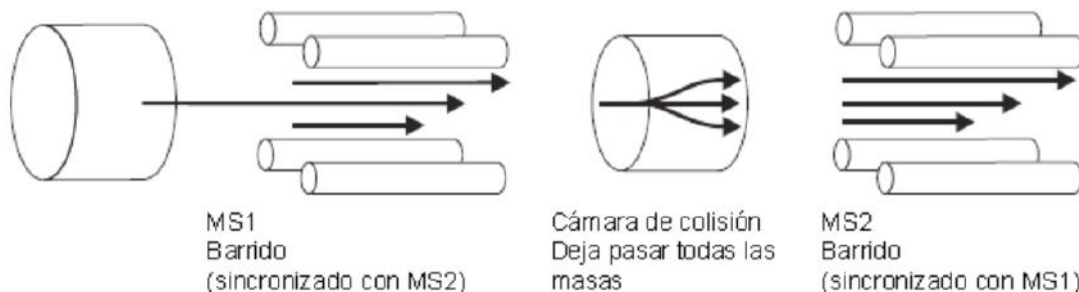
El modo MRM se utiliza habitualmente para cuantificar analitos conocidos en muestras complejas:

- Estudios metabolitos en fármacos.
- Aplicaciones forenses o toxicológicas. Por ejemplo, investigación del dopaje en el deporte.

El modo MRM no genera un espectro porque sólo se registra una transición cada vez. Se obtiene un cromatograma, al igual que en el modo SIR.

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

Modo de pérdida constante de fragmentos neutros

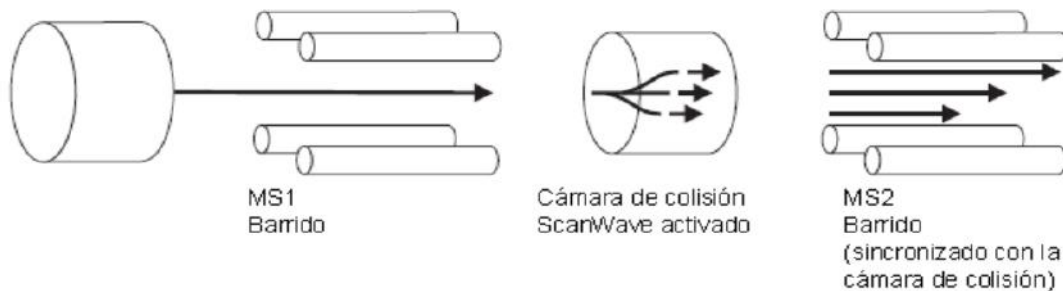


El modo de pérdida constante de fragmentos neutros detecta la pérdida de un fragmento o grupo funcional neutro determinado de uno o varios precursores no especificados. Los barridos de MS1 y MS2 están sincronizados. Cuando MS1 transmite un ion precursor específico, MS2 comprueba si ese ion precursor pierde un fragmento de cierta masa. En caso afirmativo, la pérdida se registra en el detector.

En modo de pérdida constante de fragmentos neutros, el espectro muestra las masas de todos los precursores que han perdido realmente un fragmento de cierta masa.



El modo de pérdida constante se utiliza habitualmente para estudiar mezclas en busca de una clase específica de compuestos, caracterizada por un patrón de fragmentación común, que indica la presencia de compuestos que contienen un grupo funcional común.

Modo de barrido de iones producto ScanWave



Este modo es muy similar al modo de espectro de iones producto convencional en que se puede especificar un ión de interés para su fragmentación en la cámara de colisión, generando así información estructural. Sin embargo, en este modo ScanWave, la cámara acumula iones (intactos o fragmentados) y, a continuación, los libera, según su masa, en sincronía con el analizador de masas del segundo cuadrupolo. Este modo de funcionamiento da lugar a un incremento significativo de la intensidad de la señal de los espectros de barrido completo.

Se aplica igual al modo de iones producto.

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

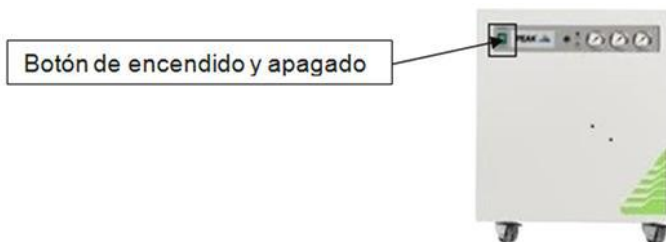
6. ENCENDER EL EQUIPO

El encendido del sistema implica la puesta en marcha de la estación de trabajo del sistema ACQUITY UPLC®, los instrumentos del sistema XEVO TQ y el software de funcionamiento MassLynx.

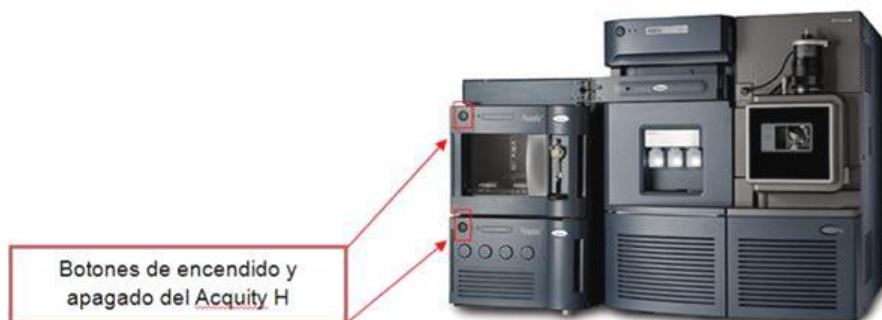




6.1. Encender el gas nitrógeno.

! Precaución. El nitrógeno debe tener una pureza mínima del 95%. No se debe permitir que la presión del suministro de nitrógeno descienda por debajo de los **100 psi**. Si baja a 80psi indica que debe de tener una fuga por lo tanto requiere de mantenimiento.



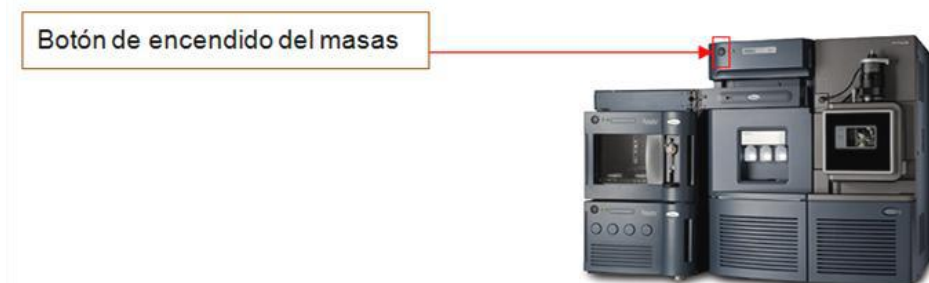
6.2. Encender los sistemas del cromatógrafo: el Administrador de Muestras (Sample Manager), y el Administrador de Solventes Binario (BSM).



	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

⚠ Advertencia. Es recomendable encender primero el *Sample Manager* ya que este establece la comunicación con todos los demás sistemas (posee la tarjeta de comunicaciones).

6.3. Encender el sistema Xevo TQ



⚠ Aviso. Cada instrumento del sistema emite tres alertas sonoras y realiza una serie de pruebas de puesta en marcha.

Indicador LED de encendido



El indicador LED de encendido, situado en la parte superior del lado izquierdo del panel frontal del espectrómetro de masas, indica cuándo se enciende o apaga el espectrómetro.

Indicador LED de funcionamiento

El indicador LED de funcionamiento, situado a la derecha del indicador LED de encendido, indica el estado de funcionamiento.

Indicaciones de los LED de funcionamiento.

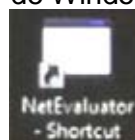
Modo y Color del Indicador LED	Descripción
Apagado	<ul style="list-style-type: none"> Sistema Administrador de Solventes Binario, Sistema Administrador de Muestras, compartimento de columnas, horno termostático para columnas y organizador de muestras: indica que el instrumento se encuentra inactivo.
Verde no parpadeante	<ul style="list-style-type: none"> Sistema Administrador de Solventes Binario: indica que el solvente fluye. Sistema Administrador de Muestras, compartimento de columnas, horno termostático para columnas y organizador de muestras: indica que el sistema administrador de muestras, el compartimento de columnas, el horno termostático



	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

Verde no parpadeante (continuación)	para columnas o el organizador de muestras están funcionando normalmente, intentando analizar las muestras pendientes o realizar la función de diagnóstico solicitada. Una vez finalizadas las solicitudes de funciones de diagnóstico y de análisis de muestras, el indicador LED volverá a apagarse.
Verde intermitente	<ul style="list-style-type: none"> • Sistema Administrador de Solventes Binario, sistema Administrador de Muestras y organizador de muestras: indica que el sistema está esperando a que al menos un módulo empiece a funcionar. Por lo general, este tipo de retrasos suelen producirlos el calentamiento de la lámpara del detector y la estabilización de la temperatura de la columna. • Compartimento de columnas y horno termostático para columnas: indica que el sistema está esperando a que el instrumento alcance el punto programado de temperatura antes del funcionamiento. Los tiempos de equilibrado de la temperatura de la columna suelen ocasionar estos retrasos. El indicador LED también parpadea de color verde durante la inicialización o mientras se espera la inicialización.
Rojo parpadeante	Indica que un error ha detenido el instrumento o dispositivo. Consultar la Consola ACQUITY UPLC para obtener información sobre el error.
Rojo continuo	Indica que se ha producido un fallo en el módulo que impide seguir utilizándolo. Apague el módulo y después vuelva a encenderlo. Si el indicador LED continúa de color rojo continuo, ponerse en contacto con un representante del Servicio Técnico de Waters.

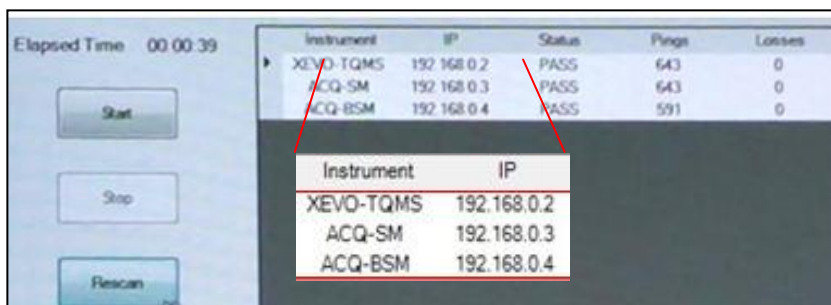
6.4. Encender la computadora y en la Consola ACQUITY UPLC, seleccionar **Control > Leak Sensors** (Control > Sensores de fugas) para activar los sensores de fugas.

6.5. Dar doble clic al icono **NetEvaluator** que se encuentra en la pantalla del escritorio o bien buscarlo en el buscador de Windows.



	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

6.6. Hacer clic en la función **Start** y espere aproximadamente 3 min para que se sincronicen los sistemas XEVO-TQMS, ACQ-SM y ACQ-BSM.



! **Indicación.** Los indicadores LED de funcionamiento y de encendido cambian del modo siguiente:

- Durante la inicialización, el indicador LED de funcionamiento del Sistema administrador de solventes binario y del Sistema administrador de muestras parpadea de color verde.
- Una vez encendidos correctamente los instrumentos, el indicador LED de encendido de cada uno de ellos se ilumina en color verde de forma continua. Los indicadores LED de funcionamiento del Sistema administrador de solventes binario, del Sistema administrador de muestras y del espectrómetro de masas permanecen apagados.

! **Observaciones:**



- Verificar que en la columna de estado (**Status**) se muestre **PASS** (pasar).
- Para monitorear fijarse en los pings, los cuales deben cambiar cada milisegundo.
- Si alguno de los sistemas no se sincroniza, dar clic en la función **Rescan** (reescanear). En caso de no sincronizarse consultar, [Solución de Problemas para la sincronización de los sistemas](#).

6.7. Una vez sincronizados los sistemas, proceder a colocar la columna. Consultar "[Colocación de la Columna](#)".

DESACTIVAR EL STANDBY

6.8. Abrir la consola **MassLynx** para iniciar el sistema de espectrometría de masas.



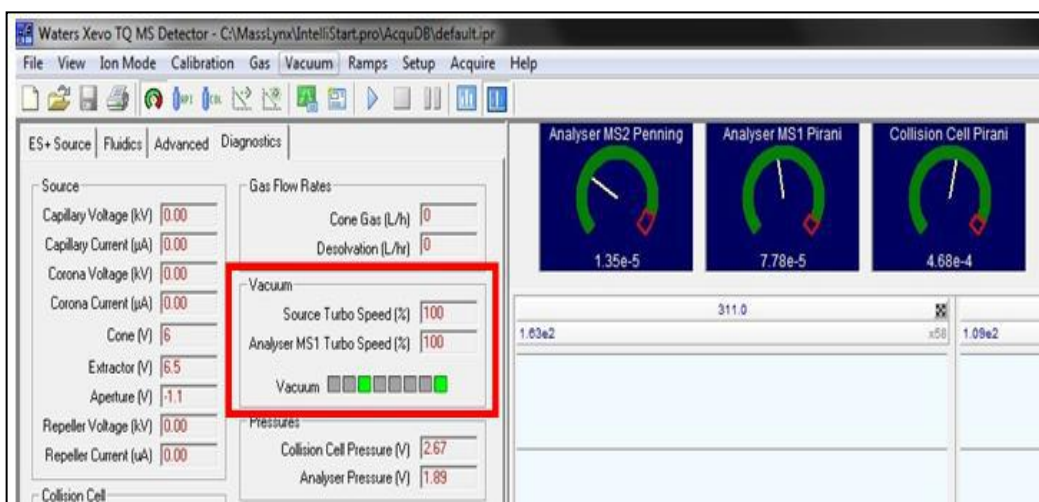
	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

6.9. Ir a la función **Instrument** (instrumento) y enseguida dirijase a la función **MS**



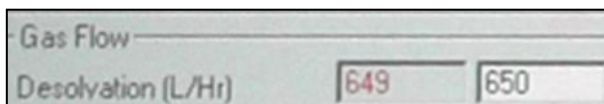
Tune para abrir la ventana del Xevo TQ MS Detector.

6.10. Seleccione la pestaña **Diagnostics** (diagnósticos) y verifique que en la función **Vacuum** (vacío), tanto el “**Source turbo Speed**” (fuente de velocidad turbo) y el “**Analyser MS1 Turbo Speed**” (analizador MS1 de velocidad turbo) estén al 100% para poder utilizar el equipo.

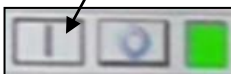




6.11. Abrir el gas nitrógeno para evitar que el flujo del cromatógrafo pase al equipo de masas y dañe el equipo.

- Para verificar que el Gas se encuentra circulando por el sistema, en la pestaña **ES+Source** en la función **Gas Flow >> Desolvation (L/Hr)** observar que el consumo de Gas no este en cero.



6.12. Desactivar el **Standby** dando clic en el icono **Operate** (Funcionar) y minimice la ventana.

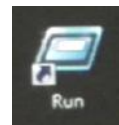


	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

SOLUCIÓN DE PROBLEMAS PARA LA SINCRONIZACIÓN DE LOS SISTEMAS.

SOLUCIÓN I

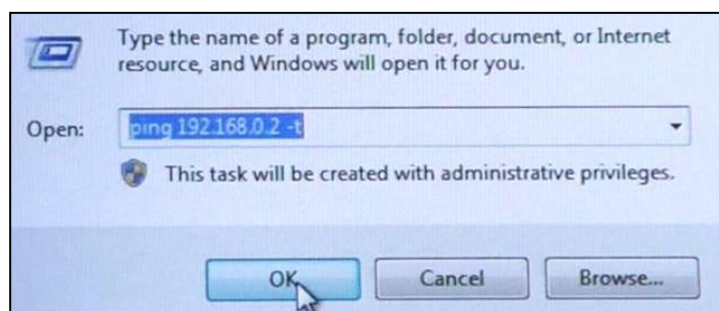
6.13. En caso de no aparecer alguno o ninguno de los sistemas, dar clic en el icono **StopAcquityProcesses** para que se establezca la comunicación entre los sistemas.




6.14. Para sincronizar los sistemas, hacer clic en el icono **Run**.

6.15. Verificar que el ping sea el siguiente: **ping 192.168.0.2 -t** y hacer clic en Ok. Esperar hasta escuchar un zumbido en el masas, finalmente espere a que se termine la reiniciación.



6.16. Ir al icono **NetEvaluator**, hacer clic en la función **Start** y esperar aproximadamente 3 min para que se sincronicen los sistemas XEVO-TQMS, ACQ-SM y ACQ-BSM.



 **Aviso.** En caso de no aparecer el ping seleccionar **telnet EPC** y dar clic en OK; en la siguiente ventana escribir con minúsculas **reboot** y teclear Enter.

6.17. Dar clic al icono **Run** seleccionar la opción **ping 192.168.0.2 -t** y hacer clic en Ok.

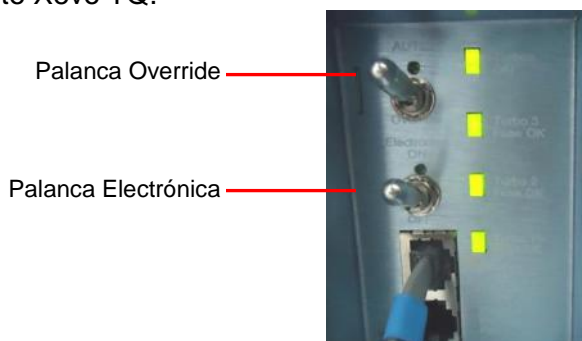
6.18. Ir al icono **NetEvaluator** y hacer clic en la función **Start**. Esperar aproximadamente 3 min para que se sincronicen los sistemas XEVO-TQMS, ACQ-SM y ACQ-BSM.

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

SOLUCIÓN II


Si ejecuto el procedimiento **SOLUCIÓN I** y no obtuvo resultados satisfactorios ejecutar el siguiente procedimiento:

6.19. Bajar la palanca **Override** (Invalidar) localizada en la parte trasera del instrumento Xevo TQ.



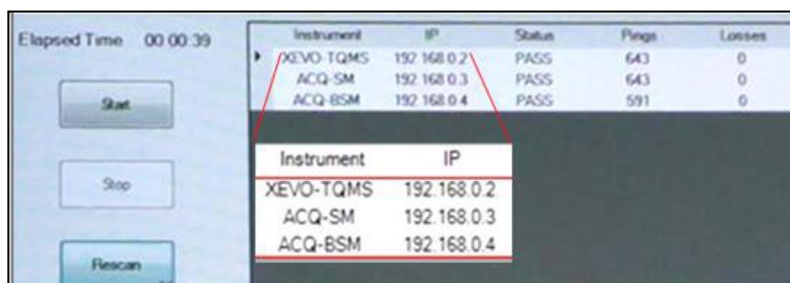
6.20. Bajar la palanca **electrónica** localizada en la parte trasera del instrumento Xevo TQ.

6.21. Cerrar todas las ventanas de la pantalla del escritorio y reiniciar la computadora.

6.22. Hacer clic en el icono  para abrir la función **NetEvaluator** (Evaluador neto).

6.23. Subir la palanca **electrónica** y enseguida verificar que los ventiladores se enciendan. Esperar a que el equipo realice su prueba de estabilidad.

6.24. Regresar a la ventana de la función **NetEvaluator** y hacer clic en **Rescan**. Verificar que se sincronicen todos los sistemas XEVO-TQMS, ACQ-SM y ACQ-BSM





Instrument	IP	Status	Pings	Losses
XEVO-TQMS	192.168.0.2	PASS	643	0
ACQ-SM	192.168.0.3	PASS	643	0
ACQ-BSM	192.168.0.4	PASS	591	0

Instrument	IP
XEVO-TQMS	192.168.0.2
ACQ-SM	192.168.0.3
ACQ-BSM	192.168.0.4

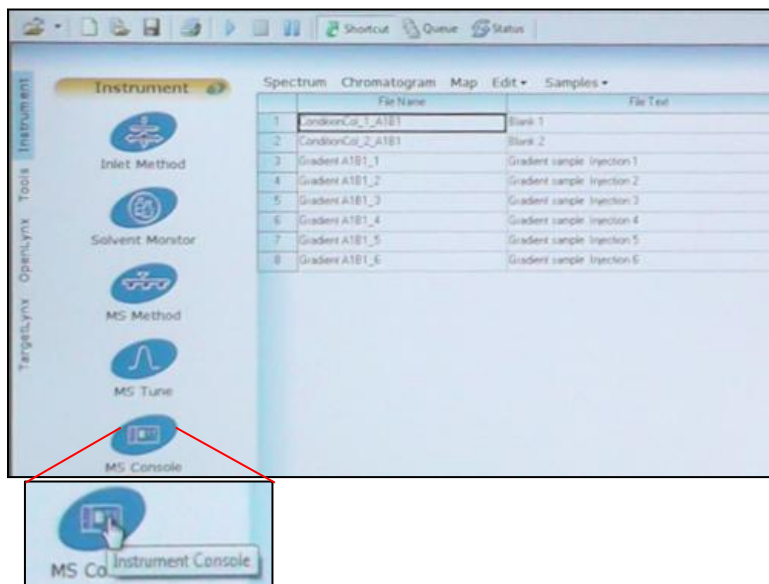
6.25. Subir la palanca **Override**.

6.26. Abrir la consola de sistema XEVO TQ MS Detector (**MS Tune**) y realizar una infusión.

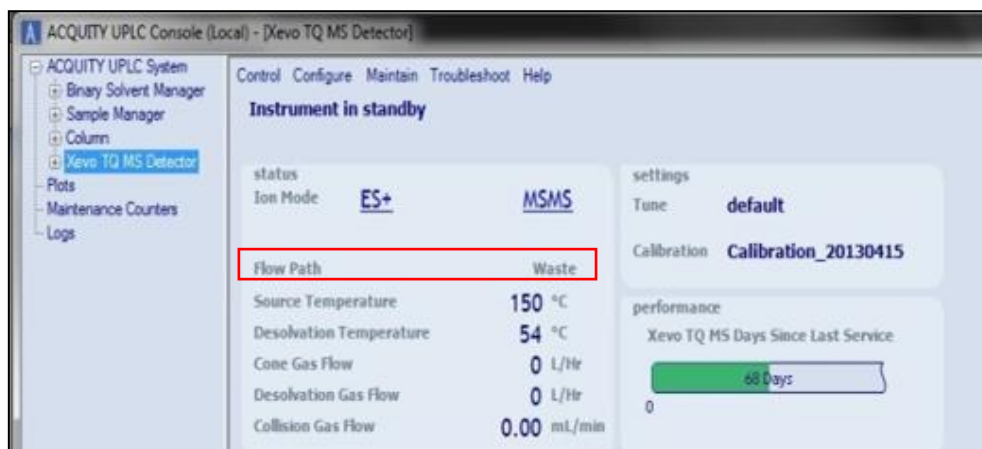
	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	



PUESTA EN MARCHA DEL SISTEMA

6.27. Regrese a la función **Instrument** y seleccione el icono **MS Console** para abrir la consola del instrumento.

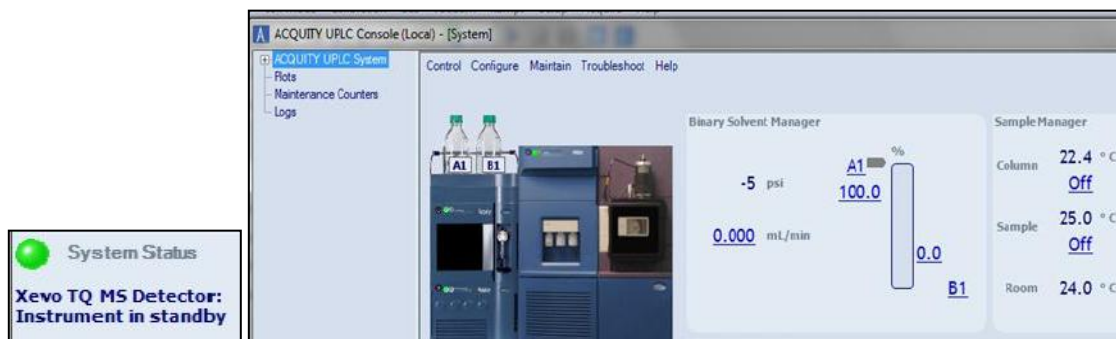


6.28. En la función **Xevo TQ MS Detector** verifique que en la opción **Flow Path** (trayectoria del flujo) se encuentre señalado **Waste** (desechos).

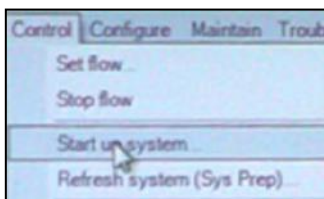


	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

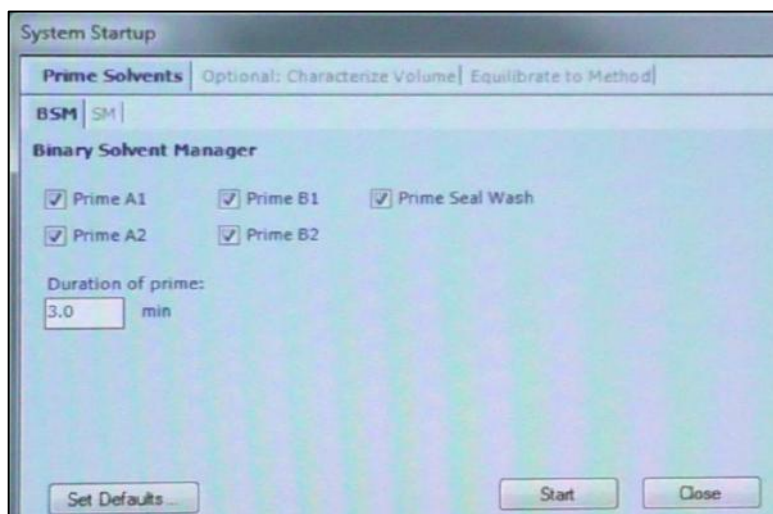
6.29. Dar clic en la función **ACQUITY UPLC System**






6.30. Para purgar ir a **Control** y dar clic en **Start up system** (puesta en marcha del sistema).



6.31. Para purgar la bomba, en la función **Prime Solvents** (Lavado de solventes) diríjase a la pestaña **BSM** (Binary Solvent Manager) y seleccione los canales que se deseen purgar (**Prime A1, A2, Prime B1, B2**), especifique la duración de lavado en la función **Duration of prime**.



 **Indicación.** Siempre activar el lavado de sellos (**Prime Seal Wash**).

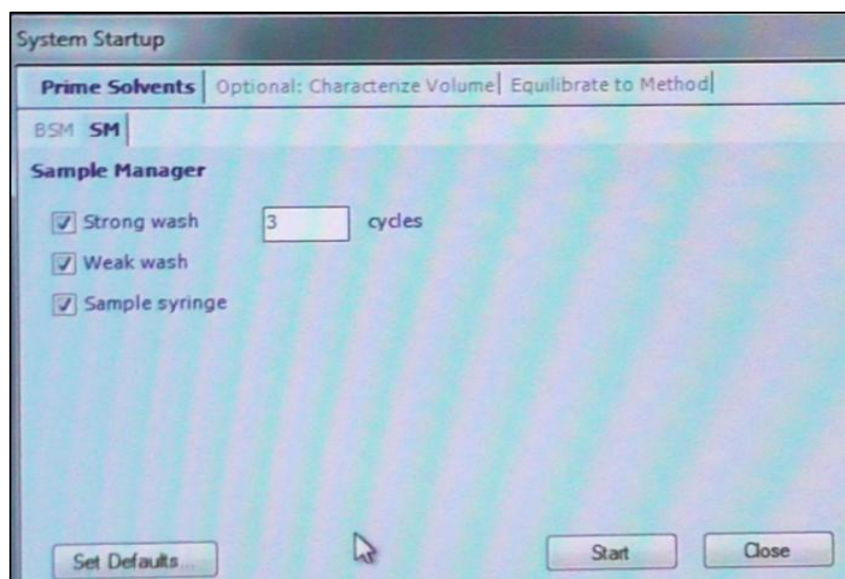
	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

Valores de la pestaña Binary Solvent Manager (lavado de solventes):

Intervalo	0.1 a 60 minutos
Predeterminado	Todas las líneas de flujo de solvente (A1, A2, B1 y B2) se lavan durante 0.1 minutos cada una.
Recomendado	Lavar durante 3 minutos .



- Todos los canales seleccionados se lavaran.
- Para volver a establecer los valores originales, hacer clic en **Set Defaults** (Valores pre determinados) en cualquier pestaña.

6.32. Dirigirse a **SM** (Sample Manager) para elegir el lavado de las agujas. **Strong wash** (Lavado fuerte), **Weak wash** (lavado débil) y **Sample syringe** (jeringa de la muestras).

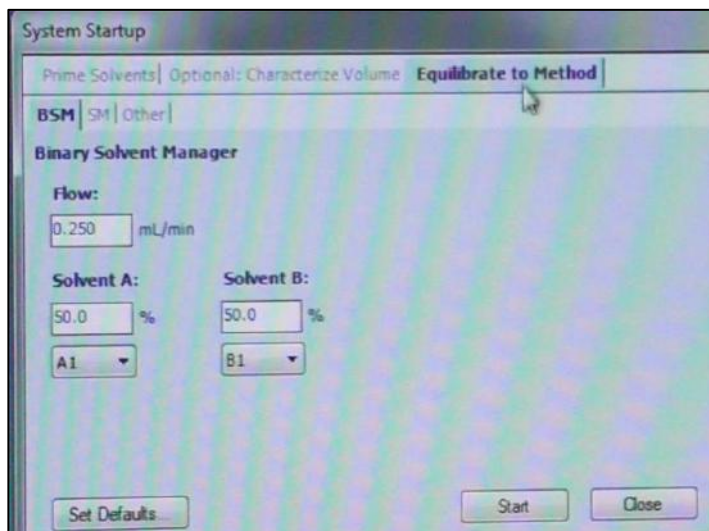


Valores de la pestaña Sample Manager (lavado del inyector):

Predeterminado	10 ciclos para cada jeringa seleccionada.
Recomendado	Lavar durante 3 ciclos .

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	



6.33. Para equilibrar al método, ir a la pestaña **Equilibrate to Method** y en la opción **BSM** especificar las condiciones de flujo, así como, el porcentaje de solvente en cada una de las bombas.



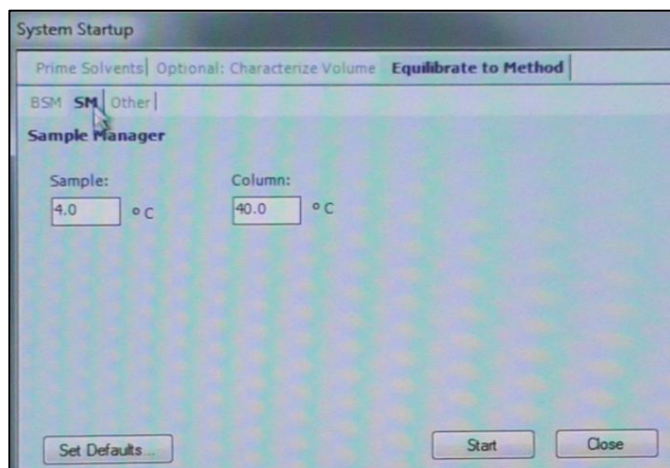
Valores de la pestaña Equilibrate to Method (Equilibrar al Método).

Parámetros de la puesta en marcha del sistema	Valores predeterminados	Valores permitidos
Flujo inicial del Método	0.25 mL/min*	De 0.1 a 2.0 mL/min
Composición de A y B (la suma debe ser 100%)	A1, 100% B1, 0%	A1, A2; del 0 al 100% B1, B2; del 0 al 100%
Temperatura de la columna	Off (Apagado)	Apagado o 5.0°C (9°F) por encima de la temperatura ambiente hasta 65°C (149°F)
Temperatura de la muestra	Off (Apagado)	Apagado de 4.0 a 40°C (de 39.2 a 104°F) en condiciones ambientales de 25°C (77°F)
Lámpara	On (Encendida)	Encendida o apagada


* Revisar las especificaciones de la columna (Ver su respectivo Manual).

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

6.34. Ir a opción **SM** y especificar las condiciones de temperatura.




6.35. Verificar que los cambios se hayan realizado correctamente y finalmente dar clic en **Start** para empezar el lavado.

 **Indicación.** Observar en la parte inferior izquierda de la consola ACQUITY UPLC que el estado del sistema (**System Status**) corra correctamente.

PRECACUCIONES PARA EL PURGADO DEL SISTEMA.



El purgado se utiliza para preparar un nuevo sistema, para realizar cambios de recipientes o de solventes, y para iniciar el sistema después de que haya estado inactivo durante más de 4 horas.

 **Precaución:** Para evitar dañar los componentes del sistema administrador binario de solventes, no se debe utilizar cloroformo, cloruro de metileno, acetato de etilo ni tolueno.

La importancia del lavado de las líneas nos permite lubricar los émbolos, llenar los recorridos de los tubos con solvente, y eliminar el solvente y/o las sales precipitadas que hayan podido quedar después de haber utilizado el sistema.

Para mantener la eficacia de los émbolos se recomienda el lavado de las líneas:

- Después de usar fases móviles amortiguadas.
- Si el sistema administrador binario de solventes ha estado inactivo durante varias horas o más.
- Si el sistema administrador binario de solventes está seco.

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

! Precaución. Verificar que la botella de la solución de lavado de la válvula de fluidos siempre contenga suficiente solución. Nunca permitir que se termine.



Recomendaciones:

- Se recomienda utilizar como solución de lavado para la válvula de fluidos 100% metanol.
- Lavar el sistema binario de solventes durante 2 minutos si el sistema ha permanecido inactivo durante 4 o 8 horas y si se tiene previsto utilizar los solventes que ya se encuentran en el sistema.
- Lavar el sistema binario de solventes durante 4 minutos si se tiene previsto utilizar solventes nuevos con la misma composición que los que ya se encuentran en el sistema.
- Lavar el sistema binario de solventes durante 5 minutos si se va a realizar un cambio de solventes por otros que tengan una composición diferente a la de los que ya se encuentran en el sistema.
- Utilizar un solvente de lavado fuerte en el cual la muestra se solubilice.
- Se recomienda utilizar un solvente de lavado suave en función de la composición química de la fase móvil y de la muestra de estudio, siempre y cuando todas las soluciones y los bufér sean miscibles y solubles.
- Se recomienda utilizar un solvente de lavado suave con un 90-75% de agua y 10-25% de metanol o acetonitrilo, y un solvente de lavado fuerte con 60% a 100% de metanol o acetonitrilo para las aplicaciones de espectrometría de masas (MS) y cromatografía de fase reversa con solución bufér.

! Precaución: para evitar la formación de sales de precipitado en el sistema, se recomienda utilizar un solvente intermedio, como por ejemplo, agua, al pasar de soluciones bufér a solventes de alto contenido orgánico. Es necesario consultar las tablas de miscibilidad de los solventes (ver anexo B).

Efectos del solvente de Lavado.

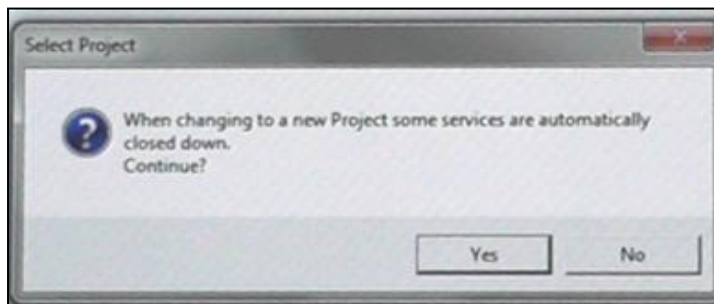
Propiedad	Efectos
Especie orgánica	Por regla general, los solventes fuertes y suaves deberían pertenecer a la misma familia. En ocasiones tal vez esto no sea posible. Sin embargo, se puede utilizar un solvente orgánico de lavado fuerte al 100%.
Composición del solvente	El solvente de lavado suave debe tener una composición lo más similar posible a la de la fase móvil del gradiente inicial.



	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

pH	Ajustar el pH de los solventes fuerte y suave para optimizar la forma de pico y el rendimiento de arrastre.
Concentración del solvente fuerte	El solvente fuerte no debe estar más concentrado de lo necesario para reducir el arrastre a un nivel aceptable.
Solubilidad de la muestra	La muestra debe ser soluble tanto en el solvente de lavado suave como en el fuerte. ! Precaución: Las proteínas (por ejemplo, en plasma) no son solubles en los solventes cuya composición orgánica es superior al 40%.
Diluyente de la muestra	El solvente de lavado suave entrará en contacto con la muestra, por lo que ambos deben ser lo más parecidos posibles. Para eliminar los efectos adversos sobre la forma de los picos como consecuencia de la composición de la base del relleno de la columna, ajustar la composición del lavado suave, sobre todo cuando se utiliza el módulo en modo de Loop parcial .
Proporción del volumen de lavado (suave/fuerte)	En un método, esta proporción de lavado suave/fuerte debe ser aproximadamente de 3:1, suficiente para garantizar que el lavado suave limpia al fuerte en la aguja y en el loop de muestra antes de la adquisición.
Duración de los ciclos	Los solventes de lavado de mayor viscosidad prolongan los ciclos de lavado.

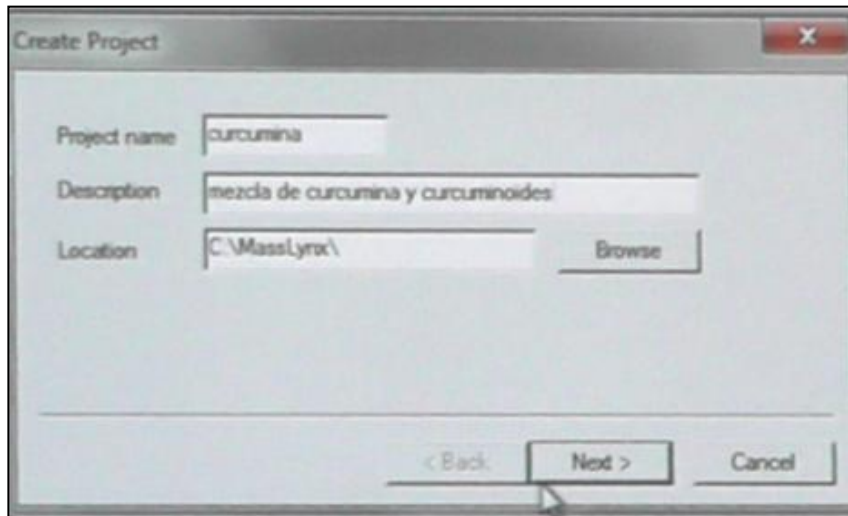
7. CREACION DE UN PROYECTO

- 7.1. Para crear un proyecto abrir la ventana de **MassLynx**, dar clic en **File >>Project Wizzard** (Archivo >> Proyecto Wizzard).
- 7.2. Si Aparece este mensaje (Cuando se cambia a un nuevo proyecto algunos de los servicios se cerraran automáticamente, ¿Continuar?) dar clic en **Yes**.

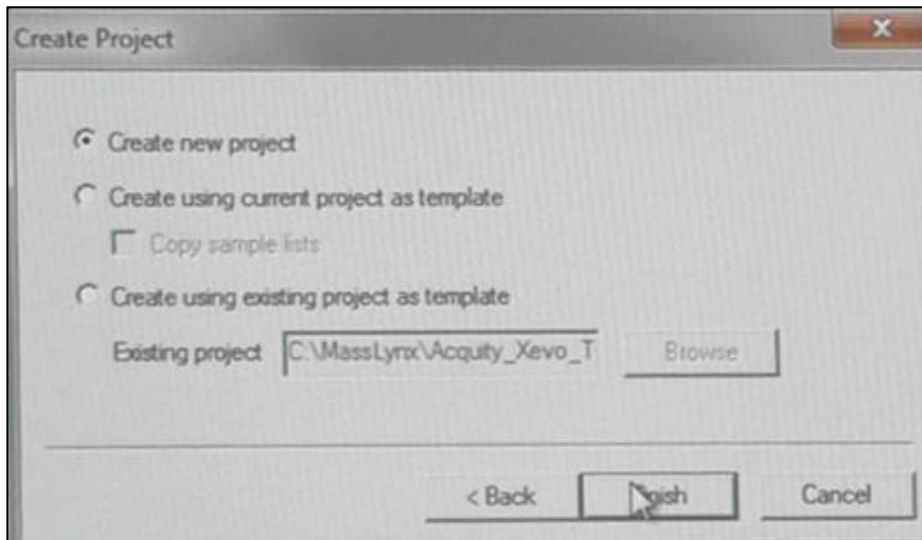




	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

7.3. En la opción **Project name** escriba el nombre del proyecto, si se desea anotar alguna descripción del mismo hacerlo en la opción **Description**, verifique en la opción **Location** (Ubicación) que este marcado la carpeta **C:\MassLynx** para guardar el proyecto; enseguida dar clic en **Next**.



7.4. Seleccionar **Create new project** (Crear un nuevo proyecto) y dar clic en **Finish** (finalizar).



	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

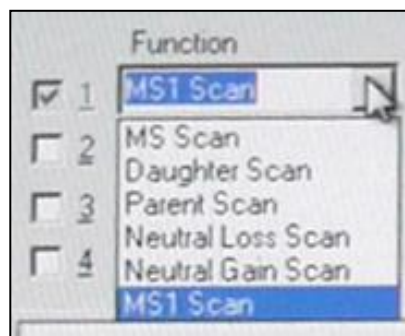
8. OPTIMIZAR CONDICIONES (ION PADRE, ION FRAGMENTO)


8.1. En la ventana **MS Tune**, activar la función 1 y desactivar las demás funciones.

	Function	Set	Mass	Span	Gain
<input checked="" type="checkbox"/>	1 MS1 Scan	56	311	10	58
<input type="checkbox"/>	2 Parent Scan	156	311	10	725
<input type="checkbox"/>	3 Daughter Scan	311	156	10	534
<input type="checkbox"/>	4 MS Scan	614	1971.61	10	10

8.2. Dar clic en la pestaña  para seleccionar el modo de función **MS1 Scan**.



- **MS1 Scan** (primer cuadrupolo)
- **MS Scan** (segundo cuadrupolo)
- **Neutralse** (utilizar cuando se trabajen muestras que tengan un núcleo en común).
- **Daughter Scan** (ion hijo)
- **Parent Scan** (ion padre)



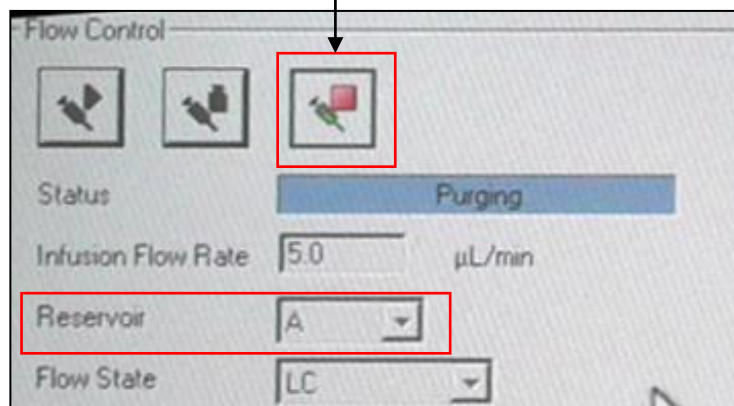
8.3. Dar clic al icono **MS Mode**  (esta función sirve para cuando no se quiere fragmentar y solo se busca optimizar las transiciones).

8.4. Para centrar la masa del compuesto (pico más alto que sale en el espectro) Establecer las condiciones de **Mass** (masa del analito), **Span** (son los Dalton para la visualización de la masa) y **Gain** (ganancia, es el aumento de la respuesta).

	Function	Set	Mass	Span	Gain
1	MS1 Scan	56	311	10	58
2	Parent Scan	156	311	10	725
3	Daughter Scan	311	156	10	534
4	MS Scan	614	1971.61	10	10

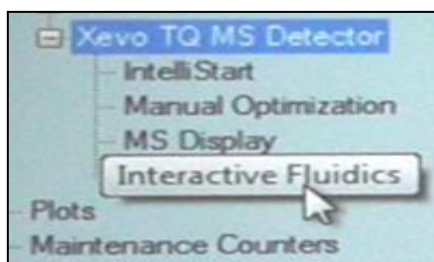
	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

8.5. Para purgar el reservorio, dirigirse a Fluidos (**Fluidics**)>>**Reservoir** y seleccione el reservorio a purgar (**A, B, C** o **Wash**). Dar clic al icono **Purge the fluidics system**.





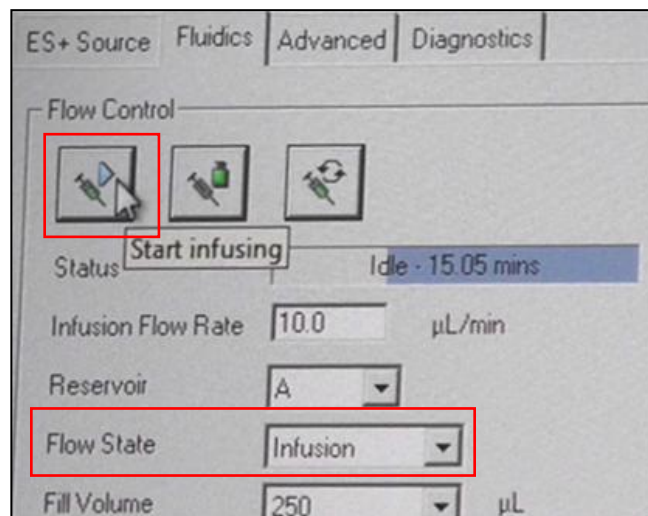
⚠ Indicación. Si se va a purgar algún otro reservorio, seleccionarlo después de que termine de purgar el primero, una vez seleccionado dar clic en icono de inyección.

- Para ver como esta trabajando el equipo seleccionar la función **Xevo TQ MS Detector** y dar clic en **Interactive Fluidics**.
- La función **Idle** indica el termino del ciclo de purgado del reservorio.

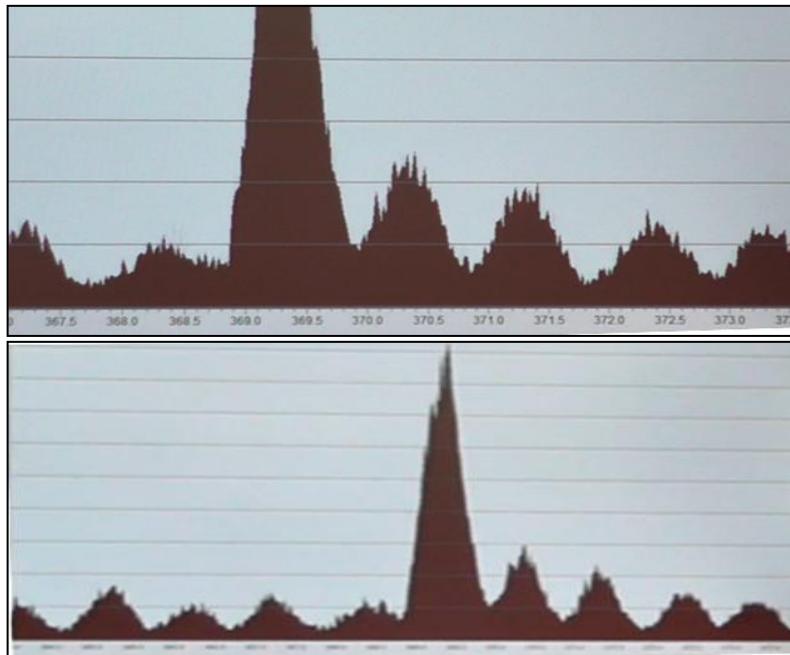


8.6. Para infundir la muestra al masas, en la pestaña **Flow State** (Estado del flujo), seleccionar **Infusion**. Dar clic al icono **Start infusing** para infundir el reservorio.



	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	



8.7. Dar doble clic en la zona de la escala para ir disminuyendo la visualización de la respuesta.



⚠ Indicación. Para saber si la respuesta es específica del compuesto, detener la infusión y observar la disminución de la respuesta, en caso de no disminuir indica que hay interferencias.

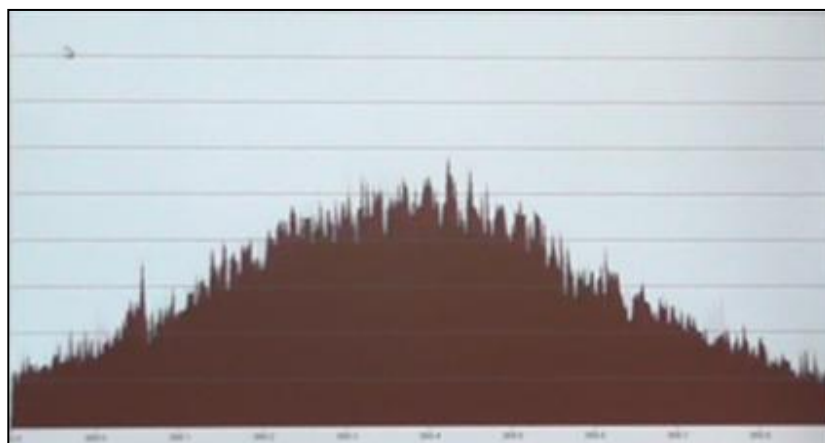
	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	


OPTIMIZAR EL VALOR DE LA MASA

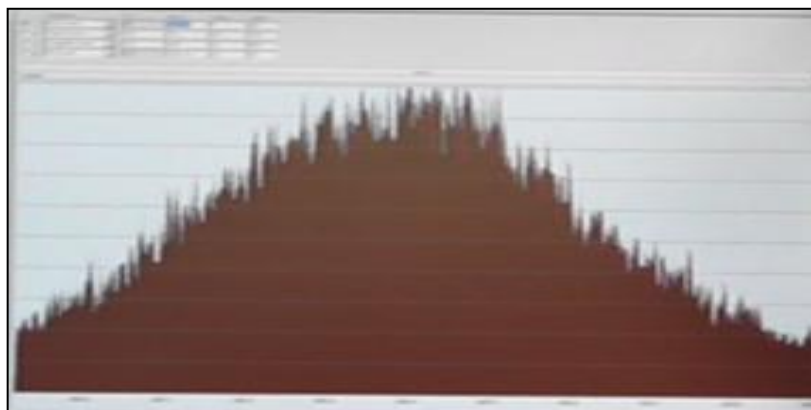
 **Advertencia:** AJUSTAR LOS VALORES DE ACUERDO AL ANALITO DE MAYOR INTERES.

- 8.8 Cambiar los valores de **Span** para ir centrando el valor de la masa (Mass), una vez centrado cambiar el valor de **Mass** por el valor obtenido.
- Cambiar el valor de la ganancia (**Gain**) para observar mejor la respuesta.



Mass	Span	Gain
369.4	1	15



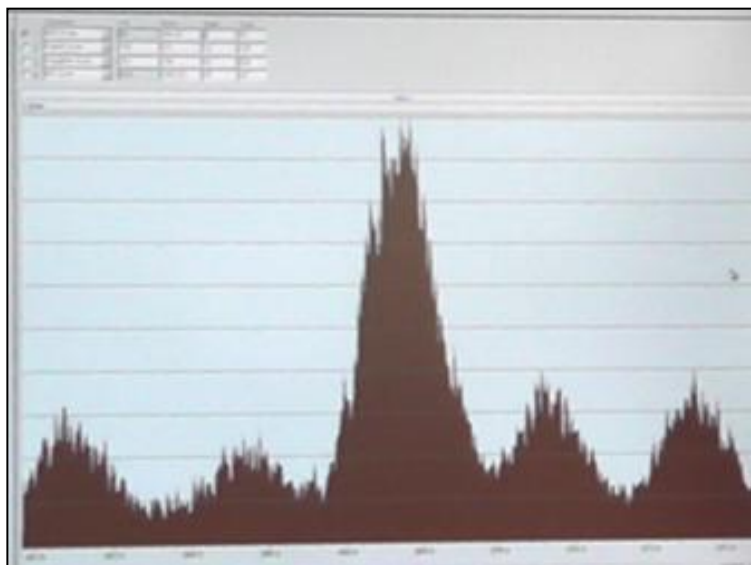
 **Indicación.** Es muy importante que el pico se visualice centrado, ya que, el valor de masa que se designe será la masa a la cual se cuantificará. El pico no necesariamente debe de verse estético, es importante que el pico máximo de respuesta se vea centrado.



Ejemplo: Pico con el valor obtenido de la masa


	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

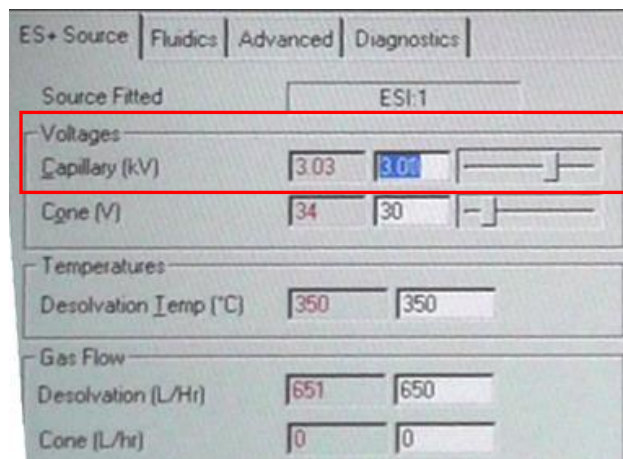
8.9 Para visualizar el pico aumentar el valor en la función **Span**.





AJUSTE DEL CAPILAR

8.10 Para ajustar el capilar, dirigirse a **ES+Source** y en la función **Capillary [kV]** establezca incrementos de 0.5, para ello, de clic sobre la línea cambie el valor y observe la respuesta. (Si se observa que el pico cae en vez de aumentar, significa que llego al límite del enlace de voltaje).


 **Indicación.** Utilizar el valor mínimo posible que de la mejor respuesta. (El valor señalado en rojo es la respuesta verdadera y el negro es el valor propuesto).



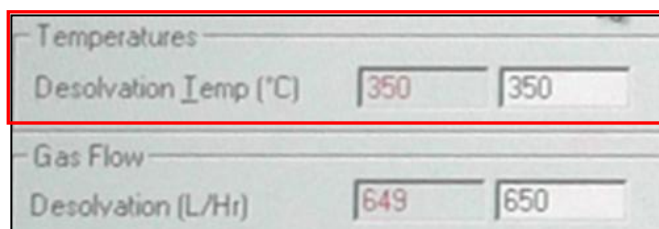
	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

AJUSTE DEL CONO

8.11 Para Ajustar el cono hacer lo mismo que el ajuste del capilar. De clic en la línea **Cone [V]**, cambie el valor y observe la respuesta.

 **Advertencia.** Cuando se tienen más compuestos en la misma muestra, solo ajuste el valor del voltaje del Cono para cada uno de los compuestos, NO cambie el valor ajustado del Capilar porque ya está optimizado (el valor del Capilar solo se ajusta una vez).

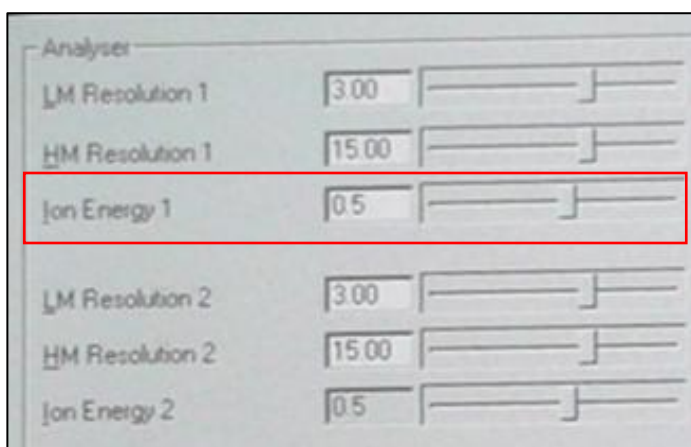
8.12 Ajustar la temperatura de la cámara de ionización para evaporar el solvente.




Temperatures	
Desolvation Temp (°C)	350
Gas Flow	
Desolvation (L/Hr)	649



ANALIZAR LOS CUADRUPOLOS

8.13 Establezca la energía del Ion para cada compuesto (para cambiar cualquier valor dar clic en la línea). Teclear las flechas de la computadora para ir obteniendo la respuesta (**Izquierda** para **Disminuir**, **Derecha** para **Aumentar**).

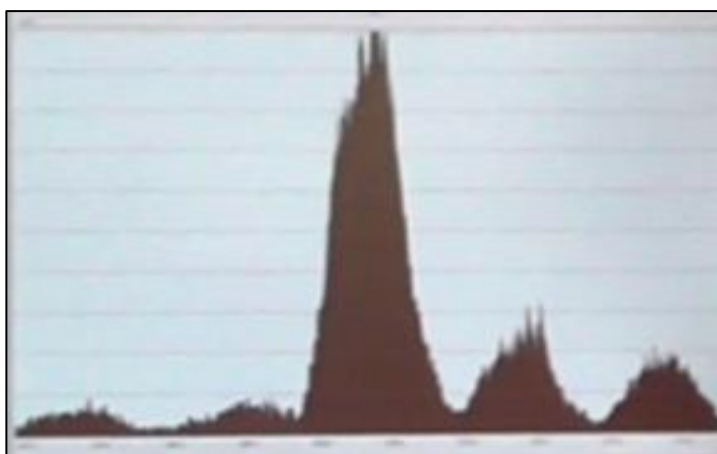


Analyser	
LM Resolution 1	3.00
HM Resolution 1	15.00
Ion Energy 1	0.5
LM Resolution 2	3.00
HM Resolution 2	15.00
Ion Energy 2	0.5

 **Indicación.** Cuando se disminuye hasta un 5% en la respuesta hay que aumentar 0.5 niveles.

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

8.14. Disminuir y aumentar la respuesta hasta que el pico vuelva al previamente optimizado en el ajuste del capilar o hasta que ya no se observe ningún cambio en la respuesta.





 **Advertencia.**

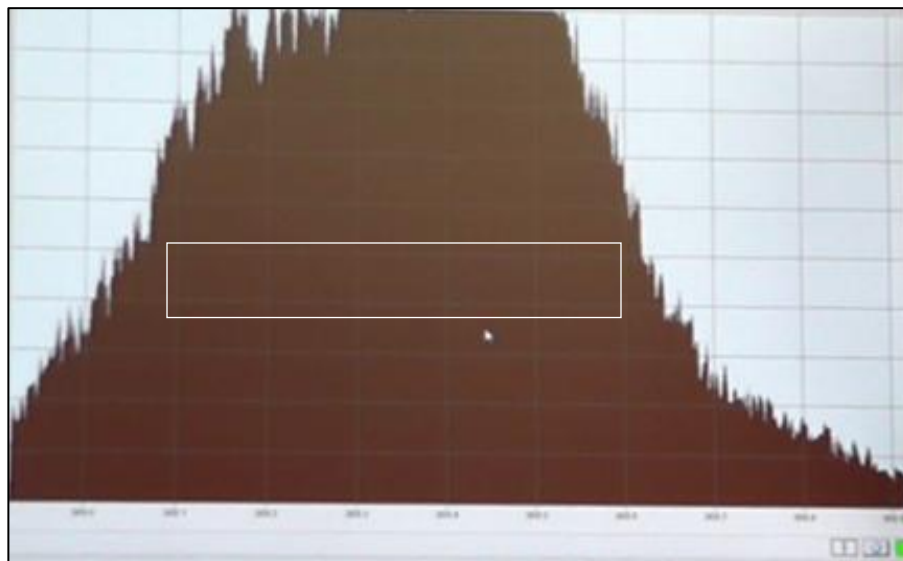
- Es importante establecer una energía de colisión aunque NO se vaya a fragmentar, esto es para que puedan viajar los iones a través de la celda de colisión; recuerde que la energía del ion es importante ya que es la energía con la que van a viajar los iones a través del cuadrupolo.
- Encender el Gas Argón ya que de lo contrario no va haber fragmentación.

ANCHO DEL PICO

8.15. Una vez optimizados los valores del capilar, el cono y la energía de ionización, observar el ancho del pico; mientras más ancho este el pico va haber mayor sensibilidad y menor resolución, por lo tanto, hay que llegar a un equilibrio entre estos dos.

- Para una cuantificación adecuada se recomienda ajustar el ancho del pico entre un valor de **0.6** y **0.8 Dalton**.
- Para establecer el equilibrio entre la sensibilidad y la resolución del pico, en la columna **Span** establecer un valor de 1, enseguida dar clic derecho sobre el pico ir a la opción **Grid** y dar clic en **Vertical** para obtener la cuadrícula.

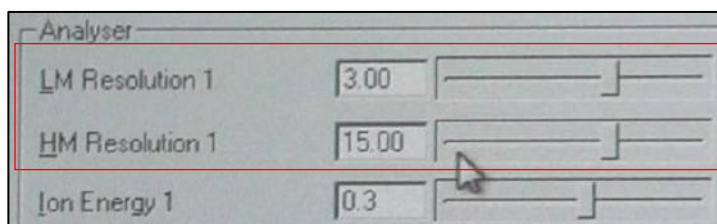
	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	





8.16. Para establecer el ancho del pico, situarse a la mitad de la altura del pico sumando los cuadros de abajo hacia arriba (el máximo quiere decir que es el 100%) enseguida sume los cuadros del ancho del pico para señalar los Dalton.

- Por ejemplo, en el pico anterior el ancho es de 5 cuadros lo que indica que al observar la escala de Dalton que es de 1 el valor será de 0.5 Dalton por lo que hay que ensancharlo.

8.17. Para ensanchar el pico, diríjase a la opción **LM Resolution** para ensanchar masas altas y **HM Resolution** para ensanchar masas bajas

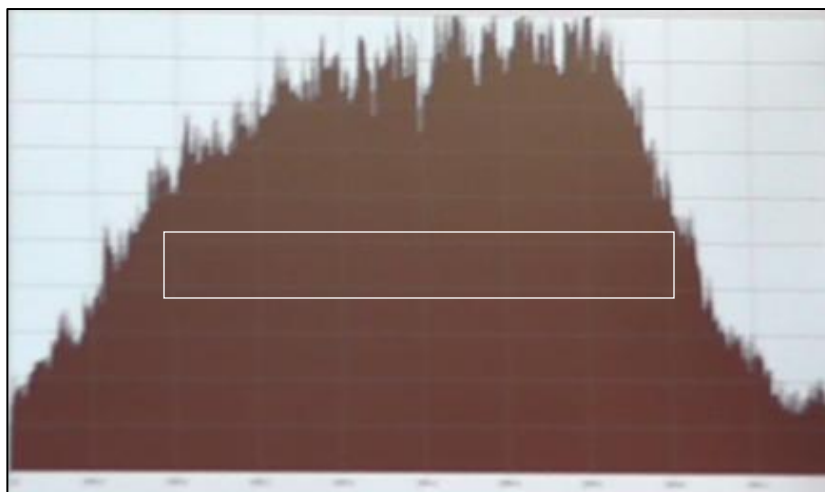



⚠ Indicación. El ensanchamiento del pico depende de la respuesta del Analito, si el Analito da una respuesta muy pequeña es recomendable ensanchar más el pico (hasta 0.8 Dalton) siempre y cuando el ensanchamiento no vaya a tener interferencia con algún compuesto que pudiera estar muy cerca del Analito o bien que no sobrepase a 1 Dalton con respecto al siguiente pico. Esto para poder discriminar bien entre un compuesto y otro ya que de lo contrario se puede sumar la respuesta del analito con la respuesta del otro compuesto y se perdería la resolución.

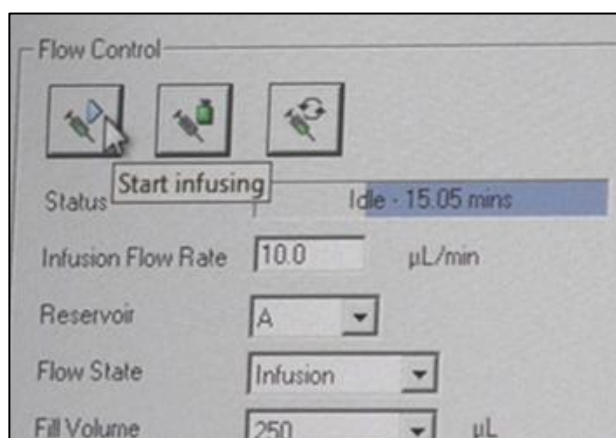
	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	



8.18. Aumentar el valor de **Span** para ver el pico delgado, enseguida aumentar el valor de **LM Resolution** y observar la respuesta. Si el pico se suma con otro disminuya la respuesta en la función **HM Resolution**.

⚠ Indicación. La función **HM Resolution** moverá la masa del analito, por lo tanto, para restablecerla y centrar el pico, ir a la columna **Mass** y ajustar al valor predeterminado.
Para dar un zoom al pico seleccionar la parte de interés con el botón izquierdo del mouse y soltar.




⚠ Indicación. En caso de que el flujo se interrumpa hay que rellenarlo, para ello, dirijase a **fluidics** y de clic al icono **Refill the syringe**  para rellenar la jeringa, enseguida dar clic en **Start infusing**





	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

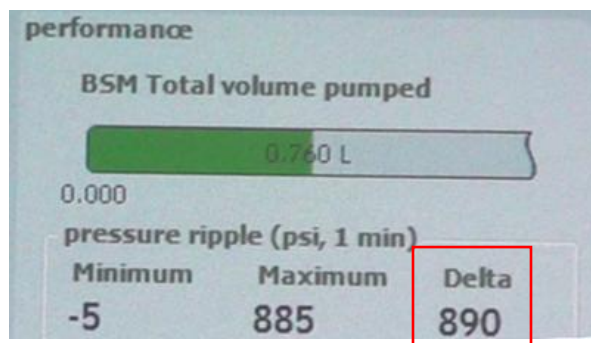
INFUSIONAR

8.19. Una vez que se hayan ajustado los valores óptimos del pico, ir a la consola


ACQUITY  y en la pestaña **Binary Solvent Manager** en la opción **Conditions**, establecer el flujo de la fase móvil, para ello hacer clic en el número

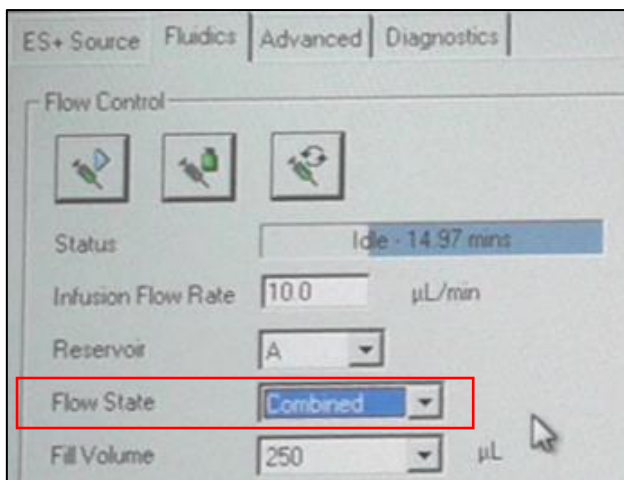
azul y especificar el valor de flujo. Dar clic en el icono 


 **Indicación.** Realizar incrementos de flujo de 0.1mL/min hasta el flujo deseado; en la función **Performance** verificar que el **Delta** se establezca para poder ir cambiando el flujo. Si no se estabiliza el delta indica que hay fuga.





8.20. Para infundir la muestra con la fase móvil y permitir que la muestra se mezcle con los aditivos de la fase móvil para poder ionizar mejor la muestra vaya

a **fluidics** (si aún está corriendo el flujo detenerlo dando clic en el icono ), en **Flow State** seleccionar la opción **Combined** para combinar la fase móvil con la muestra y ver si la respuesta incrementa.



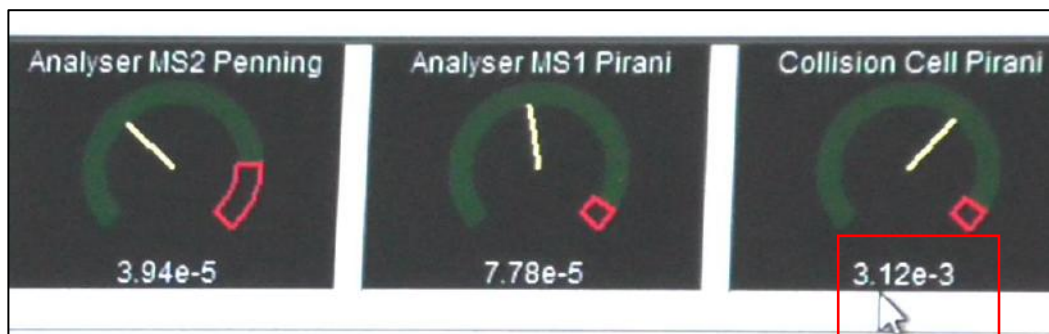
 **Indicación.** Para ver si la respuesta es dada por algún compuesto de la fase móvil, en la función **Flow State** elegir la opción **LC**, si no hay respuesta indica que no hay interferencias.



	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

RESOLUCIÓN A ALGUNOS PROBLEMAS.

- Cuando se observe que el **spray** no sale del cono, purgar los sistemas por separado (A / B) para ver si alguno de estos tiene fuga o aire.
 - Revisar los reservorios para ver si los filtros están en contacto con los solventes.
 - Abrir el administrador de solventes binario, desatornillar las tuberías por donde pasa el flujo y observar que corra flujo a través de estas.
- Para quitar el error de comunicación **Communication Failure**, Ir a la pestaña **Control>> Reset BSM** (resetear el Administrador de solventes binario).

⚠ Advertencia. Siempre verificar para todos los métodos que la energía de la celda de colisión se encuentre cerca de un valor de **3e-3** este es un valor adecuado que indica que la celda ésta trabajando correctamente.



	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

FRAGMENTACIÓN

8.21. Una vez optimizado los valores del compuesto de interés, proceder a buscar

los fragmentos del compuesto. Rellene la jeringa, y abra el gas Argón



⚠ Requisito: El gas de colisión argón; debe tener una pureza del 99.9%. Regular el suministro a 50 kPa (0.5 bar, **7 psi**).



8.22. Active la función **MSMS Mode**, de clic en la segunda opción y seleccione la función **Daughter Scan**.

8.23. En el valor de **Set** (Ajustar) escribir el valor de la masa del compuesto de interés.



	Function	Set	Mass	Span	Gain
<input checked="" type="checkbox"/> 1	MS1 Scan	56	369.3	5	10
<input checked="" type="checkbox"/> 2	Daughter Scan	369.3	301	5	3
<input type="checkbox"/> 3	MS1 Scan	311	339	5	25
<input type="checkbox"/> 4	MS Scan	614	1971.61	10	10

8.24. En la pestaña **ES+Source** disminuir el valor de la energía de colisión (**collision**) aproximadamente a un valor de 5.

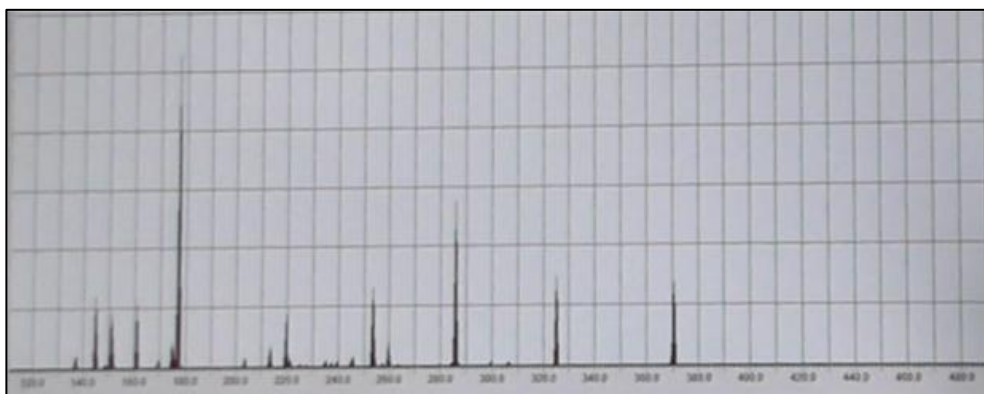
8.25. Desactivar la función 1 y en el valor de **Span** dar un valor mayor de 300 ya que este servirá para poder expandir el cuadrante y poder visualizar mejor los fragmentos de algún compuesto precursor.


⚠ Indicación. Para hacer un zoom en cualquier pico de interés seleccionarlo con el botón izquierdo del mouse hacer un barrido y soltar el botón enseguida.

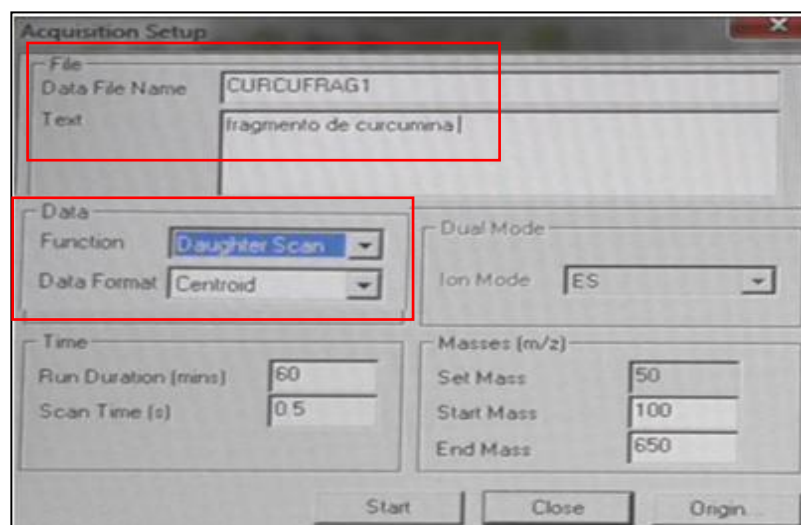
8.26. Regresar a la pestaña **ES+Source** y en la energía de colisión (**collision**) realice incrementos de 5 para ir observando la respuesta de los fragmentos, nótese que al ir aumentando la energía de colisión el pico con el que se hicieron los ajustes (el pico de mayor interés) va ir disminuyendo e ira aumentando los fragmentos.



	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

⚠ Advertencia. Recuerde que para buscar compuestos secundarios solo deben de cambiarse los valores de cono y energía de colisión.

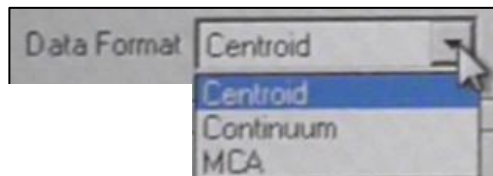


- 8.27. Una vez que se localizada la energía del otro compuesto de interés proceder hacer la adquisición de datos, diríjase a la pestaña **Acquire >>Start** (Adquirir >> Inicio); o bien, dar clic en el icono **Run** (Corrida) 
- 8.28. Enseguida en la opción **Data File Name** especificar el nombre del compuesto, si se desea escribir algún dato extra hacerlo en la opción **Text**.
- 8.29. En la función **Data** (Datos) seleccionar **Daughter Scan** (exploración Ion hijo).

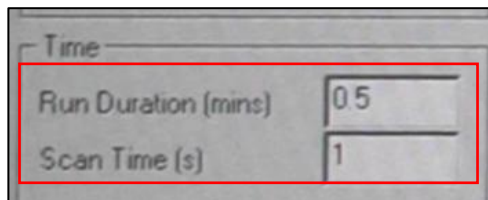


	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

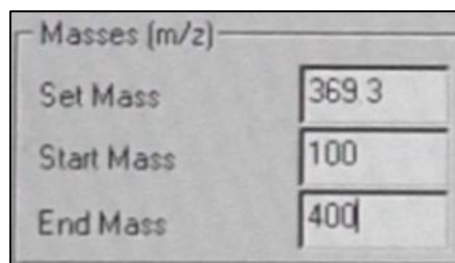
8.30. En el formato de datos (**Data Format**) seleccionar el tipo de adquisición de datos ya sea central (**Centroid**) solo muestra la masa centrada, continuo (**Continuum**) muestra todo el espectro o **MCA** al igual que el continuo muestra todo el espectro solo que con menos señal de ruido.



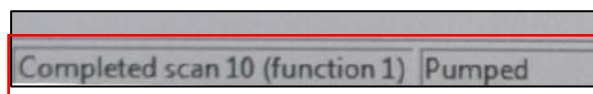
8.31. En la función **Time**, seleccione el tiempo de duración de la corrida en minutos **Run Duration (mins)**, así como, el tiempo en que se desea que aparezca cada espectro por segundo **Scan Time (s)**.





8.32. En la función **Masses (m/z)**, en la opción **Set Mass** especificar la masa del compuesto de interés, en la opción **Start Mass** seleccionar la masa donde se va iniciar la corrida y en **End Mass** donde se desea que termine la corrida (rango de la corrida) finalmente dar clic en **Start**.




- Observe en la parte inferior derecha de la ventana el escaneó. Cuando este se termine de completar aparecerá el espectro en la pantalla.

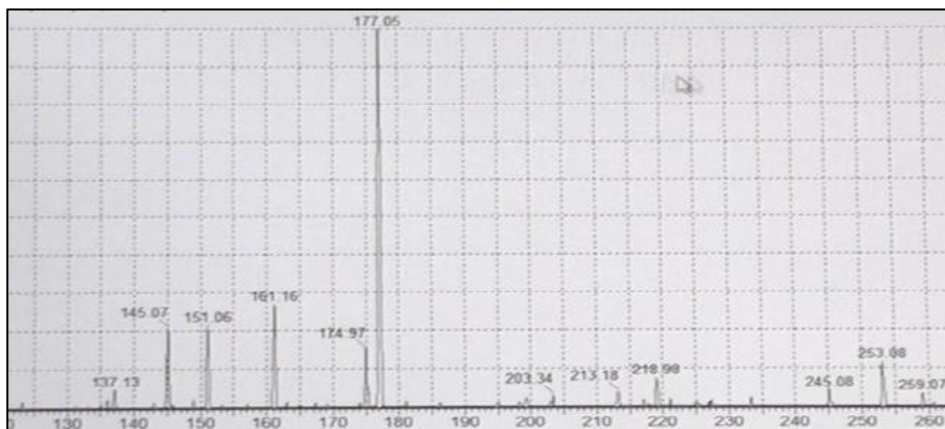


	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

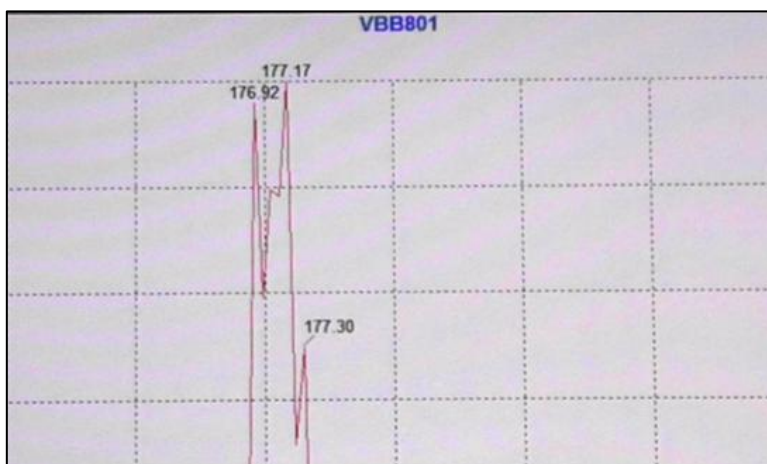
8.33. Detenga el flujo para poder visualizar el espectro, para ello, diríjase a la función **Fluidics**.

8.34. Abrir la ventana del **MassLynx** y dar clic en la pestaña **Spectrum** enseguida dar clic en el icono del reloj  para observar el último espectro adquirido.



- Otra manera de visualizarlo es ir a **File** y dar clic en **Open**, en la siguiente ventana seleccionar el ultimo espectro el cual se encuentra en el cuadro de **File Name**, activar la opción remplazar **Replace** localizada a la mitad del lado derecho de la ventana y dar clic en **OK**.



8.35. Para visualizar mejor los picos realizar un zoom (el zoom muestra el promedio de los picos).




8.36. Para visualizar de nuevo todos los picos dar clic al icono 

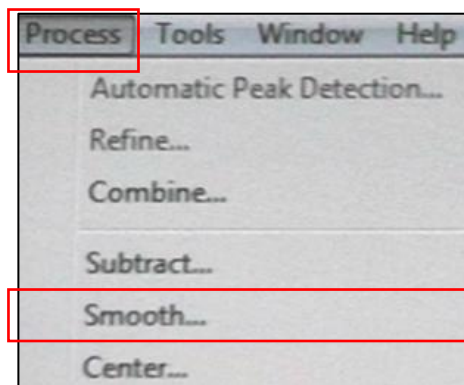
	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

8.37. Para ver las cuentas totales de todos los picos fijarse en la parte superior

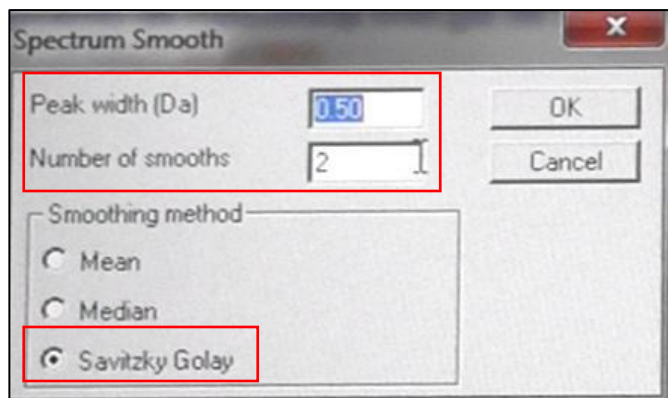
derecha del espectro 



8.38. Para ver los picos de una forma más definida hay que realizar un **Smooth**, para


ello, dar clic al icono  para evitar que los datos se sobre escriban en la misma hoja, seleccionar **Process** y la opción **Smooth**.

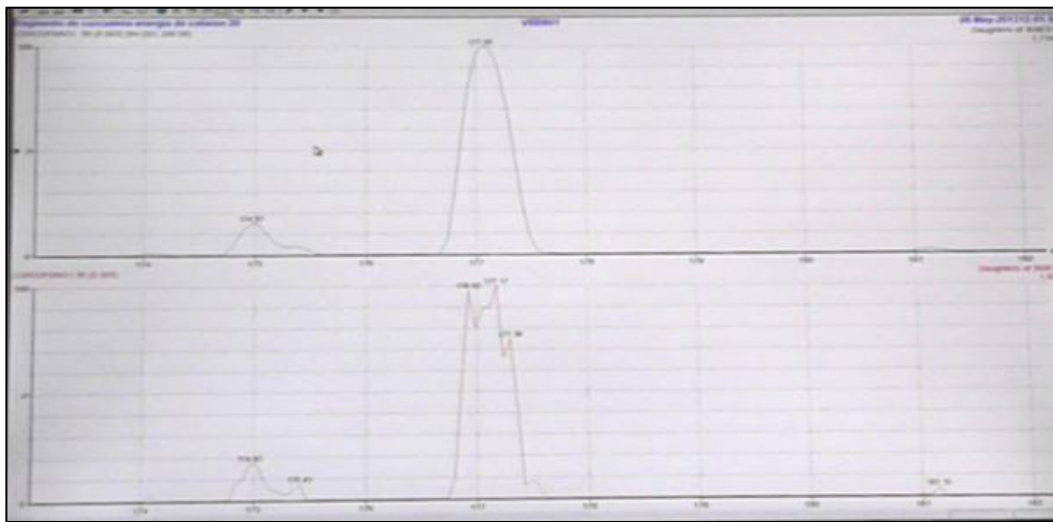


8.39. En la siguiente ventana se muestran las opciones del método de afinado, para espectros utilizar el algoritmo de **Savitzky Golay** en las opciones **Peak width (Da)** establecer el valor del ancho del pico en **Dalton** y en **Number of smooths** establecer el número de afinaciones a realizaran en el pico. Dar clic en Ok.



	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

8.40. Dar clic en el icono  enseguida realice un zoom seleccionando con el botón izquierdo del mouse una parte del pico de interés. En la siguiente ventana aparecerán los espectros totales en crudo y optimizado.





8.41. Una vez obtenidos los espectros proceder a optimizar la energía de colisión de los fragmentos de interés.

8.42. Diríjase a la ventana MS Tune , a continuación inicie el flujo, active la opción 3 y establezca la función **Parent Scar** (exploración del Ion padre).

8.43. La energía de colisión se optimiza con el que fragmento que mayor respuesta se haya observado en el espectro. Ir a la función **ES+Source** para poder establecer la energía óptima de colisión para la cuantificación.

8.44. En la opción **Set** (Ajustar) escribir la masa del fragmento de mayor respuesta, en la opción **Mass** escribir la masa del compuesto de interés para poder centrar el pico.

	Function	Set	Mass	Span	Gain
<input type="checkbox"/>	1 MS1 Scan	56	369.3	5	10
<input checked="" type="checkbox"/>	2 Daughter Scan	369.3	301	5	79
<input checked="" type="checkbox"/>	3 Parent Scan	177	369.3	5	25
<input type="checkbox"/>	4 MS Scan	614	1971.61	10	10


	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

8.45. Diríjase a la función 2 (escaneo ion hija) y en **Mass** escribir la masa del fragmento que se está buscando y en **Span** disminuir el cuadrante para ver mejor la respuesta aproximadamente en 5, cambiar el valor hasta que se visualice mejor la respuesta.

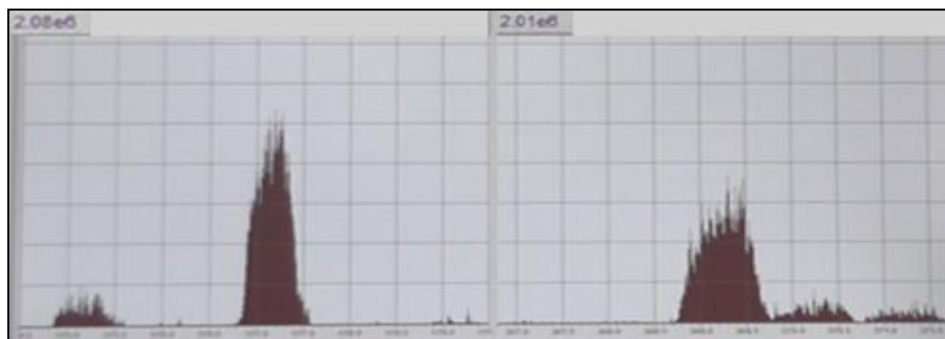
	Function	Set	Mass	Span	Gain
<input type="checkbox"/> 1	MS1 Scan	56	369.3	5	10
<input checked="" type="checkbox"/> 2	Daughter Scan	369.3	177	5	79
<input checked="" type="checkbox"/> 3	Parent Scan	177	369.3	5	25


REGLA PARA BUSCAR LOS FRAGMENTOS:



- Para visualizar correctamente un fragmento, en la función de **Set** colocar la masa exacta del compuesto precursor.
- Escribir en **Mass** la mitad del valor de la masa del compuesto más unos diez o veinte valores de más.
- Para seleccionar el **Span** el valor debe de incluir el valor de la masa del compuesto y la masa del precursor, por lo tanto, el valor del **Span** debe ser mayor.
- Para optimizar el fragmento es necesario disminuir el valor del **Span** para poder visualizarlo correctamente.

 **Indicación:** Cuando se tienen las condiciones para ver la respuesta y en esta se visualicen picos muy anchos y largos significa que en el sistema a entrado aire, por lo tanto, es necesario purgar la aguja.

8.46. Una vez visualizado los fragmentos equilibrar la respuesta, para ello, en la función **Gain** (ganancia), para ambos fragmentos (padre e hija) escribir el mismo valor por ejemplo 50, nótese que al equilibrarlos la respuesta se ve muy similar.

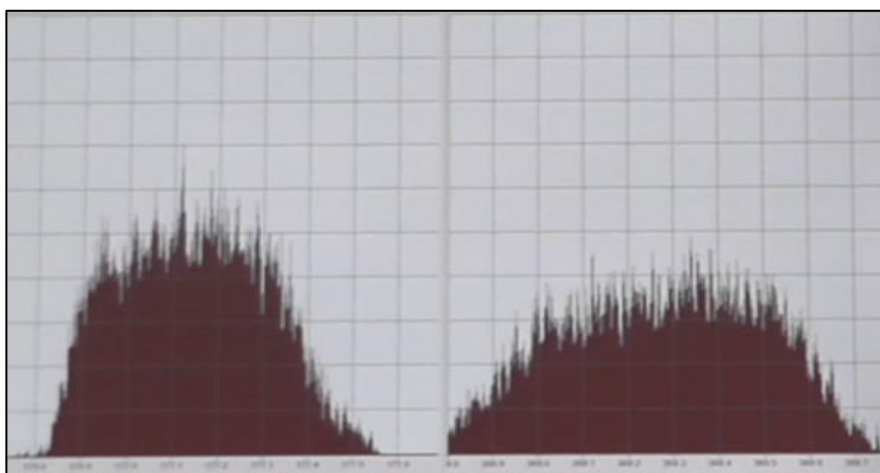


 **Indicación:** En la parte superior izquierda de cada pico se observa el valor de la respuesta.

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

8.47. Para obtener la energía óptima de colisión del fragmento, ir a la opción **ES+Source** y en la función **Collision** dar valores hasta que se observe que el pico se mantiene estable.

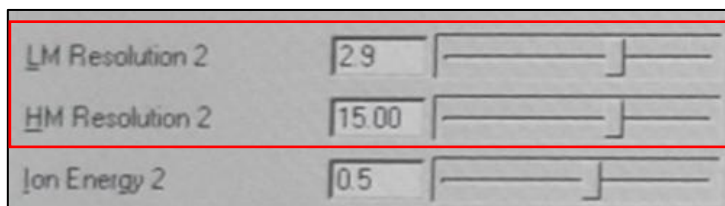
8.48. Una vez que se tiene la energía óptima se procede a centrar el pico, vaya a la función **Span** y disminuya la visualización. Centrar el pico en base a la mayor respuesta en la señal. Una vez centrado, en la función **Set** modificar el valor de la masa por el valor de la masa del fragmento centrado (guiarse con la escala).





! **Indicación.** Vea también el valor de la respuesta 1.33e6 si aumenta es que la respuesta se favoreció si disminuye entonces indica que no se eligió bien la señal máxima. Es muy importante centrar la masa en la señal más alta ya que de lo contrario se pierde respuesta.

8.49. Ya que se tiene centrado el pico se procede a equilibrar la resolución y la sensibilidad. Modificar los valores del segundo cuadrupolo. El primer cuadrupolo se modifica solo para optimizar el sistema con el compuesto de interés. El segundo cuadrupolo se modifica para el fragmento precursor (ion hijo).

8.50. Poner los mismos valores que en el primer cuadrupolo y proceda a establecer el ancho del pico.

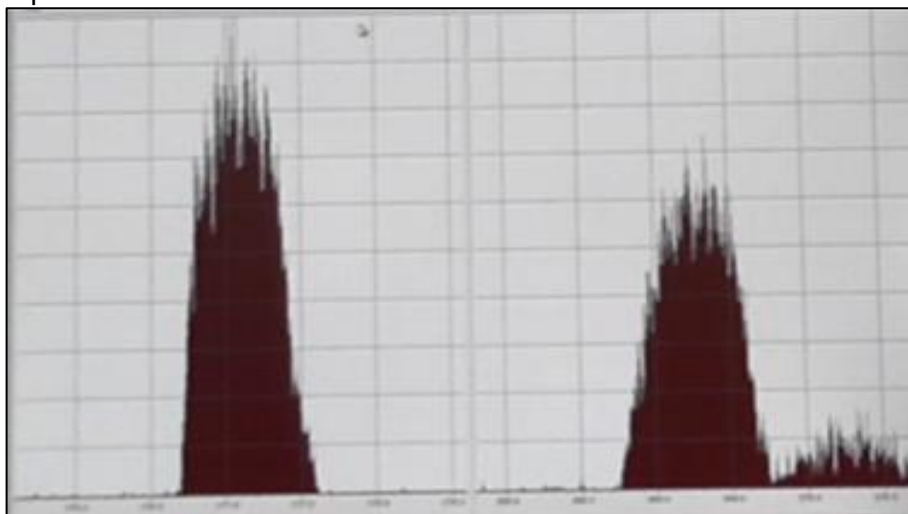


	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

8.51. Para optimizar los picos, modifique el valor de **Mass** por el valor de la masa que dio mayor señal, en la función **Span** disminuya y aumente el valor para establecer y visualizar el ancho del pico. (Ver el apartado “**Ancho del pico**”)

	Function	Set	Mass	Span	Gain
<input type="checkbox"/>	1 MS1 Scan	56	369.3	5	10
<input checked="" type="checkbox"/>	2 Daughter Scan	369.3	177.1	3	80
<input checked="" type="checkbox"/>	3 Parent Scan	177.1	369.3	3	80
<input type="checkbox"/>	4 MS Scan	614	1971.61	10	10

Picos optimizados





8.52. Una vez localizados y optimizados todos los fragmentos de interés dar clic al

icono **Save** .

⚠ Indicaciones:

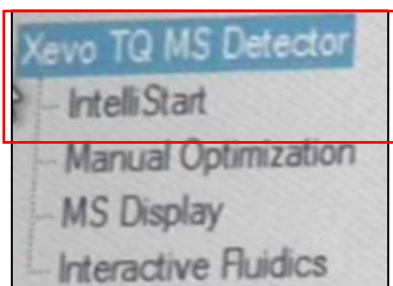
- NO modificar los valores de la energía del cono cuando se requiere ver la respuesta de algún otro compuesto dentro de la muestra. Cuando solamente se requiere ver los fragmentos de un mismo compuesto únicamente cambiar el valor de la energía de colisión.

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

- Para llevar a cabo una cuantificación es necesario solo un fragmento; no se recomienda cuantificar con dos fragmentos ya que si la respuesta de uno cambia el resultado varía, por lo tanto, este ya no es confiable.
- Para una identificación se necesitan dos fragmentos los cuales permitan caracterizar el compuesto.
- Para localizar a otro compuesto diferente (otro ion padre) hacer lo mismo, seleccionar la opción **MS1 Scan**, dar clic en el icono **MS Mode** y solamente modificar los valores del cono y la energía de colisión y buscar sus fragmentos.

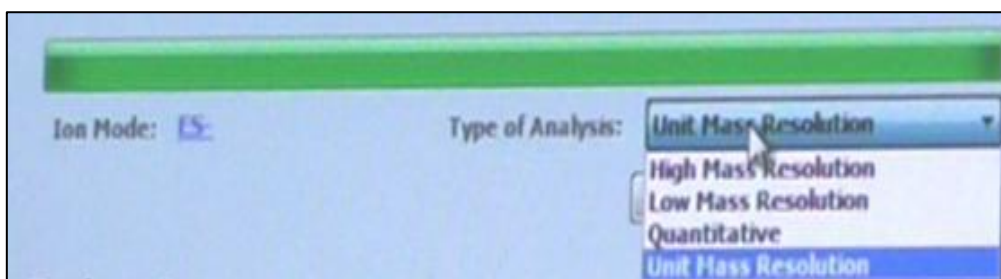
9. EXPLORACION AUTOMATICA INTELLI START



9.1. Para que el equipo haga una exploración automática. Abrir la consola del **ACQUITY**, en la pestaña de **Xevo TQ MS Detector** seleccionar la opción **IntelliStart**.



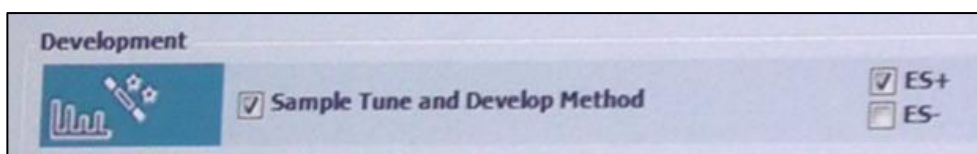
9.2. En la opción **Type of Analysis** (Tipo de análisis), seleccionar la calibración con la que se llevará acabo la optimización.


Unit Mass Resolution	<i>Unidad de Resolución de la Masa</i>
High Mass Resolution	Resolución máxima de la masa
Low Mass Resolution	Resolución mínima de la masa
Quantitative	Cuantitativo



	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

- 9.3. En la opción **Development** (Desarrollo), activar la función **Sample Tune and Develop Method** para Sintonizar la muestra y desarrollar el método de masas.
- **ES+** y **ES-** es para seleccionar la polaridad de las moléculas.

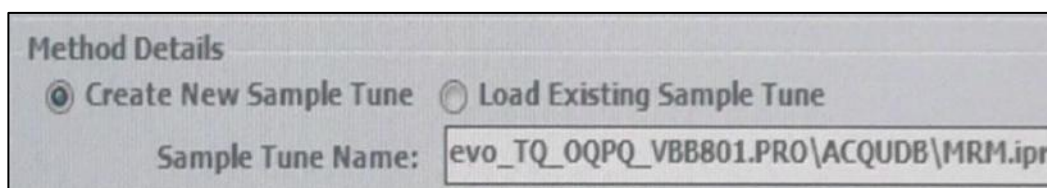


- 9.4. Dar clic al icono **Start**  en la siguiente ventana editar el nombre del compuesto dando clic en la primera fila, editar la masa del compuesto en la columna **Parent Mass** y seleccionar la polaridad de la molécula en la opción **Ion Mode**.

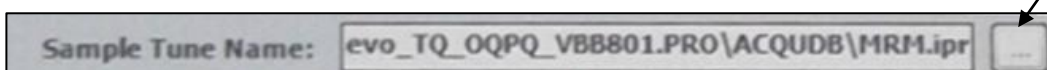
- 9.5. Hacer lo mismo para los demás compuestos que se deseen cuantificar.



Compound Name	Parent Mass	Ion Mode
<input checked="" type="checkbox"/> curcumina	369.3	ES+ ▼
<input checked="" type="checkbox"/> curcu1	339	ES+ ▼
<input checked="" type="checkbox"/> curcu2	309	ES+ ▼
<input type="checkbox"/>		ES+ ▼

- 9.6. En la función de detalles del método (**Method Details**) activar la función **Create New Sample Tune** para la creación de una nueva hoja para la sintonización de la muestra.

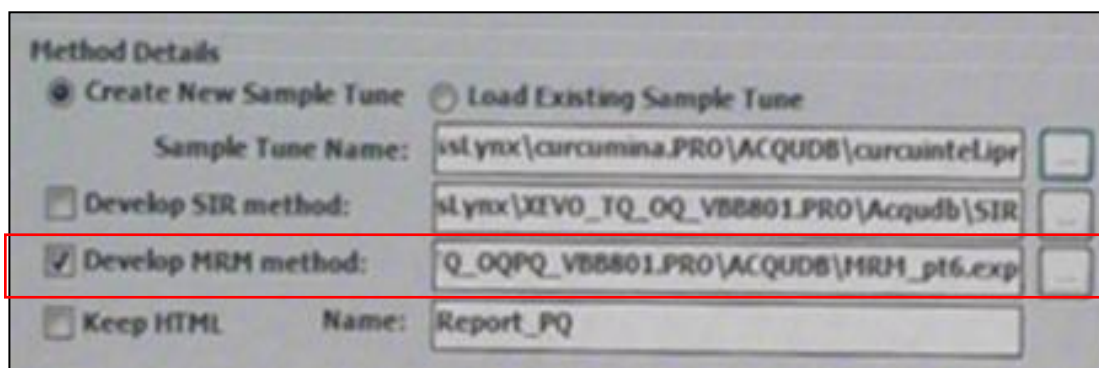


- 9.7. Para editar el nombre de la sincronización de la muestra dar clic en el botón editar.



	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

- 9.8. En la siguiente ventana diríjase a la opción **Computer >> System (C:)**, abrir la carpeta de **MassLynx**, enseguida abrir la carpeta con el nombre del proyecto y la carpeta **ACQUDB**. Nombre el archivo y guárdelo.
- 9.9. Para editar el nombre y guardar el método de desarrollo MRM, dar clic al botón editar de la función **Develop MRM method**.



Method Details

Create New Sample Tune Load Existing Sample Tune

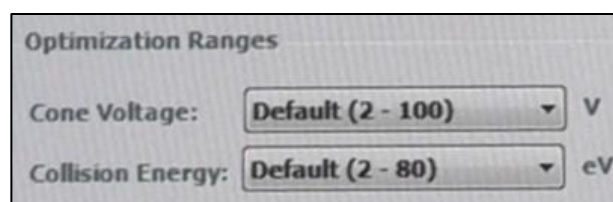
Sample Tune Name:

Develop SIR method:

Develop MRM method:

Keep HTML Name:

- 9.10. En la siguiente ventana dirigirse a **System (C:)** abrir la carpeta de **MassLynx** enseguida abrir la carpeta con el nombre del proyecto y la carpeta **MethDB** finalmente nombre y guarde el método.
- 9.11. En la función **Optimization Ranges**, seleccionar los Rangos de optimización de voltaje del cono y de la energía de colisión.





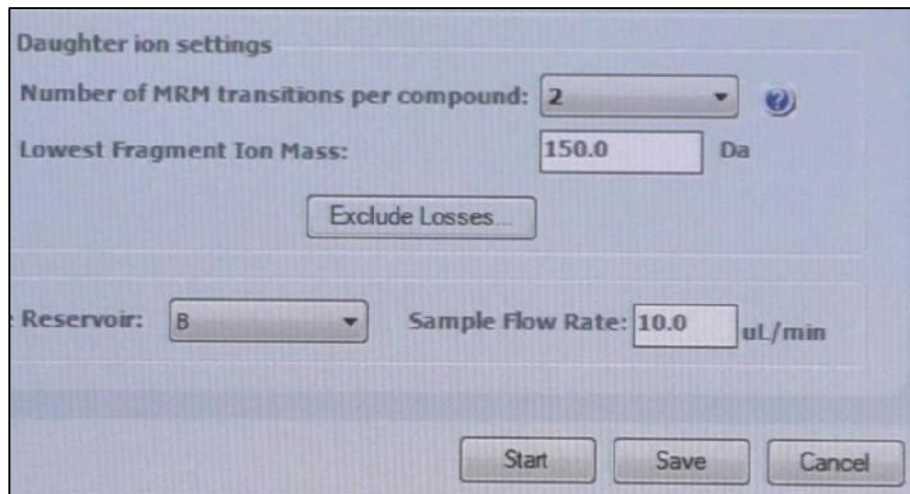
Optimization Ranges

Cone Voltage: V


Collision Energy: eV

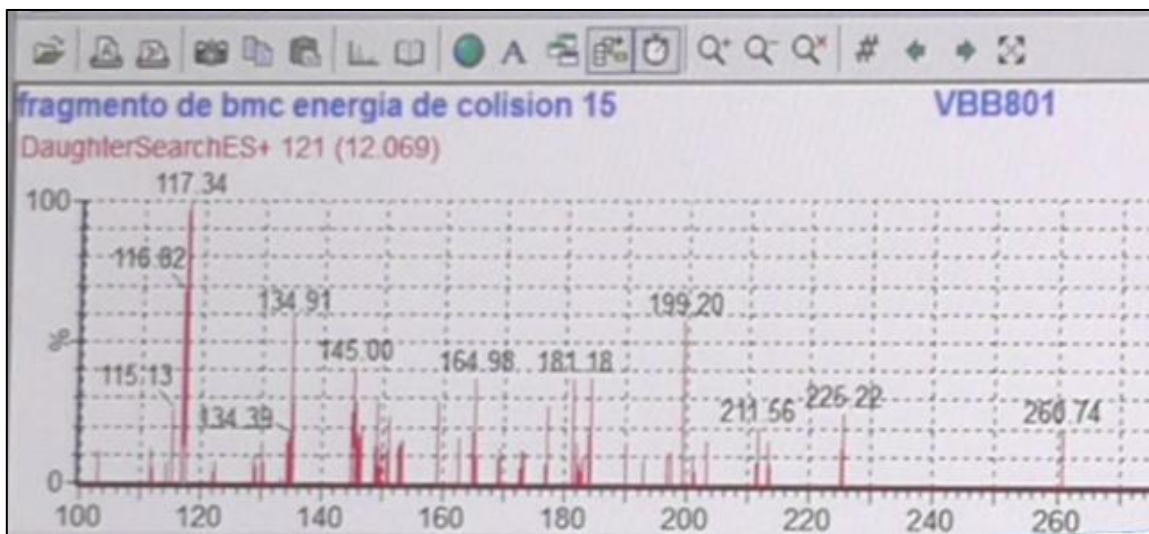
- 9.12. En la función **Daughter ion settings**, seleccionar cuantas transiciones (fragmentos) se desean por minuto, así como especificar cuál es el valor del fragmento de masa más pequeño a detectar (poner un valor 10 veces menor del fragmento a detectar) seleccionar el Reservorio que contiene la muestra y especificar la velocidad del flujo de la muestra, finalmente dar clic en **Start**.



	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	



- Espere a que termine el análisis.

9.13. Verificar en la función **SE+Source**, que las funciones del MS Tune se encuentren inhabilitadas  lo que indica que automáticamente el equipo se está optimizando. Para ir viendo el espectro conforme se va optimizando dar clic en el icono del reloj.




	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	


Recomendaciones:



- Cuando se tengan compuestos con muy poca intensidad (que estén presentes en la muestra a muy baja concentración), se sugiere buscar de uno por uno cada compuesto, ya que, si se inicia la opción de **IntelliStar** este puede no dar una respuesta.
- Para utilizar la opción de **IntelliStar** primero se recomienda visualizar y centrar correctamente la masa en la función de **MS Tune** y una vez encontrada ahora si utilizarla ya que esta opción facilita el tiempo de análisis.
- Los valores en la respuesta esperados en el **MS Tune** se encuentran entre un intervalo máximo de $10e6$ y mínimo de $8e5$ o $9e5$. Si los valores son más bajos se puede tener interacción con los niveles de ruido; a menos que el ruido sea muy bajo pueden tomarse en cuenta.
- Se recomienda trabajar con el **MS Tune** cuando se tengan concentraciones al menos de $1\mu\text{g/mL}$, ya que, concentraciones más grandes producen una saturación lo que ocasiona que no se visualicen correctamente los picos. Utilizar concentraciones mayores o menores a la recomendada siempre y cuando la respuesta no se observe correctamente.
- Para moléculas cuyos fragmentos sean difícilmente ver una respuesta ya que se tienen masas muy cercanas unas con otras, se recomienda utilizar los isótopos de los elementos que contiene la molécula dado que estos pueden influir en ella, por lo tanto, al seleccionar uno de los isótopos se pueden obtener los fragmentos.

9.14. Una vez terminado el análisis **IntelliStar** aparecerá el reporte del método. El software acomoda las respuestas en base a la intensidad de la cuenta de iones de las transiciones (de mayor a menor intensidad).

 **Indicación:** Si en el reporte del método se indica que no se encontró respuesta, optimizar nuevamente el valor de la masa.

(Si el análisis fue exitoso se mostrara una palomita en color verde caso contrario

mostrara una cruz )

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

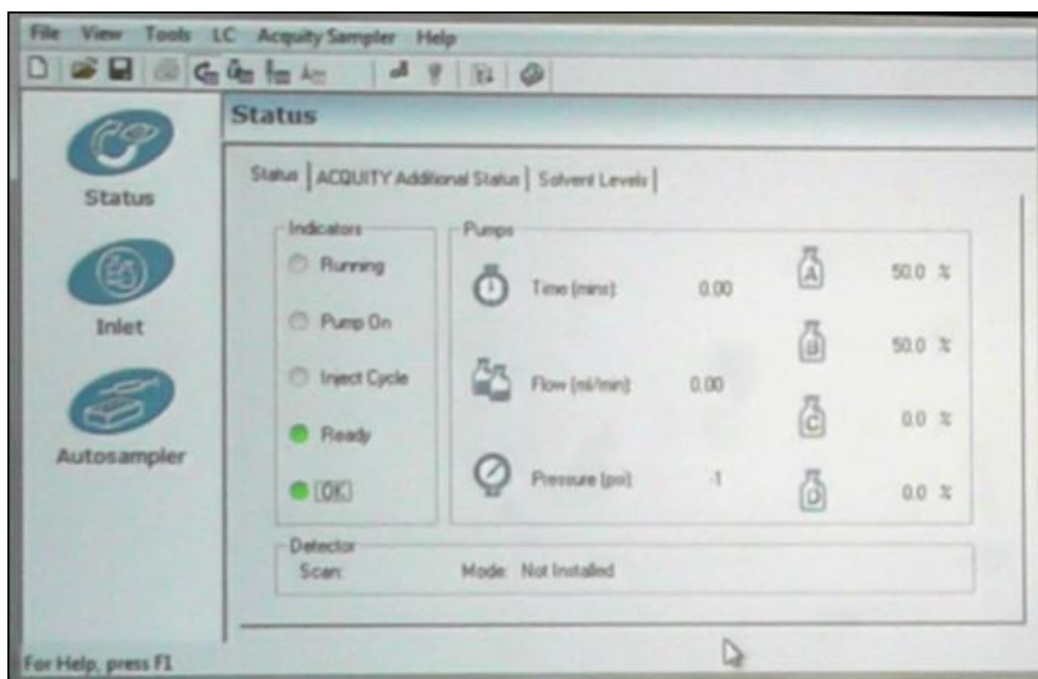
10. CREACIÓN DE MÉTODOS

CREACIÓN DEL MÉTODO DE INSTRUMENTO.

10.1. Para escribir las condiciones del método de trabajo, abrir la consola del **MassLynx**; diríjase a la función de **Instrumento** y dar clic en la opción **Inlet**





Method (método de entrada)



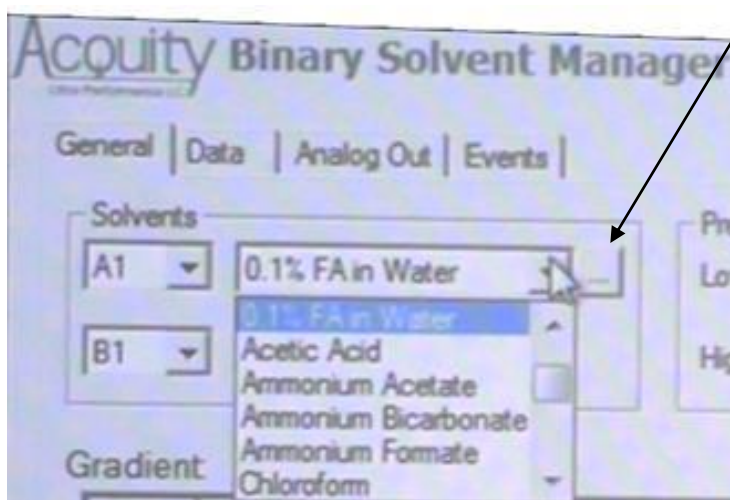
Ventana Inlet Method

10.2. Diríjase a la opción **Inlet** (Entrada)

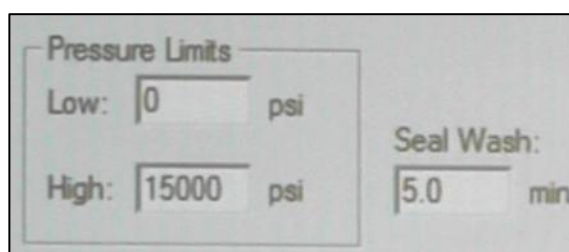


	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

10.3. En la función **General** se indicarán las condiciones de trabajo. En el estado **Solvent** (Solvente) señala la bomba a utilizar **A1 / B1** enseguida busque el solvente a utilizar desplegando las opciones dando clic en la pestaña. En caso de no encontrar en la lista el nombre del solvente, dar clic en el icono Editar y escribir el nombre del solvente que se vaya a utilizar.





10.4. Dejar los límites de presión (**Pressure Limits**) como están señalados en el sistema.



⚠️ Aviso. La función **Seal Wash** indica el tiempo en el que se llevará a cabo el lavado de sellos por ejemplo cada 5min.

⚠️ Precaución:

- **Revisar las especificaciones de la columna.** (Ver su respectivo Manual)
- Evite trabajar al nivel de presión máxima de la columna pues se puede fracturar el compuesto de relleno.

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

10.5. En la Función **Run time** especificar el tiempo de la corrida del gradiente en minutos (min).

Run Time: min

10.6. Para la tabla de Gradiente de elución (**Gradient**), en la primer fila especificar las condiciones de inicio del gradiente: el flujo **Flow (mL/min)** y los % de solvente a utilizar en cada una de las bombas **A (acuoso)** y **B (orgánico)**, en la siguiente fila especificar el tiempo del cambio de solvente **Time (min)**, así como las condiciones de flujo y % de solventes. Dar clic en OK.


	Time (min)	Flow (mL/min)	%A	%B	Curve
1	Initial	0.25	80.0	20.0	Initial
2	4.00	0.300	80.0	20.0	6
3	5.00	0.300	80.0	20.0	6
4	20.00	0.300	80.0	20.0	11
5					
6					



Comment:

OK

- Ejemplo de un gradiente lineal.

	Time (min)	Flow (mL/min)	%A	%B	Curve
1	Initial	0.250	90.0	10.0	Initial
2	6.00	0.250	10.0	90.0	6
3	6.01	0.250	90.0	10.0	6
4					
5					

 **Aviso.** La columna **Curve**, sirve para indicar el tipo de gradiente a utilizar.

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

Perfiles de una curva de gradiente [6]

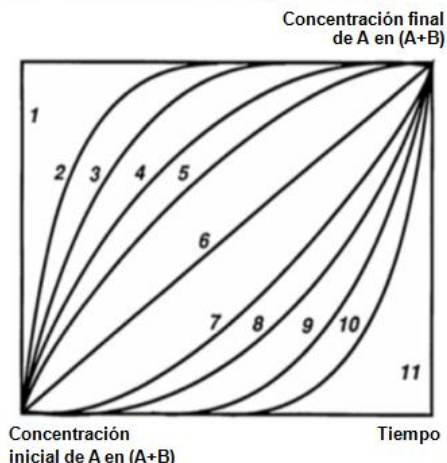


Figura 39. Perfiles de una curva de gradiente. Donde A, representa el disolvente más fuerte y B, el disolvente más débil en términos de fuerza de elución (ϵ°)

Número	Efecto de la Curva
1	Isocrático , Va inmediatamente a la condición especificada.
2 a 5	Convexo , Rápidas en alcanzar la composición final de la fase móvil. Se utilizan para picos superpuestos al final del cromatograma.
6	Lineal (por defecto)
7 a 10	Cóncavo , Lentas para alcanzar la composición final de la fase móvil. Se utilizan para picos superpuestos al principio del cromatograma.
11	Escalonado , Mantiene la condición de arranque hasta el siguiente paso.

- Para insertar o borrar cualquier dato escrito, seleccionarlo dar clic derecho y elegir la opción deseada.



	Time (min)	Flow (mL/min)	%A
1	Initial	0.250	90.0
2	6.00	0.250	10.0
3	5.00	0.300	80.0
4	20.00	0.200	80.0
5			
6			
Comm			

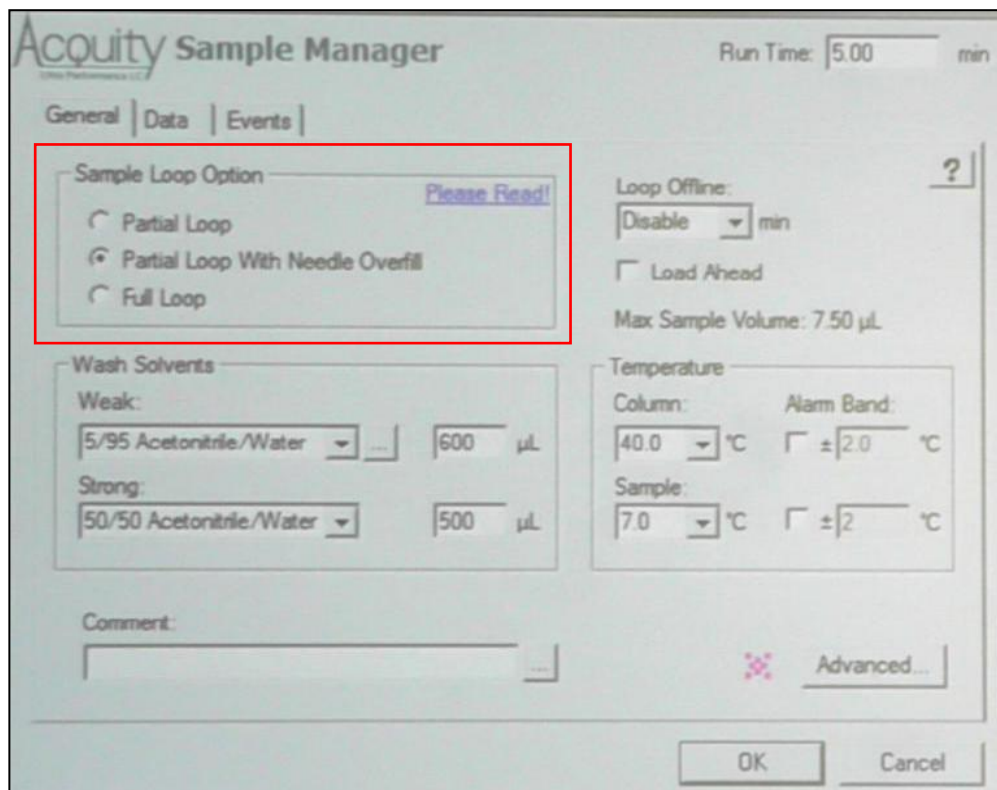
- **Insert Row** / Insertar Filas
- **Delete Rows** / Borrar Filas
- **Cut Rows** / Cortar Filas
- **Copy Rows** / Copiar Filas
- **Paste Row** / Pegar Filas





10.7. Ir a la función **Autosampler** (automuestreador)

10.8. En la pestaña **General** en la función **Sample Loop Option**, activar el tiempo de inyección de muestra que se va utilizar.

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	



- **Partial Loop** (Loop parcial). Esta opción se utiliza en situaciones en las que el tiempo de análisis tiene más importancia que cualquier otro aspecto, cuando el volumen de inyección de la muestra es muy pequeño. Inyecta del 10 al 50% del volumen del loop.
- **Partial Loop With Needle Overfill** (Sobrecarga de la aguja de Loop parcial). Se utiliza de manera general. El modo de inyección consiste en meter dos separaciones de aire, una al principio y otra al final; lleva la muestra con el afán de que ésta no se diluya o no se disperse en la fase móvil. Proporciona una exactitud superior en Loop parcial, precisión y linealidad para una amplia gama de muestras, incluidos los ácidos, las bases fuertes y débiles, y los compuestos hidrófilos e hidrófobos. Inyecta del 10 al 75% del volumen del loop.
- **Full Loop** (Loop completo). Se recomienda cuando la exactitud y la precisión sean las preocupaciones principales. Es el modo recomendado cuando se utilicen columnas de diámetro interno de 1.0mm. Inyecta el loop completo, por ejemplo, 10µL.

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

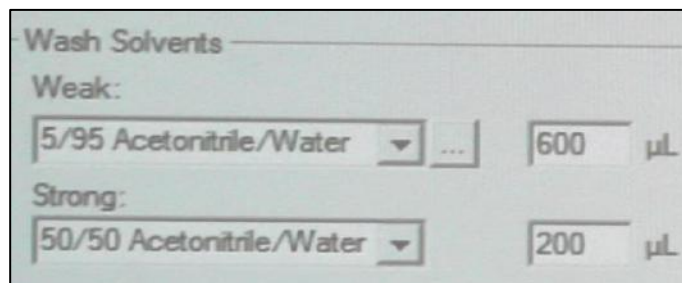
La siguiente tabla muestra los volúmenes de inyección mínimos y máximos de cada uno de los loops utilizados habitualmente.



Selección del modo de inyección y del volumen del loop.

Volumen de inyección de la muestra (µL)	Volumen del loop					
	1 µL	2 µL	5 µL	10 µL	20 µL	50 µL ^a
Intervalo de inyección (µL) del modo Partial Loop (Loop parcial)	No recomendado	No recomendado	No recomendado	De 1.0 a 5.0	De 2.0 a 10.0	De 0 a 25.0
Intervalo de inyección (µL) del modo Partial Loop Needle Overfil (Sobrecarga de aguja de loop parcial)	De 0.1 a 0.8	De 0.2 a 1.5	De 0.5 a 3.8	De 1.0 a 7.5	De 2.0 a 15.0	De 0 a 37.0
Intervalo de inyección (µL) del modo Full Loop (Loop completo)	1	2	5	10	20	50

a. El loop de 50 µL se debe utilizar con una jeringa de muestras de 250 µL.

10.9. En la opción **Wash Solvents** (solventes de lavado). En las funciones **Weak** (lavado débil) y **Strong** (lavado fuerte) especificar la cantidad de volumen y el solvente de lavado a utilizar.



	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

10.10. En la función **Temperature**, especificar la temperatura de la columna y la muestra.

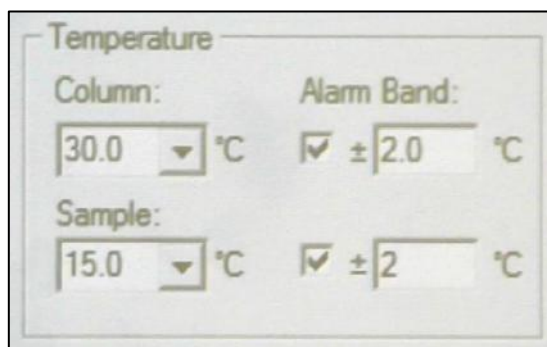
- **Valor recomendado para la Columna:** 30°C.
- Se recomienda No manejar temperaturas menores a 25°C en la columna, ya que afectara el tiempo de retención de la muestra, logrando un análisis mucho más largo.
- **Criterio a tomar.** Estabilidad de la muestra.

La temperatura de la columna va a depender de la estabilidad de la muestra como en la rapidez del análisis; va a ayudar a controlar que el tiempo de retención sea constante así como en la separación de los componentes. Normalmente se manejan temperaturas entre 25°C y 50°C (el horno llega a una temperatura máx. de 80°C).

10.11. En la opción **Sample** (muestra), seleccionar la temperatura a la cual va estar conservada la muestra durante el análisis (dentro del vial). Si la muestra es muy estable se recomienda trabajar a temperatura ambiente o por debajo de ella con la finalidad de que el equipo no retenga tanto tiempo la muestra y el análisis sea más rápido.

- Si es temperatura ambiente se recomienda apagar la opción (Off).
- Si se desea conservar en un ambiente fresco se recomienda especificar 15°C.

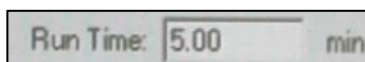
10.12. Activar la opción **Alarm Band** (Margen de Alarma) y especificar un intervalo de temperatura para que el equipo inyecte la muestra, ya que si la señalada en las opciones **Sample** y **Column** empieza a fluctuar el equipo no podrá inyectar la muestra hasta que la temperatura se estabilice.





The screenshot shows a 'Temperature' control panel with the following settings:

Parameter	Value	Unit	Alarm Band	Unit
Column:	30.0	°C	<input checked="" type="checkbox"/> ± 2.0	°C
Sample:	15.0	°C	<input checked="" type="checkbox"/> ± 2	°C

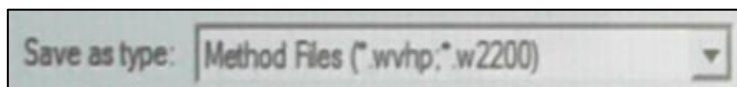
10.13. En la opción **Run Time** volver a señalar el tiempo de la corrida, dar clic en OK



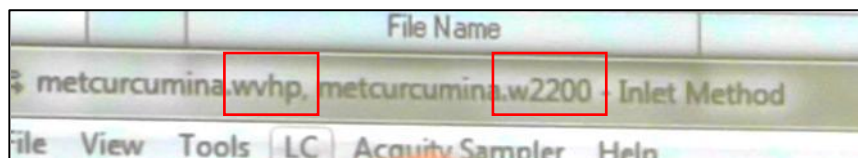
The screenshot shows a 'Run Time' control field with the value 5.00 and the unit 'min'.


	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	



10.14. Para guardar los cambios en la ventana **Inlet** (entrada) ir a la opción **File** (Archivo) y dar clic en **Save As** (guardar como). Buscar la carpeta MassLynx, enseguida abra la carpeta con el proyecto de trabajo y guarde el método en la carpeta **MethDB**.



⚠️ Aviso. Para ver si los cambios se guardaron correctamente en la parte superior de la ventana nótese que aparecerá el nombre del proyecto con los tipos de métodos del inyector (**wvhp**) y de la bomba (**w2200**).



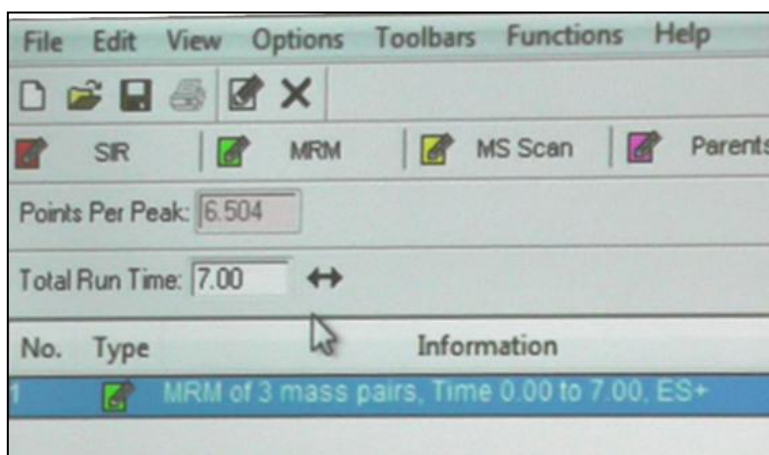
10.15. Para activar el método en la ventana **Inlet** dar clic al icono  (una vez activado se escuchara un clic en el equipo).

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

MÉTODO DE MASAS (MRM)



10.16. Abrir la ventana **MS Method**.





Existen varios métodos de masas los mas utilizados son: **MRM (cuantificar)** **SIR**, **MS Scan (Identificar)**.

El método **SIR** (Selección de registro del Ion), es un método de identificación el cual se utiliza cuando se desea explícitamente localizar la presencia de una o varias transiciones determinadas, con la mayor rapidez o con la máxima sensibilidad posible. En esta modalidad de trabajo se detectan solamente algunas masas de interés. De esta forma, se aumenta la selectividad del método, reduciéndose las interferencias.

El método **MRM** es una relación entre el cuadrupolo 2 y el cuadrupolo 1 para dar una respuesta, es decir, es la relación entre un ion fragmento y su precursor para decir donde se encuentra, cuando no se fragmenta los dos cuadrupolos buscan la misma masa, el primer cuadrupolo busca al precursor y el segundo cuadrupolo busca el ion fragmento y hace la relación (se busca así mismo).

El **MRM** da mejor respuesta porque la relación señal ruido es mejor ya que las impurezas se minimizan.

Los métodos **Parents** (Padres) y **Daughters** (Hijas) son métodos de identificación, se utilizan para buscar fragmentos.

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

El método **Neutral Loss** es un método para identificar el núcleo en común cuando se tiene un grupo de compuestos pertenecientes a una misma familia. Si se tienen fragmentos en común este método sirve.

El método **ScanWave MS** (Barrido) es un método de identificación, esta función ayuda al aumento de la respuesta, No es un método de cuantificación.

El método **ScanWave DS** (Fragmentos) es un método de identificación, acumula la concentración de iones para incrementar la respuesta. Se utiliza para ver respuestas que no son fácilmente visibles, por ejemplo para ver residuos de algún compuesto.


El método **Phosphopeptide** es utilizado cuando se trabaja con proteínas.



10.17. Dar clic en la opción **MRM**  y a continuación llene la tabla con los datos correspondientes de cada compuesto.

Channels									
	Compound Name	Parent (m/z)	Daughter (m/z)	A	Dwell (s)	Cone (V)	Collision (V)	PC	Comments
1				<input type="checkbox"/>	0.02			<input type="checkbox"/>	

Canales de la tabla MRM

• Compound Name	Nombre del compuesto.
• Parent (m/z)	Masa del Ion Padre encontrada en la ventana MS Tune.
• Daughter (m/z)	Masa del Ion Hija encontrada en la ventana MS Tune.
• Dwell (s)	Tiempo de adquisición de datos. El valor depende de que tan rápido salgan la moléculas
• Cone (V) • Collision (V)	Valores óptimos de la energía del Cono y la Energía de Colisión

 **Advertencia.** Si los valores de la pagina **MS Tune** NO son los optimizados, deshabilitar las opciones **Use Tune Cone Voltage** y **Use Tune Collision Energy** y escribir en la tabla los valores optimizados.

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

Funciones de los canales de la ventana MRM

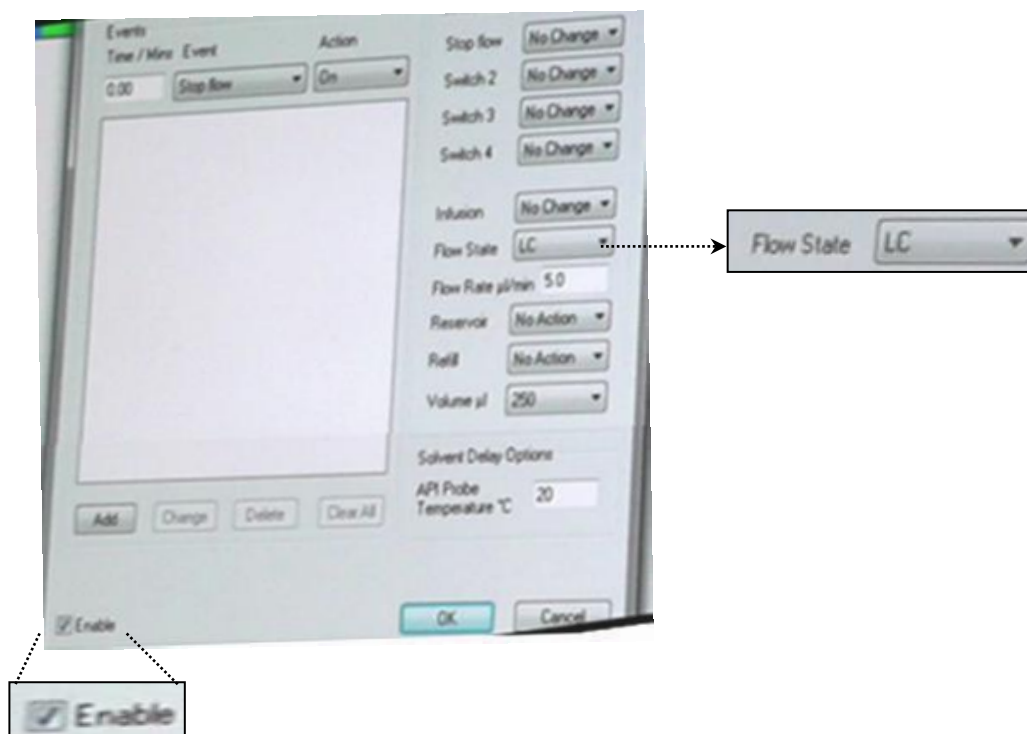
• Add	Añadir
• Delete	Borrar
• Clear All	Limpiar Todos
• Undo	Deshacer
• Redo	Rehacer
• Fill Down	Rellenar abajo



10.18. En la función **Retention Window (Mins)**, establecer el tiempo de inicio y término de la corrida.

10.19. Ir a **File >> Save As** y guardar el método en la carpeta de trabajo **ACQUDB**.

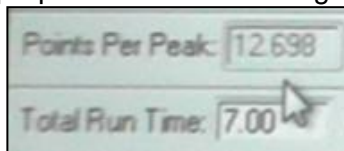
10.20. Ir a **Options** (Opciones) y enseguida a **Method Events...** (Eventos del método...) habilite la opción **ENABLE** ya que de lo contrario el equipo **NO** tomara el flujo del cromatógrafo, si no lo que este especificado en la ventana del MS Tune. Si en esta no esta especificada la opción **LC** no se observara ninguna respuesta.

10.21. Una vez habilitada la opción **Enable** (Permitir), dar clic en **OK** y guardar los cambios dando clic al icono **Save** .



	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

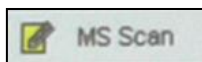
- La parte derecha de la ventana sirve para programar eventos en el masas cuando se requiere infundir algo durante la corrida, por ejemplo, si se desea mandar algo a desechos, adicionar algún modificador o adicionar un placebo cargado, etc.
- ⊕ En la función **Points Per Peak** (puntos por pico) observar que se tengan entre 12 y 15 datos por señal cromatografía; esto es, para tener un buen conocimiento de lo que esta pasando y tener una integración adecuada.
- ⊕ Para modificar el número de señales cromatografías, cambiar los valores de **Dwell (s)**. Entre más pequeño sea el valor asignado mayor serán las señales.



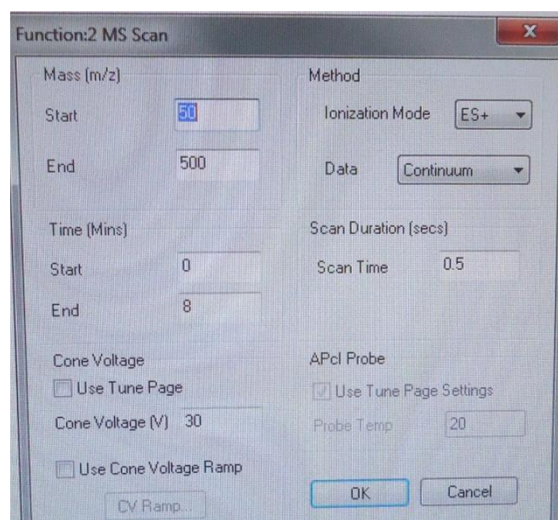
MÉTODO DE IDENTIFICACIÓN MS SCAN.



10.22. Abrir la ventana **MS Method**.

10.23. Seleccionar la función **MS Scan**



10.24. En la siguiente ventana en la función **Mass (m/z)** especificar el intervalo del Scan; en la función **Data** seleccionar el tipo de adquisición de datos (Central, Continuo o MCA). En la opción **Time (Mins)** especificar el tiempo de la corrida y en **Scan Time** especificar el tiempo de salida de cada espectro por segundo. Finalmente especificar la energía de voltaje del Cono (**Cone Voltage (V)**).



	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

⚠ Indicación. Cuando se tienen fragmentos con variación en la energía de voltaje del Cono se recomienda realizar una rampa, para ello, seleccione la función **Use Cone Voltage Ramp** y en la siguiente ventana especificar el intervalo de inicio y fin de la búsqueda así como el valor de la energía de cono de cada fragmento.

10.25. Hacer clic en OK.

10.26. Ir a **File >> Save As** y guardar el método en la carpeta de trabajo **ACQUDB**.

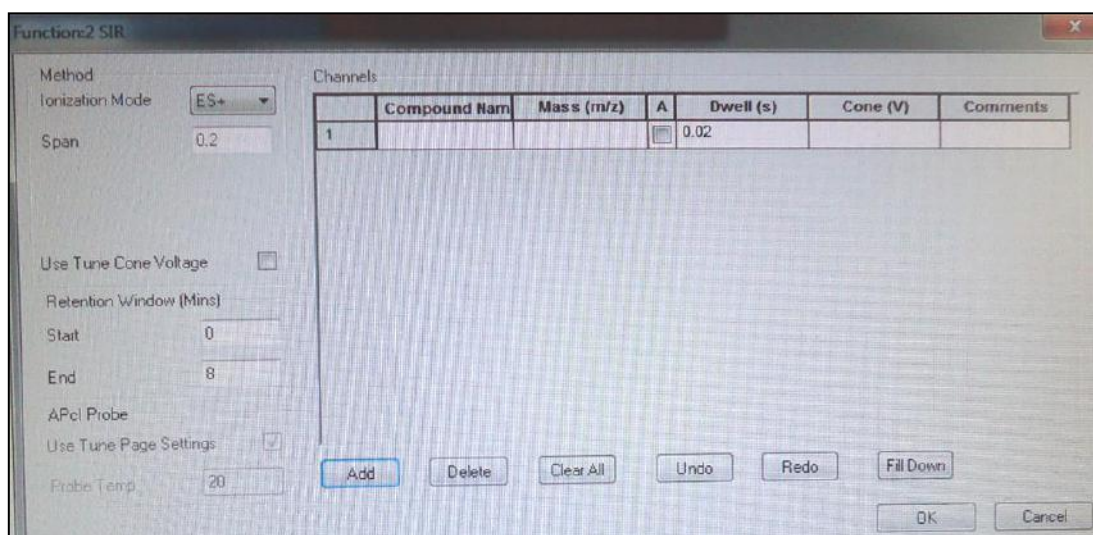
MÉTODO DE IDENTIFICACIÓN SIR.

10.27. Abrir la ventana **MS Method**.

10.28. Seleccionar la función **SIR**





10.29. En la siguiente ventana llenar la tabla con los datos correspondientes:




Compound Name	Mass (m/z)	A	Dwell (s)	Cone (V)	Comments
		<input checked="" type="checkbox"/>	0.02		

Canales de la ventana SIR

• Compound Name	Nombre del compuesto.
• Mass (m/z)	Masa del Ion encontrada en la ventana MS Tune.
• Dwell (s)	Tiempo de adquisición de datos. El valor depende de que tan rápido salgan las Moléculas.
• Cone (V)	Valores óptimos de la energía del Cono.
• Comments	Comentario para identificar al compuesto.

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

 **Advertencia.** Si los valores de la página **MS Tune** NO son los optimizados deshabilitar la función **Use Tune Cone Voltage** (Utilizar el voltaje del cono del Tune) y escribir en la tabla los valores optimizados.

10.30. En la función **Retention Window (Mins)**, establecer el tiempo de inicio y término de la corrida.

10.31. Ir a **File >> Save As** y guardar el método en la carpeta de trabajo **ACQUDB**.


MÉTODO DE LAVADO DE LA COLUMNA.

10.32. Para escribir las condiciones del método de lavado, abrir la consola **MassLynx**, diríjase a la función de **Instrumento** y dar clic en la opción **Inlet Method** (método de entrada).

10.33. Diríjase a la opción **Inlet**.

10.34. En la función **General** se indicarán las condiciones de lavado. En el estado o **Solvents**, activar las bombas A1 / B1, enseguida busque el solvente a utilizar dando clic en la pestaña, en caso de no encontrar en la lista el nombre del solvente dar clic en el icono del lado derecho y escribir el nombre del solvente que se vaya a utilizar.



10.35. Dejar los límites de presión (**Pressure Limits**) como están señalados en el sistema.

 **Aviso.** La función **Seal Wash** indica el tiempo en el que se llevará acabo el lavado de sellos, por ejemplo, cada 5min.

10.36. En la Función **Run time** especificar el tiempo (min) para el lavado de la columna y el equipo.

- Se recomiendan mínimo 20 minutos de lavado para garantizar una buena limpieza.

10.37. Para la tabla de Gradiente de elución (**Gradient**), en la primer fila especificar las condiciones de inicio de gradiente: el flujo **Flow (mL/min)** y los % de solvente a utilizar en cada una de las bombas **A (acuoso)** y **B (orgánico)**, en la siguiente fila **Time (min)** especificar el tiempo del cambio de solvente, así como, las condiciones de flujo y % de solventes; una vez escritos dar clic en OK.

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

- Para el lavado de una columna se recomienda realizar diferentes gradientes, por ejemplo, en proporciones 70:30 solvente acuoso-solvente orgánico, 50:50 solvente acuoso-solvente orgánico, 30:70 solvente acuoso-solvente orgánico, y finalmente 10:90 solvente acuoso-solvente orgánico.



Importante:

- Para saber que solventes utilizar en el lavado de la columna, *revisar su respectivo Manual de uso.*
- Para calcular el tiempo y flujo de lavado de la columna (*ver Manual de uso*), o bien, utilizar las formulas siguientes.
- Para detener el flujo **Flow (mL/min)**, es recomendable siempre disminuirlo poco a poco hasta un flujo de cero.

10.38. Para guardar los cambios en la ventana **Inlet** (entrada) ir a la opción **File** (Archivo) y dar clic en **Save As** (guardar como). Buscar la carpeta MassLynx, enseguida abrir la carpeta con el nombre del proyecto de trabajo y guardar el método en la carpeta **MethDB**.

Ecuación para calcular el volumen de la columna.

$$V = \pi * r^2 * L$$

Donde:

V : Volumen de columna en mL



r : Radio de la columna en cm

L: Longitud de la columna en cm

Para calcular el tiempo de equilibrio

(Volumen de la columna) (10 a 20 veces el volumen de la columna)*

*Depende de las especificaciones descritas en el Manual de la columna.


	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

11. COLOCACIÓN DE LAS MUESTRAS Y ARRANQUE DE LA SECUENCIA

CARGA DE LAS PLACAS DE MUESTRAS EN EL SISTEMA ADMINISTRADOR DE MUESTRAS.

El sistema administrador de muestras ACQUITY UPLC admite hasta dos placas ANSI/SBS que se adaptan por la puerta frontal. La plaza izquierda se denomina posición 1 y la derecha posición 2.


11.1. Abrir la puerta del sistema administrador de muestras ACQUITY UPLC.

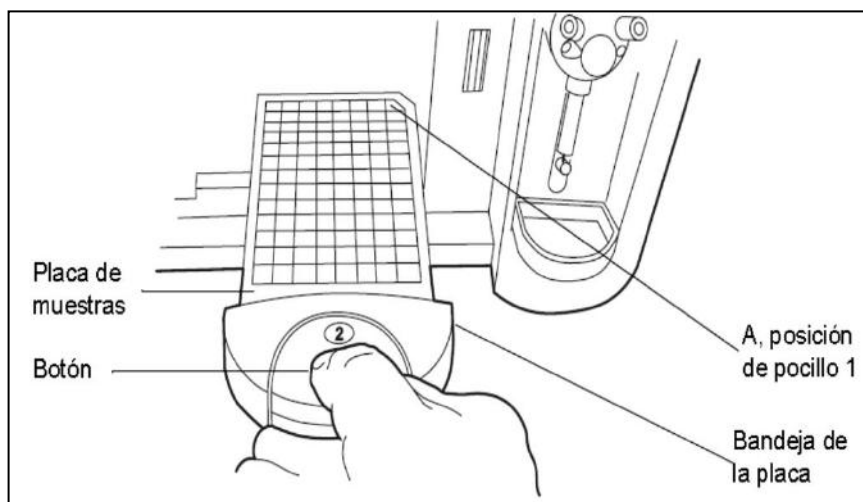
 **Indicación.** Para evitar que el compartimiento de muestras se congele, abrir la puerta sólo cuando sea necesario. (Al abrir la puerta se permite la entrada de aire húmedo en el compartimiento de muestras, lo que provoca la condensación y congelación).



11.2. Oprimir el botón de la bandeja de la placa mientras se tira de ésta hacia afuera.

11.3. Colocar las muestras en la placa de muestra correspondiente (1 / 2).

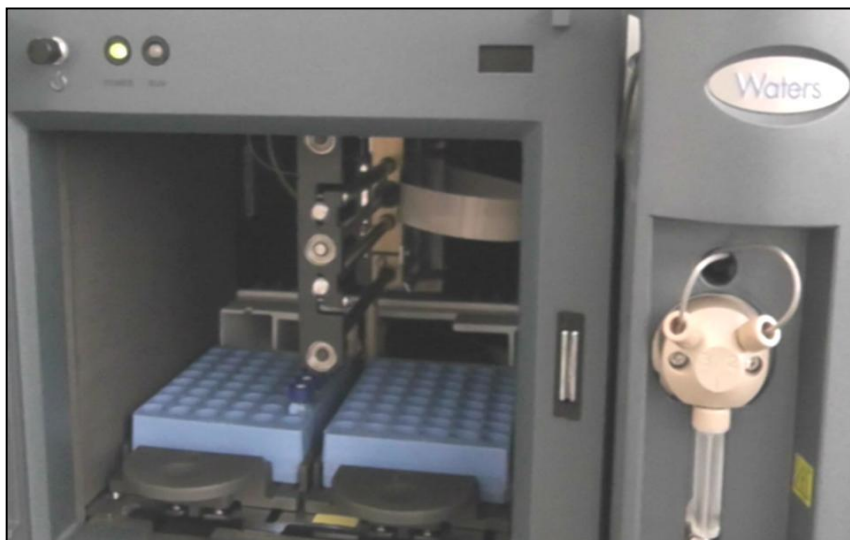
11.4. Adaptar las placas en la bandeja de manera que la posición del pocillo A,1 se encuentre en la esquina posterior derecha y el borde delantero de la placa quede detrás del tope de la parte frontal del transportador.

 **Indicación.** **A** representa el número de **Fila 1**.
1 representa la posición del **vial**.



	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	



- 11.5. Deslizar la bandeja en el sistema administrador de muestras hasta que haga clic en su sitio.



! **Precaución.** Las placas deben estar colocadas correctamente para evitar daños en la aguja de toma de muestras.


- 11.6. Cerrar la puerta del compartimiento de muestras. Un mecanismo que se encuentra en la puerta garantiza la posición correcta de las placas al cerrarse la puerta.
- 11.7. En la consola **ACQUITY UPLC**, seleccionar **Sample Manager** (Sistema administrador de muestras), en la ventana de información del sistema hacer clic en **Configure >> Sample Organizer** (Configurar >> Organizador de muestras).
- 11.8. En el cuadro de dialogo **Sample Organizer Configuration** (Configuración del organizador de muestras), seleccionar el organizador de muestras en la lista de números de serie y después hacer clic en **OK**.
- 11.9. El organizador de muestras detectara automáticamente las bandejas que contienen placas e iluminara los indicadores LED correspondientes.

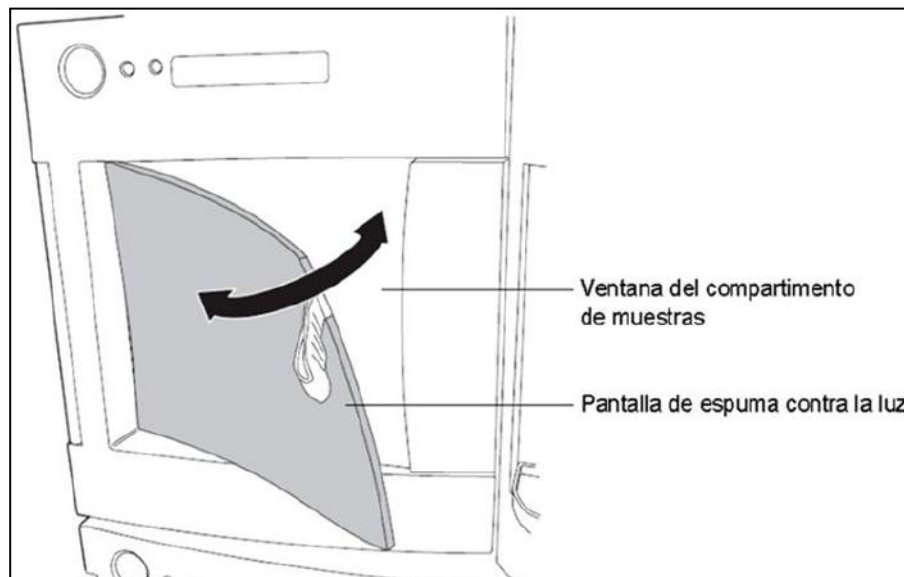
! **Regla.** Las placas y las bandejas se pueden cargar antes o después de configurarlas en la aplicación de datos, pero se deben configurar antes de analizar las muestras.



	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

- Una vez que se comience la inyección, no se debe abrir la puerta del sistema administrador de muestras. Abrir hasta que se termine la inyección de la muestra.


PANTALLA OPCIONAL CONTRA LUZ DEL SISTEMA ADMINISTRADOR DE MUESTRAS.

 **Indicación.** Si las muestras son sensibles a la luz se recomienda instalar una pantalla de espuma contra luz sobre el exterior de la ventana del compartimento de muestras.



	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

ARRANQUE DE LA SECUENCIA

11.10. En la ventana **MassLynx**, dar clic al icono Nuevo  para crear la secuencia de muestreo.


11.11. Dar clic en el primer recuadro de la fila **File Name** (nombre de la muestra) y escribir el nombre de la primera muestra.

11.12. En la siguiente columna **File Text** escribir algo que identifique a la muestra. Por ejemplo, la concentración.

11.13. En la columna **MS File** dar clic derecho, seleccionar **Rush**, buscar el método de Masas y dar clic en **Open**.



11.14. En **MS Tune File** dar clic derecho >> **Rush** y abrir el método de trabajo.

11.15. En la columna **Inlet File** dar clic derecho >>**Rush**, seleccionar el método de instrumento.

 **Indicación.** Si por alguna razón el método no se enlaza, verificar que haya sido guardado en la carpeta correcta.

11.16. En la columna **Bottle** especificar la posición del vial (número de la bandeja, letra, posición del vial, ejemplo 1: A, 1); finalmente en la columna **Inject Volume** escribir el volumen de inyección.

	File Name	File Text	MS File	MS Tune File	Inlet File	Bottle	Inject Volume
1	curcumina01	100ng_ml	curcumina	curcumina	metcurcumina	1.A.2	5.000
2	curcumina02	100ng_ml	curcumina	curcumina	metcurcumina	1.A.2	5.000
3	curcumina03	500ng_ml	curcumina	curcumina	metcurcumina	1.A.6	5.000
4	curcumina04	500ng_ml	curcumina1	curcumina	metcurcumina	1.A.6	5.000
5	curcumina05	500ng_ml	curcumina1r	curcumina	metcurcumina	1.A.6	5.000
6	curcumina06	500ng_ml	curcumina_nrm	curcumina	metcurcumina	1.A.6	5.000
7	curcumina07	500ng_ml	curcumina_nrm	curcumina	metcurcumina50_50	1.A.6	5.000
8	curcumina08	200ng_ml	curcumina_nrm	curcumina	metcurcumina30_70	1.A.3	5.000
9	curcumina09	200ng_ml	curcumina_nrm	curcumina	metcurcumina40_60	1.A.3	5.000
10	curcumina10	1ng_ml	curcumina_nrm	curcumina	metcurcumina40_60	1.A.1	7.500
11	curcumina11	100ng_ml	curcumina_nrm	curcumina	metcurcumina40_60	1.A.2	5.000
12	curcumina12	200ng_ml	curcumina_nrm	curcumina	metcurcumina40_60	1.A.3	5.000
13	curcumina13	300ng_ml	curcumina_nrm	curcumina	metcurcumina40_60	1.A.4	5.000
14	curcumina14	400ng_ml	curcumina_nrm	curcumina	metcurcumina40_60	1.A.5	5.000

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	


11.17. Para adicionar más filas, dar clic derecho en cualquier posición de la tabla y seleccionar la función adicionar **Add** (Añadir). En la siguiente ventana establezca la cantidad de puntos a adicionar y hacer clic en **Ok**.

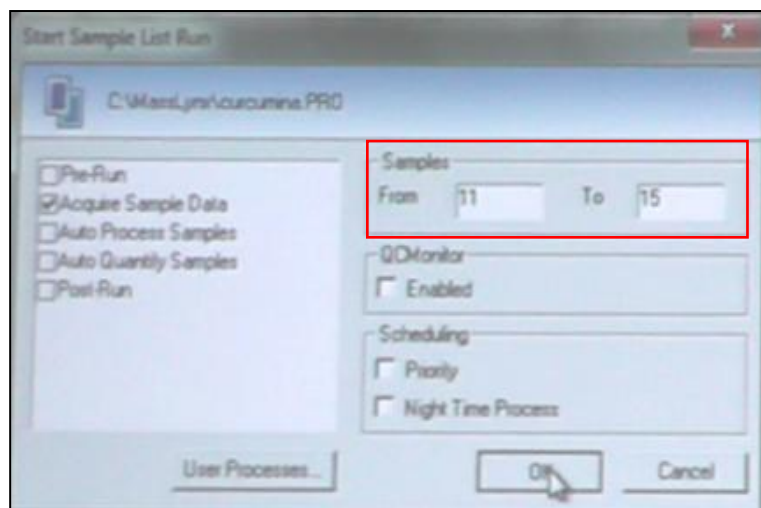
11.18. Editar cada punto con el nombre y datos correspondientes.



 **Consejos:**

- Cuando se va inyectar por primera vez una muestra se recomienda llevar acabo la primera corrida de la curva de manera aleatoria, con la finalidad de observar mejor la salida de los compuestos de interés.
- Para insertar una columna, seleccione una fila de clic derecho y en seguida elija la opción **Insert**. Seleccione la nueva columna, de clic izquierdo y elija la función **Customize Display...** (Personaliza pantalla...) en la siguiente ventana seleccionar la función deseada y dar **Ok**.
- Para introducir más muestras en la secuencia; seleccione el recuadro de la primer fila y barra hacia abajo con el mouse, enseguida de clic derecho y elija la función **Fill Series** (ajuste adecuado, sirve para dar un numero consecutivo de muestras) o **Fill Down** (ajuste hacia abajo, es para copiar lo mismo).



11.19. Para guardar la secuencia, diríjase a **File>>Save As...** (Archivo >>Guardar como) busque la carpeta del proyecto de trabajo y de un nombre al archivo a guardar.

11.20. Para correr las muestras, dar clic en el icono **Run**  en la siguiente ventana señalar de que muestra a que muestra se va a correr y dar clic en **Ok**.

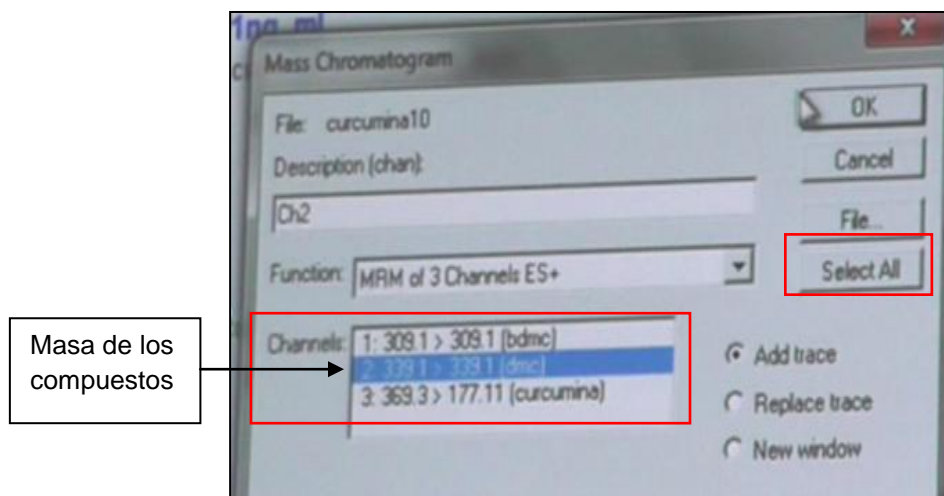


	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	



! **Indicación.** Una vez que comience la corrida checar que la presión se mantenga constante, para ello revisar la ventana del **ACQUITY**.

11.21. Para ver el cromatograma, dar clic en la pestaña **Chromatogram** y enseguida dar clic en el icono del reloj  y al icono 

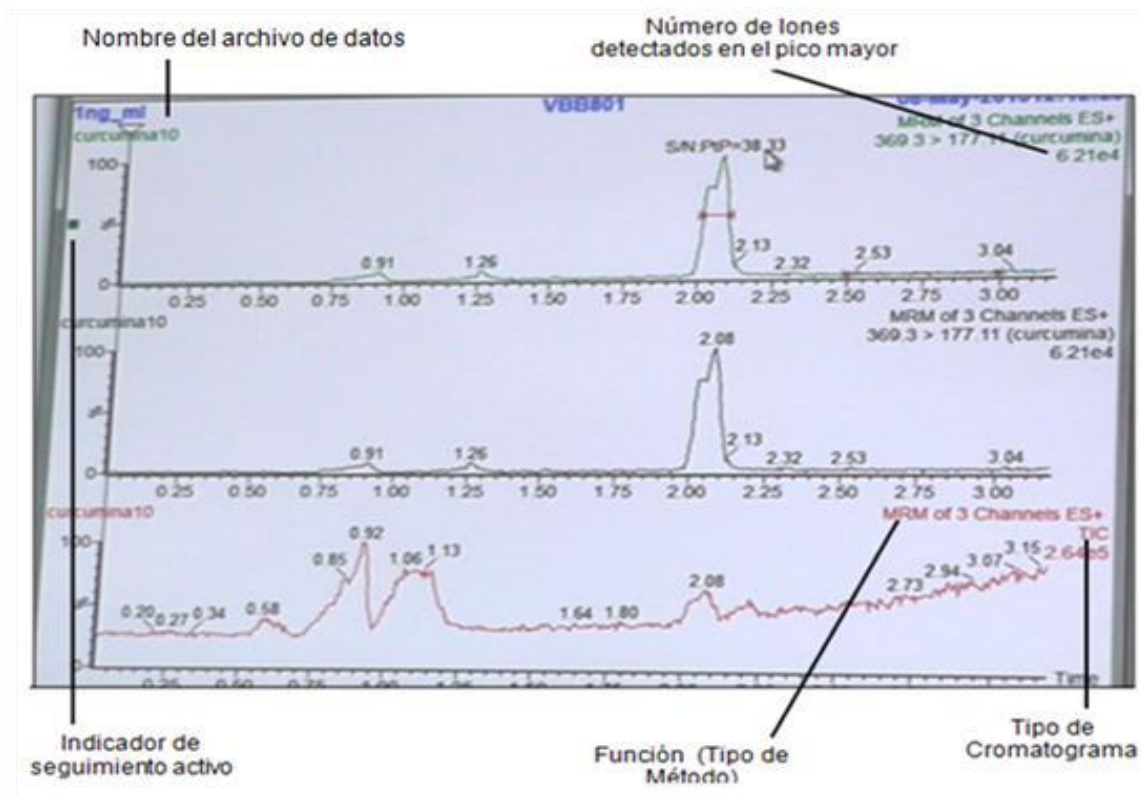
11.22. Para ver todas las transiciones en la ventana del cromatógrafo, diríjase a la opción **Display** (Mostrar) y dar clic en **Mass** (Masa). En la siguiente ventana seleccionar **Select All** >> **Ok** (Seleccionar todas >> Aceptar).




! **Indicación.** Esperar a que empiece la nueva corrida para indicar el cambio ya que de lo contrario se quedarán guardados los datos anteriores.



	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

Ventana del Cromatograma.

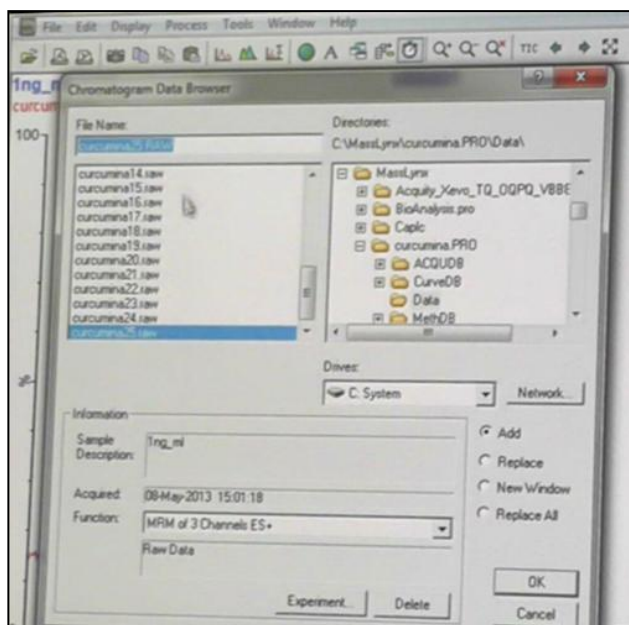


⚠️ Consejos:

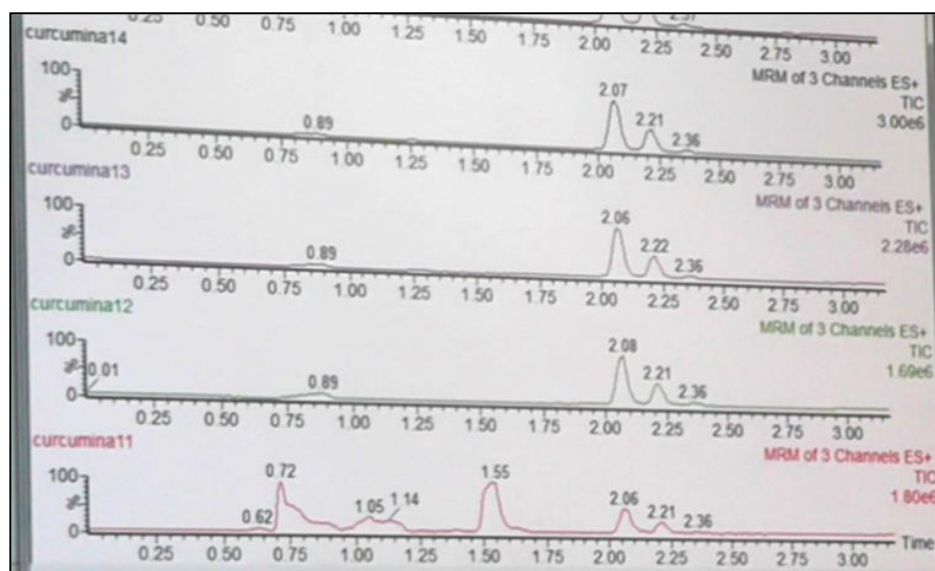
- Para quitar alguna transición de la ventana del cromatograma; seleccione la transición a eliminar dando clic izquierdo y presione la tecla **Delete**.
- Para hacer un **Zoom** (Acercamiento) del cromatograma, con el botón izquierdo del mouse seleccionar de forma horizontal un intervalo del pico y soltar el botón
- Para visualizar el espectro de las transiciones, seleccionar el pico de interés dando clic derecho.
- Para juntar varios espectros en una misma hoja; seleccionar el pico de interés, minimizar la ventana del espectro, enseguida seleccionar el siguiente pico y minimizar la ventana. Repetir este procedimiento hasta seleccionar el ultimo pico, finalmente maximizar la ventana.
- Para pausar el cromatograma dar clic al icono del reloj, para reanudar la visualización dar clic de nuevo en el icono 



	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

11.23. Para comparar una muestra con otra, dar clic en **File >> Open** (Archivo >> Abrir). Seleccione el archivo deseado, active la función **Add** (Añadir) y hacer clic en Ok






⚠ Alternativa. Para añadir de un solo paso todas las muestras deseadas en la ventana del cromatograma; diríjase a la ventana MassLynx, seleccione las muestras y hacer clic en la pestaña Chromatogram.





	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

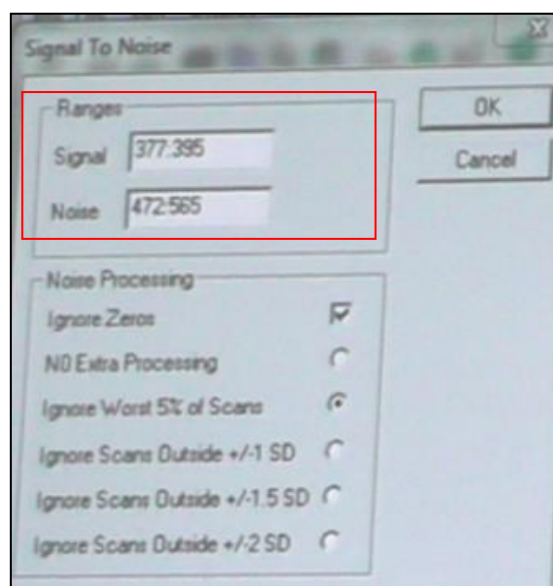
11.24. Para realizar un **Smooth** en el pico, ir a la función **Process >> Smooth** (Proceso >> Suavizado) en la siguiente ventana especifique el número de Smooth que desee realizar.



Consejos.

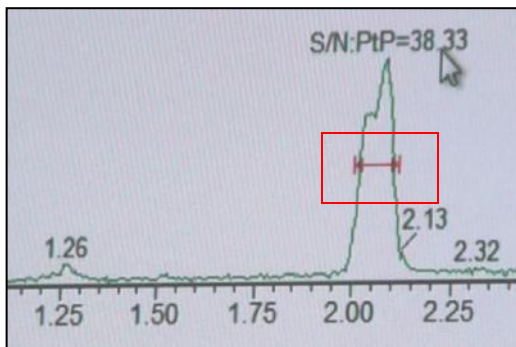
- Si desea realizar alguna función a todos los cromatogramas, dar clic en el icono del mundo . Por ejemplo si desea realizar un Smooth a todos los cromatogramas dar clic en el icono  y en seguida a **Process >> Smooth**.
- Si desea reemplazar alguna función hecha en cualquier cromatograma, dar clic al icono **Replace**  (Reemplazar).

11.25. Para ver la integración de los picos, vaya a la pestaña **Process >> Integrate >> Integrate** (Proceso >> Integrar >> Integrar).

11.26. Para observar el punto de detección, hacer clic en el icono del reloj  y al icono  diríjase a la función **Process >> Signal To Noise** (Proceso >> Señal de Ruido). Seleccione el ancho de los picos de interés, nótese que en seguida aparecerá el valor de la señal (**Signal**) en el recuadro de la función **Range** (Rango) de la ventana Signal To Noise. Seleccione un poco de la línea base, el valor aparecerá en la opción **Noise** (Ruido) de la ventana Signal To Noise. Dar clic en **OK**.



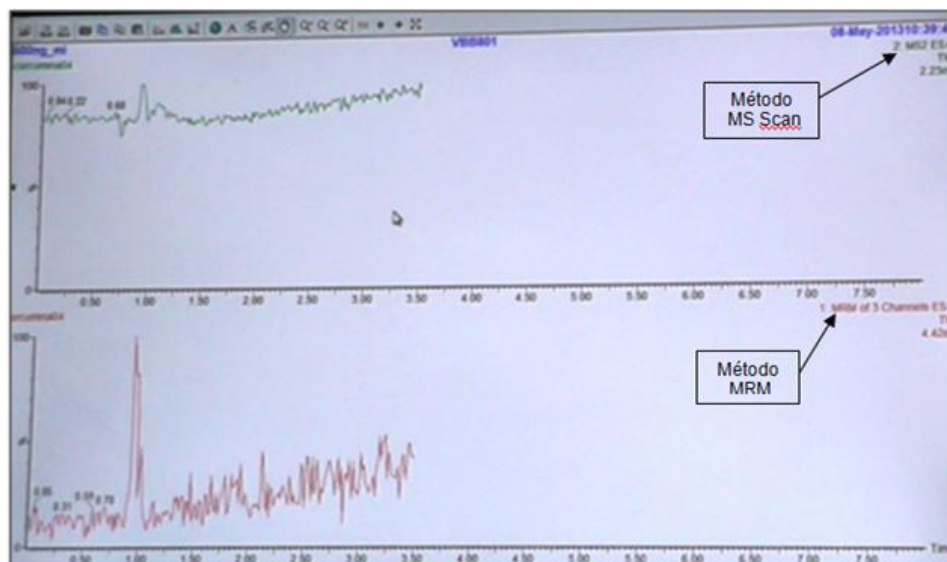
	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	





Selección del ancho del pico de interés.

FUNCIÓN RADAR.

- 11.27. Para observar las transiciones del método **MRM** con el método **MS Scan**, seleccionar y correr la(s) muestra(s). En la ventana del cromatógrafo dar clic al icono  y diríjase a la función **Display >> Tic**.
- 11.28. Cuando comience el escaneo diríjase a la función **Display** y de clic en **Mass**, en la siguiente ventana escribir la masa del fragmento a buscar. Hacer clic en **Ok**
- 11.29. Para visualizar por separado cada una de las transiciones dentro de la misma hoja del cromatograma, seleccione el cromatograma del método **MS Scan** dando clic izquierdo, diríjase a la función **Display >> Mass** y escriba la masa del fragmento.





	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

CORRER MÉTODO SIR.





11.30. Abrir la página **MS Tune** y activar la función **MS Mode** y desactivar el gas Argón para evitar la fragmentación.

11.31. Correr la(s) muestra(s).

11.32. Abrir la ventana del cromatograma y dar clic en el icono del reloj  y al icono .

11.33. Ir a **Display >> Mass >> Select All** (Mostrar >> Masa >> Seleccionar Todo).



Suspender el Método.

- Para detener el método, diríjase a la ventana **Inlet Method** y hacer clic en el icono en forma de llave , regresar a la ventana MassLynx y hacer clic en el icono **Stop** .
- Para pausar la corrida de clic en el icono en forma de llave  después de clic en el icono **Pause**  de la ventana MassLynx.

⊕ *Realizar este procedimiento, ya que de lo contrario el equipo tiende a bloquearse y habrá que resetear el ACQUITY Process.*

Tipos de cromatogramas:



Tipo de cromatograma	Descripción
Total Ion Current (TIC) (Total de Iones existentes)	Por lo general, el tipo predeterminado de cromatograma abierto en MassLynx, un cromatograma TIC puede ser pensado como un espectro sintetizado representado gráficamente en el tiempo. Se muestra la suma total de iones detectados (de cualquier masa) durante el período del MS Scan.
Base Peak Intensity (BPI) (Intensidad Pico Base)	Un cromatograma BPI es una variante de un cromatograma TIC. Traza, para cada exploración durante todo el período del MS Scan, la intensidad de sólo el ion más abundante en el momento de la exploración. Se ignoran todos los demás iones menos abundantes, detectados al mismo tiempo.
Mass (Masa)	Un cromatograma de masas muestra la corriente iónica resultante de sólo una masa especificada.

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

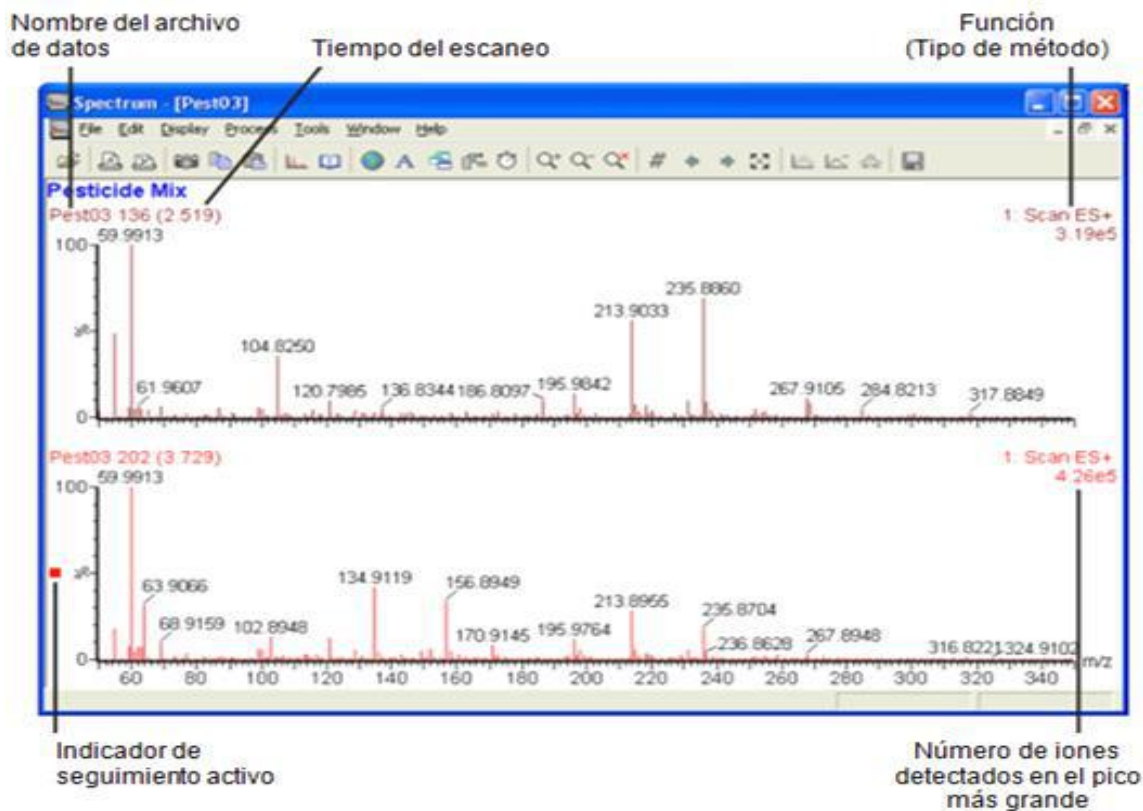
Mass (continuación)	El cromatograma de masa puede reducir la complejidad y hacer que sea más fácil identificar un componente conocido.
Analog (Analógico)	Durante una adquisición, MassLynx puede almacenar información analógica obtenida a partir de una fuente auxiliar, tal como un detector de UV. Si los datos analógicos se ha adquirido se puede visualizar utilizando un cromatograma analógico.

Para mostrar los diferentes tipos de cromatogramas:

Para visualizar este tipo de cromatograma	Haga esto
TIC	<ol style="list-style-type: none"> 1. Dar Clic en Display >> Tic (Mostrar >> Tic). 2. Dar Clic en la función para la que desea visualizar el cromatograma. 3. Dar Clic en OK.
BPI	<ol style="list-style-type: none"> 1. Dar Clic en Display >> Tic (Mostrar >> Tic). 2. Dar Clic en la función para la que desea visualizar el cromatograma. 3. Seleccionar BPI Chromatogram. 4. Dar Clic en OK.
Mass	<ol style="list-style-type: none"> 1. Dar Clic en Display >> Mass (Mostrar >> Masa). 2. Escriba la masa (m / z) del compuesto de interés en el cuadro Description (Descripción). 3. Dar Clic en la función para la que desea visualizar el cromatograma. 4. Dar Clic en OK.
Analog	<ol style="list-style-type: none"> 1. Dar Clic en Display >> Analog (Mostrar > Analógico). 2. Dar Clic en la función para la que desea visualizar el cromatograma. 3. Dar Clic en OK.



	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

Ventana del Espectro.



⚠ Alternativa: Para mostrar parte del espectro.



- Haga clic en **Display >> Range >> From** (Mostrar >> Rango >> A partir de) en la siguiente ventana, establecer un intervalo de búsqueda de los valores de masa.
- Para volver a ver a todo el espectro, dar clic en **Display >> Range >> Default** (Mostrar >> Rango >> Predeterminado) y haga clic en **Ok**.

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

Una serie de características están disponibles para mejorar la apariencia de su espectro, que le ayudaran a analizar los resultados con mayor eficacia.

Funciones para Procesar los Espectros:

Proceso	Descripción	Haga esto
Refine (Clarificar)	Elimina automáticamente los iones de base de un espectro, con lo que podrán ser más fácilmente identificados - por búsqueda de la biblioteca, por ejemplo. El proceso Refine opera sobre los datos del modo centrado solamente.	Dar Clic Process >> Refine
Combine (Combinar)	Produce un solo espectro restando los espectros de base promedio de la media de los espectros de un pico TIC. Las exposiciones de exploración combinado mejoran la señal-ruido y dan mayor precisión de la masa. El proceso de espectros Combine opera en datos de modo continuo o centrado.	Dar Clic Process >> Combine
Smooth (Suavizado)	Reduce el ruido de alta frecuencia presente en un espectro, ayudando así a su interpretación. Los datos deben ser suavizados antes de la medición de masa que se pretende con el proceso Center, de lo contrario picos de ruido se pueden utilizar para crear picos.	Dar Clic Process >> Smooth
Integrate (Integrar)	Localiza picos espectrales, dibuja las líneas de base y calcula áreas de los picos. El espectro de integración funciona sobre el rango de masas del espectro.	Dar Clic Process >> Integrate
Center (Centrar)	Utiliza todos los puntos a través de un pico en un rastro continuo para calcular la masa del centro del pico. El proceso de centrado se puede utilizar para etiquetar cada pico con la masa calculada, o para producir una sola barra de cada pico en un espectro continuo.	Dar Clic Process >> Center
Mass measure (Masa medida)	Realiza una combinación de sustracción de base, suavizado, y centrado en un comando.	Clic Process >> Mass Measure

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

12. CREACIÓN DEL MÉTODO DE PROCESAMIENTO DE DATOS

12.1. En la ventana **MassLynx**, seleccione la función **TargetLynx** y enseguida de clic en el icono **Edit Method** (Editar Método).

12.2. Abrir una hoja en blanco dando clic en **Nuevo** 

12.3. De clic al icono **Add New Compound**  para añadir un nuevo compuesto.



12.4. Para definir las propiedades del nuevo compuesto, dar clic al icono **User Defined Properties** (Propiedades definidas por el usuario) y llenar los datos que sean requeridos.

12.5. En la opción **Compound Name** escribir el nombre del compuesto de interés.

12.6. Para poner los datos de adquisición **Acquisition Function Number** ir al cromatograma y seleccionar la mitad del ancho del pico con el botón derecho del mouse. Enseguida minimizar la ventana.

- Enseguida a parecerán de manera automática los valores del pico en la tabla **User Defined Properties**.

User Defined Properties	Value
Compound Name	curcumina
Acquisition Function Number	1
Quantification Trace	369.3 > 177.11
Predicted Retention Time	2.0650
Retention Time Window (mins) ±	0.0350
Update Method Times Using Multiple Samples?	<input checked="" type="checkbox"/> NO
Concentration of Standard: Level	Fixed
Concentration of Standard	0.0000

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

Acquisition Function Number	Adquisición del número de función
Quantification Trace	Señal de Cuantificación de la transición
Predicted Retention Time	Predicción del tiempo de Retención
Retention Time Window (mins)±	Ventana ± el 5% con respecto al Tiempo de Retención (minutos)
Concentration of Standard: Level	Nivel de concentración del estándar
Concentration of Standard	Concentración del estándar

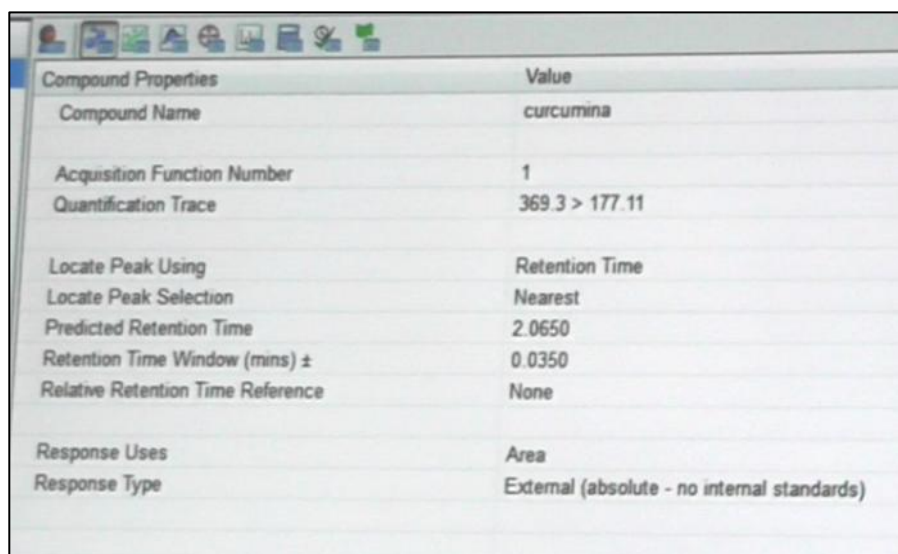
12.7. Para señalar el nivel de concentración del estándar (**Concentration of Standard: Level**) dar clic en la pestaña **Fixed** (Fijo) y seleccionar de las opciones una concentración (Elegir de acuerdo al orden alfabético).

12.8. Para colocar la columna del nivel de concentración del estándar en la corrida; en la ventana **MassLynx** seleccione una fila, de clic derecho con el mouse y elija la función **Customize Display** (Personalizar pantalla) en la siguiente ventana busque la concentración requerida y hacer clic en **OK**.



- Aparecerá la nueva columna, por ejemplo **Con A**, en ella escribir la concentración del estándar.



12.9. Dar clic al icono **Compound Properties** (Propiedades del compuesto)



Compound Properties	Value
Compound Name	curcumina
Acquisition Function Number	1
Quantification Trace	369.3 > 177.11
Locate Peak Using	Retention Time
Locate Peak Selection	Nearest
Predicted Retention Time	2.0650
Retention Time Window (mins) ±	0.0350
Relative Retention Time Reference	None
Response Uses	Area
Response Type	External (absolute - no internal standards)

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

12.10. Para seleccionar como va hacer buscado el pico, dar clic a la pestaña **Retention Time** (Tiempo de retención) de la opción **Locate Peak Using** (localización del pico) y elegir la función deseada.

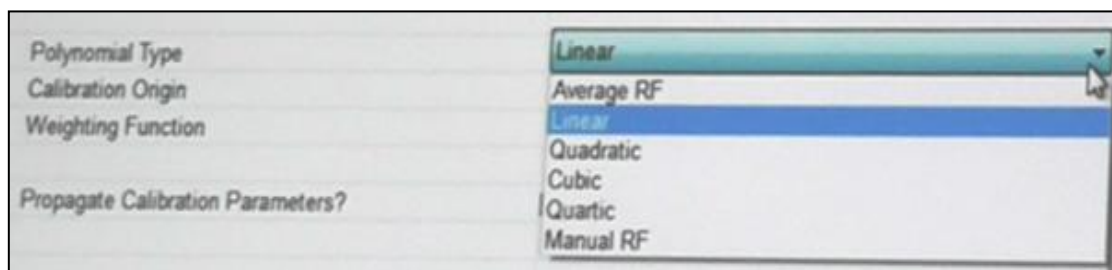
12.11. En la opción **Locate Peak Selection** (Selección del pico) dar clic a la opción **Nearest** y elegir la función deseada:

- **Nearest** - - - En base al más cercano
- **Largest** - - - En base al más grande
- **First** - - - El primero que encuentre
- **Last** - - - El ultimo que encuentre
- **Totals** - - - Todos
- **Group Totals** - - - En base a un Grupo

12.12. En la opción **Response uses** elegir el modo de cuantificación de las muestras, para cambiar dar clic en la barra derecha; por ejemplo, en base al **Área**. En la opción **Response Tipo** (Tipo de cuantificación) señalar si es por estándar interno o externo.



12.13. Dar clic al icono **Calibration Properties** (Propiedades de la calibración)  y en la opción **Stock Concentration Factor** (Factor de concentración del Stock) escribir el factor de dilución.

12.14. En la función **Polynomial Type** seleccionar el tipo de comportamiento de la curva (Promedio RF factor de respuesta, Lineal, Cuadrática, Cubica, Factor de respuesta Manual RF).




12.15. En las opciones **Calibration Origin** (origen de la calibración), seleccionar la función: Incluir, Excluir o Forzar el Cero (**Include / Exclude / Force**).

La función **Weighting function** es la ponderación con respecto al peso y la función **Propagate Calibration Parameters** (Programar parámetros de calibración) sirve para propagar lo mismo a los demás componentes.

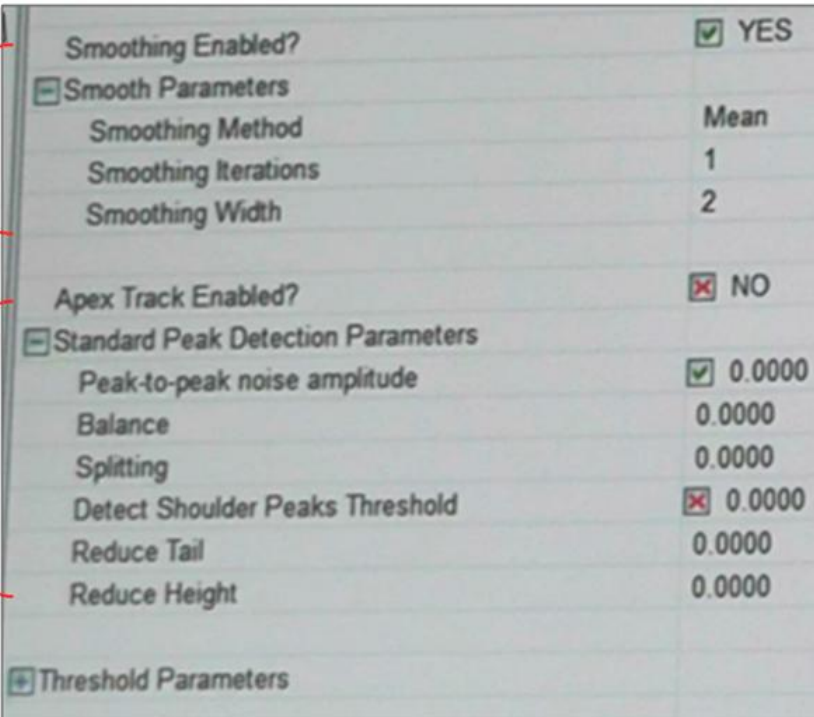
	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

12.16. Para ver las propiedades de la integración dar clic al icono **Integration**

Properties  e indique el modo de integración de los datos si es por **Threshold Parameters** o **Apex Track**.

- **Threshold** (Umbral). Especifica una intensidad mínima de picos para el algoritmo a considerar. Se especifica como un porcentaje de la intensidad del pico más intenso en el espectro.
- **Apex Track**. Es una derivada con respecto a la línea base, define si una respuesta es un pico o es ruido, sirve para definir los límites de cuantificación; se utiliza para concentraciones muy pequeñas por ejemplo para 1ng.

12.17. Activar la opción **Yes** (Si) para indicar el uso de la función **Smoothing** (Suavizado), enseguida establezca los parámetros de la optimización.



Parámetros de Optimización (Smoothing Parameters)


Método de Smoothing
Iteraciones del Smoothing
Ancho de Alisamiento



Parámetros Estándar de Detección del Pico

Amplitud de ruido de pico a pico
Equilibrio
División
Detectar el umbral del hombro del pico
Reducir la cola
Reducir la altura

Smoothing Enabled?	<input checked="" type="checkbox"/> YES
<input type="checkbox"/> Smooth Parameters	
Smoothing Method	Mean
Smoothing Iterations	1
Smoothing Width	2
Apex Track Enabled?	<input checked="" type="checkbox"/> NO
<input type="checkbox"/> Standard Peak Detection Parameters	
Peak-to-peak noise amplitude	<input checked="" type="checkbox"/> 0.0000
Balance	0.0000
Splitting	0.0000
Detect Shoulder Peaks Threshold	<input checked="" type="checkbox"/> 0.0000
Reduce Tail	0.0000
Reduce Height	0.0000
<input type="checkbox"/> Threshold Parameters	

12.18. Para incluir más compuestos, dar clic en el icono **Add New Compound** y seguir los pasos del 12.4 al 12.6.

 **Indicación.** Solamente cambiar el nivel de concentración del estándar (**Concentration of Standard: Level**) cuando se trabaje con diferentes compuestos y concentraciones diferentes. Para ello, seguir los pasos 12.7 y 12.8

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

12.19. Dar clic a **File >> Save As** y guarde el Método de Proceso en la carpeta **MethDB** del proyecto de trabajo.

PROCESAMIENTO DE DATOS DE MUESTRAS (ESTÁNDAR).

12.20. Para señalar el nivel de concentración del estándar (**Concentration of standard**) en la ventana **MassLynx**, seleccione una fila, de clic derecho y elija la función **Customize Display**. En la siguiente ventana active la opción **Sample Type (TYPE)** (Tipo de Muestra), hacer clic en OK.

12.21. En la nueva columna Sample Type, seleccione la función **Standard** (Estándar).

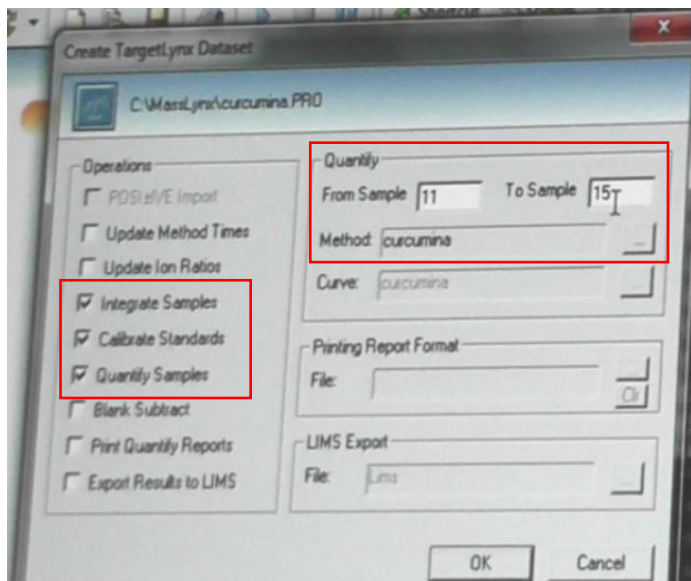
12.22. Seleccione los estándares y dirijase a la función **Process Samples**





(Procesador de muestras) y de clic en OK.

12.23. En la siguiente ventana, verificar que en la función **Quantify** (cuantificar) **From Sample --- To Sample** (a partir de la muestra --- a la muestra) estén señaladas las muestras seleccionadas y en la función **Method** (Método) se encuentre señalado el método de procesamiento deseado.

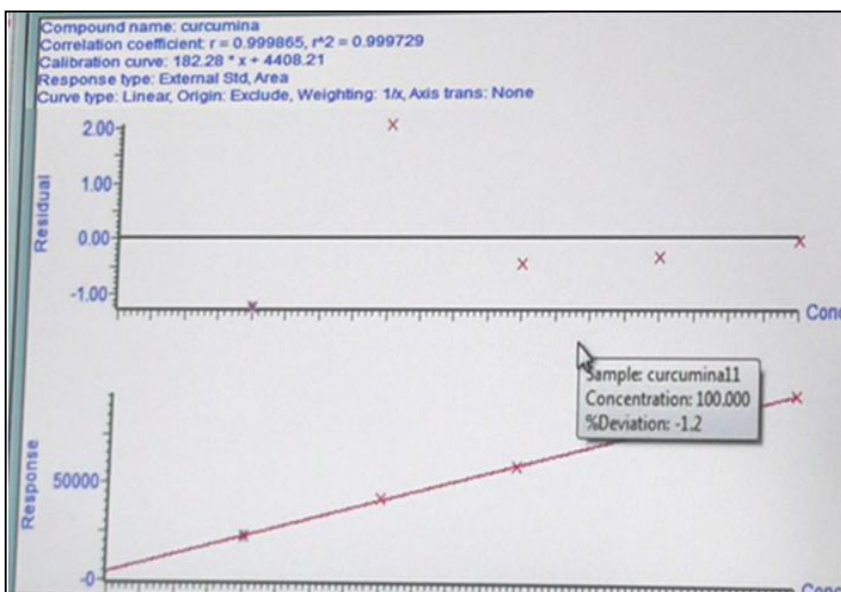
12.24. En la lista del lado izquierdo seleccionar las operaciones a realizar (**Integrate Samples** (Integrar muestras), **Quantify Samples** (Cuantificar muestras), **Calibrate Standards** (Calibrar estándares) y dar en **OK**.



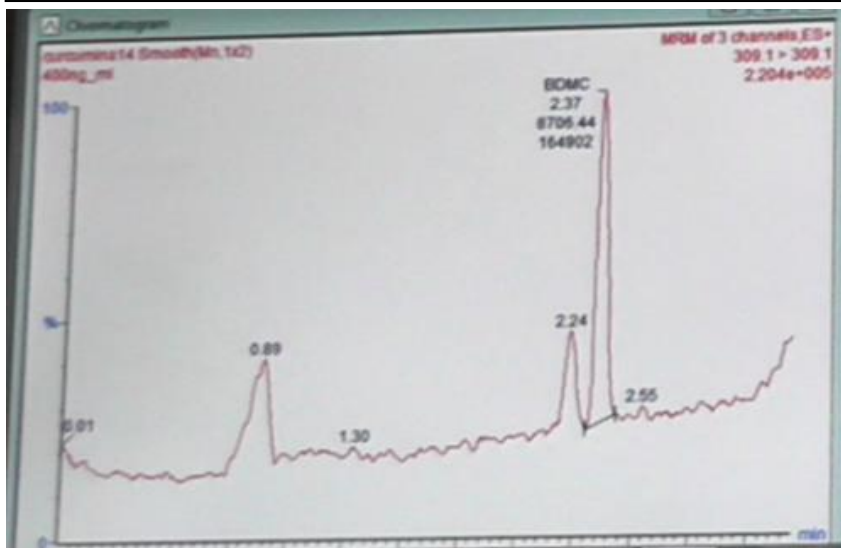
	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

12.25. En la siguiente ventana se mostrarán los resultados de la integración y de la cuantificación.



Name	Sample Text	Vial	Inj Vbl	RT	Height	Area	Response	Conc.
1 curcumina11	100ng_ml	1:A,2	5.0	2.214	290691	13996	13996	9.9955e1
2 curcumina12	200ng_ml	1:A,3	5.0	2.214	564385	27690	27690	2.0502e2
3 curcumina13	300ng_ml	1:A,4	5.0	2.214	790314	38575	38575	2.8854e2
4 curcumina14	400ng_ml	1:A,5	5.0	2.214	1072347	53256	53256	4.0117e2
5 curcumina15	500ng_ml	1:A,6	5.0	2.214	1359063	66829	66829	5.0532e2



Curva



Cromatograma

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

12.26. Para observar los resultados de cada muestra dar clic al icono **Next Sample**

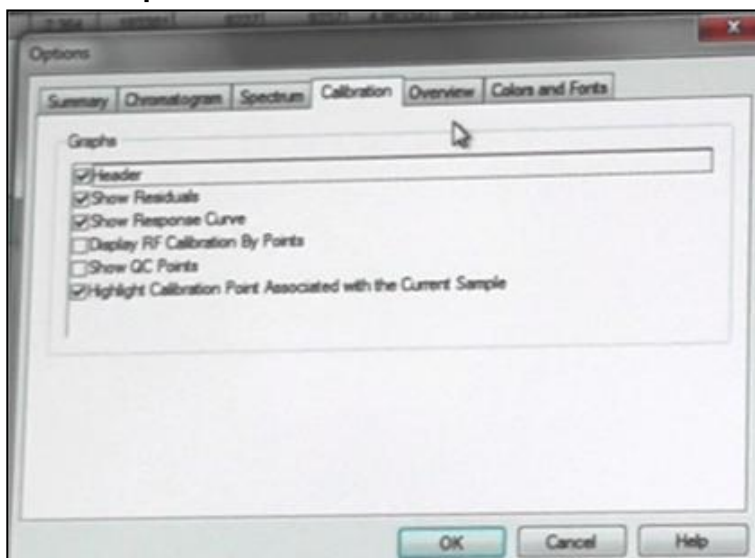


12.27. Para ver la cuantificación de cada compuesto dar clic al icono Siguiete





12.28. Para observar y editar diferentes parámetros dentro del gráfico, hacer clic derecho sobre éste y dirijase a la función **Options** (Opciones): **Summary** (Resumen), **Chromatogram** (Cromatograma), **Spectrum** (Espectro), **Calibration** (Calibración), **Overview** (Visión de conjunto), **Colors and Fonts** (colores y fuentes).

Ventana de las Opciones de Calibración



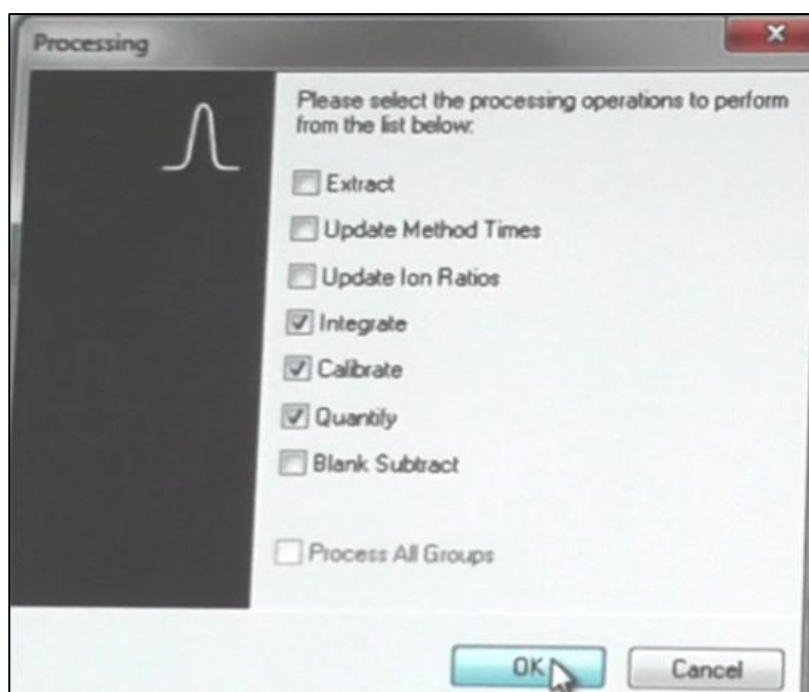
Opciones de la función Calibración

Header	Encabezado
Show residuals	Mostrar residuales
Show response curve	Mostrar curva de respuesta
Display RF Calibration By Points	Pantalla de calibración de radiofrecuencia Por puntos
Show QC Points	Mostrar puntos de control de calidad
Highlight Calibration Point Associated with the Current Sample	Resaltar Calibración Punto relacionado con la muestra actual

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	



12.29. Para optimizar el valor de la integración diríjase a la pestaña **Edit >> Method** (Editar >> Método). Seleccione el nombre del compuesto de interés y en la opción **Predicted Time Window (mins)** Ventana ± con respecto al Tiempo de Retención (minutos) cambie el valor, cierre la ventana y guarde los cambios.

12.30. Para ejecutar los cambios en el sistema, diríjase a la pestaña **Processing >> Execute** (Procesar >> Ejecutar), en la siguiente ventana indicar el tipo de proceso requerido (Integrar, Calibrar, Cuantificar, etc.) dar en **OK** observe los cambios en el gráfico.



Extract	Extraer
Update Method Times	Actualización Método Tiempos
Update Ion Ratios	Ratios de actualización de Ion
Integrate	Integrar
Calibrate	Calibrar
Quantify	Cuantificar
Blank Subtract	Restar blanco

- Para editar las propiedades de la calibración, dar clic en **Edit >> Properties**.

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

12.31. Para guardar el Método de Procesamiento dar clic en **File** (Archivo), seleccionar la función **Export >> Calibration** (Exportar >> Calibración) buscar la carpeta del **MassLynx** y en seguida la del nombre del proyecto, abra la carpeta de la curva **CurveDB**, establezca un nombre y de clic en **Save** (Guardar).



PROCESAMIENTO DE LOS DATOS DE MUESTRAS.

12.32. Para procesar las muestras hacer lo mismo que los estándares, seleccione las muestras y en la columna **Sample Type** especifique la función **Analyte** (Analito); dirijase a la función **Procces Sample** y Desactive la función **Calibrate** (Calibrar), al hacer esto automáticamente se habilita la función Curva (**Curve**) dar clic derecho en dicha función seleccione el método y de clic en Ok.

12.33. Para optimizar la integración, dirijase a la función **Edit >> Method** y cambie el valor de predicción en la opción **Predicted Time Window**. Cierre la ventana y guarde los cambios.

12.34. Para ejecutar los cambios, dirijase a la pestaña **Processing >> Execute** Desactive la función **Calibrate** y finalmente de clic en OK.

12.35. Para guardar el Método de Procesamiento dar clic en **File** (Archivo), seleccionar la función **Export >> Calibration** (Exportar >> Calibración) buscar la carpeta del **MassLynx** y en seguida la del nombre del proyecto, abra la carpeta de la curva **CurveDB**, establezca un nombre y de clic en **Save** (Guardar).

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

13. CREACIÓN DEL REPORTE

13.1. Para ver y editar el reporte diríjase a **File** (Archivo) y seleccione la función **Report Format..** (Formato del Reporte).

13.2. En la pestaña **General**, en la opción **Header** edite y escriba el encabezado, en la opción **Footer** escriba el pie de página.

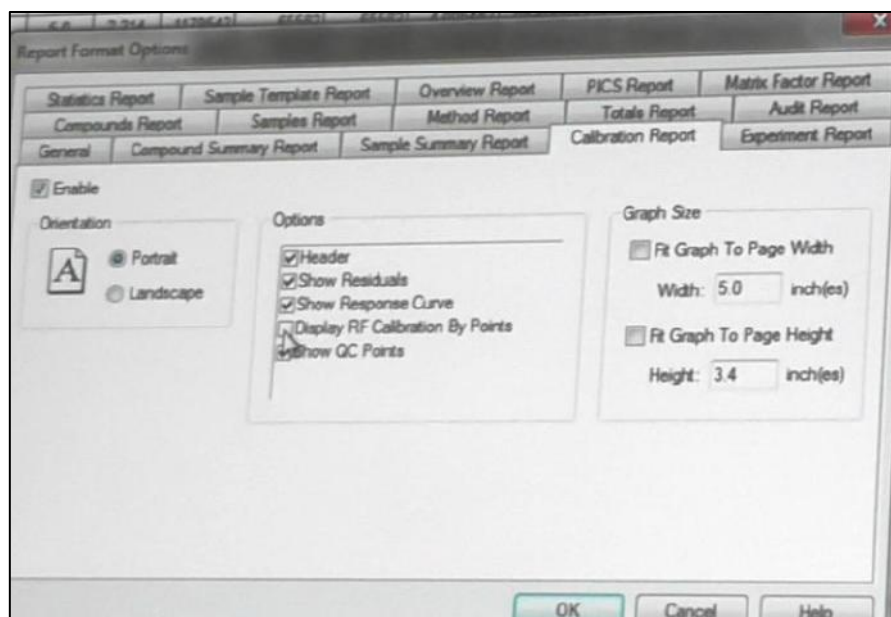
13.3. Seleccionar el modo de impresión **Hard Copy** (Copia impresa) o **Soft Copy** (Copia temporal Adobe PDF).



13.4. En la función **Page Numbering**, especifique el tipo de numeración de páginas **Apply Page Numbers** (Aplicar Números de Página): **Individual Report Numbering** Numeración Individual del Informe / **Continuous Numbering** (Numeración Continua).

13.5. En la función **Print Margins** especificar los márgenes de impresión: **Top** (Superior) / **Bottom** (Inferior) / **Left** (Izquierdo) / **Right** (Derecho).

13.6. Para editar el reporte habilite cualquier pestaña dando clic en la función **Enable** (Permitir) realice los cambios necesarios y de clic en OK.

- Por ejemplo, para editar el reporte de la curva de calibración seleccionar la pestaña **Calibration Report** dar clic en **Enable** y seleccione las opciones necesarias (Orientación del gráfico y **Graph Size** (tamaño del grafico)).



	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

Opciones de la Función Reporte de Calibración

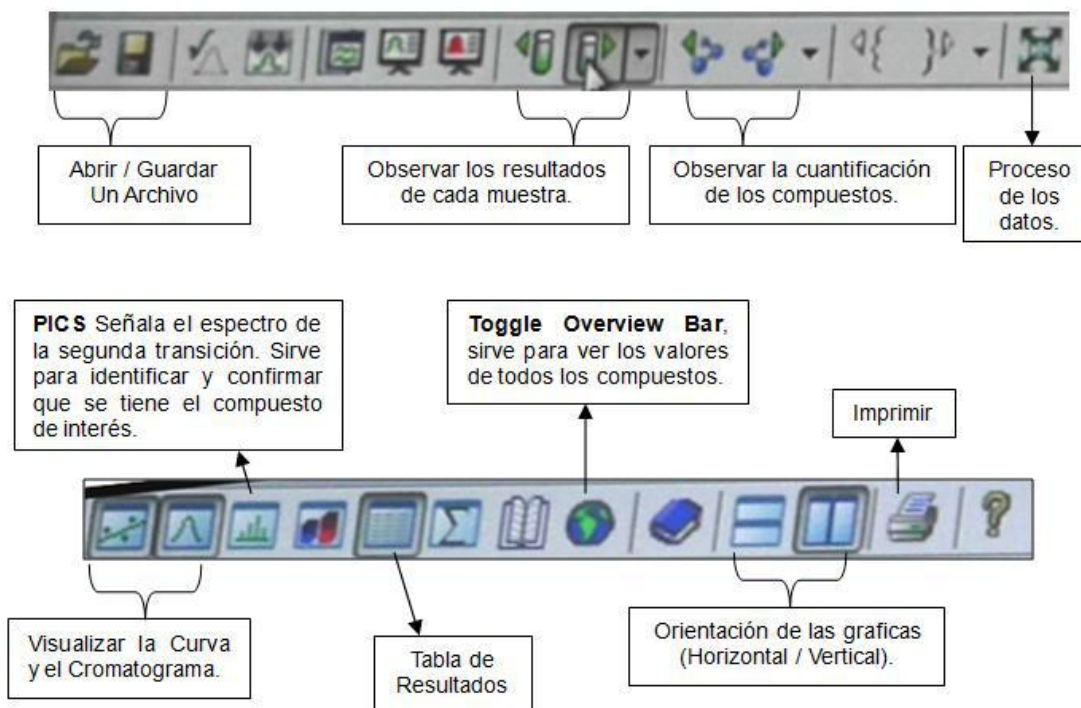
• Header	Encabezado
• Show Residuals	Mostrar residuales
• Show Response Curve	Mostrar respuesta de la curva
• Display RF Calibration By Points	Mostrar la respuesta factor de la calibración por puntos
• Show QC Points	Mostrar el control de calidad de los puntos



13.7. Para modificar y guardar el formato de presentación de una tabla, diríjase a las opciones **File >> Apply Layout...** (Aplicar diseño).

13.8. Para aceptar o rechazar los datos que se hayan modificado diríjase a las opciones **File >> Accept Dataset** (Archivo >> Conjunto de datos).

13.9. Si se desean modificar las propiedades de la calibración diríjase a la pestaña **Edit >> Properties** en la siguiente ventana modifique las propiedades.

13.10. Los iconos sirven para ver las diferentes pantallas (gráficos o tablas) en el reporte.



	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

13.11. Para modificar las propiedades de cualquier columna en el reporte, hacer clic derecho en la columna y seleccionar la opción **Edit Column Properties** (Editar propiedades de la columna). Elegir las funciones deseadas y dar clic en **OK**.

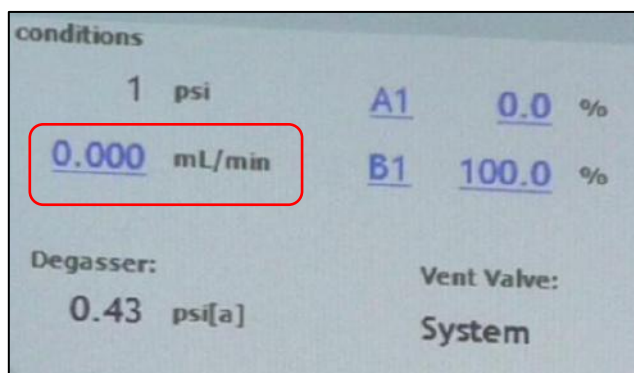
13.12. Para ver el reporte con los cambios realizados diríjase a **File>> Print Preview** (Archivo >> Vista preliminar). Para visualizar las páginas del Reporte de clic en la pestaña **Next Page** (Página Siguiente) o **Prev Page** (Página Anterior).



13.13. Para modificar las propiedades de la barra de tareas del menú inicio, dar clic derecho sobre el reporte y seleccionar la opción necesaria: **Taskbar** (Barra de Tareas), **Start Menu** (Menú de inicio) o **Toolbars** (Barra de herramientas). Active la función requerida y hacer clic en **Apply >> OK** (Aplicar >> Aceptar).

13.14. Para guardar el Reporte en formato **PDF**, diríjase a la opción **Print** Impresión. En la barra de búsqueda, elija la opción **PDF (Reader)**, hacer clic en **OK** y después seleccionar la carpeta para guardar el documento.


14. STANDBY PUESTA EN ESPERA DEL INSTRUMENTO.

14.1. Para dejar el equipo en espera (Standby) siempre hay que fijarse que el flujo se encuentre en cero, para ello ir a la consola del **ACQUITY** y dar clic en la opción **Binary Solvent Manager**, en la opción **Conditions** (Condiciones) verifique que el flujo se encuentre marcado **0.000 mL/min** (en caso contrario bajar el flujo poco a poco).



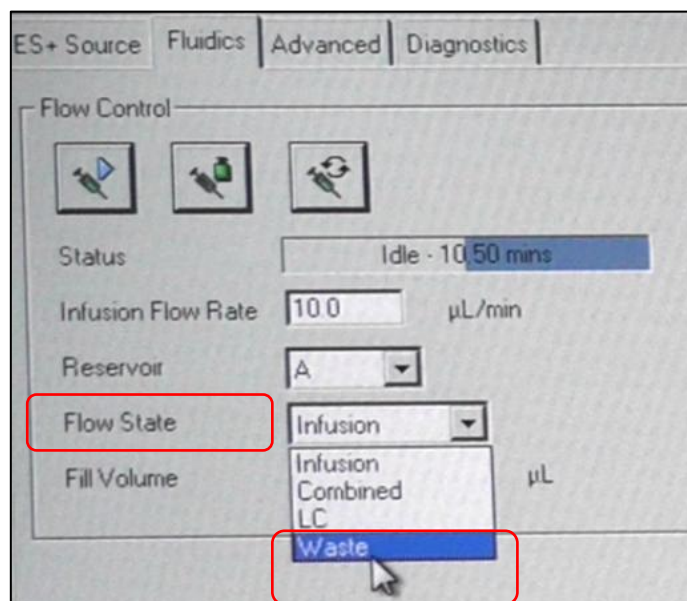
	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	



14.2. Regresar al menú de la consola **ACQUITY** y dar clic en la opción **Sample Manager** apague el horno, dirigirse a la función **Temperature** de clic en el numero azul y en la siguiente ventana **Set Parameter** (Ajuste de

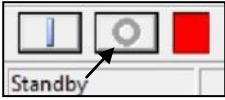
Parámetro) indique una temperatura de cero o de clic en el icono , una vez hecho esto aparecerá en la pantalla la indicación de **Off**.




14.3. Una vez que se tiene el flujo y la temperatura en **OFF**, ir a la consola **MS Tune >> Fluidics**, en la función **Flow State** (Estado de flujo) seleccione la opción **Waste** (Residuos) para mandar a desechos todo lo que haya quedado en el sistema.




	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	


14.4. Dar clic en el icono **Standby**  para poner al equipo en espera.

14.5. Finalmente apagar los gases , minimizar las ventanas y apagar el monitor.

15. PURGADO DEL SISTEMA XEVO TQ

 **Indicación.** Dependiendo del tipo de soluciones utilizadas, el sistema de administración de solventes del instrumento puede requerir más de un ciclo de purga para minimizar el arrastre.

15.1. Abrir la ventana **MassLynx** y en la función **Instrument** (Instrumento) buscar y abrir la ventana del **MS Tune**.


15.2. Abrir el gas nitrógeno  para evitar que el flujo del cromatógrafo de líquidos pase al equipo de Masas y pueda causar algún daño en el equipo.



15.3. Diríjase a la pestaña **Fluidics** (flujo) para señalar las condiciones del purgado.

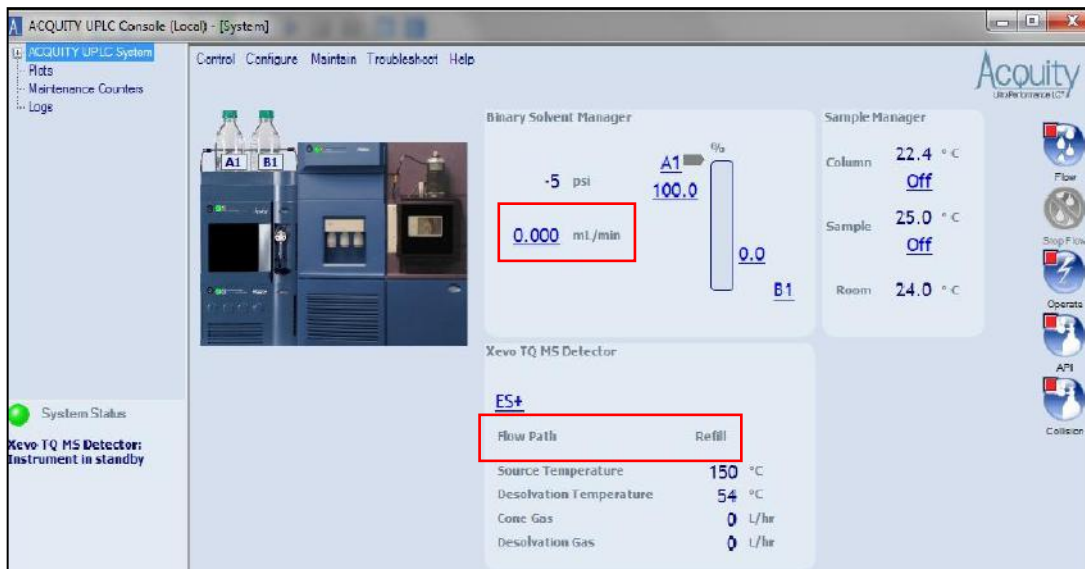
15.4. En la función **Reservoirs** (reservorio) seleccione el estado de **Wash** (lavado).

15.5. En la función **Flow State** (estado del flujo), seleccione **Waste** (desechos).

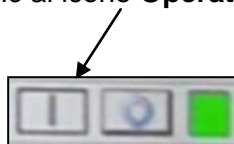
15.6. En la función **Infusion Flow Rate** establezca el flujo de infusión y en la función **Fill Volume** señale el volumen de llenado.

15.7. Diríjase a la consola del **ACQUITY UPLC System**  y verifique que el flujo del Sistema de administración de solventes binario (**Binary Solvent Manager**) este apagado y en la función **Flow Path** (Trayectoria del flujo) este señalado **Refill** (Rellenar).

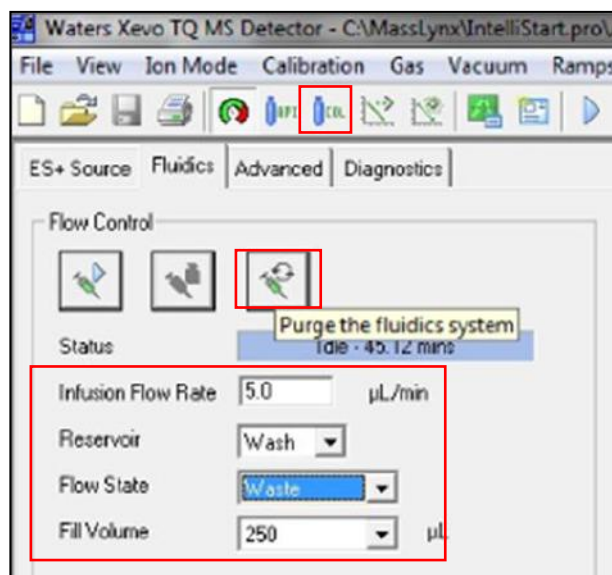
	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	





15.8. Desactivar el **Standby** dando clic al icono **Operate** (Funcionar).



15.9. Para purgar dar clic al icono **Purge the Fluidics system** (Purgar el sistema de fluidos).



	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

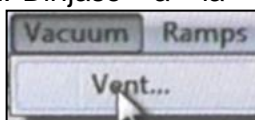
16. VENTEAR EL EQUIPO

! **Indicación.** Cuando se va dejar el equipo fuera de funcionamiento por un largo periodo de tiempo (mayor a 15 días), es recomendable Ventear el equipo y apagar totalmente todos los sistemas.

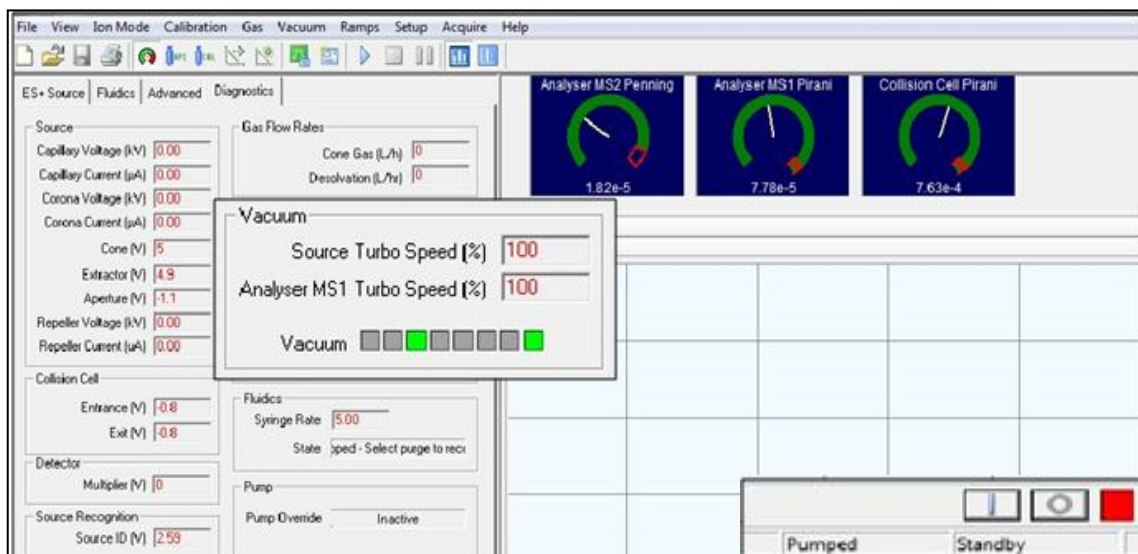
! **Advertencia.** Nunca apagar los switch de los sistemas antes de ventear el equipo, ya que, si se apagan primero se puede dañar las bombas así como el sistema eléctrico.

16.1. Abrir la ventana **MassLynx** y en la función **Instrument** (Instrumento) abrir la ventana de la función **MS Tune**.



16.2. Diríjase a la pestaña **Vacuum** y de clic en la función **Vent...**



16.3. Una vez que comience el venteo ir a la función **Diagnostics** (Diagnóstico), y en la función de **Vacuum** (Vacío) monitoree los valores de las funciones **Source Turbo Speed (%)** (Velocidad Turbo de la Fuente) y **Analyser MS 1 Turbo Speed (%)** (Velocidad Turbo del Analizador MS1). Los valores de estas funciones irán bajando hasta alcanzar valores entre **5** y **0** una vez que termine en la parte inferior de la ventana aparecerá la indicación **Vent** en vez de **Pumped**.



16.4. Proceder a apagar todos los sistemas: Cromatógrafo, el Masas, la Computadora y el gas nitrógeno.

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico	Número de código: MAN-OP-02	
		Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

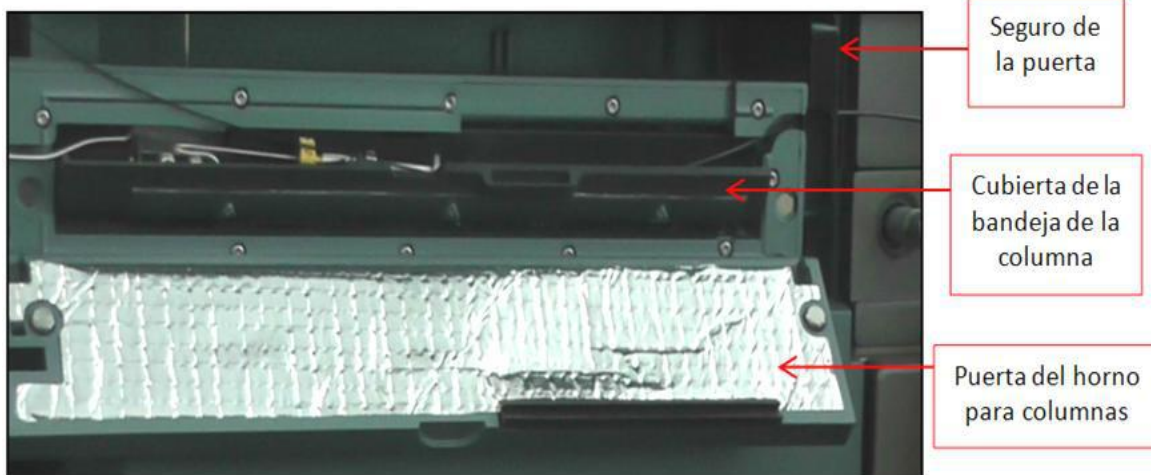
17. COLOCACIÓN DE LA COLUMNA.



⚠ Advertencia. Para la colocación de una columna es necesario siempre utilizar guantes libres de polvo mientras se realiza este procedimiento.

17.1. Quitar el seguro para desbloquear la puerta del horno de columnas y después, tirar de esta hacia usted. La puerta se abre hacia abajo.




17.2. Tirar de la cubierta posterior y después inclinar hacia abajo la bandeja de columnas.



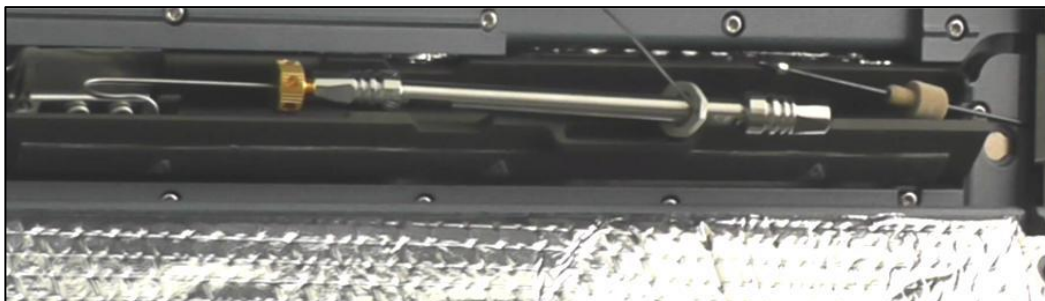
	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

17.3. Para colocar la columna, primero se deben retirar los conectores de ambos extremos de la columna.

 **Advertencia.** Colocar la columna siempre fijándose que la trayectoria del flujo se dirija del muestreador hacia el detector de masas. (*La dirección del flujo viene marcada en la columna*).

17.4. Acoplar la entrada de la columna al conector de acero inoxidable.

17.5. Acoplar a la salida de la columna el capilar de entrada del espectro de masas. Para ello, enrosque el conector un poco en la columna y asegure de introducir el capilar hasta el tope, una vez introducido enrosque completamente.





17.6. Situar la columna en la bandeja.

17.7. Cerrar la cubierta de la bandeja de la columna y posteriormente la puerta del horno para columnas.

17.8. Acoplar el soporte del chip de la columna al receptor del lateral del horno de columnas.



	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

Instalar una precolumna.

Se puede instalar una precolumna entre el inyector y la columna analítica para protegerla de la contaminación con partículas de muestras y sustancias con un alto grado de retención. La precolumna es una columna corta que normalmente se rellena con el mismo material que la columna analítica y suele tener el mismo diámetro interno. Una precolumna elimina las partículas contaminantes de las muestras por adsorción.

La precolumna se debe sustituir cuando se contamine o cuando la presión del sistema ascienda por encima de los niveles esperados.

18. CAMBIO DE LOOP

Sustituir el loop cuando esté atascado o cuando su capacidad no sea la apropiada para las necesidades cromatográficas.

! **Precaución.** Al colocar un Extended Loop, el volumen del loop se convierte en el volumen total del inyector.

Para evitar el ensanchamiento de la banda o un arrastre excesivo, comprobar que se ha vuelto a instalar el loop de muestra instalado previamente con la orientación exacta con la que estaba instalado anteriormente, de manera que el mismo extremo entre en el mismo puerto.

! **Advertencia:** El volumen del loop no debe sobrepasar el volumen de la jeringa, de ser así, realizar un cambio de jeringa.



! **Advertencia:** Es necesario siempre utilizar guantes limpios y libres de polvo mientras se realiza este procedimiento.

18.1. Sacar la bandeja de fluidos del sistema administrador de muestras.

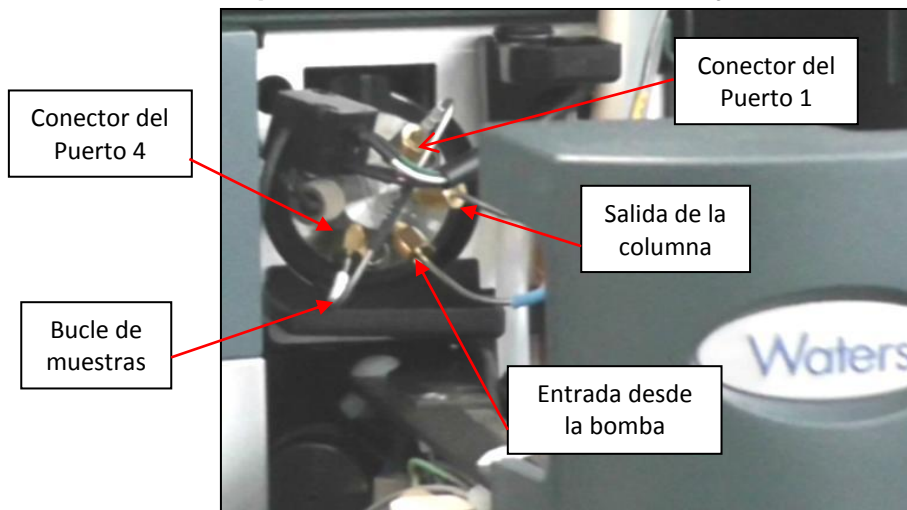
! **Precaución.** Para evitar que se retuerzan, no tirara de los tubos del dispositivo de detección de volúmenes (puerto 2) ni de la aguja de toma de muestras (puerto 3).

18.2. Sostener el loop de muestras y tirara de la válvula de inyección hacia afuera.

18.3. Utilizar una llave fija de 1/4pulg para quitar los conectores de los puertos 1 y 4 de la válvula de inyección.

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

Conectores del loop de muestras en la válvula de inyección.



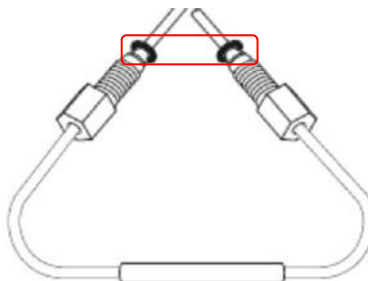
18.4. Retirara el bucle de muestras y los conectores.

18.5. Si se va a reutilizar el bucle de muestras, se debe identificar cada extremo con el puerto al que estaba conectado.

⚠ Indicación. Si se sustituyó el cartucho de la válvula de inyección, no se deben instalar loops de muestras usados en el cartucho nuevo.



18.6. Colocar el loop de muestras y sus conectores en una bolsa a prueba de contaminación.

18.7. Desempaquetar el bucle de muestras y las conexiones de recambio.



⚠ Precaución. Para evitar fugas, se deben extraer los anillos antes de instalar el loop de muestra.

18.8. Extraer los anillos del loop de la muestra.

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	



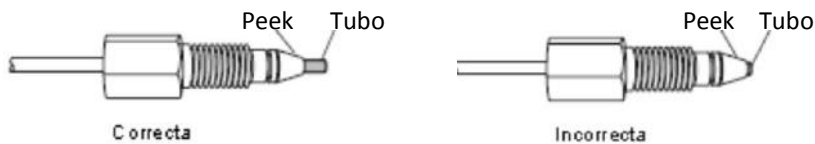
Precaución.

- Para evitar el volumen muerto en el sistema, comprobar que los extremos del loop estén completamente insertados en los puertos de la válvula de inyección antes de mover los Peek.
- Utilizar únicamente loops ACQUITY UPLC aprobados por Waters.

18.9. Deslizar un peek de dos piezas y el tornillo de compresión por un extremo del loop de muestras, y fijar el extremo al puerto 1 de la válvula de inyección.

18.10. Apretar con las manos la conexión y, a continuación, apretar $\frac{3}{4}$ de vuelta más con la llave fija.

18.11. Extraer el conector e inspeccionar el peek para comprobar que no se haya movido.



18.12. Repetir el paso 17.8 al 17.10 para el otro extremo del loop de muestra y para el puerto 4 de la válvula de inyección.

18.13. Reinstalar el conector del loop de muestra en los puertos 1 y 4 de la válvula.



Precaución.

- Para evitar que se retuerzan, no empujar los tubos del dispositivo de detección de volúmenes (puerto 2) ni de la aguja de toma de muestras (puerto 3).
- Para evitar el ensanchamiento de la banda o un arrastre excesivo, comprobar que se ha vuelto a instalar el loop de muestras con orientación exacta con la que estaba instalado anteriormente, de manera que el mismo extremo entre en el mismo puerto.



18.14. Volver a colocar la válvula de inyección en la posición cerrada.



Precaución. Se debe proceder con cuidado para no aplastar el loop ni el conducto del dispositivo de detección de volúmenes.

18.15. Deslizar la bandeja de fluidos para cerrarla.

18.16. En la consola **ACQUITY UPLC**, seleccionar **Sample Manager** (Sistema administrador de muestras).

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

18.17. Hacer clic en **Maintain >> Calibrate System Volume** (Mantenimiento >> Calibrar volumen del sistema) para caracterizar los volúmenes del sistema nuevo.

19. CAMBIO DE LA JERINGA DE MUESTRAS.

Las burbujas de aire afectan negativamente a la presión del sistema, la línea base, el volumen y el área de picos. Eliminar las burbujas de aire, golpeando con cuidado la jeringa mientras se retrae el émbolo, como cuando se ceba la jeringa de muestras.

Sustituir la jeringa de muestras cuando se produzca cualquiera de estas situaciones:

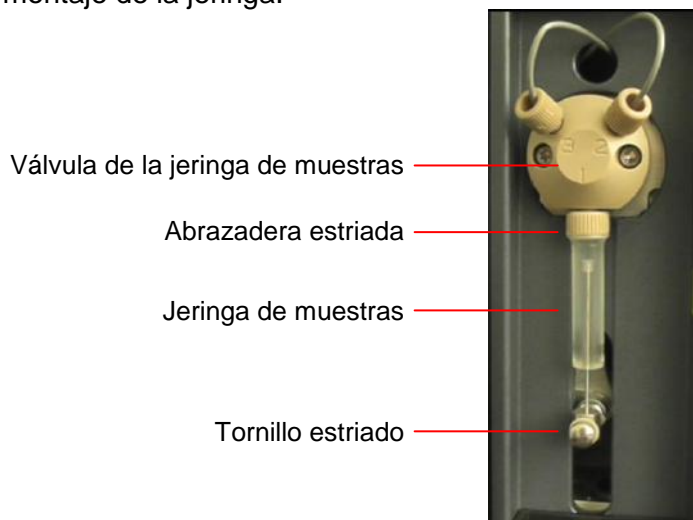
- El extremo del émbolo de la jeringa está desgastado o descolorido.
- Se desea modificar el tamaño de la jeringa.
- La jeringa tiene una fuga o produce burbujas de aire
- La jeringa no supera la prueba de fugas.



⚠ Advertencia: Es necesario siempre utilizar guantes limpios y libres de polvo mientras se realiza este procedimiento.

19.1. En la consola **ACQUITY UPLC**, seleccionar **Sample Manager** (Sistema de gestión de muestras) en el esquema del sistema.


19.2. Hacer clic en **Maintain >> Replace >> Sample syringe** (Mantenimiento >> Reemplazo >> Jeringa de muestra). Esto activa un asistente que desplaza la jeringa a la posición más baja.

19.3. Extraer el tornillo estriado que sujeta la jeringa de muestras al soporte del montaje de la jeringa.

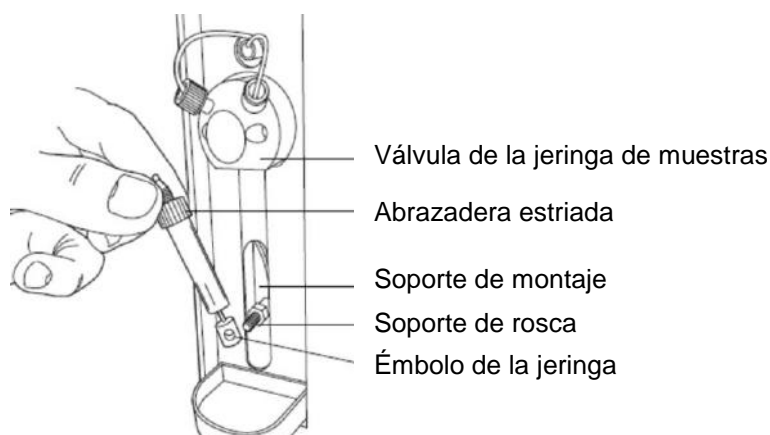


	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

19.4. Desenroscar la jeringa de muestras en sentido contrario a las manecillas del reloj hasta que se separe la válvula de la jeringa de muestras.

 **Precaución.** Para evitar romper la jeringa, no se debe sujetar por el cilindro de vidrio. La jeringa siempre se debe sujetar por la abrazadera estriada.

19.5. Desempaquetar la jeringa de muestras de recambio.



19.6. Rellenar parcialmente a mano la nueva jeringa con solvente de lavado suave para eliminar las burbujas de aire.

Requisito. Comprobar que se han eliminado todas las burbujas de aire.

19.7. Retraer el embolo de la jeringa de forma que su extremo se deslice por el poste de rosca del soporte de montaje de la guía de la jeringa.


19.8. Enroscar parcialmente la nueva jeringa de muestras en la válvula.



19.9. Apretar de forma manual la jeringa de muestras.

19.10. Instalar y apretar de forma manual el tornillo de rosca que fija el embolo de la jeringa de muestras al soporte de montaje.

19.11. Diríjase a la consola ACQUITY UPLC y en la función **Control**, ejecutar la opción **Reset** (Reajustar), esperar a que la jeringa se acomode.


19.12. En la función **Prime Syringes** (Purgar jeringas), ejecute la opción **Sample syringe Only** (Purgar solo la jeringa de muestras), hasta que no haya burbujas en la jeringa de muestras.

 **Indicación.** Dar pequeños golpes en la jeringa de muestras al apretar el émbolo para eliminar el aire.



	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

SUSTITUCIÓN DE LAS JERINGAS DE LAVADO.

Sustituir las jeringas de lavado cuando el extremo del émbolo de la jeringa presente fugas, esté desgastado o descolorido, o no supere la prueba de fugas.

- 19.13. Sacar la bandeja de fluidos del sistema administrador de muestras.
 - 19.14. Extraer los tornillos estriados que fijan los émbolos de las jeringas de lavado a los soportes de montaje de las jeringas.
 - 19.15. Mirando hacia las jeringas de lavado, desenroscar cada jeringa en sentido de las manecillas del reloj hasta que se separe del soporte de montaje.
-  **Precaución.** Para evitar romper la jeringa, no se debe de sujetar por el cilindro de vidrio. La jeringa siempre se debe sujetar por la abrazadera estriada.
- 19.16. Empujar el cuerpo de la jeringa para liberar el soporte de montaje superior y extraer la jeringa.
 - 19.17. Desempaquetar cada jeringa de muestras de recambio.
 - 19.18. Rellenar parcialmente a mano las nuevas jeringas de lavado con solvente de lavado suave o fuerte para eliminar las burbujas de aire.
 - 19.19. Empujar hacia abajo el émbolo de las jeringas de lavado de forma que el extremo del émbolo se deslice por el poste de rosca del soporte de montaje de la guía de la jeringa.




	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

19.20. Enroscar todas las jeringas de lavado nuevas parcialmente en el soporte de montaje.

19.21. Apretar a mano las jeringas de lavado.

19.22. Instalar y apretar a mano el tornillo de rosca que fija el cuerpo de las jeringas de lavado al soporte de montaje.

 **Precaución.** Se debe proceder con cuidado para no aplastar el conducto del dispositivo de detección de volúmenes.

19.23. Deslizar la bandeja de fluidos para cerrarla.

Conducto del dispositivo de detección de volúmenes



19.24. Ejecutar la opción **System Prime** (Purgado del sistema) hasta eliminar las burbujas de la jeringa.



MODIFICACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE CONFIGURACIÓN DE LA JERINGA DE MUESTRAS.

Para configurar el sistema para un tamaño de jeringa diferente del actual.

19.25. En la consola ACQUITY UPLC, seleccionar **Sample Manager** (Sistema de gestión de muestras) en el esquema del sistema.

19.26. Seleccionar **Configure >> Volumes** (Configurar >> Volúmenes).

19.27. En el cuadro de diálogo **Volume Configuration** (Configuración del volumen), seleccionar el tamaño de jeringa de muestras adecuado de la lista y, a continuación, hacer clic en OK.

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

20. CAMBIO DE LA AGUJA

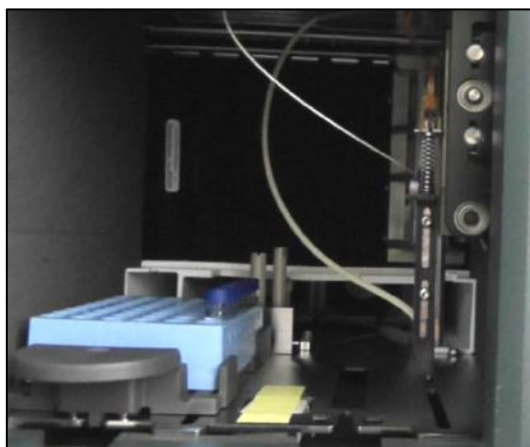
Se recomienda sustituir la aguja de inyección si:

- El sistema administrador de muestras no alcanza la presión de transferencia de muestras.
- La aguja está doblada.
- El extremo de la aguja está dañado.
- La aguja está taponada.

20.1. En la consola ACQUITY UPLC, hacer clic en **Sample Manager** (Sistema administrador de muestras), seleccionar **Maintain >> Change needle** (Mantener >> Cambiar aguja).

Aparecerá un mensaje que solicitara la extracción de la placa de muestras de la derecha del compartimiento del sistema administrador de muestras.



20.2. Abrir la puerta del sistema administrador de muestras. Tirara hacia afuera de la bandeja derecha y extraer la placa de muestras.

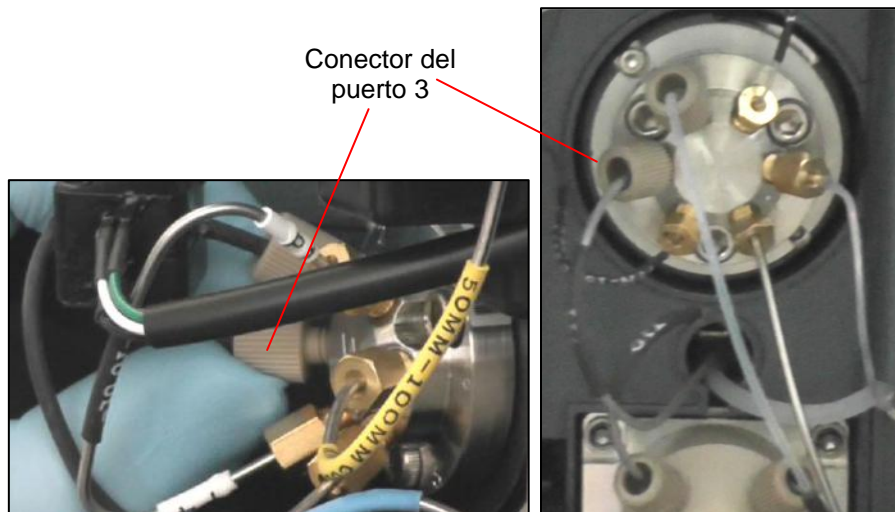


20.3. Tras extraer la placa de muestras de la bandeja, hacer clic en **OK** en la ventana de mensajes de la consola ACQUITY UPLC.

20.4. Sacar la bandeja de fluidos del sistema administrador de muestras.

20.5. Tirar hacia al frente la válvula de fluidos y desatornillar el conector del dispositivo de inyección del puerto 3 del inyector.

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

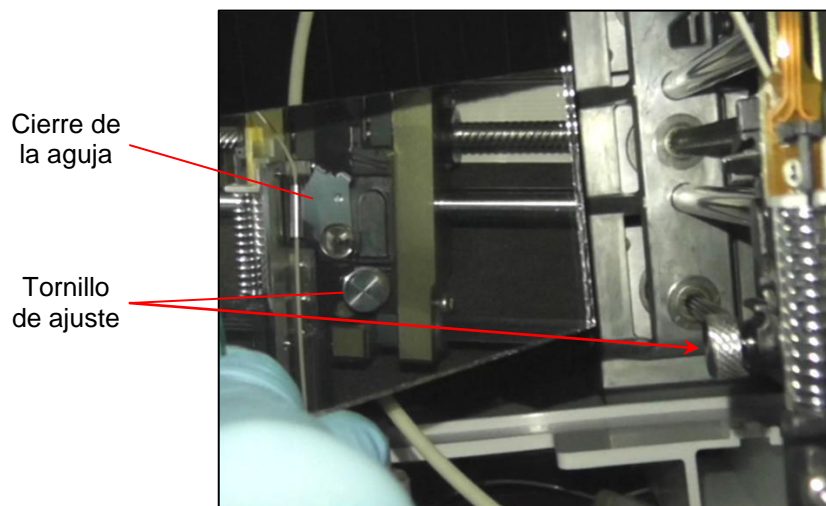




20.6. Extraer el conector de la aguja.

20.7. En el compartimiento de muestras, aflojar el tornillo del soporte de montaje de la aguja.

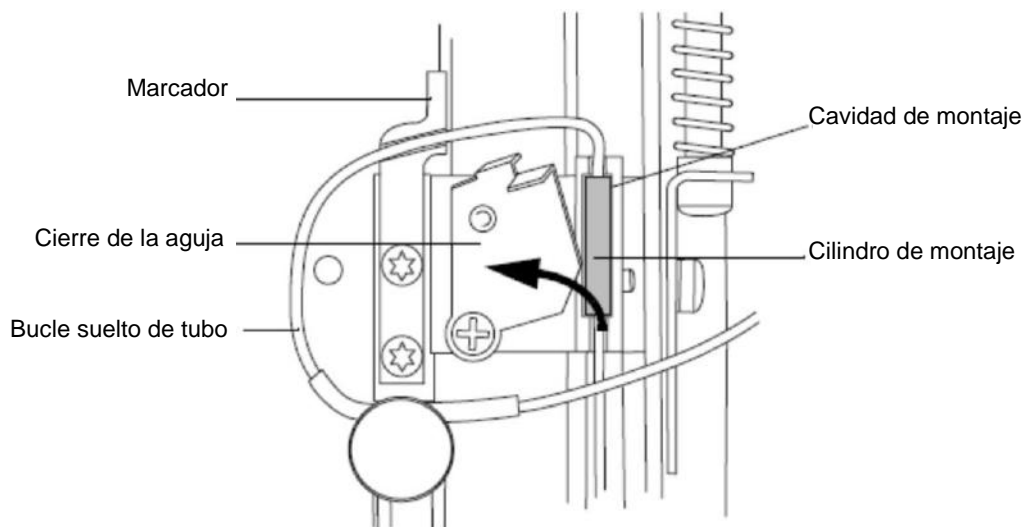
⚠ Indicación. Las agujas de perforación extendidas presentan un tornillo de ajuste manual de plástico gris o de acero inoxidable en el soporte de montaje de la aguja.

Mecanismo de coordenadas tridimensionales

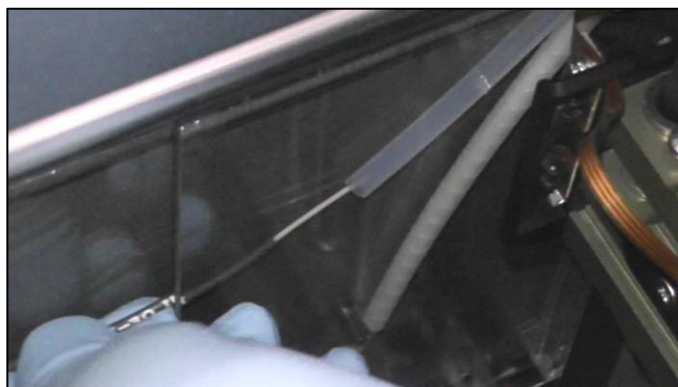


	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

20.8. Tirar del cierre de la aguja para liberar el cilindro del montaje de la aguja de su cavidad de montaje.





20.9. Sacar el extremo de la aguja de la guía de plástico blanca situada en la parte inferior del mecanismo XYZ.

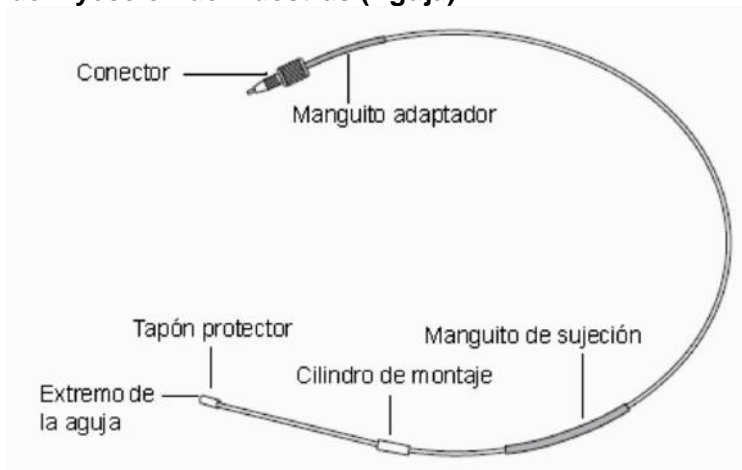


⚠ Advertencia. Para evitar heridas por punción o daños en el extremo de la aguja, no se debe tocar o presionar el extremo.

20.10. Extraer el dispositivo de inyección del compartimiento de muestras.

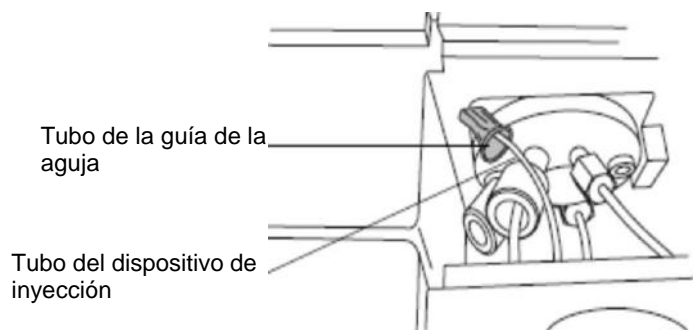
	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

Dispositivo de inyección de muestras (Aguja)



Para instalar el dispositivo de inyección.

20.11. Insertar el extremo de la aguja en el tubo de la guía al inyector.





20.12. Empujar cuidadosamente el dispositivo de inyección hacia el interior del compartimiento de muestras.

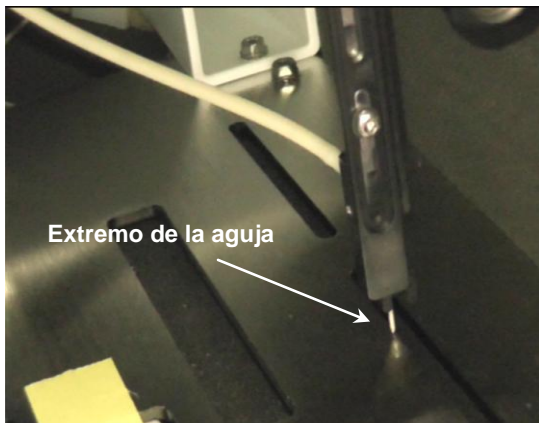
20.13. Desde el interior del compartimiento de muestras, sujetar el tubo del dispositivo de inyección que entra en la cámara desde la parte superior.

20.14. Extraer el tapón protector del extremo de la aguja.

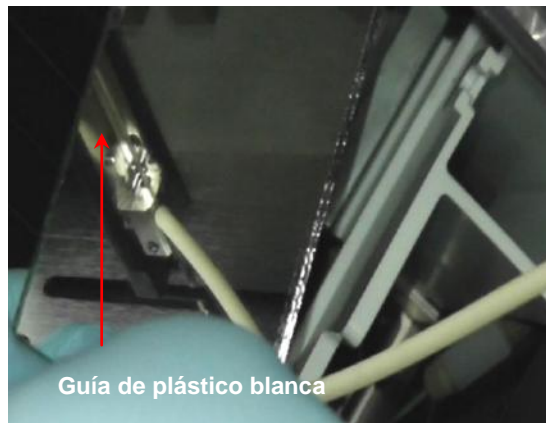
20.15. Sostener la aguja por el cilindro de montaje y, con el extremo de la aguja apuntando hacia abajo, insertar su extremo en la guía de plástico blanca situada en la parte inferior del mecanismo XYZ.

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

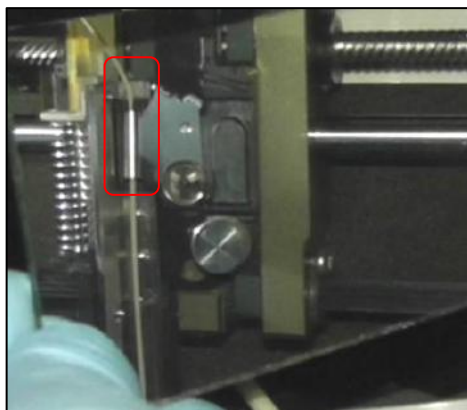
Vista frontal



Vista trasera





20.16. Insertar el cilindro de montaje de la aguja en la cavidad de montaje.




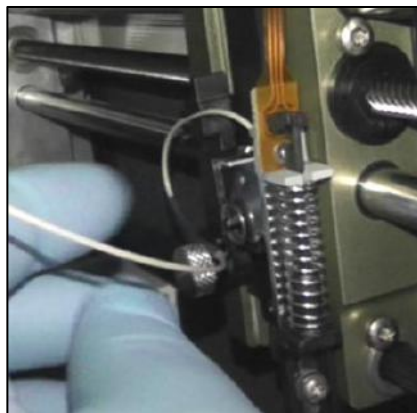
20.17. Empujar el cierre de la aguja hacia adelante para fijar el dispositivo de inyección.



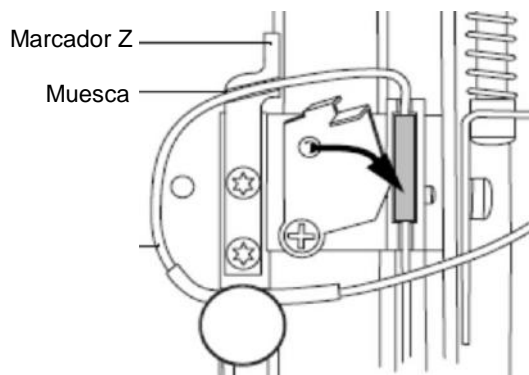
	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

20.18. Formar un bucle de forma que la sección del tubo con el manguito de sujeción negro pueda fijarse mediante el tornillo.

 **Precaución.** Para evitar dañar el módulo, no se debe colocar el loop de tubo suelto sobre el marcador Z.





20.19. Conducir el tubo a lo largo de la muesca por debajo del marcador Z. Como se muestra en la figura siguiente:



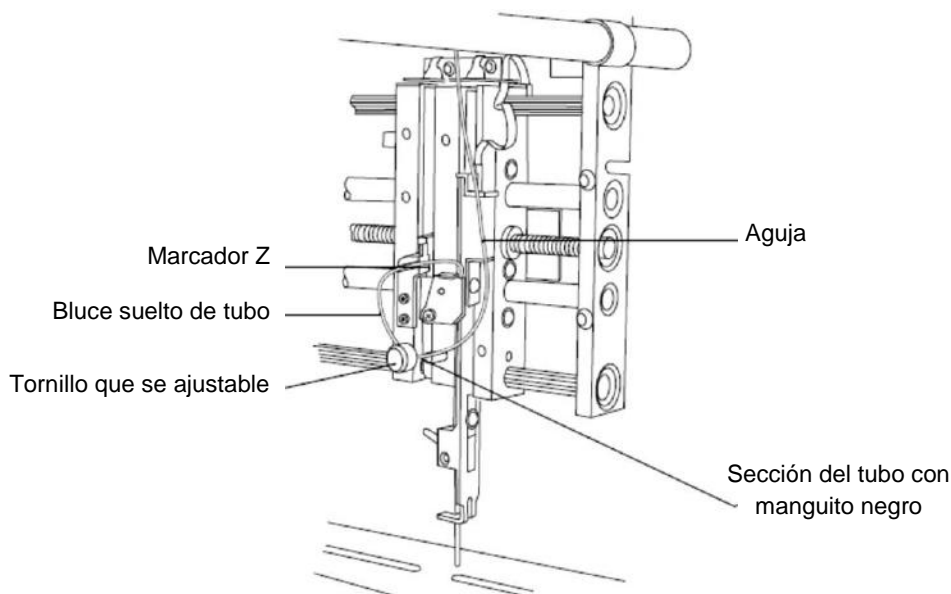
Colocación incorrecta del loop de tubo suelto.



	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

20.20. Alinear el tubo de forma que la sección que se encuentra justo a la izquierda del manguito de sujeción encaje en la muestra de detrás del tornillo.

20.21. Apretar el tornillo de forma que sujete la sección del tubo con el manguito negro.



20.22. Comprobar que el tubo de la aguja esté completamente insertado en el puerto 3, en la válvula de inyección, e introducir el conector en el puerto, apretándolo firmemente.

20.23. Cerrar la puerta del sistema administrador de muestras.



20.24. En la Consola ACQUITY UPLC, hacer clic en **Control >> Prime syringes** (Control >> Purgar jeringas).

20.25. Seleccionar **Sample syringe and wash syringes** (Jeringa de muestras y jeringas de lavado) en el cuadro de diálogo **Prime Syringes** (Purgar jeringas).

20.26. Escribir 1 en el cuadro de texto **Number of cycles** (Número de ciclos).

20.27. Hacer clic en el botón **OK**. El estado del sistema de gestión de muestras indicará "**Priming**" (Purgando). Cuando haya finalizado el purgado, el estado volverá a "**Idle**" (Sin actividad).

Recomendación. Calibrar el eje Z de la aguja tras sustituir el dispositivo de inyección de muestras y caracterizar la junta de la aguja.

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

CARACTERIZACIÓN DEL SELLO DE LA AGUJA.

La función de caracterización del sello de la aguja busca la posición en la que la aguja alcanza un acoplamiento en el bloque de la estación de lavado. La caracterización del sello de la aguja es fundamental para obtener un rendimiento aceptable del sistema administrador de muestras.

Realizar este procedimiento después de sustituir y/o ajustar estos elementos:

- La aguja de la muestra o cualquier pieza del dispositivo de inyección
- Los marcadores de la aguja (Z) o de la aguja de perforación (Zp) (inicial y de la parte superior de la placa)
- Algún sensor inicial o de la parte superior de la placa
- Estación de lavado

Requisitos:

- Comprobar que el sistema administrador de muestras se lave antes de caracterizar el sello de la aguja.
- Este procedimiento se realiza antes de calibrar la aguja y los volúmenes del bucle.



20.28. Hacer clic en **Maintain >> Characterize >> Needle seal** (Mantenimiento >> Caracterizar >> Sello de la aguja).

20.29. Hacer clic en **Start** (Iniciar). Comenzará la caracterización y el estado del sistema administrador de muestras será "**Characterizing seal**" (Caracterizando el sello).

Resultado. Cuando finalice la operación, aparecerá el panel **Results** (Resultados).

20.30. Si la caracterización no se realiza con éxito, se debe examinar la aguja para comprobar que está bien instalada. Realizar cualquier ajuste necesario y, a continuación, caracterizar el sello de la aguja de nuevo. Si no se tiene éxito, consultar la ayuda en línea de la Consola ACQUITY UPLC.

20.31. Si la caracterización se realiza con éxito, hacer clic en **Close** (Cerrar).

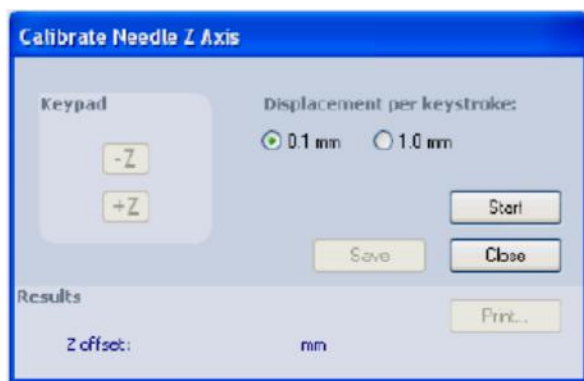
	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

CALIBRAR EL EJE Z DE LA AGUJA.

Es necesario calibrar el eje Z de la aguja siempre que se sustituya la aguja de la muestra.

20.32. Hacer clic en **Maintain >> Calibrate needle Z axis** (Mantenimiento >> Calibrar eje Z de la aguja).

20.33. En el cuadro de diálogo **Calibrate Needle Z Axis** (Calibrar eje Z de la aguja), hacer clic en **Start** (Iniciar) y, a continuación, en **OK** (Aceptar) en la ventana de confirmación.





20.34. Usar el botón **+Z** para que la aguja descienda hasta menos de 1 mm de la superficie de la bandeja.

20.35. Cambiar el incremento de desplazamiento a 0.1 mm y descender la aguja de toma de muestras hasta que prácticamente toque la superficie del soporte de la bandeja de muestras.

⚠ Indicación. Para colocar la aguja correctamente de un modo sencillo y eficaz, deslizar una tarjeta de crédito por debajo de la aguja. A continuación, descender la aguja hasta que entre en contacto ligeramente con la tarjeta, pero sin impedir su movimiento.

Aguja de la muestra a punto de tocar la superficie de la bandeja de muestras o tocando la tarjeta de visita.



	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	


20.36. Hacer clic en **Save** (Guardar).


Resultado. Se abrirá la ventana de confirmación.

20.37. Hacer clic en **Yes** (Sí).

21. SONDA ESI

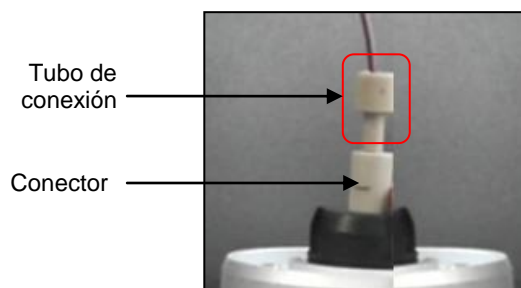
EXTRAER LA SONDA ESI.


 **Advertencia.** Las conexiones del sistema LC, la sonda ESI y los componentes de la fuente pueden estar contaminados con materiales tóxicos y/o con riesgo biológico. Es necesario utilizar siempre guantes sin talco resistentes a compuestos químicos para llevar a cabo este procedimiento.



 **Advertencia.** La sonda y la fuente pueden estar calientes. Para evitar lesiones por quemaduras, se debe tener mucho cuidado al llevar a cabo este procedimiento.

21.1. Poner el instrumento en modo de espera (**Standby**) (Consultar **“Standby puesta en espera del instrumento”**)

21.2. Desconectar el tubo de conexión de la sonda ESI.




 **Precaución.** Sujetar fuertemente el conector del tubo de conexión de la sonda ESI, ya que éste, está sujeto al capilar de la sonda ESI y se puede llegar a desmontarse o bien puede provocar mal funcionamiento eléctrico.

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

21.3. Desconectar el cable de la sonda ESI del conector de alto voltaje.

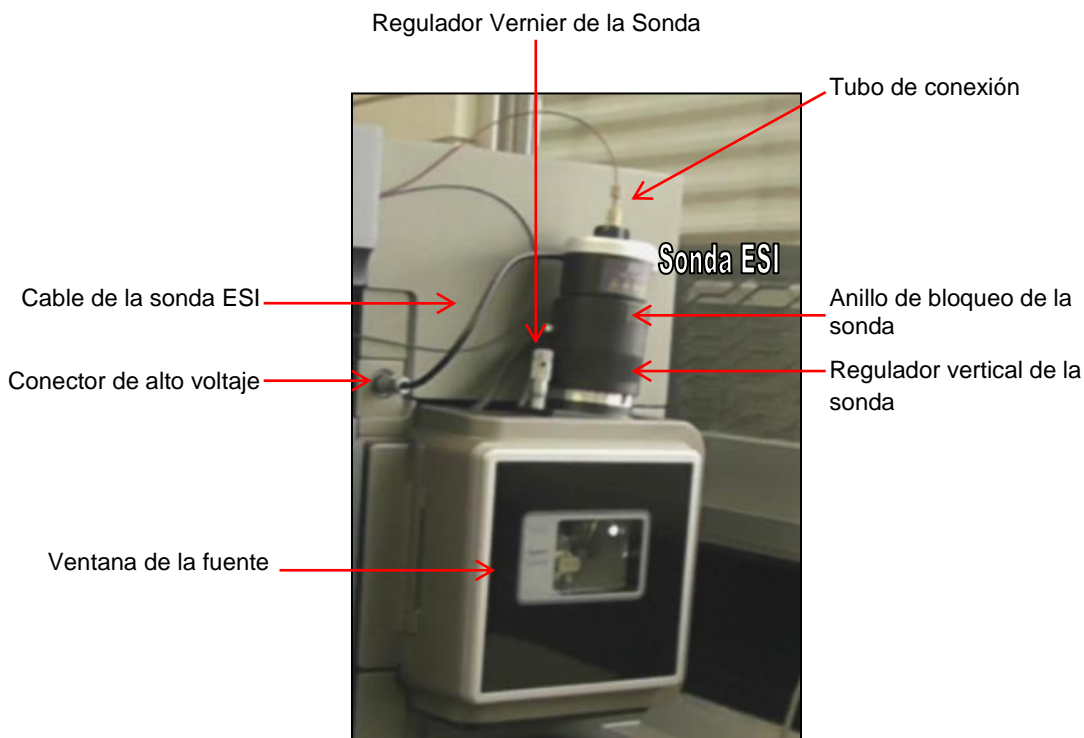
21.4. Desconectar el anillo de bloqueo de la sonda.



 **Advertencia.** El extremo de la sonda ESI está afilado. Para evitar heridas por punción, la sonda se debe manipular con cuidado.

21.5. Extraer cuidadosamente la sonda ESI del regulador de la sonda.


21.6. Si esta disponible, ajustar el manguito protector al extremo de la sonda ESI.


Sonda ESI, montada sobre la cubierta de la fuente



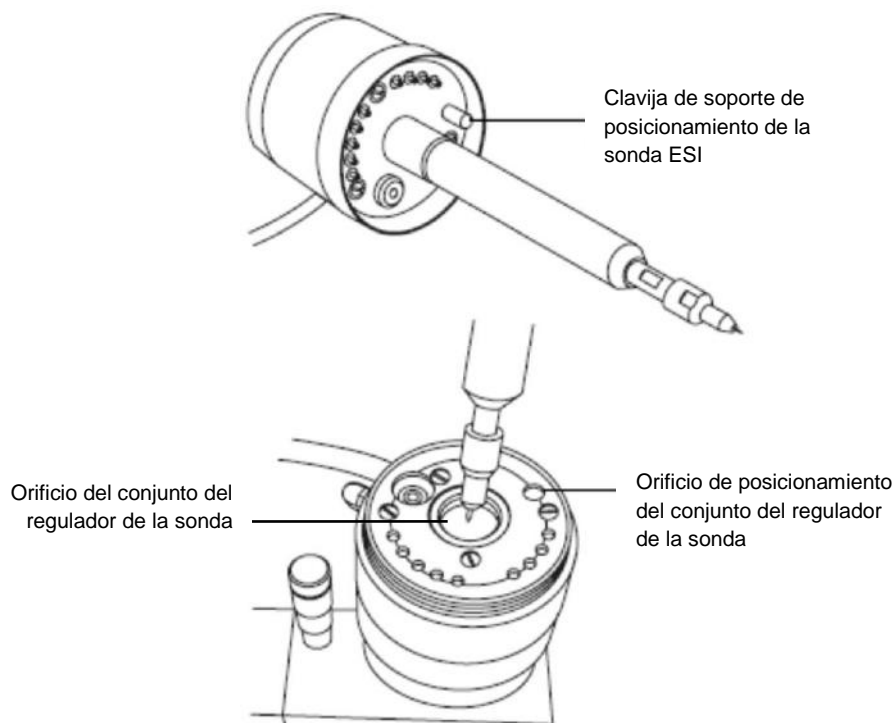
	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	



INSTALAR LA SONDA ESI

 **Advertencia.** Las conexiones del sistema LC, la sonda ESI y los componentes de la fuente pueden estar contaminados con materiales tóxicos y/o con riesgo biológico. Es necesario utilizar siempre guantes sin talco resistentes a compuestos químicos para llevar a cabo este procedimiento.

 **Advertencia.** La sonda y la fuente pueden estar calientes. Para evitar lesiones por quemaduras, se debe tener mucho cuidado al llevar a cabo este procedimiento.

- 21.7. Poner el instrumento en modo de espera (**Standby**) (Consultar **“Standby puesta en espera del instrumento”**)
- 21.8. Retirara el manguito protector, si lo hay, del extremo de la sonda ESI.
- 21.9. Con el extremo de la sonda mirando hacia delante, deslizar con cuidado la sonda ESI en el orificio del conjunto del regulador de la sonda, comprobando que la clavija de posicionamiento de la sonda quede alineada con el orificio de posicionamiento del conjunto del regulador de la sonda.



	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

21.10. Apretar el anillo de bloqueo de la sonda para sujetarla en su sitio.



Anillo de bloqueo de la sonda

! **Precaución.** Para evitar la fuga de nitrógeno, se debe apretar por completo el anillo de bloqueo de la sonda.

21.11. Conectar el cable de la sonda ESI al conector de alto voltaje.

21.12. Conectar el tubo de conexión de la sonda ESI.

! **Precaución.** Sujetar fuertemente el conector del tubo de conexión de la sonda ESI, ya que éste, está sujeto al capilar de la sonda ESI y se puede llegar a desmontarse o bien puede provocar mal funcionamiento eléctrico.



Si se sustituye el tubo que conecta la válvula divisora con la sonda ESI seguir los siguientes pasos:

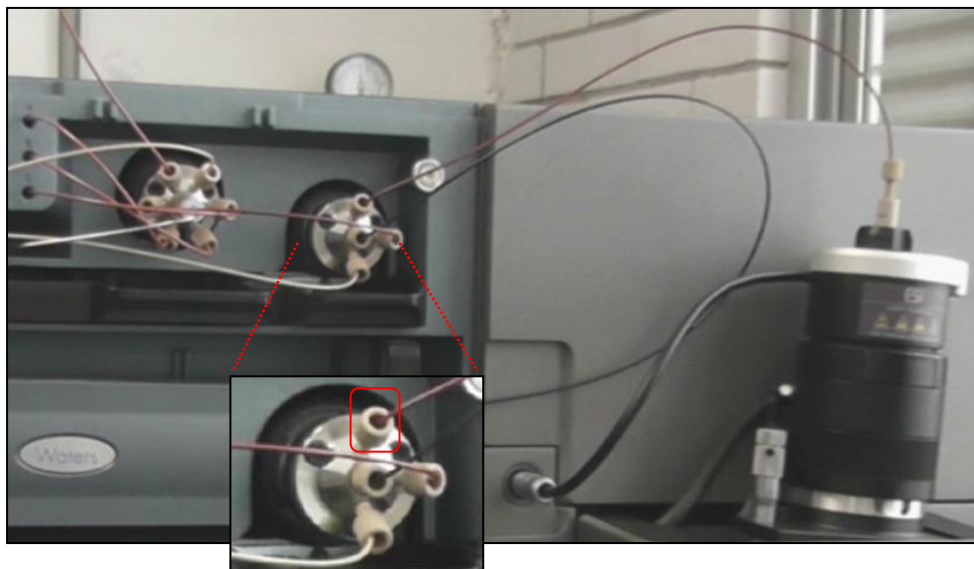
21.13. Abrir la puerta de acceso a la válvula de fluidos.

⚠ **Advertencia.** Para evitar una descarga eléctrica, no se deben utilizar tubos de acero inoxidable para conectar la válvula divisora a la sonda ESI; utilizar los tubos de PEEK suministrados con el instrumento.


21.14. Conectar el puerto 2 (puerto superior) de la válvula divisora a la sonda ESI utilizando tubos con un diámetro interno mayor o igual a 0.004 pulg.

Recomendación. Para reducir el ensanchamiento de picos, se debe utilizar un tubo de 0.004 pulg. de diámetro interno para los caudales ≤ 1.2 mL/min; para los caudales > 1.2 mL/min se debe usar un tubo de 0.005 pulg. de diámetro interno.



	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	



Requisito. Se debe tener la precaución de reducir al mínimo la longitud del nuevo tubo que se coloque. De este modo se minimizan los tiempos de demora y la dispersión.



 **Precaución.** Comprobar que el tubo no queda atrapado cuando se cierra la puerta de acceso a la válvula de fluidos.


21.15. Cerrar la puerta de acceso.

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

22. SONDA APCI

INSTALAR LA SONDA APCI


  **Advertencia.** Las conexiones del sistema LC, la sonda APCI y los componentes de la fuente pueden estar contaminados con materiales tóxicos y/o con riesgo biológico. Es necesario utilizar siempre guantes sin talco resistentes a compuestos químicos para llevar a cabo este procedimiento.

 **Advertencia.** La sonda y la fuente pueden estar calientes. Para evitar lesiones por quemaduras, se debe tener mucho cuidado al llevar a cabo este procedimiento.



- 22.1. Poner el instrumento en modo de espera (**Standby**) (Consultar **“Standby puesta en espera del instrumento”**)
- 22.2. Con el extremo de la sonda mirando hacia delante, deslizar con cuidado la sonda APCI en el orificio del conjunto del regulador de la sonda, comprobando que la clavija de posicionamiento de la sonda quede alineada con el orificio del conjunto del regulador de la sonda.




- 22.3. Apretar el anillo de bloqueo de la sonda para sujetarla en su sitio.


 **Precaución.** Para evitar la fuga de nitrógeno, se debe apretar por completo el anillo de bloqueo de la sonda.

- 22.4. Conectar el tubo de conexión de la sonda API.

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

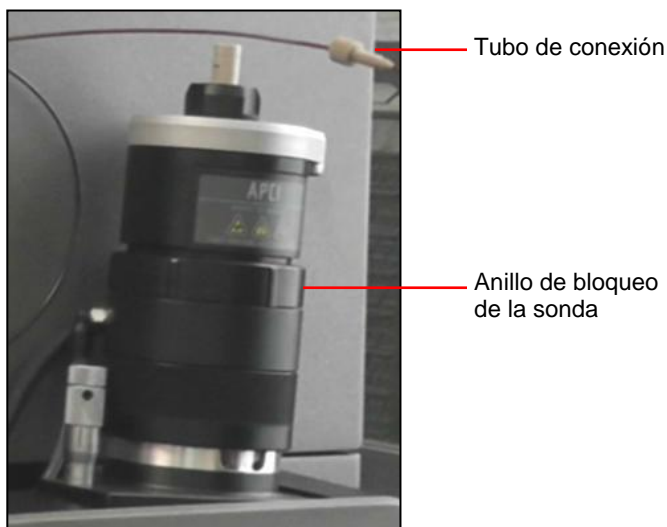
EXTRAER LA SONDA APCI


Advertencia. Las conexiones del sistema LC, la sonda APCI y los componentes de la fuente pueden estar contaminados con materiales tóxicos y/o con riesgo biológico. Es necesario utilizar siempre guantes sin talco resistentes a compuestos químicos para llevar a cabo este procedimiento.


Advertencia. La sonda y la fuente pueden estar calientes. Para evitar lesiones por quemaduras, se debe tener mucho cuidado al llevar a cabo este procedimiento.



22.5. Poner el instrumento en modo de espera (**Standby**) (Consultar **“Standby puesta en espera del instrumento”**)

22.6. Desconectar el tubo de conexión de la sonda APCI.



22.7. Desconectar el anillo de bloqueo de la sonda.

22.8. Extraer cuidadosamente la sonda APCI del regulador de la sonda.

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

23. LIMPIEZA DEL CONO

El conjunto del cono de muestras (que se compone del cono de la muestra, la junta tórica y la boquilla del gas del cono) se puede extraer para limpiarlo sin romper el vacío del instrumento.

Limpiar el cono de la muestra y la boquilla del gas del cono cuando se cumplan estas condiciones:

- El cono de la muestra y la boquilla del gas del cono están visiblemente sucios.
- Se han descartado causas relacionadas con la cromatografía líquida (LC) y las muestras que expliquen la disminución de la intensidad de la señal.



Advertencia. Los componentes de la fuente pueden estar contaminados con materiales tóxicos y/o con riesgo biológico. Es necesario utilizar siempre guantes sin talco resistentes a compuestos químicos para llevar a cabo este procedimiento.



Advertencia. La fuente puede estar caliente. Para evitar lesiones por quemaduras, se debe tener mucho cuidado al trabajar con la fuente del instrumento abierta.



Advertencia. Para evitar heridas por punción, se debe tener cuidado cuando se trabaja con la cubierta de la fuente abierta, ya que la sonda ESI tiene una punta afilada.



DESMONTAJE DEL CONO

23.1 Abrir la consola MassLynx y hacer clic en **MS Tune** para expandir la ventana del Espectro de masas TQ Xevo.

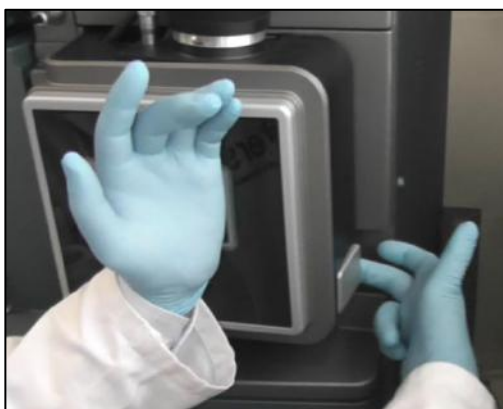
23.2 Hacer clic en la pestaña **Advanced** (Avanzado) y activar la función **Enable Manual Controls** (Permitir Control Manual). Hacer clic en el recuadro de la opción **Source Temp** (Temperatura de la fuente) e indique una temperatura de 30°C.

23.3 Poner el instrumento en modo de espera (**Standby**) (Consultar **“Standby puesta en espera del instrumento”**)

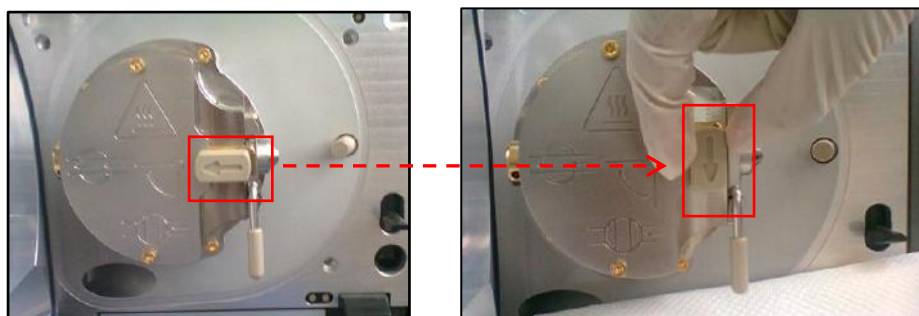
Recomendación. Esperar 5 minutos para permitir el enfriamiento del cono.

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

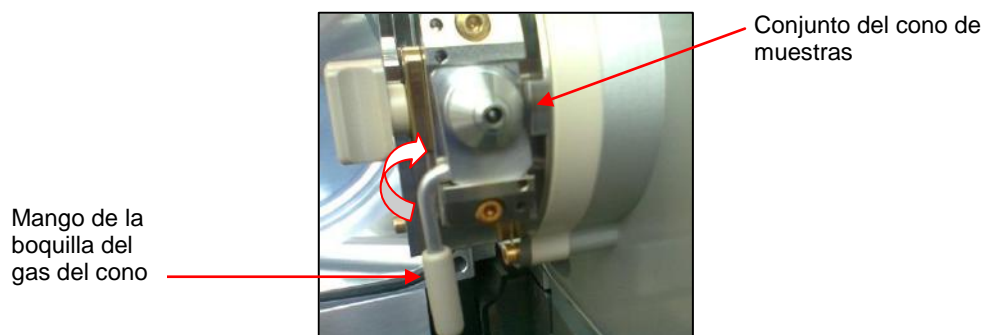
23.4 Tirar del asa de liberación de la cubierta de la fuente hacia afuera y abrir la cubierta.





23.5 Cerrar la válvula de aislamiento de la fuente moviendo la llave en sentido contrario a las manecillas del reloj, hasta una posición vertical.



23.6 Sujetar el mango de la boquilla del gas del cono y utilizarlo como palanca para girar 90 grados el conjunto del cono de muestras, moviéndolo desde la posición vertical hasta una posición horizontal.



	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

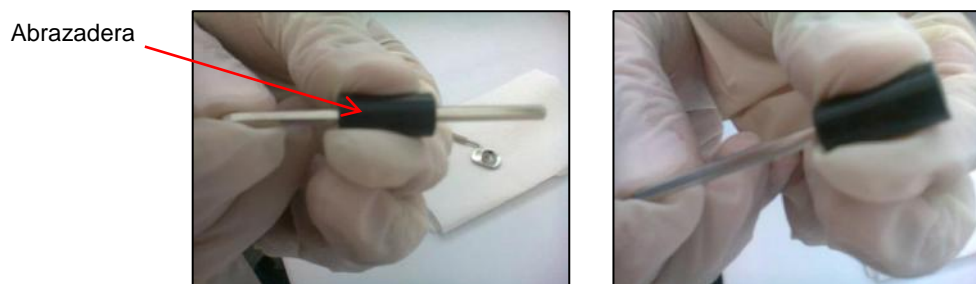
23.7 Deslizar y separar el conjunto del cono de muestras del conjunto de bloque de iones.





23.8 Tomar la llave Allen, la cual se localiza en la parte superior, lado derecho de la caja de seguridad.

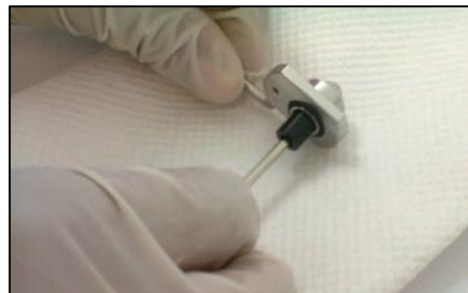


23.9 Deslizar la abrazadera hasta el extremo de la llave Allen.



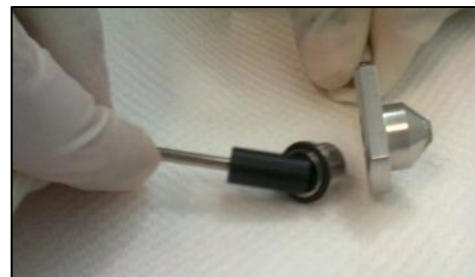
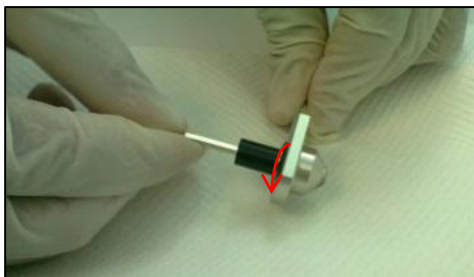
	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

23.10 Para la extracción de cono, inserte la abrazadera en el anillo del cono de la muestra.

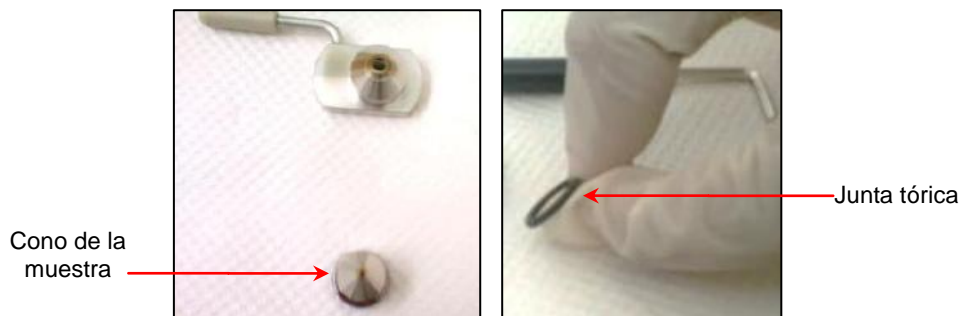


! **Precaución.** El cono de la muestra es frágil. Nunca se debe apoyar sobre su punta, siempre apoyar sobre su base.



23.11 Girar y levantar la llave con la abrazadera para retirar el cono de la muestra del conjunto del cono de muestras.



23.12. Retirar la junta tórica del cono de la muestra.



! **Indicación.** Si la junta tórica muestra señales de deterioro o daños, sustituir por una nueva.

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

23.13. Desenroscar y extraer el mango de la boquilla del gas el cono si este se encuentra sucio.


LIMPIEZA DEL CONO.

Material necesario



- Guantes sin talco, resistentes a compuestos químicos.
- Recipientes de vidrio del tamaño adecuado para sumergir completamente los componentes cuando se lleva a cabo la limpieza. Se deben utilizar solamente utensilios de vidrio que no hayan estado previamente en contacto con surfactantes.
- Metanol de calidad HPLC (o superior).
- Agua de calidad HPLC (o superior).
- Ácido fórmico.
- Baño de ultrasonidos
- Gas inerte libre de aceites (nitrógeno o argón) para secar (el secado con aire comprimido es optativo).
- Pinzas de plástico
- Escobillón pequeño y suave

23.14. Sumergir por separado el cono de la muestra, el gas del cono y el mango de la boquilla del gas del cono (si éste último se encuentra sucio) en vasos de vidrio que contengan una solución de ácido fórmico al 0.1%




 **Precaución.** El cono de la muestra es frágil. Nunca lo coloque sobre la punta, siempre colocarlo sobre su base.


23.15. Colocar los vasos en un baño de ultrasonido durante 15 minutos.

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

23.16. Enjuagar los componentes sumergiéndolos por separado en vasos de vidrio que contengan agua y colocar los vasos en el baño de ultrasonido durante 15 minutos.


23.17. Eliminar cualquier resto de agua de los componentes, para ello, sumergir por separado los componentes en vasos de vidrio que contengan metanol y posteriormente colocar los vasos en el baño de ultrasonido durante 15 minutos.



 **Precaución.** Inspeccionar cada componente, si persiste la contaminación regresar al baño de ultrasonido.

 **Precaución.** Para evitar que se vuelvan a contaminar de los componentes, utilice guantes resistentes a los químicos, para el resto de este procedimiento.

23.18. Transcurrido el tiempo, retirar con cuidado los componentes de los vasos y secarlos con gas nitrógeno o aire comprimido.



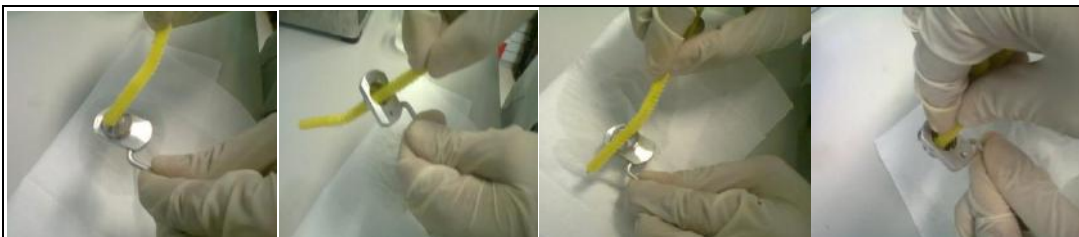
 **Precaución** Utilizar pinzas de plástico para el manejo de los componentes.

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

Si persiste la contaminación de los componentes seguir los siguientes pasos:

23.19. Lavar con metanol el conjunto del cono de muestras y cepillar suavemente utilizando un escobillón.

 **Precaución.** Evitar el rayado del conjunto del cono de muestras.






23.20. Lavar con metanol el cono de la muestra y cepillar suavemente utilizando un escobillón.

 **Precaución.** Evitar el rayado del cono de la muestra.



23.21. Secar con aire comprimido cada uno de los componentes.

 **Precaución.** Utilizar pinzas de plástico para el manejo de los componentes.

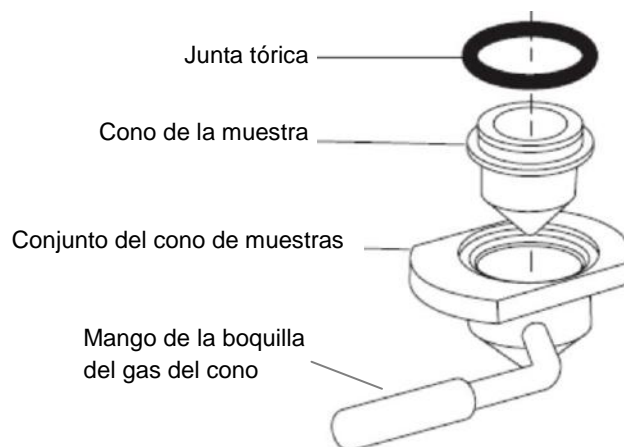
	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

MONTAJE DEL CONO DE MUESTRA

! **Precaución.** Para evitar la contaminación del conjunto del cono de muestras, utilice guantes resistentes a los químicos y libres de polvo para el resto de este procedimiento.

23.22. Ajustar la junta tórica (O-ring) en el cono de la muestra. (Colocar una nueva junta tórica en el caso de que se haya desechado).

23.23. Adaptar cuidadosamente el cono de la muestra en el conjunto del cono de muestras.





AJUSTAR EL CONJUNTO DEL CONO DE MUESTRAS A LA FUENTE

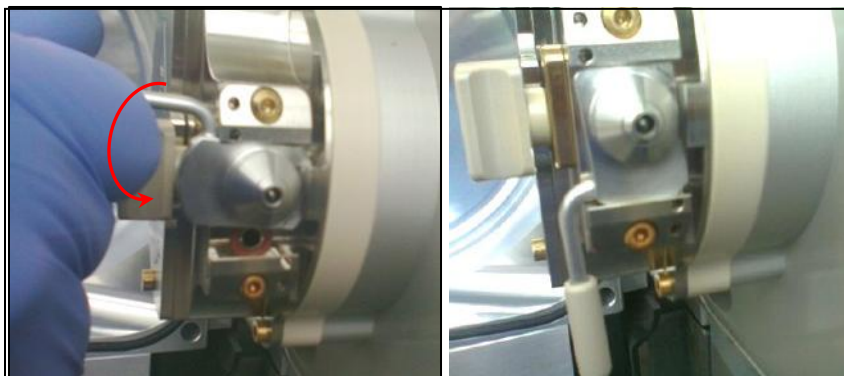
23.24. Tirar del asa de liberación de la cubierta de la fuente hacia afuera para abrir la cubierta.

23.25. Comprobar que la válvula de aislamiento de la fuente esté en la posición de cerrada.

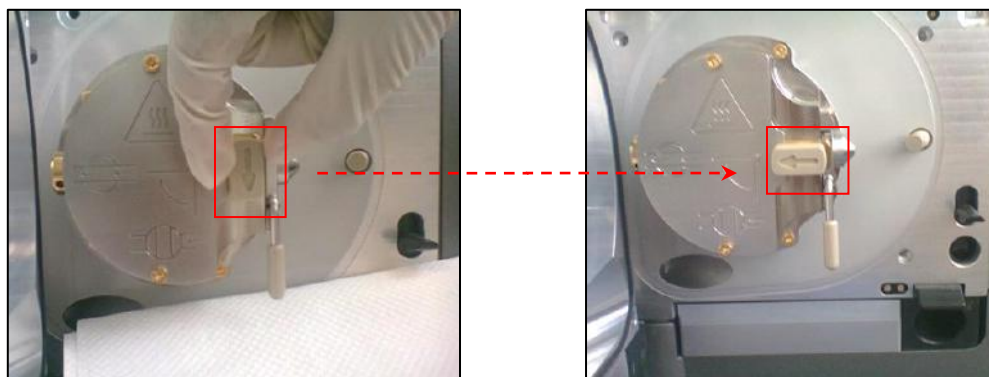
23.26. Sostener el conjunto del cono de muestras de manera que el mango de la boquilla del gas del cono esté orientado horizontalmente y en la parte superior. Enseguida deslizar el conjunto del cono de muestras en el conjunto del bloque de iones.

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

23.27. Sujetar el mango de la boquilla del gas del cono para hacer girar 90 grados el conjunto de cono de muestras, moviendo el mango hacia abajo desde una posición horizontal a una posición vertical.



23.28. Abrir la válvula de aislamiento de la fuente. Gire 90 grados moviendo de una posición vertical a una posición horizontal.





23.29. Cerrar la cubierta de la fuente.

23.30. Esperar a que haga su prueba de presión, se deberán escuchar dos disparos de purga.


! **Precaución.** Si no se escuchan los dos disparos de purga indica que se encuentra mal cerrada la cubierta de la fuente.

23.31. En la consola del instrumento **MS Tune**, ajustar la temperatura a 150°C.

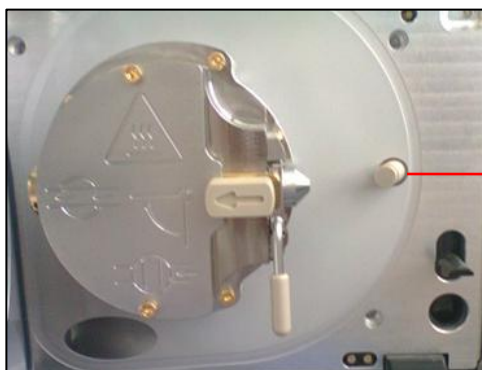
	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

24. INSTALAR LA AGUJA CORONA

Quando se utiliza la sonda APCI es necesario instalar la aguja corona en la fuente de ionización.


 **Advertencia.** Los componentes de la fuente pueden estar contaminados con materiales tóxicos y/o con riesgo biológico. Es necesario utilizar siempre guantes sin talco resistentes a compuestos químicos para llevar a cabo este procedimiento.

- 24.1. Poner el instrumento en modo de espera (**Standby**) (Consultar **“Standby puesta en espera del instrumento”**)
- 24.2. Tirar del asa de liberación de la cubierta de la fuente hacia afuera para abrir la cubierta.
- 24.3. Retirara el tapón de cierre del montaje de la aguja corona.





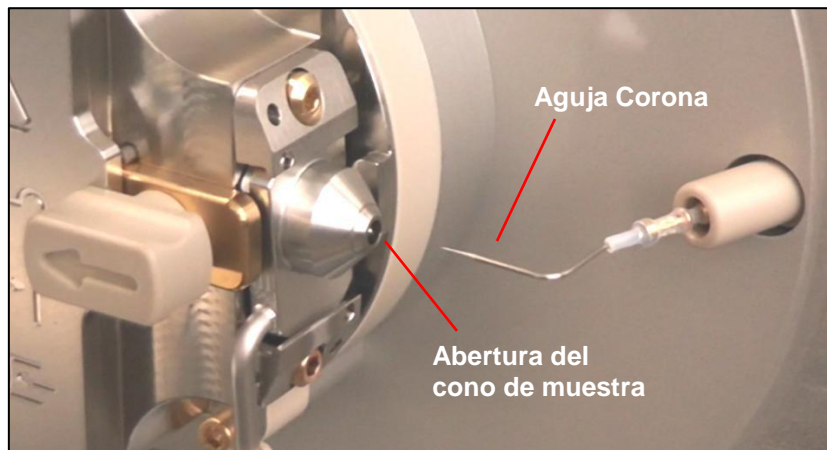
Tapón de cierre de la aguja corona

- 24.4. Desempaquetar la aguja corona.

 **Advertencia.** Para evitar heridas por punción, sujetar del mango la aguja corona.


- 24.5. Ajustar el mango de la aguja corona en el contacto de montaje, asegurando que el mago de la aguja corona éste montado de forma segura y que la punta de la aguja se alinea con la abertura del cono de muestra.

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	



24.6. Cerrar la cubierta de la fuente.


EXTRAER LA AGUJA CORONA

 **Advertencia.** Los componentes de la fuente pueden estar contaminados con materiales tóxicos y/o con riesgo biológico. Es necesario utilizar siempre guantes sin talco resistentes a compuestos químicos para llevar a cabo este procedimiento.

24.7. Poner el instrumento en modo de espera (**Standby**) (Consultar **“Standby puesta en espera del instrumento”**)

24.8. Tirar del asa de liberación de la cubierta de la fuente hacia afuera para abrir la cubierta.



24.9. Extraer la aguja corona tirando de ella hacia adelante.

 **Advertencia.** Para evitar heridas por punción, sujetar del mango la aguja corona.

24.10. Guardar la aguja corona en su empaque.

24.11. Colocar el tapón de cierre en el montaje de la aguja corona.

24.12. Cerrar la cubierta de la fuente.

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

25. TRANSFERIR MÉTODOS DE HPLC A UPLC

La función **ACQUITY UPLC Columns Calculator** (Calculadora de columnas), se utiliza para transferir las condiciones de un método HPLC a un método UPLC.



25.1. Hacer clic en el icono **ACQUITY UPLC Columns Calculator**

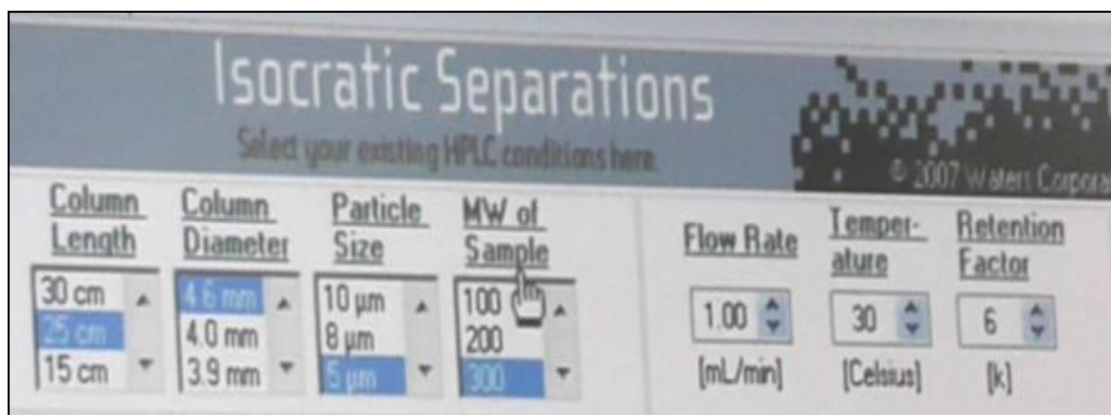
25.2. Seleccionar el tipo de cálculo del sistema: **Isocratic Separation** (Separación Isocrática) o **Gradient Separation** (Separación en Gradiente).

- **SEPARACIONES ISOCRÁTICAS**

- **Selección de las condiciones de HPLC existentes**

25.3. Seleccionar los datos de: Longitud de la columna (**Column Length**), diámetro de la columna (**Column Diameter**), tamaño de partícula (**Particle Size**) y masa del componente (**MW of Sample**).



25.4. Seleccionar la velocidad de flujo (**Flow Rate mL/min**), la temperatura (**Temperature Celsius**) y el factor de retención (**Retention Factor K**)

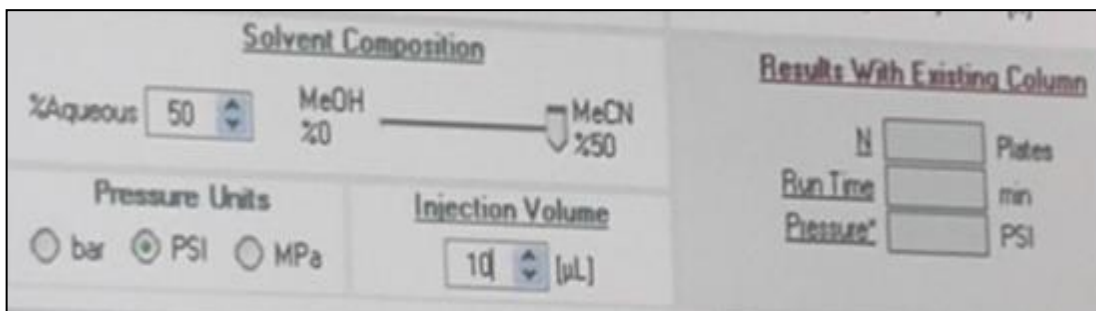


25.5. Elegir la composición de los solventes, % de solvente acuoso y % solvente orgánico (Metanol / Acetonitrilo).

25.6. Señalar las Unidades de presión en la opción **Pressure Units (bar, PSI ó MPa)**

25.7. En la función **Injection Volume**, señalar el volumen de inyección (µL).

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	



25.8. Una vez señaladas las condiciones hacer clic en la opción **Calculate** (Calcular).





25.9. Enseguida en la opción **Results With Existing Column** se observarán los resultados de los valores de los platos teóricos (**N - Plates**), el tiempo de corrida (**Run Time - min**) y la presión (**Pressure - PSI**).

Observar las condiciones de la columna para el Método UPLC.

25.10. Condiciones de igual eficiencia (**Conditions of Equal Efficiency**), condiciones de máxima eficacia (**Conditions of Maximum Efficiency**) y condiciones para el análisis a un tiempo más corto (**Conditions of Shortest Analysis Time**).

Column Length	(cm)	➤ Longitud de la columna
Run Time	(min)	➤ Tiempo de la corrida
Flow Rate	(mL/min)	➤ Velocidad de flujo
Pressure	(PSI)	➤ Presión
Column ID	(mm)	➤ Diámetro interno de la columna
Inj. Volume	(μ L)	➤ Volumen de inyección

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

Click here for your ACQUITY UPLC® column choices.

Calculate Print Reset Exit

Select the %water, then select the mixture of acetonitrile and methanol using the trackbar on the right.

Results | Explanation of Results |

Conditions of Equal Efficiency		Conditions of Maximum Efficiency		Conditions of Shortest Analysis Time	
		10 cm	15 cm	3 cm	5 cm
Column Length	3 cm	Max. Plates	29871	Run Time	0.3 min
Run Time	1.7 min	Run Time	8.6 min	Plates	3514
Flow Rate	0.287 mL/min	Flow Rate	0.287 mL/min	Flow Rate	1.772 mL/min
Pressure*	1599 PSI	Pressure*	7986 PSI	Pressure*	10000 PSI
Column ID	2.1 mm	Column ID	2.1 mm	Column ID	2.1 mm
Inj. Volume	0.9 µL	Inj. Volume	4.3 µL	Inj. Volume	0.9 µL

- **SEPARACIÓN EN GRADIENTE**

Selección de las condiciones de HPLC existentes.

- 25.11. Seleccionar los datos de: Longitud de la columna (**Column Length**), diámetro de la columna (**Column Diameter**), tamaño de partícula (**Particle Size**) y masa del componente (**MW of Sample**).
- 25.12. Seleccionar la velocidad de flujo (**Flow Rate mL/min**), la temperatura (**Temperature Celsius**) y el volumen de inyección (**Injection Volume**).
- 25.13. En la opción **Organic Modifier in B**, elegir la composición de solvente orgánico.
- 25.14. Señalar las Unidades de presión en la opción **Pressure Units (bar o PSI)**.

Gradient Separations

Select your existing HPLC conditions here.



© 2007 Waters Corporation

Column Length	Column Diameter	Particle Size	MW of Sample	Flow Rate	Temperature	Injection Volume	Instrument Delay
30 cm	4.6 mm	10 µm	100	0.97	30	20	1.00
25 cm	4.0 mm	8 µm	200	[mL/min]	[Celsius]	[µL]	[mL]
15 cm	3.9 mm	5 µm	300				

Organic Modifier in B: MeCN %100 — MeOH %0

Pressure Units: bar PSI MPa

Results With Existing Column: Peak Capacity [] bar, Pressure* [] bar

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

25.15. En la tabla de gradiente anotar los valores correspondientes al cambio del Tiempo (min) y al porcentaje de solvente orgánico (%B).

25.16. Indicación. Los valores de las demás funciones se dan de manera automática.

Step	Time [min]	Flow [mL/min]	zA	zB	Time Segment [min]	Column Volumes
Init Cond.	0.00	0.60	50	50	0.00	.
Init Hold	0.00	0.60	50	50	0.00	0.00
3	20.00	0.60	45	55	20.00	4.38
4						



Recomendación. En las condiciones **Init Cond.** e **Init Hold** es recomendable dejar un valor de cero en la función **Time**.

25.17. Hacer clic en la función **Calculate** (Calcular) para ver los resultados.

Observar las condiciones de la columna para el Método UPLC.

Length	(cm)	Longitud de la columna
ID	(mm)	Diámetro interno de la columna
Flow	(mL/min)	Velocidad de flujo
Peak Capacity		Capacidad del pico
Run Time	(min)	Tiempo de la corrida
Pressure	(PSI)	Presión
Injection Volume	(μ L)	Volumen de inyección
Detailed Gradient Profile		Detalle del perfil de gradiente

Scaled Gradient 2.1 mm Column (HPLC Linear Velocity)							
Length [cm]	ID [mm]	Flow [mL/min]	Peak Capacity	Run Time [min]	Pressure* [bar]	Injection Volume [μ L]	Detailed Gradient Profile
3	2.1	0.125	10	2.4	67	0.3	View
5	2.1	0.125	13	4.0	112	0.4	View
10	2.1	0.125	18	8.0	223	0.8	View
15	2.1	0.125	22	12.0	335	1.3	View

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

27. SÍMBOLOS DE ADVERTENCIA

Los siguientes símbolos de advertencia avisan de los riesgos que se pueden producir durante el funcionamiento o el mantenimiento de un instrumento componente.



Advertencia. Riesgo general de peligro



Advertencia. Riesgo de quemaduras producidas por contacto con superficies calientes).



Advertencia. Riesgo de lesiones por objetos punzantes.



Advertencia. Riesgo de exposición a sustancias tóxicas.





Advertencia. Riesgo de exposición a agentes biológicos que pueden suponer un grave peligro para la salud.

SÍMBOLO DE PRECAUCIÓN



El símbolo de precaución significa que el uso correcto o indebido de un instrumento puede causar daños al instrumento o poner en peligro la integridad de una muestra.

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

28. ANEXO A

⊕ CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE LOS SOLVENTES.^[7]

⚠ Advertencia: Para evitar los riesgos implícitos a la manipulación de compuestos químicos, se recomienda cumplir siempre con las buenas prácticas de laboratorio cuando se trabaje con el sistema, se manipulen solventes o se cambien tubos. Leer las hojas de datos sobre seguridad de materiales referentes a los solventes que se van a utilizar.

1. Solventes limpios

Los solventes limpios proporcionan resultados reproducibles y permiten un mantenimiento mínimo de los módulos.

Los solventes sucios pueden producir ruido en la línea base, pueden obstruir los filtros del recipiente de solventes, los filtros de entrada y los conductos capilares.

2. Calidad de los solventes

Para obtener los mejores resultados posibles se deben utilizar solventes de calidad HPLC/MS, el requisito mínimo es calidad HPLC. Es necesario filtrar los solventes a través de un filtro de membrana apropiado.

! Recomendación: comprobar que el solvente seleccionado es compatible con las recomendaciones del fabricante o el proveedor del filtro de membrana.



3. Preparación de los solventes

Mediante una preparación adecuada de los solventes, principalmente mediante filtración, se pueden evitar muchos problemas de bombeo.

! Recomendación: siempre se debe utilizar material de vidrio ámbar para inhibir el crecimiento microbiano.

4. Agua

Se recomienda utilizar únicamente agua procedente de un sistema de purificación de agua de alta calidad. Si el sistema de agua no proporciona agua filtrada, se debe filtrar con un filtro de membrana de 0.2 µm antes de utilizarla.

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

! Precaución: el uso de agua al 100% puede producir crecimiento microbiano. Se recomienda cambiar las soluciones que contengan agua al 100% cada día. Si se añade una pequeña cantidad de solvente orgánico (~10%) se evita el crecimiento microbiano.

5. Utilizar soluciones bufér

Ajustar el pH de los bufér acuosos. Filtrarlos para eliminar el material insoluble y, a continuación, mezclarlos con los modificadores orgánicos adecuados. Tras utilizar un bufér, se debe enjuagar la bomba mediante un rellenado en húmedo de, al menos, cinco volúmenes del sistema con agua destilada o desionizada de calidad HPLC. Si la bomba ha estado parada durante más de un día, debe enjuagarse con una solución de metanol/agua al 20% para evitar el desarrollo de microorganismos.

! Precaución: algunas soluciones bufér pueden ser incompatibles con los espectrómetros de masas. Se recomienda consultar la documentación que acompaña al instrumento para conocer las soluciones bufér compatibles.

! Indicación: para evitar las precipitaciones salinas, la concentración de las soluciones bufér no volátiles no debe ser superior a **100 mM**.

6. Solventes bufér

Al utilizar un bufér, se deben elegir reactivos de buena calidad y filtrarlos a través de un filtro de membrana de 0.2 µm.

! Recomendación: para evitar el crecimiento microbiano, se debe cambiar el 100 % de la fase móvil acuosa cada día.



Recomendaciones sobre los solventes

! Indicación: es posible utilizar algunos solventes de fase normal en el sistema si se llevan a cabo las modificaciones apropiadas.

7. Directrices generales sobre los solventes

Se deben seguir siempre las siguientes directrices generales sobre solventes:

- Utilizar material de vidrio ámbar para inhibir el crecimiento microbiano.

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

- Filtrar los solventes. Las partículas pequeñas pueden bloquear los conductos capilares del sistema. Filtrar los solventes también mejora el rendimiento de la válvula de retención.

8. Solventes recomendados

- Agua
- Metanol
- Acetonitrilo
- Mezclas de acetonitrilo/agua
- Mezclas de metanol/agua
- Isopropanol

9. Otros solventes

Se pueden utilizar los solventes siguientes. Sin embargo, se debe tener en cuenta que estos solventes pueden reducir el tiempo de vida útil del instrumento. Si se utilizan habitualmente los solventes de esta lista, se recomienda instalar el kit de compatibilidad con hexano/THF.

- Tetrahidrofurano (THF)
- Hexano
- Hexafluoroisopropanol (HFIP)



Notas:

- ⊕ 1 - 4% de soluciones acuosas de HFIP para aplicaciones de oligonucleótidos.
- ⊕ El HFIP no se debe utilizar nunca en los solventes de lavados fuertes y suaves, ni en el lavado de las líneas de flujo.

Al cambiar los solventes de fase reversa habituales se debe tener en cuenta la polaridad del solvente. Aclarar el sistema con un solvente de polaridad intermedia (como isopropanol) antes de introducir solventes no polares como el THF o el hexano.

10. Aditivos/modificadores

- Ácido etilendiaminotetraacético al 0.1% (EDTA)
- Ácido hexafluorobutírico al 0.1%
- Trietilamina (TEA) al 0.1 %
- Ácido trifluoroacético (TFA) al 0.1 %
- Ácido fórmico al 0.2%
- 10 mM de bicarbonato de amonio
- 10 mM de bufér de fosfato

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

- 50 mM de acetato amónico
- 50 mM de hidróxido de amonio

11. Disolventes de la muestra

- Acetonitrilo
- Mezclas de acetonitrilo/agua
- Dimetilformamida (DMF)
- Dimetilsulfóxido (DMSO)
- Isopropanol
- Metanol
- Mezclas de metanol/agua
- Agua

 **Recomendación:** no utilizar soluciones bufér para lavar las agujas.

12. Agentes de limpieza

- Ácido fosfórico ($\leq 30\%$)
- Hidróxido de sodio ($\leq 1M$)



13. Solventes NO permitidos

Se deben evitar los siguientes solventes:

- Solventes que contengan halógenos: flúor, bromo o yodo.
- Ácidos fuertes. (Utilizarlos sólo con una concentración baja, $<5\%$, a menos que sea como agentes de limpieza. Evitar utilizar ácidos como fases móviles cuando su pH sea <1.0 .)
- Los compuestos peroxidables como los éteres de calidad UV, THF no estabilizado, dioxano y diisopropiléter. (Si se tienen que utilizar compuestos peroxidables, es necesario comprobar que se filtran a través de óxido de aluminio seco para adsorber los peróxidos que se han formado.)
- Soluciones que contengan concentraciones elevadas de agentes complejantes como el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA).

Recomendaciones sobre el sistema ACQUITY UPLC

- El THF y el hexano se pueden utilizar como fase móvil en los sistemas ACQUITY UPLC. Sin embargo, como ocurre con muchos solventes que no contienen agua, pueden acortar la vida útil del sistema y el instrumento comparados con los equipos que utilizan solventes de fase reversa habituales.

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	



- Cuando se utilice THF no estabilizado, se debe comprobar que el solvente sea reciente. Las botellas de tetrahidrofurano que se hayan abierto previamente contienen peróxidos, que son contaminantes y producen deriva en la línea base.
- Por lo general, no es recomendable utilizar cloroformo, diclorometano, acetato de etilo ni tolueno en los sistemas ACQUITY UPLC. No obstante, se pueden utilizar estos solventes en disoluciones débiles (<10%) como aditivos, disolventes de la muestra o modificadores.
- Cuando se utiliza THF o hexano, se deben instalar tubos de acero inoxidable y minimizar el uso de los componentes PEEK.
- Los solventes acuosos no deben permanecer en un sistema cerrado ya que se utilizan como substrato para las colonias microbianas. Los microbios pueden obstruir los filtros del sistema y los conductos capilares. Para evitar su proliferación, se debe agregar una pequeña cantidad (~10%) de un solvente orgánico tales como acetonitrilo o metanol.
- No se recomienda utilizar ácido metanosulfónico en los sistemas ACQUITY UPLC.

Recomendaciones sobre el sistema administrador de solventes binario

- El sistema de lavado de las líneas no debe secarse nunca, especialmente durante las separaciones que utilizan una fase móvil polar.
- El alcohol isopropílico o las mezclas de metanol y agua, como un 20% de metanol/agua, son solventes de lavado de las líneas efectivos para las mezclas de solventes de THF.
- Para las aplicaciones de fase reversa, utilizar soluciones de lavado de las líneas acuosas con un componente orgánico débil (por ejemplo: metanol/agua en una proporción de 1:9).
- No utilizar soluciones de lavado de las líneas de flujo orgánicas al 100%.

Recomendaciones sobre el sistema administrador de muestras

- Instalar la aguja de acero inoxidable (número de referencia 205000362) en el sistema de gestión de muestras cuando se utilice THF o hexano.
- No utilizar concentraciones de THF o hexano superiores al 10% como solvente de lavado suave.
- Se admite el uso de disolventes de la muestra orgánica habituales como el dimetilsulfóxido (DMSO) y la dimetilformamida (DMF).

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	



14. Miscibilidad de los solventes

Antes de cambiar los solventes, se debe consultar la tabla siguiente para determinar su miscibilidad. Se deben tener en cuenta los efectos siguientes:

- Los cambios en los que se empleen dos solventes miscibles se pueden realizar de manera directa. Los cambios en los que estén involucrados dos solventes que no sean totalmente miscibles (por ejemplo, de cloroformo a agua), requieren un solvente intermedio, como el *n*-propanol.
- La temperatura puede afectar a la miscibilidad de los solventes. Si se está trabajando con una aplicación a alta temperatura, se debe tener en cuenta el efecto de la temperatura sobre la solubilidad del solvente.
- Las soluciones bufér disueltas en agua se pueden precipitar cuando se mezclan con solventes orgánicos.

Cuando se cambia de una solución bufér fuerte a un solvente orgánico, se debe enjuagar a fondo el sistema con agua destilada antes de incorporar el solvente orgánico.

Índice de polaridad	Eluyente	Viscosidad cP, 20 °C (@1 atm)	Punto de ebullición en °C (1 atm)	Número de miscibilidad (M)	Valor de corte λ (nm)
0.0	N-hexano	0.313	68.7	29	—
1.8	Trietilamina	0.38	89.5	26	—
4.2	Tetrahidrofurano (THF)	0.55	66.0	17	220
4.3	1-propanol	2.30	97.2	15	210
4.3	2-propanol	2.35	117.7	15	—
5.2	Etanol	1.20	78.3	14	210
5.4	Acetona	0.32	56.3	15, 17	330
5.5	Alcohol bencílico	5.80	205.5	13	—
5.7	Metoxietanol	1.72	124.6	13	—
6.2	Acetonitrilo	0.37	81.6	11, 17	190
6.2	Ácido acético	1.26	117.9	14	—
6.4	Dimetilformamida	0.90	153.0	12	—
6.5	Dimetilsulfóxido	2.24	189.0	9	—
6.6	Metanol	0.60	64.7	12	210
9.0	Agua	1.00	100.0	—	—

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

14.1. Utilización de los valores de miscibilidad (números M)

Los valores de miscibilidad (números M) se deben utilizar para predecir la miscibilidad de un líquido con un solvente estándar.

Para predecir la miscibilidad de dos líquidos, se debe restar el valor M más bajo del valor M más alto.

- Si la diferencia entre los dos valores M es de 15 o inferior, los dos líquidos son miscibles en todas las proporciones a 15 °C.
- Una diferencia de 16 indica una temperatura de solución crítica entre 25 y 75 °C, con 50 °C como temperatura óptima.
- Si la diferencia es de 17 o más, los líquidos son inmiscibles o su temperatura de solución crítica se encuentra por encima de los 75 °C.

Algunos solventes no se pueden mezclar con los solventes que se encuentran en ambos extremos de la escala de lipofiliidad. Estos solventes reciben un valor M doble.



- El primer valor, siempre inferior que 16, indica el grado de miscibilidad con solventes muy lipofílicos.
- El segundo valor se aplica al extremo opuesto de la escala. Si la diferencia entre estos dos números es grande, el solvente presenta un grado limitado de miscibilidad.

Por ejemplo, algunos disolventes fluorocarburos no se pueden mezclar con todos los solventes estándar y presentan números M de 0 a 32. Dos líquidos con números M dobles son generalmente miscibles entre sí.

Un líquido se clasifica en el sistema de valores M mediante pruebas de miscibilidad con una serie de solventes estándar. Luego se suma o se resta un término de corrección de 15 unidades al valor límite de miscibilidad.

15. Estabilizadores de solventes

No se debe dejar que se sequen los solventes que contengan estabilizadores, como THF con hidroxitolueno butilado (BHT) en la trayectoria de flujo del sistema. Si la trayectoria de flujo, incluida la celda de flujo del detector, está seca, se puede contaminar con los residuos de los estabilizadores, por lo que deberá someterse a una limpieza profunda para recuperar las condiciones iniciales.

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

16. Viscosidad de los solventes

Por lo general, la viscosidad no es importante cuando se trabaja con un solo solvente o con una presión baja. No obstante, con una cromatografía en gradiente, los cambios de viscosidad que tienen lugar cuando se mezclan los solventes en distintas proporciones pueden producir cambios de presión durante el análisis. Por ejemplo, una mezcla de agua/metanol 1:1 produce una presión dos veces mayor que el agua o el metanol por separado.

Si no se conoce hasta qué punto afectarán al análisis, los cambios de presión se debe controlar la presión durante el proceso.

17. Selección de la longitud de onda

Las tablas de esta sección proporcionan los valores límite de UV para:



- Solventes comunes
- Fases móviles mezcladas

18. Valores de corte de UV para solventes comunes

En la tabla siguiente se muestran los límites de UV para algunos solventes cromatográficos habituales (se trata de la longitud de onda a la que la absorbancia del solvente es igual a 1 UA). El funcionamiento a una longitud de onda cercana o por debajo del valor límite aumenta el ruido de la línea base debido a la absorbancia del solvente.

Longitudes de onda del valor de corte de UV para solventes cromatográficos comunes:

Eluyente	Valor de corte de UV (nm)
Acetona	330
Acetonitrilo	190
Dietilamina	275
Etanol	210
Isopropanol	205
Éter isopropílico	220
Metanol	205
n-Propanol	210
Tetrahidrofurano (THF)	230



	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

19. Fases móviles mezcladas

La tabla siguiente contiene los valores de longitud de onda límite aproximados para otros solventes, soluciones amortiguadoras, detergentes y fases móviles. Las concentraciones de solventes representadas son las que se utilizan con más frecuencia.

Si se desea utilizar una concentración diferente, se puede determinar la absorbancia aproximada utilizando la ley de Beer, ya que la absorbancia es proporcional a la concentración.

Fase móvil	Valor de corte de UV (nm)	Fase móvil	Valor de corte de UV (nm)
Ácido acético, 1%	230	Cloruro de sodio, 1 M	207
Acetato de amonio, 10 mM	205	Citrato sódico, 10 M	225
Bicarbonato amónico, 10 mM	190	Duodecilsulfato de sodio	190
Polioxietileno (35) lauril éter (BRIJ 35), 0.1%	190	Formiato sódico, 10 mM	200
3-[(3-colamidopropil)-dimetilamonio]-1-propanosulfonato (CHAPS) 0.1%	215	Trietilamina, 1%	235
Fosfato diamónico, 50 mM	205	Ácido trifluoroacético, 0.1%	190
(Etilendiamina) sal disódica del ácido tetraacético (EDTA disódico), 1 mM	190	TRIS HCl, 20 mM, pH 7.0, pH 8.0	202, 212
4-(2-hidroxi-etilo)-1-ácido piperazinataetanosulfónico (HEPES), 10 mM, pH 7.6	225	Triton™ X-100, 0.1%	240
Ácido clorhídrico, 0.1%	190	Reactivo A PIC® de Waters, 1 vial/litro	200
Ácido morfolinoetanosulfónico (MES), 10 mM, pH 6.0	215	Reactivo B-6 PIC de Waters, 1 vial/litro	225

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

Valores de corte de la longitud de onda para diferentes fases móviles: (cont.)



Fase móvil	Valor de corte de UV (nm)	Fase móvil	Valor de corte de UV (nm)
Fosfato potásico, monobásico, 10 mM	190	Reactivo B-6 PIC de Waters, UV baja, 1 vial/litro	190
dibásico, 10 mM	190		
Acetato sódico, 10 mM	205	Reactivo D-4 PIC de Waters, 1 vial/litro	190

20. Absorbancia de la fase móvil

En esta sección se muestran las absorbancias a diferentes longitudes de onda para las fases móviles más utilizadas. La fase móvil se debe elegir con precaución para reducir el ruido de la línea base.



La mejor fase móvil para una aplicación determinada es la que es transparente en las longitudes de onda de detección elegidas. Una fase móvil de estas características garantiza que cualquier absorbancia se deba únicamente a la muestra. La absorbancia de la fase móvil también reduce el rango dinámico lineal del detector en la cantidad de absorbancia que se sustrae en la puesta a cero automática. La longitud de onda, el pH y la concentración de la fase móvil repercuten en su absorbancia. En la tabla siguiente se pueden ver ejemplos de diferentes fases móviles.

Las absorbancias que se muestran en la tabla siguiente se basan en una longitud de la trayectoria de 10 mm.

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	



Absorbancia de la fase móvil medida con referencia a aire o agua

	Absorbancia a la longitud de onda especificada (nm)									
	200	205	210	215	220	230	240	250	260	280
Eluyentes										
Acetonitrilo	0.05	0.03	0.02	0.01	0.01	<0.01	—	—	—	—
Metanol (no desgasificado)	2.06	1.00	0.53	0.37	0.24	0.11	0.05	0.02	<0.01	—
Metanol (desgasificado)	1.91	0.76	0.35	0.21	0.15	0.06	0.02	<0.01	—	—
Isopropanol	1.80	0.68	0.34	0.24	0.19	0.08	0.04	0.03	0.02	0.02
Tetrahidrofurano no estabilizado (THF, reciente)	2.44	2.57	2.31	1.80	1.54	0.94	0.42	0.21	0.09	0.05
Tetrahidrofurano no estabilizado (THF, no reciente)	>2.5	>2.5	>2.5	>2.5	>2.5	>2.5	>2.5	>2.5	2.5	1.45
Ácidos y bases										
Ácido acético, 1 %	2.61	2.63	2.61	2.43	2.17	0.87	0.14	0.01	<0.01	—
Ácido clorhídrico, 0.1 %	0.11	0.02	<0.01	—	—	—	—	—	—	—
Ácido fosfórico, 0.1 %	<0.01	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Ácido trifluoroacético	1.20	0.78	0.54	0.34	0.22	0.06	<0.02	<0.01	—	—
Fosfato diamónico, 50 mM	1.85	0.67	0.15	0.02	<0.01	—	—	—	—	—
Trietilamina, 1 %	2.33	2.42	2.50	2.45	2.37	1.96	0.50	0.12	0.04	<0.01

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	



(continuación)

	Absorbancia a la longitud de onda especificada (nm)									
	200	205	210	215	220	230	240	250	260	280
Tampones y sales										
Acetato amónico, 10 mM	1.88	0.94	0.53	0.29	0.15	0.02	<0.01	—	—	—
Bicarbonato amónico, 10 mM	0.41	0.10	0.01	<0.01	—	—	—	—	—	—
Etilendiamina) sal disódica del ácido tetraacético (EDTA disódico), 1 mM	0.11	0.07	0.06	0.04	0.03	0.03	0.02	0.02	0.02	0.02
4-(2-hidroxietilo)-1-ácido piperazinataetanosulfónico (HEPES), 10 mM, pH 7.6	2.45	2.50	2.37	2.08	1.50	0.29	0.03	<0.01	—	—
Ácido morfolinoetanosulfónico (MES), 10 mM, pH 6.0	2.42	2.38	1.89	0.90	0.45	0.06	<0.01	—	—	—
Fosfato potásico, monobásico (KH ₂ PO ₄), 10 mM	0.03	<0.01	—	—	—	—	—	—	—	—
Fosfato potásico, dibásico, (K ₂ HPO ₄), 10 mM	0.53	0.16	0.05	0.01	<0.01	—	—	—	—	—
Acetato sódico, 10 mM	1.85	0.96	0.52	0.30	0.15	0.03	<0.01	—	—	—
Cloruro de sodio, 1 M	2.00	1.67	0.40	0.10	<0.01	—	—	—	—	—
Citrato sódico, 10 mM	2.48	2.84	2.31	2.02	1.49	0.54	0.12	0.03	0.02	0.01
Formiato sódico, 10 mM	1.00	0.73	0.53	0.33	0.20	0.03	<0.01	—	—	—
Fosfato sódico, 100 mM, pH 6.8	1.99	0.75	0.19	0.06	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	<0.01
TrisHCl, 20 mM, pH 7.0	1.40	0.77	0.28	0.10	0.04	<0.01	—	—	—	—
TrisHCl, 20 mM, pH 8.0	1.80	1.90	1.11	0.43	0.13	<0.01	—	—	—	—

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	



(continuación)

	Absorbancia a la longitud de onda especificada (nm)									
	200	205	210	215	220	230	240	250	260	280
Reactivos PIC ^o de Waters										
PIC A, 1 vial/L	0.67	0.29	0.13	0.05	0.03	0.02	0.02	0.02	0.02	<0.01
PIC B6, 1 vial/L	2.46	2.50	2.42	2.25	1.83	0.63	0.07	<0.01	—	—
PIC B6, UV baja, 1 vial/L	0.01	<0.01	—	—	—	—	—	—	—	—
PIC D4, 1 vial/L	0.03	0.03	0.03	0.03	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.01
Detergentes										
BRIJ 35, 1 %	0.06	0.03	0.02	0.02	0.02	0.01	<0.01	—	—	—
3-[(3-colamido-propil) dimetilamonio] -1-propane sulfonato (CHAPS), 0.1%	2.40	2.32	1.48	0.80	0.40	0.08	0.04	0.02	0.02	0.01
Dodecil sulfato de sodio (SDS), 0.1%	0.02	0.01	<0.01	—	—	—	—	—	—	—
4-octilfenol polietoxilato (Triton ^o X-100), 0.1%	2.48	2.50	2.43	2.42	2.37	2.37	0.50	0.25	0.67	1.42
Monolaurato de sorbitano polioxietileno (Tween [™] 20), 0.1%	0.21	0.14	0.11	0.10	0.09	0.06	0.05	0.04	0.04	0.03

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Manual de Operación para el equipo de espectrometría de masas Xevo TQ	Número de código: MAN-OP-02	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	


REFERENCIAS.

1. Guía técnica para elaborar manuales operativos. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. INEGI, México. 2013.
2. Norma Mexicana IMNC. Sistemas de gestión de calidad. Fundamentos y vocabulario. Instituto Mexicano de Normalización y Certificación. ISO 9000:2005. NMX-CC-9000-IMNC-2008.
3. López, R. (2013). *Curso de Espectrometría de Masas [Vídeo]* LEDEFAR. UNAM.
4. VIM: 2008, International vocabulary of metrology – Basic and general concepts and associated terms.
5. WATERS CORPORATION. (2010). Espectrómetro de masas Xevo TQ de Waters. Guía de Mantenimiento y descripción general. Revisión C.
6. WATERS CORPORATION. (2009). MassLynx Online Information System.
7. WATERS CORPORATION. (2010) Sistema ACQUITY UPLC Guía de Funcionamiento. Revisión E.


	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Instructivo de encendido para el equipo de espectrometría de masas XEVO TQ	Número de código: INST-EQ-010	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

OBJETIVO. Describir de manera detallada las operaciones necesarias que se deben de llevar a cabo para el encendido del equipo de espectrometría de masas XEVO TQ después de haber sido venteado.


1. Encender el gas nitrógeno pulsando el botón verde (Encendido/Apagado) del suministro.

 **Precaución.** No se debe permitir que la presión del suministro de nitrógeno descienda por debajo de los **100 psi**. El nitrógeno debe tener una pureza mínima del 95%.

2. Encender los sistemas del cromatógrafo: el Administrador de Muestras (Sample Manager) y el Administrador de Solventes Binario (BSM) pulsando el **Switch** de Encendido/Apagado que se encuentra en la parte superior izquierda de cada sistema.

 **Aviso.** Es recomendable encender primero el Sample Manager ya que este establece la comunicación con todos los demás sistemas (posee la tarjeta de comunicaciones).

3. Encender el sistema Xevo TQ MS pulsando el **Switch** de Encendido/Apagado situado en la parte superior del lado izquierdo del panel frontal del espectrómetro de masas.


 **Indicación.** Cada instrumento del sistema emite tres señales auditivas y realiza una serie de pruebas de puesta en marcha.

4. Prenda la computadora y en la Consola ACQUITY UPLC, seleccionar **Control > Leak Sensors** (Control > Sensores de fugas) para activar los sensores de fugas.



NOMBRE DE USUARIO Y CONTRASEÑA DE LA COMPUTADORA.

User Name: waters Password: waters

5. Dar doble clic al icono **NetEvaluator** que se encuentra en la pantalla del escritorio o bien buscarlo en el buscador de Windows.
6. Hacer clic en la función **Start** y espere aproximadamente 3 min para que se sincronicen los sistemas **XEVO-TQMS, ACQ-SM y ACQ-BSM**.

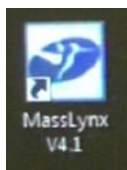
 **Observación.**

- Verificar que en la columna de estado (**Status**) se muestre **PASS** (pasar).
- Para monitorear fijarse en los Pings, los cuales deben cambiar cada milisegundo.

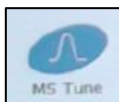
	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Instructivo de encendido para el equipo de espectrometría de masas XEVO TQ	Número de código: INST-EQ-010	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

- Si alguno de los sistemas no se sincroniza, dar clic en la función **Rescan** (reescanear). En caso de no sincronizarse consultar la sección “*Solución de Problemas para la sincronización de los sistemas*” en el Manual de Operación del Equipo (MAN-OP-02).

7. Regresar a la pantalla del escritorio y dar clic al icono de la consola **MassLynx** para ver el cromatógrafo de masas.





8. Ir a la función **Instrument** (instrumento) y enseguida diríjase a la función **MS Tune**



para abrir la ventana de Xevo TQ MS Detector.

9. Seleccione la pestaña **Diagnostics** (diagnósticos) y en la función **Vaccum** (vacío), supervisé que las funciones “**Source turbo Speed**” (fuente de velocidad turbo) y “**Analyser MS1 Turbo Speed**” (analizador MS1 de velocidad turbo) se incremente la velocidad hasta llegar al 100%. Una vez que termine en la parte inferior de la ventana aparecerá la indicación **Pumped** en vez de Vent.
10. Esperar aproximadamente 24hrs para que el sistema se acondicione completamente y pueda utilizar el equipo.

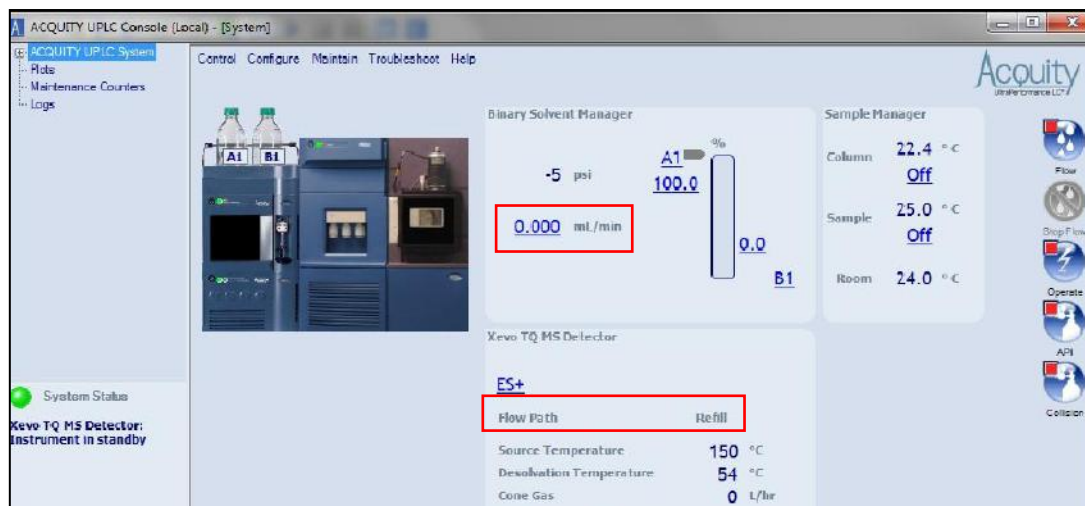
	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Instructivo para el purgado del sistema XEVO TQ	Número de código: INST-EQ-011	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	



OBJETIVO. Describir los pasos que deben de llevarse a cabo para purgar el sistema de espectrometría de masas XEVO TQ.

PURGADO DEL MASAS

! **Indicación.** Dependiendo del tipo de soluciones utilizadas, el sistema administrador de solventes del instrumento puede requerir más de un ciclo de purga para minimizar el arrastre. Todos los solventes, incluida el agua deberán de tener calidad MS y deberán ser filtrados y desgasificados antes de ser utilizados.

1. Abrir la ventana **MassLynx** y en la función **Instrument** (Instrumento) buscar y abrir la ventana del **MS Tune**.
2. Abrir el gas nitrógeno  para evitar que el flujo del cromatógrafo de líquidos pase al equipo del Masas y pueda causar algún daño en el equipo.
3. Dirijase a la pestaña **Fluidics** (flujo) para señalar las condiciones del purgado.
4. En la función **Reservoirs** (reservorio) seleccione el estado de **Wash** (lavado).
5. En la función **Flow State** (estado del flujo), seleccione **Waste** (desechos).
6. En la función **Infusion Flow Rate** establezca el flujo de infusión y en la función **Fill Volume** señale el volumen de llenado.
7. Dirijase a la consola del **ACQUITY UPLC System** y verifique que el flujo del Sistema de administración de solventes binario (**Binary Solvent Manager**) este apagado y en la función **Flow Path** (Trayectoria del flujo) este señalado **Refill** (Rellenar).

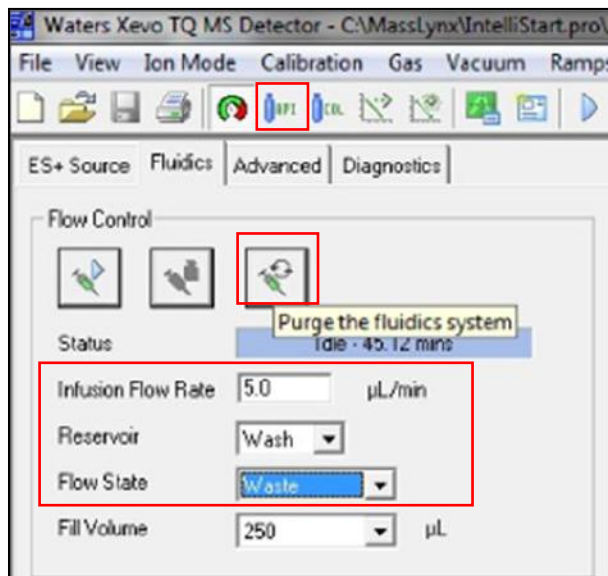




	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Instructivo para el purgado del sistema XEVO TQ	Número de código: INST-EQ-011	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

8. Desactivar el **Standby** dando clic al icono **Operate** (Funcionar).



9. Para purgar dar clic al icono **Purge the Fluidics system** (Purgar el sistema de fluidos).



	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Limpieza de los filtros de las columnas cromatográficas	Número de código: INST-EQ-016	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

OBJETIVO. Mostrar el procedimiento de limpieza de los filtros de las columnas cromatográficas para eliminar las partículas adheridas en los filtros.

1. LIMPIEZA DE FILTROS DE LA COLUMNAS.

⚠ Advertencia: Es necesario siempre utilizar guantes limpios y libres de polvo mientras se realiza este procedimiento.

1.1. Colocar la columna sobre una superficie plana y retirar los conectores de ambos extremos de la columna.

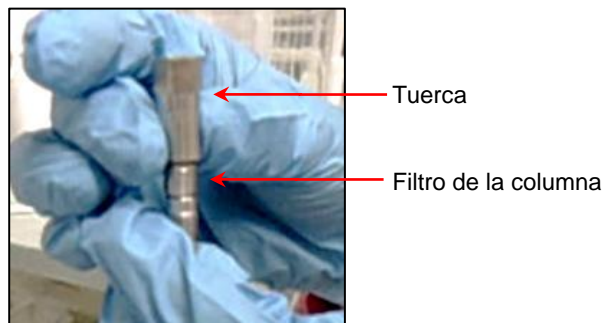




1.2. Con ayuda de una llave inglesa desatornillar la tuerca de uno de los extremos de la columna.



! Precaución. Para no dañar la columna, asegúrese de colocar la llave inglesa en la posición correcta.

1.3. Con mucho cuidado retire la tuerca y el filtro del extremo de la columna.



	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Limpieza de los filtros de las columnas cromatográficas	Número de código: INST-EQ-016	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

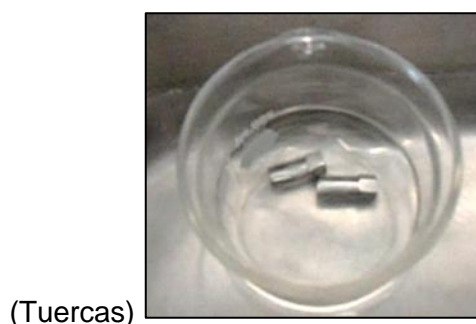
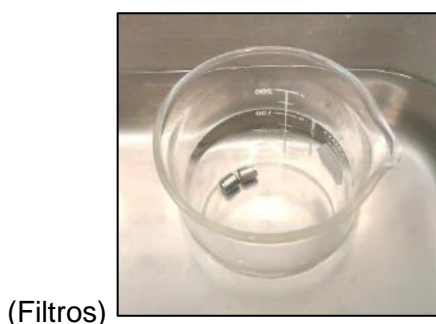
! **Precaución:** Tenga cuidado con el manejo y posición de las piezas especialmente con el filtro.

- 1.4. Cubrir con papel parafilm el extremo de la columna para evitar la evaporización de la sílice.



- 1.5. Repetir los pasos 1.2 al 1.4 para el otro extremo de la columna.

- 1.6. Sumergir por separado los filtros y las tuercas en vasos de vidrio que contengan agua milli-Q.





- 1.7. Colocar los vasos en un baño de ultrasonido durante 10 minutos.

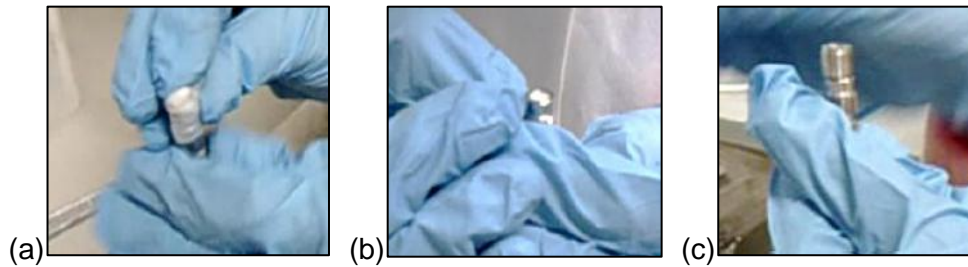
- 1.8. Retirar el agua de los componentes y sumergir por separado los componentes en vasos que contengan metanol, a continuación colocar los vasos en baño de ultrasonido durante 10 minutos.

! **Aviso.** Si los filtros o las tuercas se encuentran demasiado sucios, sustituir el metanol por ácido acético al 10% y llevar a baño de ultrasonido durante 10 minutos, enseguida enjuagar los componentes con agua milli-Q y sonicar durante 10 minutos (cambiar el agua hasta que el olor a ácido acético desaparezca).

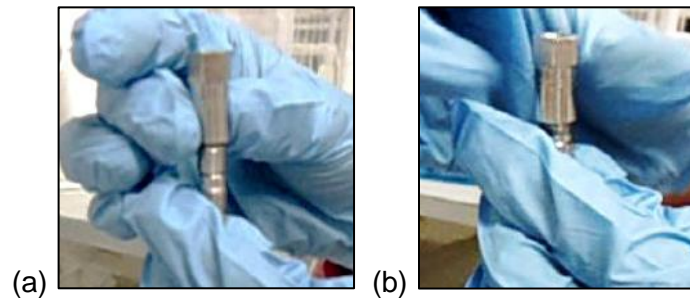
- 1.9. Retirar los componentes de los vasos y secarlos con aire comprimido.

	Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico Limpieza de los filtros de las columnas cromatográficas	Número de código: INST-EQ-016	
		Revisión: 0	
		Fecha de aplicación: Febrero-2015	
		Fecha de vencimiento: Febrero-2018	

1.10. Retirar el papel parafilm de uno de los extremos de la columna (a), enseguida limpiar cuidadosamente las orillas de la columna con papel libre de pelusas (b) y procederá colocar el filtro sobre la sílice (c).



1.11. Instalar cuidadosamente la tuerca sobre el filtro (a) y enroscar fuertemente (b).



1.12. Colocar la columna sobre una superficie plana y enseguida asegurar la tuerca utilizando una llave inglesa.



1.13. Repetir el paso **1.10** al **1.12** para el otro extremo de la columna.

1.14. Colocar los conectores en cada uno de los extremos de la columna.

ANEXO C (resultados).

Sección	Pág.
C-1 Recomendaciones Generales para el mantenimiento de las columnas cromatográficas.	375
C-2 Troubleshooting. Resolución de Problemas cromatográficos.	377

RECOMENDACIONES GENERALES PARA EL MANTENIMIENTO DE LAS COLUMNAS CROMATOGRÁFICAS (HPLC/ UPLC)

1. Hacer circular el flujo de solvente en el sentido indicado por la flecha impresa en la columna.
2. Utilizar solventes, soluciones bufér y aditivos de alta calidad (específicos para HPLC o MS), desgasificados y filtrados. Esto último es particularmente importante cuando se utilicen "bufér".
3. Mantenga al mínimo el volumen muerto del camino que recorre la muestra. Con columnas de 4 o 4,6 mm de diámetro interno utilice tuberías de 0,010" o 0.007" de diámetro interno (o el mínimo compatible con el equipamiento que se cuenta) y minimice la longitud entre inyector, columna y detector. Si se utiliza columnas de 2,1 mm de diámetro interno utilice tuberías de 0,007" o 0,005".
4. Usar fases móviles con pH entre 2 y 7,5. Los enlaces siloxano, aún cuando son estables en la mayoría de los ambientes, pueden hidrolizarse a valores de pH extremos.
5. Filtrar las muestras antes de su inyección.
6. Salvo que se conozca de antemano la inexistencia de partículas o compuestos que puedan quedar retenidos irreversiblemente en la columna, es altamente recomendado el uso de precolumnas.
7. Evite utilizar presiones por encima de las recomendadas en el manual de la columna ya que la Sílice puede fracturarse. De la misma manera, evite todo golpe mecánico sobre la columna.
8. Siempre que sea posible evite la presencia de sales de halógenos en la fase móvil. Estas inducen la corrosión de las superficies de acero inoxidable cuando quedan dentro de la columna. Si las debe utilizar, asegúrese, antes de guardar la columna, que estas sales sean rigurosamente eliminadas con agua grado HPLC y luego con solventes orgánicos apropiados. La desgasificación de la fase móvil para eliminar el Oxígeno también es recomendable para esta situación.
9. Antes de comenzar con la separación, es recomendable equilibrar adecuadamente la columna con la fase móvil a utilizar. Las columnas de fase unida ("bonded phase") requieren aproximadamente 20 volúmenes de columna (aprox. 50 mL), mientras que las de sílice no unida requieren aproximadamente 60 volúmenes de columna.
10. Las columnas deben mantenerse a temperatura constante si se quiere evitar que varíen los tiempos de retención.

11. La aplicación de temperatura ayuda en muchas ocasiones a mejorar la selectividad, reproducibilidad y resolución. En estos casos la temperatura máxima recomendada es de 70°C. Temperaturas mayores pueden producir la hidrólisis de fases unidas y también acortar la vida de la columna.
12. Las columnas pueden deteriorarse por diversas razones, como la contaminación, el cambio de polaridad debido a la pérdida de actividad o una perturbación en la geometría de la columna. La contaminación puede producirse en el cuerpo de la columna, a causa de la unión irreversible de un componente a la fase estacionaria o, más frecuentemente, debido a la retención de materia extraña en la parte superior de la columna. Sólo es necesario prestar atención a las columnas si el deterioro de la resolución es analíticamente significativo. Si es necesario puede quitarse el extremo superior de la columna; a continuación se quita el "filtro" de retención, se lava y se inspecciona el relleno de la columna.
13. El problema más grave es la pérdida de sensibilidad de una columna por razones que varían ampliamente según el tipo de columna (intercambio de iones, sílice, FR, fase unida). Se deberá tratar de limpiar la columna introduciendo en ella el disolvente utilizado habitualmente en el análisis, y si con esto no se consigue una mejora, se utilizará un disolvente de distinta polaridad, teniendo presente la necesidad de elegir un disolvente miscible y la naturaleza del relleno de la columna. Introducir por detrás el disolvente no da buenos resultados, ya que altera el relleno y hace que el flujo de disolvente sea desigual.

Rendimiento de las Columnas

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

- La asimetría del pico eludido proporciona información sobre las condiciones de la columna y el estado del "filtro" en la cabeza de ésta. Un pico asimétrico puede deberse al excesivo número de sitios activos, a la desactivación de la columna, a la formación de un túnel dentro de ésta, a un flujo demasiado rápido o a la utilización de un disolvente inadecuado.
- El número de platos teóricos de la columna mide la eficiencia de ésta. Cuanto más alto sea este número, más eficiente será la columna y mayor será la separación entre los dos compuestos.

Almacenamiento de la columna

Como recomendación general, si se utilizan fases móviles que contengan "bufér" o reactivos de apareamiento iónico (PIC) es muy importante que esas fases móviles sean eliminadas completamente de la columna antes de su almacenaje. Debe lavarse la columna con al menos 5 volúmenes de columna con agua grado HPLC y con solventes orgánicos que no contengan "bufér" o reactivos PIC.

Las condiciones de almacenamiento más comunes para columnas HPLC con base de sílice son las siguientes:

- Columna Fase Reversa (C18, C8, Fenilo, etc.): Usar 65% Acetonitrilo + 35% Agua
- Columna Fase Normal (Sílice, Nitrilo, Amino, etc.): Usar Isopropanol
- Columnas de Intercambio Iónico (SAX, SCX, etc.): Usar Metanol (lavar la columna con 50 mL de Agua antes de fluir el Metanol)

TROUBLESHOOTING Resolución de Problemas

En la siguiente tabla se señalan los problemas cromatográficos, las posibles causas y las acciones correctivas propuestas para solucionar los posibles problemas del sistema ACQUITY UPLC.

Problema	Posible causa	Medidas correctivas
Línea base		
No aparece ningún pico en la línea base.	No hay flujo de solvente.	1. Comprobar los frascos de solvente y asegurarse de que contienen solvente. 2. Comprobar que el flujo es > 0.
	La lámpara del detector no está encendida.	Encender la lámpara. Si no se enciende, sustituirla por una nueva.
	Longitud de onda incorrecta en el detector.	Verificar la configuración de la línea base.

Continuación.

No aparece ningún pico en la línea base (cont.)	Fuga en la trayectoria del solvente.	Verificar las conexiones.
	La fase móvil está absorbiendo una cantidad excesiva de rayos UV a las longitudes de onda seleccionadas.	<ul style="list-style-type: none"> • No realizar el análisis con longitudes de onda tan bajas. • Reducir la concentración del aditivo de la fase móvil. • Utilizar un aditivo o un solvente distinto con menor absorbancia en la longitud de onda elegida.
	Posición incorrecta del vial.	Colocar el vial en la posición correcta.
	Vial incorrecto.	Sustituir el vial por uno correcto.
	Inyector no inyecta.	Purgar las jeringas de muestras.
	Parámetros del método incorrectos.	Establecer los parámetros del método correctos.
Ruido constante prolongado de la línea base (aprox. entre 10 minutos y 1 hora).	Fluctuaciones de la temperatura ambiente.	Estabilizar la temperatura ambiente.
Ruido constante de la línea base a corto plazo (entre 30 y 60 segundos).	Fluctuaciones del flujo.	Buscar posibles fugas.
	Ruido de radiofrecuencia.	Eliminar la interferencia.
Ruido aleatorio de la línea base.	Aire en la celda de flujo del detector.	Enjuagar la celda de flujo del detector para eliminar el aire.
	Se ha detectado una burbuja.	Purgar el sistema administrador de solventes.
	Contaminación de los solventes.	Cambiar los solventes.

Continuación.

Ruido aleatorio de la línea base (cont.)	Columna contaminada.	Limpiar o sustituir la columna
	Celda de flujo sucia.	Limpiar la celda de flujo.
	Ruido de radiofrecuencia.	Eliminar la interferencia.
	La fase móvil esta absorbiendo demasiado a las longitudes de onda seleccionadas.	<ul style="list-style-type: none"> • No realizar el análisis con longitudes de onda tan bajas. • Reducir la concentración del aditivo. • Utilizar un aditivo o un solvente distinto con menor absorbancia a la longitud de onda elegida.
Deriva rápida de la línea base.	Columna no equilibrada.	Equilibrara la columna.
	Se ha dejado calentar al detector.	Dejar que el detector se caliente hasta que la línea base se estabilice. El tiempo variará en función de la longitud de onda y de la sensibilidad.
	Contaminación de solventes (deriva rápida o lenta).	Cambiar los solventes.
	Fluctuaciones del flujo (deriva rápida o lenta).	Purgar la bomba, sustituir las líneas de la bomba, comprobar las válvulas.
	Longitud de onda incorrecta para el solvente.	Comprobar que el solvente no presente absorbancia a la longitud de onda utilizada.
Deriva lenta de la línea base.	Fluctuaciones de la temperatura ambiente.	Estabilizar la temperatura ambiente para poder estabilizar el detector.

Continuación.

Deriva lenta de la línea base (cont.)	Celda de flujo sucia.	Limpiar la celda de flujo.
	Existe una diferencia de absorbancia entre las fase móviles A y B.	Equilibrar la absorbancia de las dos fases móviles reduciendo la concentración de los aditivos en la fase móvil con mayor absorbancia. Nota: de este modo, la fase móvil diferirá ligeramente respecto al aditivo.
	Hay una fuga en las conexiones de entrada y salida de la celda de flujo.	Apretar los conectores.
Anomalías Cromatográficas		
Ensanchamiento de la banda, forma del pico poco definida o pérdida de la resolución de la columna.	La columna esta sucia, defectuosa o contaminada.	1. Enjuagar la columna con un solvente orgánico limpio y tener cuidado de no precipitar las soluciones bufér. 2. Si el problema persiste, limpiar la columna utilizando los procedimientos de limpieza y regeneración que se describen en el <i>Manual de la columna</i> . 3. Si el problema persiste, sustituir la columna.
	Volúmenes o solventes de lavado incorrectos.	Cambiar los volúmenes y/o los solventes de lavado.
	Fluctuaciones de la temperatura.	Establecer una temperatura de columna adecuada.

Continuación.

Disminución de los tiempos de retención.	Flujo incorrecto.	Modificar el flujo.
	Composición del solvente incorrecto.	Cambiar la composición.
	Temperatura de la columna demasiado alta.	Reducir la temperatura de la columna.
	Fase móvil incorrecta.	Utilizar la fase móvil correcta.
	Columna contaminada.	Limpiar o sustituir la columna
	Columna incorrecta.	Utilizar la columna correcta.
	El disolvente de la muestra puede ser más fuerte que la fase móvil inicial.	<ul style="list-style-type: none"> • Diluir la muestra en una solución menos concentrada. • Inyectar menos cantidad.
Tiempos de retención erráticos.	Burbuja de aire en el cabezal de la bomba.	Purgar el sistema administrador de solventes.
	Fallo en las válvulas de retención.	Limpiar o sustituir los cartuchos de entrada de las válvulas de retención.
	Filtros de solvente obstruidos.	Limpiar o Sustituir los filtros.
	El tiempo de equilibrado tras el gradiente puede ser insuficiente.	Especificar un tiempo de equilibrado más largo.
	Volúmenes o solventes de lavado incorrectos.	Cambiar los volúmenes y/o los solventes de lavado.
	Fluctuaciones de la temperatura.	Establecer una temperatura adecuada.

Continuación.

Picos planos.	La concentración o volumen de inyección de la muestra superan el voltaje de salida del detector.	Disminuir la concentración de la muestra o el volumen de inyección.
Aumento en los tiempos de retención.	Flujo incorrecto.	Modificar el flujo.
	Composición del solvente incorrecto.	Cambiar la composición del solvente.
	Fase móvil incorrecta.	Utilizar la fase móvil correcta.
	Columna contaminada.	Limpiar o sustituir la columna
	Columna incorrecta.	Utilizar la columna correcta.
	Fuga del fluido (disminuye el flujo).	<ul style="list-style-type: none"> • Comprobar que no haya fugas en las conexiones. • Realizar la prueba de caída de presión estática.
Aumento en la presión del sistema.	La columna esta obstruida.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Enjuagar la columna con un solvente orgánico limpio y tener cuidado de no precipitar las soluciones bufér. 2. Si el problema persiste, limpiar la columna utilizando los procedimientos de limpieza y regeneración que se describen en el <i>Manual de utilización y mantenimiento de la columna.</i> 3. Si el problema persiste, sustituir la columna.

Continuación.

Aumento en la presión del sistema (cont.)	El tubo está taponado.	Comprobar sistemáticamente el tubo efectuando e interrumpiendo las conexiones.
Disminución en la presión del sistema.	Fuga del fluido.	Comprobar que no haya fugas en las conexiones.
	Flujo incorrecto.	Modificar el flujo.
Pérdida de eficacia de la columna.	El sistema no está estabilizado o equilibrado químicamente.	<p>Equilibrar la columna con un mínimo de 10 volúmenes de columna de la fase móvil que se va a utilizar. Si se utiliza un método de gradiente automatizado, comprobar que se están utilizando tiempos de equilibrado suficientes y reproducibles entre las inyecciones.</p> <p>Ejemplo: para una columna BEH ACQUITY UPLC de 2.1 × 100 mm, pasar aproximadamente 2.5 mL de solución a 0.5 mL/min durante unos 5 minutos.</p> <p>Consultar también: El <i>Manual de utilización y mantenimiento de la Columna.</i></p>
	Volúmenes o solventes de lavado incorrectos.	Cambiar los volúmenes y/o los solventes de lavado.
	Fluctuaciones de la temperatura.	Establecer una temperatura adecuada.

Continuación.

<p>Perdida de eficacia de la columna (cont.)</p>	<p>La columna esta sucia, defectuosa o contaminada.</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Enjuagar la columna con un solvente orgánico limpio y tener cuidado de no precipitar las soluciones bufér. 2. Si el problema persiste, limpiar la columna utilizando los procedimientos de limpieza y regeneración que se describen en el <i>Manual de mantenimiento y utilización de la columna.</i> 3. Si el problema persiste, sustituir la columna.
<p>Errores de reproducibilidad.</p>	<p>Errores en la integración.</p>	<p>Verificar la integración.</p>
	<p>Problema en el sistema administrador de muestras.</p>	<p>Corregir las anomalías del sistema administrador de muestras.</p>
	<p>Volúmenes o solventes de lavado incorrectos.</p>	<p>Cambiar los volúmenes y/o los solventes de lavado.</p>
	<p>Rango de volumen incorrecto para el tipo o el método de inyección.</p>	<p>Cambiar el rango de volumen.</p>
<p>Pérdida de sensibilidad.</p>	<p>Fuga en el sistema administrador de solventes.</p>	<p>Corregir las anomalías del sistema administrador de solventes.</p>
	<p>Muestra degradada, contaminada o mal preparada.</p>	<p>Utilizar una muestra nueva.</p>
	<p>Columna contaminada.</p>	<p>Limpiar o sustituir la columna.</p>
	<p>Perdida de eficacia de la columna.</p>	<p>Limpiar o sustituir la columna.</p>