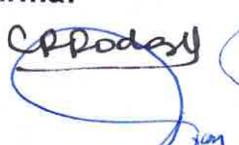
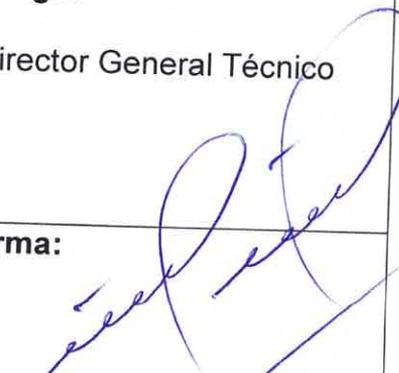




# USO DEL UPLC-FLR WATERS

Código: ITR-DLQ-122  
Emisor: DGT-DL-DLQ-LRPM  
Versión: 01  
Vigente: 03-04-23  
Página: 1 de 14

## USO DEL UPLC-FLR WATERS

MODIFICADO POR	VERIFICADO POR	APROBADO POR
<b>Nombre y Apellido:</b> Lic. Carmen Rodas Lic. Alba Domínguez	<b>Nombre y Apellido:</b> Dra. Ing. Agr. Jadyi Torales	<b>Nombre y Apellido:</b> Ing. Agr. Cesar Rivas
<b>Cargo:</b> Técnica Responsable del área de Micotoxinas Jefa Interina del DLQ	<b>Cargo:</b> Directora de Laboratorios	<b>Cargo:</b> Director General Técnico
<b>Firma:</b> 	<b>Firma:</b> 	<b>Firma:</b> 
<b>Fecha:</b> 22/03/2023	<b>Fecha:</b> 24/03/2023	<b>Fecha:</b> 03-04-23

### 1. OBJETIVO

Describir el modo de operación y verificación del Cromatógrafo Líquido de Ultra Alta Performance (UPLC) con detector de Fluorescencia

### 2. ALCANCE

Se aplica a los equipos marca Waters, modelo ACQUITY H CLASS con Códigos N°: LR.UPLC.02

El equipo cuenta con los siguientes módulos:

- a) Bomba quaternaria Quaternary Solvent Manager Acquity UPLC H-Class
- b) Inyector automatico Sample Manager – FTN Acquity UPLC H-Class
- c) Horno de columna Acquity CH-A
- d) Horno de columna Acquity CH-30A
- e) Bandeja de solventes Acquity UPLC
- f) Detector de Fluorescencia FLR Detector Acquity UPLC
- g) CPU marca HP
- h) Monitor marca HP
- i) Programa cromatográfico Waters Empower 3.

### 3. SIGLAS Y DEFINICIONES

#### 3.1. Siglas

- |         |   |  |
|---------|---|--|
| a) ITR  | : | Instructivo de trabajo                               |
| b) DLQ  | : | Dirección de Laboratorios Químicos                   |
| c) LRPM | : | Laboratorio de Residuos de Plaguicidas y Micotoxinas |
| d) UMEL | : | Unidad de Mantenimiento de Equipos de Laboratorio.   |

#### 3.2. Definiciones

- a) **Instructivo (ITR):** son los documentos que describen las actividades paso a paso que se realizan en una etapa de un proceso y son complementarias a los procedimientos.
- b) **Formularios (FOR):** son documentos con formato (físico o digital) preestablecido
- c) **Calibración:** es el conjunto de operaciones que establecen, en condiciones especificadas, la relación entre los valores de una magnitud indicados por un instrumento de medida o un sistema de medida, o los valores representados por una medida materializada o por un material de referencia, y los valores correspondientes de esa magnitud realizados por patrones.



#### 4. RESPONSABILIDAD

Es responsabilidad del Responsable de la Unidad de Mantenimiento de Equipos de Laboratorio y de los técnicos que operan el equipo, verificar el adecuado cumplimiento de este instructivo.

#### 5. ACTIVIDADES

##### 5.1 Encendido del Sistema UPLC

El modo de encendido se aplica antes de cada uso y se realiza como se detalla a continuación:

- 5.1.1 Encender todos los módulos del equipo con la perilla "ON".
- 5.1.2 Encender la computadora, esperar que en la pantalla aparezca el icono del programa "Empower", luego escribir el nombre del usuario en "USER IDENTIFICATION" y por último escribir el "PASSWORD" correspondiente.
- 5.1.3 Cambiar el contenido de las botellas de fases móviles, líquidos de lavado y purga, etiquetar.
- 5.1.4 Colocar la columna adecuada dentro de la porta columnas de acuerdo a la metodología a realizar o a desarrollar.

##### 5.2 Crear Proyecto:

- 5.2.1 En el menú principal, hacer clic en **Configure System**.
- 5.2.2 En la siguiente ventana que aparece, ir hasta FILE → NEW → PROJEC.
- 5.2.3 Luego en la siguiente ventana tildar  la opción → SIGUIENTE.
- 5.2.4 Para la primera condición de esta ventana, **Allways Acces**, tildar  la opción OWNER, GROUP AND WORLD, en la segunda condición de la misma ventana, **Allways Acces to Groups** tildar  la opción ADMINISTRADOR SIGUIENTE.
- 5.2.5 En esta siguiente ventana, en FROM PROJEC, desplegar las opciones y elegir un proyecto, para sobre escribir en la misma SIGUIENTE.
- 5.2.6 Nuevamente aparece una ventana como muestra la **Figura 1** donde se da nombre al proyecto y en el espacio destinado para los comentarios, se detalla el análisis a realizar → FINALIZAR.



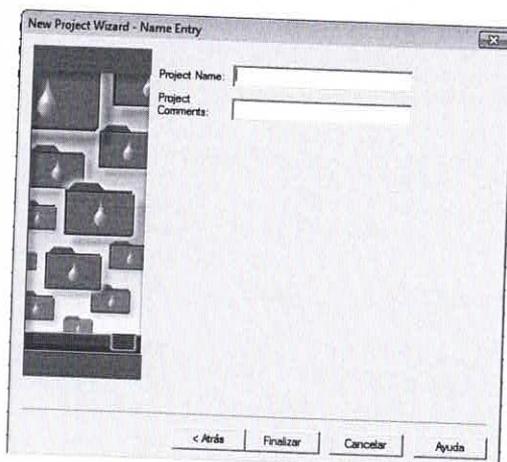


Figura 1

### 5.3 Crear un Método a partir de un Proyecto creado

5.3.1 Desde el menú principal, hacer clic en **Run samples**, posterior a esto aparece la lista de proyectos → seleccionar el nombre de proyecto creado según el punto 4.2 → Ok. **Figura 2**

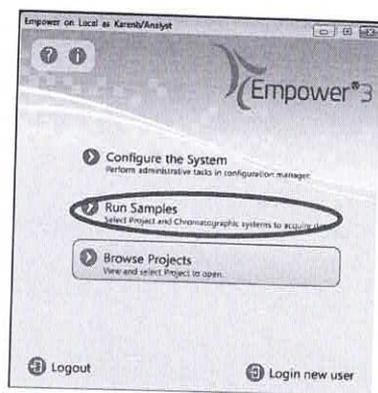


Figura 2.1

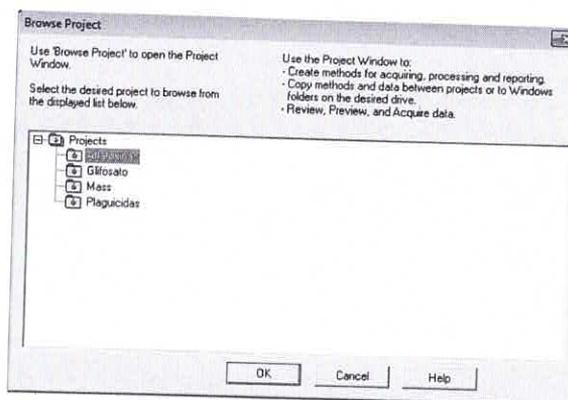


Figura 2.2

5.3.2 En la ventana emergente, ir hasta **EDIT** seleccionar el método **OPEN**.

OPEN METODO SET,

5.3.3 Aparece una ventana como muestra en la **Figura 3**, en la opción **INSTRUMENT METHOD EDIT**.

*Handwritten signature and initials in blue ink.*

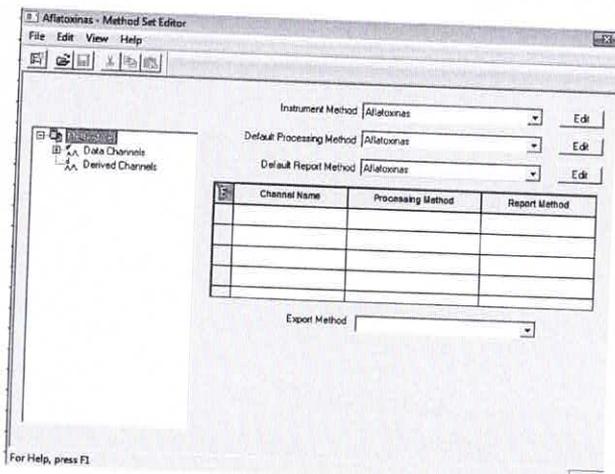


Figura 3

5.3.4 Hacer clic en el ícono  que representa al **Quaternary Solvent Manager**, aquí se establecen los límites de presión, el solvente, el flujo y se condiciona al equipo a trabajar de forma isocrática o gradiente según la necesidad de trabajo. **Figura 4**

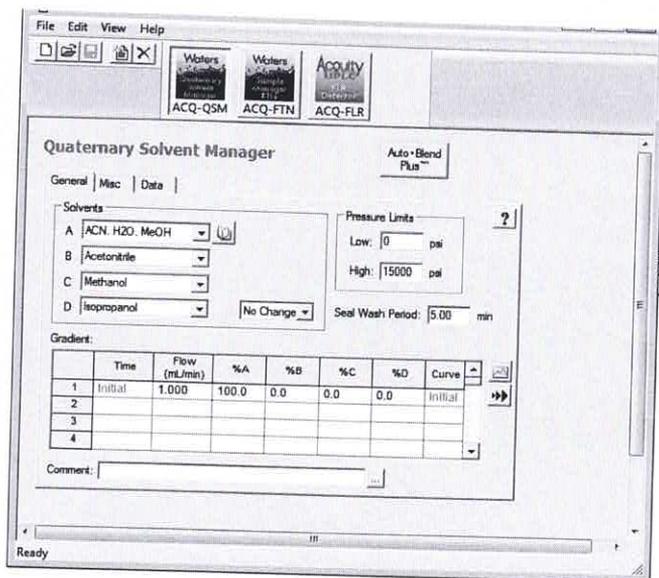


Figura 4

5.3.5 Sin salir de la ventana, hacer clic en el ícono  que representa al **Sample Manager-FTN**, aquí se establecen los solventes de purga y lavado, así como la temperatura del horno de la columna y la temperatura del plato (rack). **Figura 5**

*Handwritten signature in blue ink.*

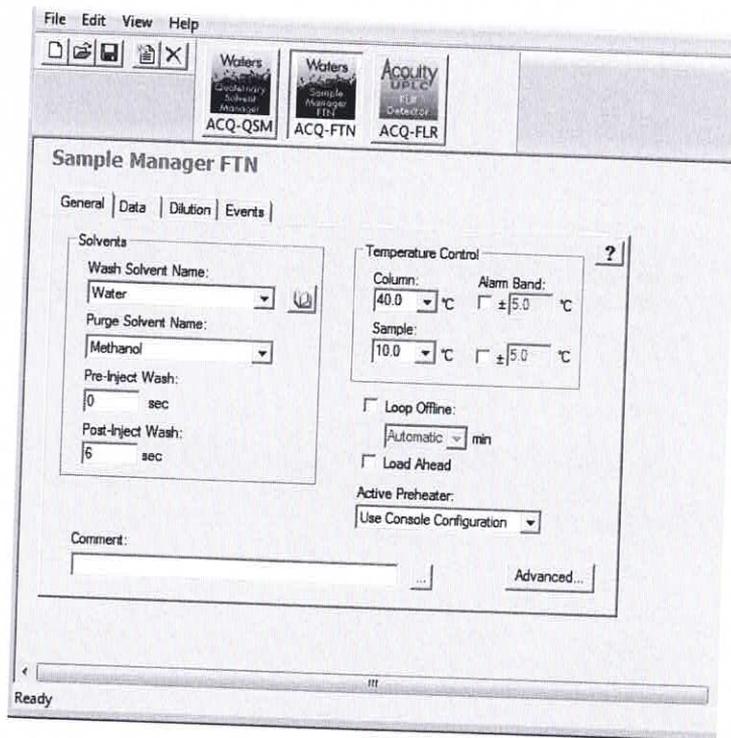
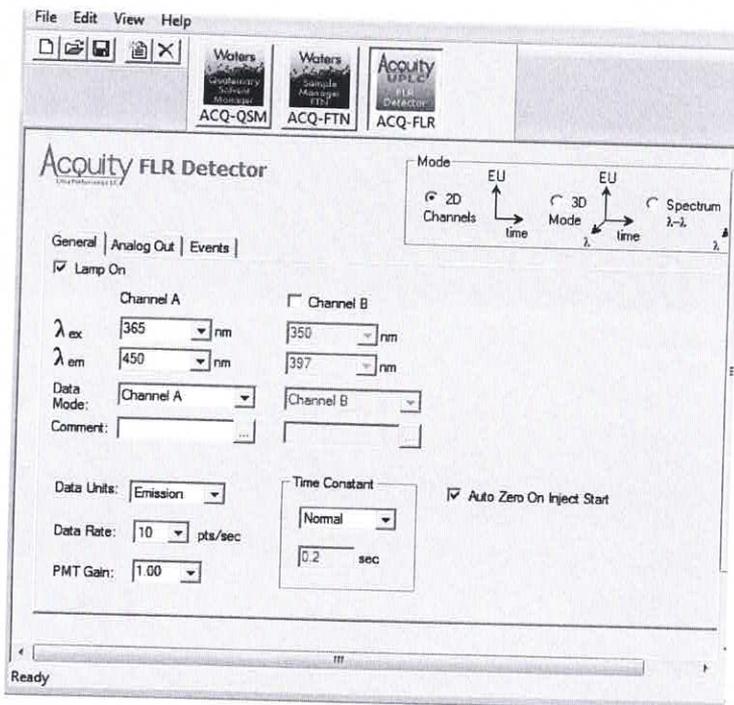


Figura 5

5.3.6 Sin salir de la ventana, hacer clic en el icono  que representa al **FLR Detector**, aquí se establecen las longitudes de onda, tanto de excitación como de emisión. **Figura 6**



*Handwritten signature:* cel  
 ACS

Figura 6

- 5.3.7 Sin salir de la ventana (Figura 3) en la opción DEFAULT PROCESSING METHOD → EDIT.
- 5.3.8 En este punto, se completa en la pantalla de integración con el ancho y altura del pico deseado, entre otras opciones como Inhibir Peak, Force Peak. Etc. Según la conveniencia. Figura 7

Figura 7

- 5.3.9 En la pestaña **Componentes**, nombrar el pico, establecer el tiempo de retención del pico y la ventana del TR, etc. Figura 8

Name	Component Type	Peak Label	Retention Time (min)	RT Window (min)	Peak Width	3D Channel Name	Channel	Y Value	X Value	FI	Weighting	Internal Std	RT Reference	Ref RT Reference	Curve Reference
A1	...	...	4.257	0.213	0.000	...	...	Area	Amount	Linear	None				
A2	...	...	5.495	0.261	0.000	...	...	Area	Amount	Linear	None				
A3	...	...	6.181	0.408	0.000	...	...	Area	Amount	Linear	None				

Figura 8

*Handwritten signature and initials in blue ink.*



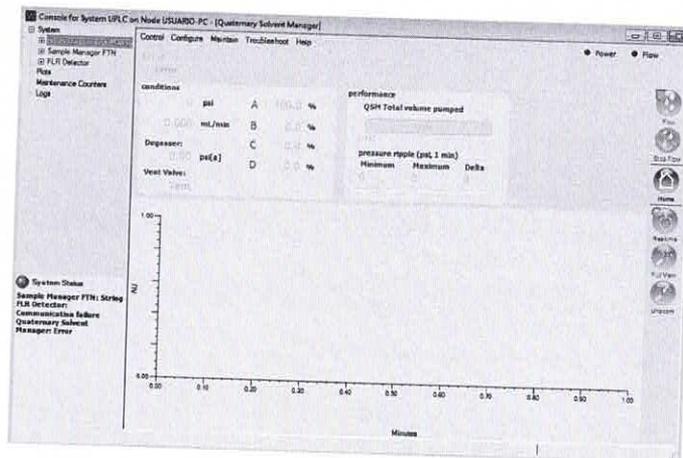


Figura 10

- 5.4.2 verificar que el sistema se encuentre listo, seleccionar en **Instrument Method (B)**, el método deseado con los parámetros analíticos previamente cargados, y dar clic en **Setup**.
- 5.4.3 Luego seleccionar el tipo de corrida **Run and Process (C)** y el tipo de rack **Plates(D)** normalmente 48 vial 2mL
- 5.4.4 Seleccionar el panel **Samples (E)** planilla correspondiente a la muestra, para completar con los datos de la muestra a inyectar.
- 5.4.5 Clic en la primera columna **Plate/Well (F)** del panel, colocar el número del rack : seguido la posición del vial correspondiente (previamente seleccionar el tipo de rack en la función **Plates** y el **Plate Sequencing Modo**)
- 5.4.6 En la siguiente columna **Injection Vol (G)**, completar el volumen de inyección de trabajo en  $\mu\text{L}$
- 5.4.7 En la columna de **#of inj (H)**, completar con la cantidad de inyecciones a realizar por cada muestra
- 5.4.8 Clic en la siguiente columna la que corresponde a **Sample Name (I)**, completar con el nombre de la muestra a inyectar.
- 5.4.9 En la siguiente columna **Level (J)**, completar los niveles de los puntos de la curva.
- 5.4.10 Clic en la columna **Funtion (K)**, desplegar las opciones y seleccionar, en caso de ser una referencia o estándar, **Inject Reference** o **Inject Standards**, y para una muestra, **Inject Sample**.
- 5.4.11 Click en la columna **Method Set/Report Method (L)**: desplegar las opciones y seleccionar el método.

*cl*  
*res*



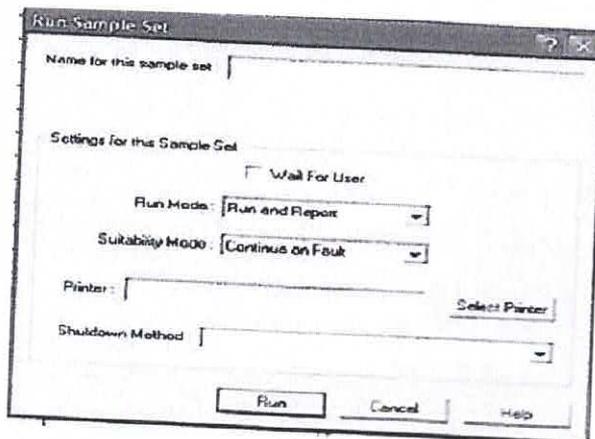


Figura 12

## 5.5 Creación de Tabla de Integración

- 5.5.1 Una vez creado el método y se tengan los resultados de las primeras corridas se deben establecer las condiciones de integración.
- 5.5.2 Entrar en EDIT → OPEN → METHOD SET. Ver **Figura 3**.
- 5.5.3 Verificar los puntos desde el 4.3.8 hasta el 4.3.13 y completar los datos que faltantes con los obtenidos en la corrida previa.
- 5.5.4 Una vez cargados todos los datos se guardan los cambios FILE → ~~SAVE AS~~. FILE → EXIT.
- 5.5.5 Se vuelve a la ventana inicial, de nuevo, FILE → SAVE AS. FILE → EXIT.

## 5.6 Curva de Calibración y edición de Cromatogramas

- 5.6.1 Durante la corrida de una inyección, después de que el pico principal se encuentra identificado, el cromatograma puede observarse dando un clic en el ícono de  FILE → OPEN → METHOD SET.
- 5.6.2 Aparece una nueva ventana, seleccionar el método. En el cromatograma se observa el pico principal y su correspondiente área de acuerdo a las condiciones de integración establecidas.
- 5.6.3 Para editar el reporte o cromatograma se hace clic primeramente en **Review**. Luego en **Integrate**, **Cuantitate** y se guarda el resultado.
- 5.6.4 Para cargar la curva abrir cada punto de la curva, **Integrate**, **Calibrate** (realizar lo mismo en cada punto de curva), seguidamente click en **Calibration Curve**. Debe poder visualizarse los datos de la curva. **Figura 13**

*Handwritten signature in blue ink.*

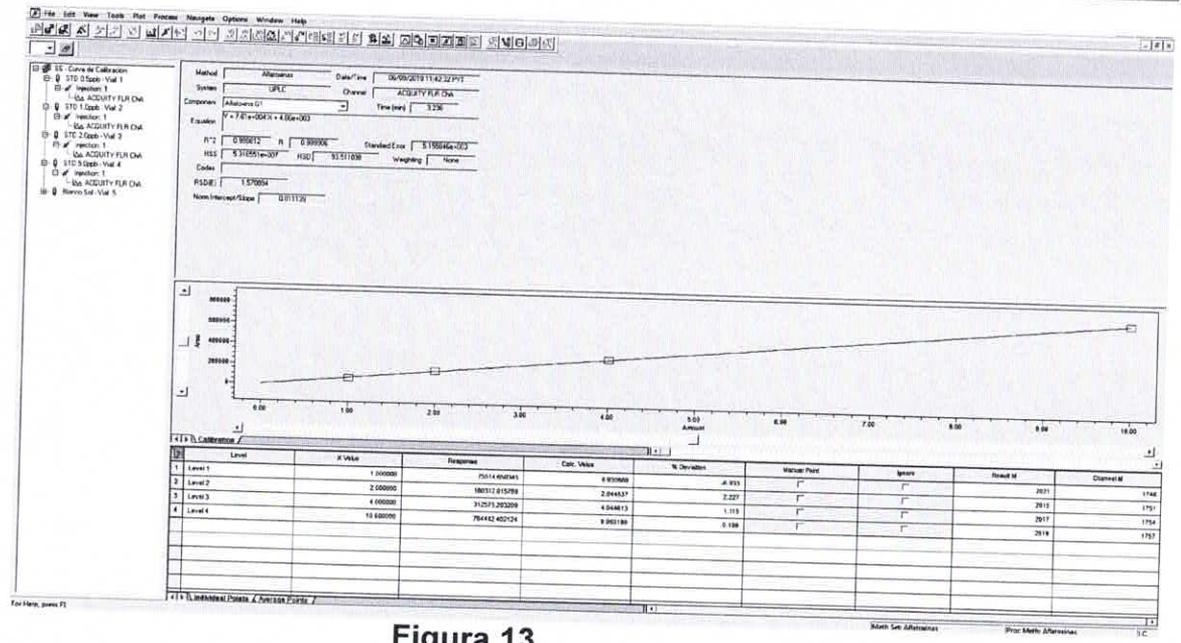


Figura 13

5.6.5 Para imprimir el cromatograma, ir hasta la pestaña de *Results*, dar clic en *Update*, seleccionar la corrida con el cambio realizado a imprimir.

5.7 Apagado del Sistema UPLC

5.7.1 Cuando el equipo se deja trabajando toda la noche se debe observar que todos los frascos de las bombas estén con disolvente para evitar la entrada de aire a las bombas.

5.7.2 Una vez terminada la secuencia, programar al final de la misma el “apagado automático”

5.8 Verificación del Sistema UPLC

5.8.1. Las operaciones de verificación del estado del equipo se realizan mediante la inyección de un material de referencia certificado con columna específica e identificada para tal efecto. Con lo cual se verifica la eficacia, la precisión (repetibilidad y reproducibilidad de las áreas) y exactitud del equipo

5.8.2. La frecuencia de verificación es la misma que la que figura en el FOR-DLQ-009 Plan Anual de Evaluación de los Ensayos.

5.9 Calibración

5.9.1. Este equipo no se calibra, por lo tanto, no está incluido dentro del Plan de Calibración.



## USO DEL UPLC-FLR WATERS

**Código:** ITR-DLQ-122  
**Emisor:** DGT-DL-DLQ-LRPM  
**Versión:** 01  
**Vigente:**  
**Página:** 13 de 14

5.9.2. Las comprobaciones para asegurar que responde a las especificaciones exigidas se realizan a través de las verificaciones, que se detallan en el punto anterior.

### 5.10 Mantenimiento

5.10.1. El servicio técnico de la empresa representante de la marca, y el Responsable de la Unidad de Mantenimiento de Equipos de Laboratorio son los encargados de realizar el mantenimiento de este equipo. La frecuencia de mantenimiento es cada vez sea necesaria, esto se verifica en el FOR-DL-028 Ficha de Equipos y un mantenimiento programado anual FOR-DL-050 Plan de Mantenimiento.

## 6. CONTROL DE CAMBIOS

Item	Página	Cambios
NA	1	<p>Proviene de un Sistema de Gestión de Calidad de la Norma NP-ISO/IEC 17025:2018.</p> <p>La DL adopta el SGCI del SENAVE en cumplimiento de la Resolución SENAVE N° 42/2023 "Control de documentos", versión 04.</p> <p>- Se realiza el cambio de formato al SGCI del ITR-LRPM-122 Ver:1 Vigencia: 30/09/2020., pasa a la versión 01, teniendo en cuenta lo establecido en la Nota 02 del PRO-DSGC-001 "Control de documentos".</p>

## 7. DOCUEMNTOS

Nombre del Documento	Código	Área de archivo	Responsable	Tiempo de retención por dependencia	Disposición Final
Plan de Mantenimiento	FOR-DL-050	LRPM	Responsable del área de micotoxinas	5 años	Eliminación
Protocolo de Trabajo	FOR-DLQ-048	LRPM	Responsable del área de micotoxinas	5 años	Eliminación
Ficha de equipos	FOR-DL-028	LRPM	Responsable del área de micotoxinas	5 años	Eliminación



## USO DEL UPLC-FLR WATERS

**Código:** ITR-DLQ-122  
**Emisor:** DGT-DL-DLQ-LRPM  
**Versión:** 01  
**Vigente:**  
**Página:** 14 de 14

### 8. ANEXOS

NA