


Laboratorios Bonin 	PROCEDIMIENTO ESTÁNDAR DE OPERACIÓN USO Y LIMPIEZA DEL EQUIPO HPLC HITACHI CHROMASTER. ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD	Código: PEO-AC-109-05
		Versión: 5
		Vigencia 30/11/2022 Vencimiento: 30/11/2024
		Página 1 de 12

1. PROPÓSITO

Brindar instrucciones precisas para la correcta operación del instrumento HPLC Hitachi Chromaster.

2. ALCANCE

Equipo HPLC Hitachi Chromaster ubicado en el laboratorio de análisis fisicoquímico del departamento de Aseguramiento de Calidad.

3. DOCUMENTOS RELACIONADOS

CÓDIGO	NOMBRE DEL DOCUMENTO
No aplica.	

4. DEFINICIONES

Cromatografía: Es un método físico para separación de componentes de una mezcla, permitiendo identificar y cuantificar cada uno de sus componentes.

Tiempo de retención: Tiempo característico en que tarda un analito específico en pasar a través del sistema.

Analito: Sustancia de interés que se va a identificar y/o cuantificar durante el análisis.

Fase móvil: Líquido que se mueve en una dirección definida, generando una serie de interacciones con la fase estacionaria las cuales dan lugar a la separación de los analitos presentes en una muestra.

Fase estacionaria: Sustancia que está fija dentro de la columna cromatográfica.

Cromatograma: Resultado gráfico de la cromatografía. Se refiere a la señal obtenida de un análisis cromatográfico.

5. RESPONSABILIDAD Y AUTORIDAD

RESPONSABILIDAD


Asistente de Investigación y Desarrollo y Analista de Estabilidades: Son los encargados de utilizar correctamente el equipo, haciendo uso del presente documento.

Jefe de Investigación y Desarrollo: Es el responsable de supervisar el uso adecuado y limpieza del equipo.

AUTORIDAD

Gerencia de Aseguramiento: Tiene la autoridad de efectuar los cambios que considere necesarios en el presente procedimiento.

Elaborado por: Asistente de Documentación AC	Firma	Fecha: 30/11/2022
Revisado por: Jefe de Control de Calidad	Firma	Fecha: 30/11/2022
Aprobado por: Gerente Aseguramiento de Calidad	Firma	Fecha: 30/11/2022

Laboratorios Bonin 	PROCEDIMIENTO ESTÁNDAR DE OPERACIÓN USO Y LIMPIEZA DEL EQUIPO HPLC HITACHI CHROMASTER. ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD	Código: PEO-AC-109-05
		Versión: 5
		Vigencia 30/11/2022 Vencimiento: 30/11/2024
		Página 2 de 12

6. CONTENIDO

6.1. Preparación del equipo

6.1.1. Al iniciar la persona que utilizará el equipo debe de llenar el **FO-AC-058 Control de uso de Equipo HPLC Hitachi Chromaster**.

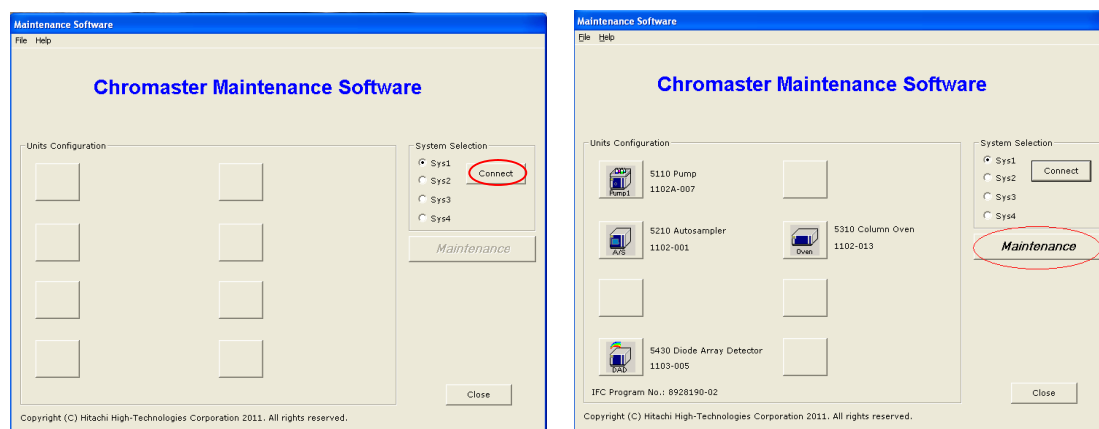
6.1.2. Antes de iniciar el funcionamiento del equipo, revise que el equipo cuente con soluciones cromatográficas suficientes para funcionar y con un depósito de desechos disponible.

6.1.3. Observación: Cambiar el agua a diario, dejando constancia del cambio en el **FO-AC-137 Control de cambios de agua para equipo HPLC**.

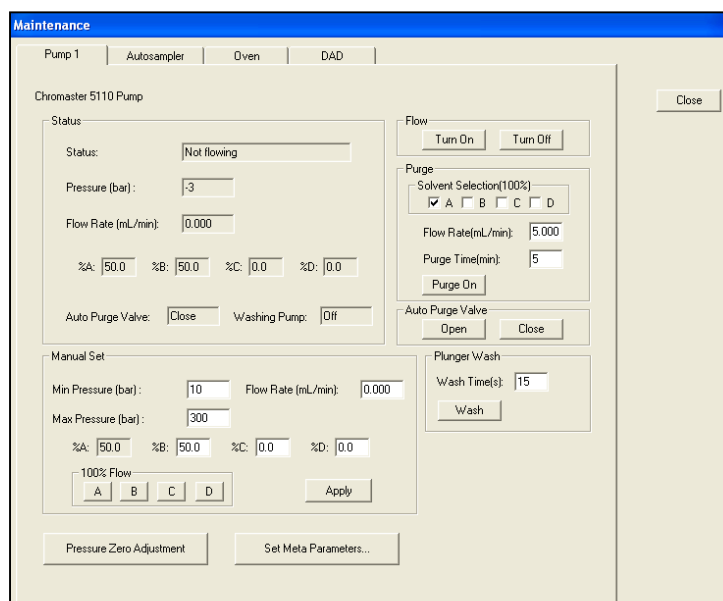
6.1.4. Una vez encendido el ordenador, proceda a encender el equipo HITACHI CHROMASTER de la siguiente manera:

Primero encienda los Estabilizadores de energía, (Ubicados en el costado derecho del equipo) luego en el orden siguiente encender: Detector > Horno > Auto-muestreador > Bomba.

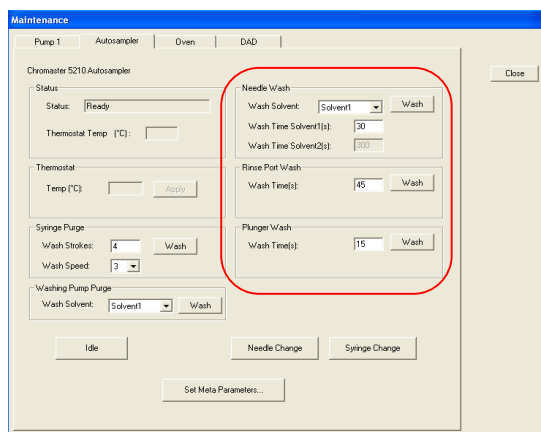
6.1.5. En la pantalla de inicio seleccionar “Acceso directo a CMMaintenance” y dar doble click. Se abrirá una ventana, de click en la opción: “Conect”. Esta operación permite al equipo reconocer los módulos que conforman el equipo. Una vez reconocidos los módulos, la opción “Maintenance” se habilitará.




Al dar click en la opción Maintenance, se desplegará una ventana con opciones para cada uno de los módulos conectados al equipo. A continuación, se explican a detalle estas opciones.



- 6.1.6. En la pestaña de la bomba (Pump), ubique la opción de Purga (Purge) y seleccione las vías que desea purgar. Luego, establezca el flujo de purga y la duración de la purga, y dé click en el botón “Purge On”. El equipo realizará la purga de las vías y al transcurrir el tiempo establecido se detendrá.
- 6.1.7. En el menú Manual Set, puede hacer pasar soluciones por la columna con el fin de acondicionar el equipo previo a un análisis o bien, para realizar lavados de la columna, el lavado se debe realizar al menos 30 minutos por cada solvente y si las fases móviles tienen varios días de preparación deben filtrarse previo a su uso.
- 6.1.8. En la pestaña del Automuestreador (Autosampler) se debe realizar el lavado de la aguja de inyección y de la vía de inyección de las muestras. Estas opciones las encuentra en el lado derecho de la pantalla.



Laboratorios Bonin 	PROCEDIMIENTO ESTÁNDAR DE OPERACIÓN USO Y LIMPIEZA DEL EQUIPO HPLC HITACHI CHROMASTER. ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD	Código: PEO-AC-109-05 Versión: 5 Vigencia 30/11/2022 Vencimiento: 30/11/2024 Página 4 de 12
--	---	---

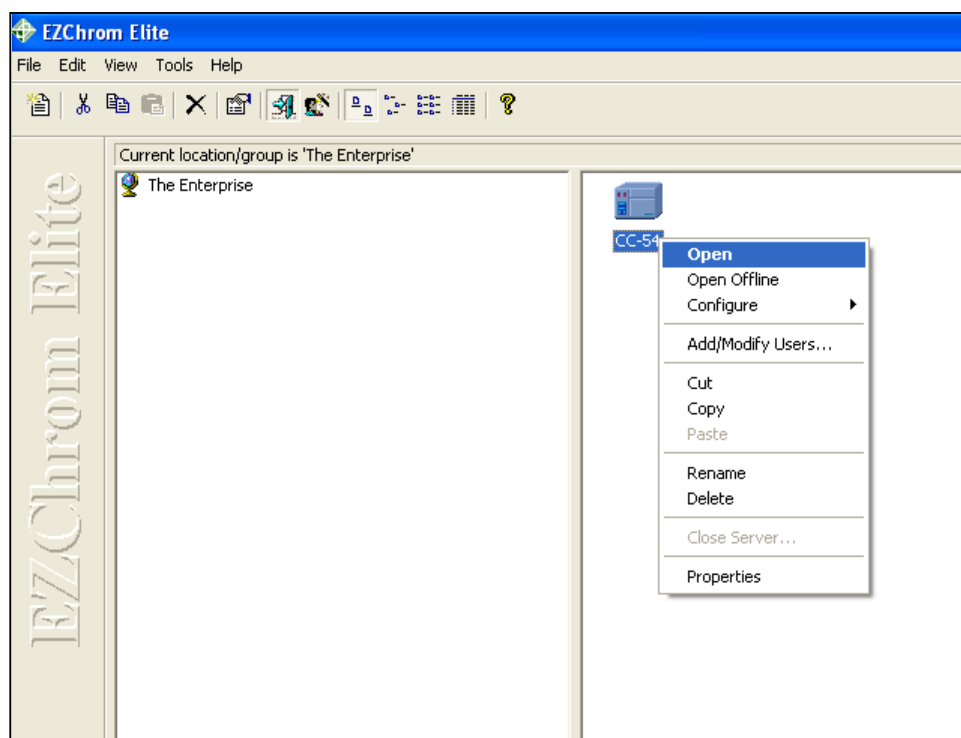
6.1.9. En las pestañas del Horno (Oven) y del Detector (DAD), puede indicar la temperatura y la longitud de onda con la que desea trabajar.

6.1.10. Una vez terminadas las opciones de mantenimiento dar click en la opción Cerrar (Close) para cerrar la ventana de mantenimiento.

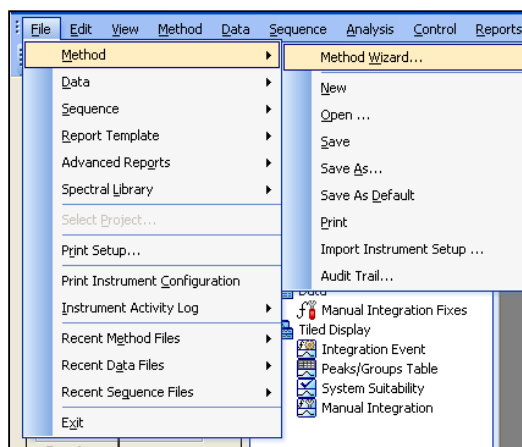
6.2. Procedimiento de operación

6.2.1. Previo a iniciar el funcionamiento del equipo, revise que la columna y la fase móvil sean las indicadas por la metodología de análisis.

6.2.2. En la pantalla de inicio, seleccione la opción EZChrom Elite y dele doble click. Se abrirá una ventana. Posicione el cursor sobre el ícono “CC-54” y dele click derecho. En el menú que aparece dar click en la opción Abrir (Open) para acceder al programa.



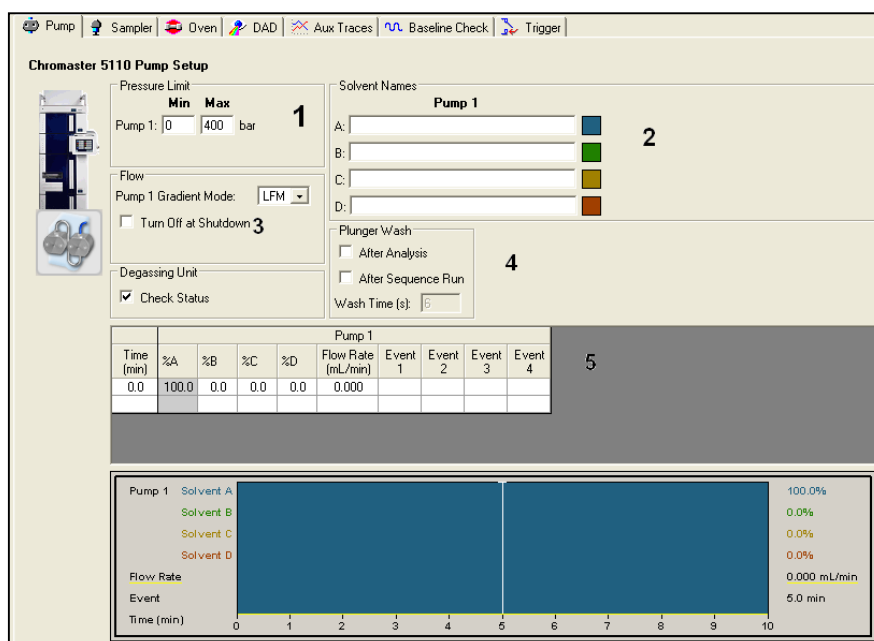
6.2.3. Una vez inicializado puede seleccionar el método que desea utilizar accediendo al menú File > Method > Open. Si el método que desea utilizar no existe, puede crear un nuevo método accediendo a la opción Method wizard, dentro del menú File > Method.



6.2.4. Si abre un método ya existente, acceda al menú Control y de click en la opción Descargar método (Download method).

6.2.5. Si utiliza la opción Method Wizard, deberá personalizar cada uno de los módulos, iniciando por el módulo de la bomba (Pump).

Como se observa en la imagen expuesta a continuación, en la pestaña de la bomba, **Primero** deberá establecer los límites de presión bajo los cuales trabajará el equipo. **Segundo**, tendrá que especificar qué solventes pasaran en cada una de las vías. **Tercero**, activar el apagado automático si se considera que es necesario. **Cuarto**, determinar las opciones de lavado durante el análisis. **Quinto**, establecer las mezclas de solventes y el flujo con los que se llevará a cabo el análisis.



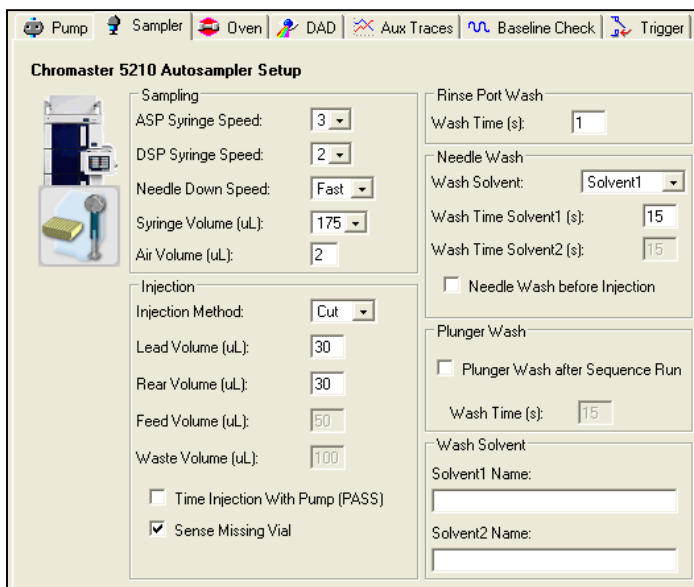
USO Y LIMPIEZA DEL EQUIPO HPLC
HITACHI CHROMASTER.
ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD

Versión: 5

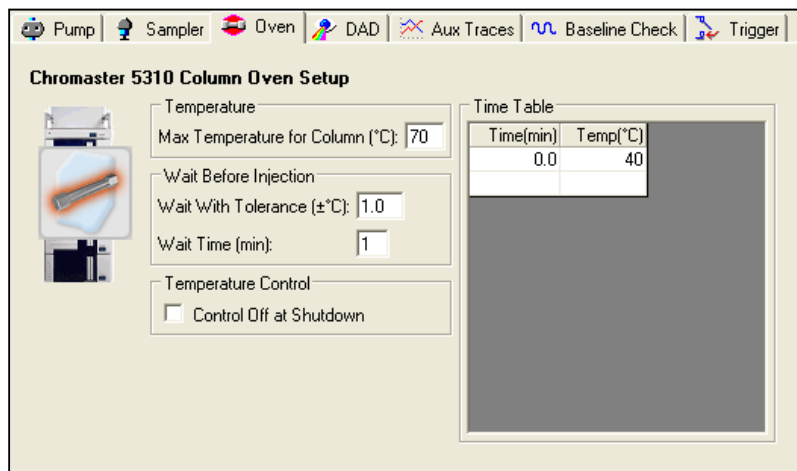
Vigencia 30/11/2022

Vencimiento: 30/11/2024

Página 6 de 12



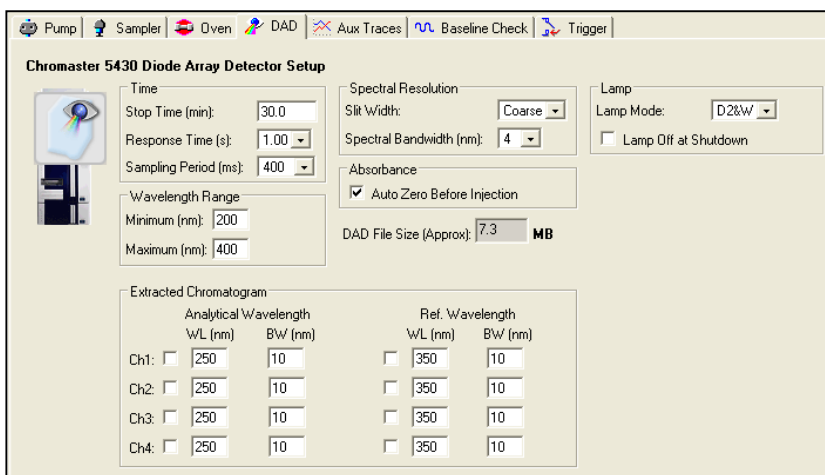
En la pestaña del Horno, se establecen los límites de temperatura bajo los cuales trabajara el equipo. Así mismo, en esta pestaña se define la temperatura a la que realizarán los análisis.



Time(min)	Temp(°C)
0.0	40

NOTA: En cada módulo verificar el estado de la opción apagado automático.

- 6.2.6. En la pestaña del detector (DAD) es importante especificar el tiempo de parada (Stop time). Éste tiempo indica cuánto tiempo durará cada análisis. En la pestaña del detector también encontramos los límites de longitudes de onda, la combinación de lámparas que se utilizarán (D2 y W), el número de longitudes de onda a las que se trabajará.



Chromaster 5430 Diode Array Detector Setup

Time
Stop Time (min): 30.0
Response Time (s): 1.00
Sampling Period (ms): 400

Spectral Resolution
Slit Width: Coarse
Spectral Bandwidth (nm): 4

Lamp
Lamp Mode: D2&W
☐ Lamp Off at Shutdown

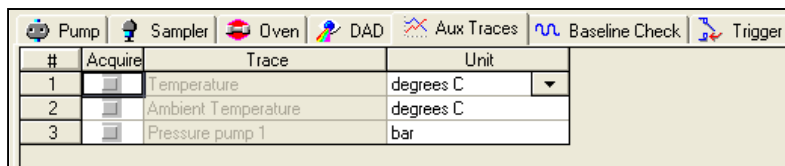
Wavelength Range
Minimum (nm): 200
Maximum (nm): 400

Absorbance
☒ Auto Zero Before Injection
DAD File Size (Approx): 7.3 MB

Extracted Chromatogram

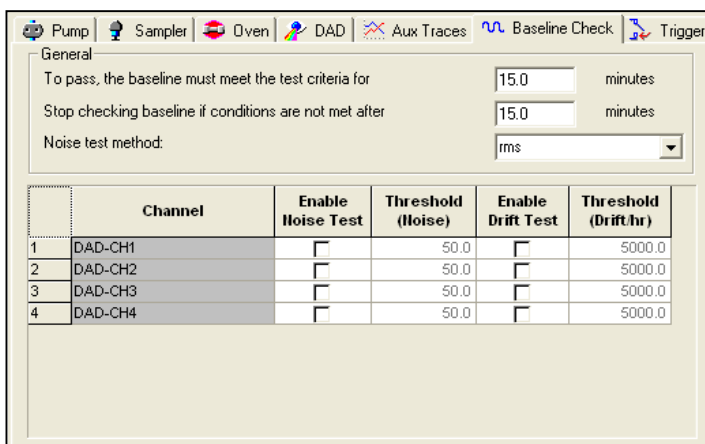
	Analytical Wavelength WL (nm)	BW (nm)	Ref. Wavelength WL (nm)	BW (nm)
Ch1:	<input type="checkbox"/> 250	<input type="checkbox"/> 10	<input type="checkbox"/> 350	<input type="checkbox"/> 10
Ch2:	<input type="checkbox"/> 250	<input type="checkbox"/> 10	<input type="checkbox"/> 350	<input type="checkbox"/> 10
Ch3:	<input type="checkbox"/> 250	<input type="checkbox"/> 10	<input type="checkbox"/> 350	<input type="checkbox"/> 10
Ch4:	<input type="checkbox"/> 250	<input type="checkbox"/> 10	<input type="checkbox"/> 350	<input type="checkbox"/> 10

6.2.7. La opción Aux Traces



#	Acquire	Trace	Unit
1	<input type="checkbox"/>	Temperature	degrees C
2	<input type="checkbox"/>	Ambient Temperature	degrees C
3	<input type="checkbox"/>	Pressure pump 1	bar

6.2.8. La opción Chequeo de la línea base (Baseline Check), establece los criterios para el chequeo de la línea base del equipo. El control de la línea base ayuda a obtener mejores resultados al momento de analizar.




General

To pass, the baseline must meet the test criteria for 15.0 minutes

Stop checking baseline if conditions are not met after 15.0 minutes

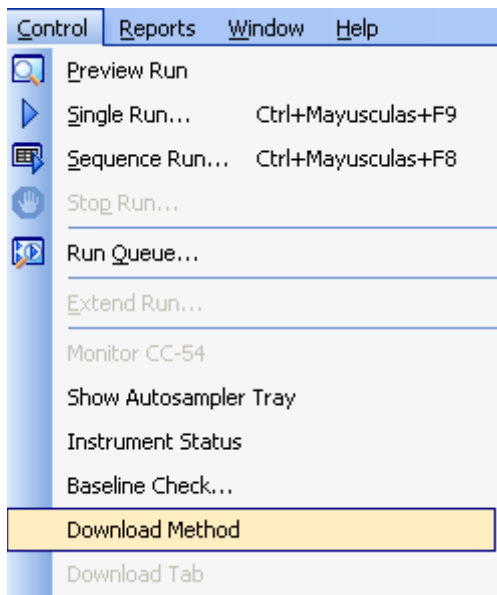
Noise test method: rms


	Channel	Enable Noise Test	Threshold (Noise)	Enable Drift Test	Threshold (Drift/hr)
1	DAD-CH1	<input type="checkbox"/>	50.0	<input type="checkbox"/>	5000.0
2	DAD-CH2	<input type="checkbox"/>	50.0	<input type="checkbox"/>	5000.0
3	DAD-CH3	<input type="checkbox"/>	50.0	<input type="checkbox"/>	5000.0
4	DAD-CH4	<input type="checkbox"/>	50.0	<input type="checkbox"/>	5000.0

Laboratorios Bonin 	PROCEDIMIENTO ESTÁNDAR DE OPERACIÓN USO Y LIMPIEZA DEL EQUIPO HPLC HITACHI CHROMASTER. ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD	Código: PEO-AC-109-05 Versión: 5 Vigencia 30/11/2022 Vencimiento: 30/11/2024 Página 8 de 12
--	---	---

6.2.9. Para iniciar los análisis

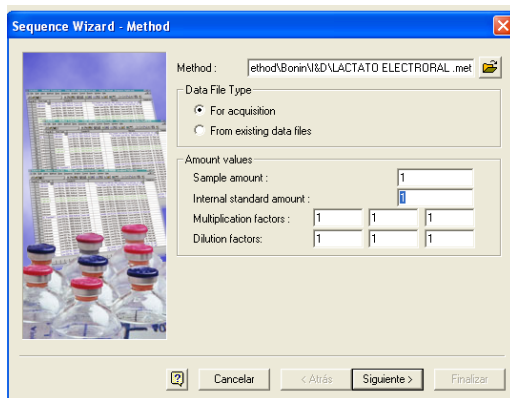
6.2.9.1. Una vez seleccionado el método ir al menú Control y dar click en la opción “Download method” para así cargar el método en el equipo.

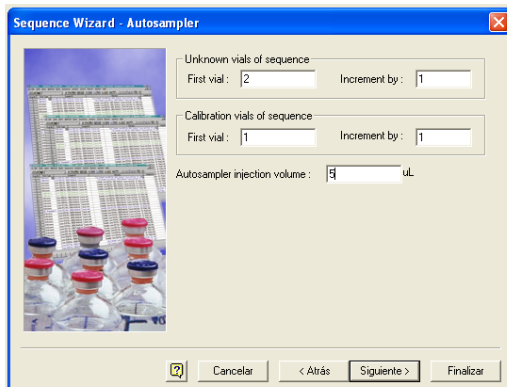


6.2.9.2. En la barra de herramientas ubicar el ícono  y darle click. De esta forma podrá ver el comportamiento de la línea base. Cuando ésta se vea estable proceder a realizar una prueba de línea base ingresando nuevamente al menú Control y dando click en la opción “Baseline Check”. **NOTA 2:** La prueba de línea base tardará el tiempo que el usuario defina en la ventana Baseline check.

6.2.9.3. Si el comportamiento de la línea base es apropiado, dar click en el ícono “STOP RUN”. Para realizar pruebas parciales dar click en el ícono “RUN”.

6.2.9.4. Para realizar el análisis de una secuencia, acceder a File, Sequence, Sequence Wizard. Y seguir los pasos como procede a continuación:

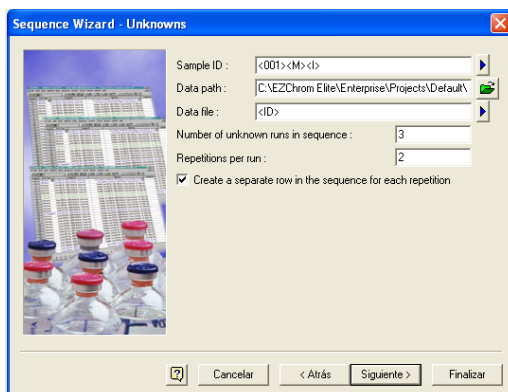




Indicar el primer vial en donde se encuentra la primera muestra desconocida, y cada cuanto se repite la muestra desconocida.

Indicar en qué posición se ubica el estándar.

Ingresar el volumen de inyección.



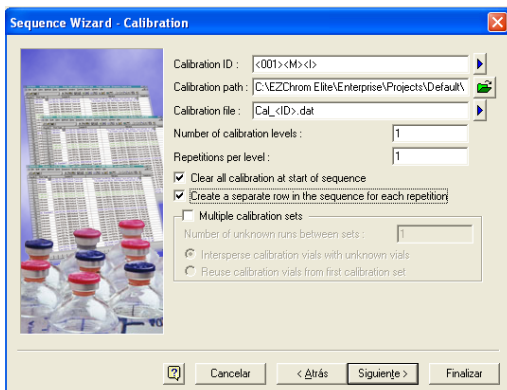
En la casilla “*Calibration ID*” agregue los campos “*Increment number*”, “*Method name*” e “*Instrument name*”.

En la casilla “*Calibration path*” Indicar la carpeta en la que se guardará la información del análisis.

En la casilla “*Data file*” agregar el campo “*Sample ID*”.

Indicar el número de muestras desconocidas y el número de repeticiones por análisis.


Accionar la casilla en blanco para separar los análisis durante la corrida.

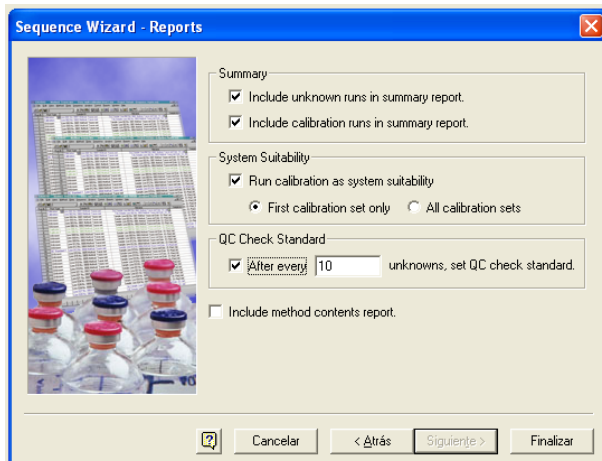


“*Calibration ID*” agregar los campos *Increment number*, *Method name* e *Instrument name*.

Indicar la carpeta en la que se guardará la información, y agregar el campo *Sample ID*.

Llenar los campos siguientes como se indica en la imagen.

Laboratorios Bonin 	PROCEDIMIENTO ESTÁNDAR DE OPERACIÓN USO Y LIMPIEZA DEL EQUIPO HPLC HITACHI CHROMASTER. ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD	Código: PEO-AC-109-05 Versión: 5 Vigencia 30/11/2022 Vencimiento: 30/11/2024 Página 10 de 12
--	---	--




Llenar los campos según la imagen.

El campo “*QC Check Standard*” se utiliza **únicamente** para colocar estándares entre las muestras desconocidas.

6.2.9.5. Una vez hecha la secuencia, corroborar los datos y dar click en la opción “Run sequence”.

6.3 Precauciones para el uso de HPLC:

- A fin de evitar la contaminación, no recicle el disolvente de lavado de sellos
- Cambie semanalmente el disolvente de lavado de sellos
- Se recomienda encarecidamente la utilización de Kit de cabeza de botella para lavado de sellos.
- Preste atención a que la muestra sea completamente soluble en ambos: en el disolvente de la muestra utilizada y en la fase móvil en las condiciones iniciales.
- En la medida de lo posible, haga coincidir el disolvente de la muestra y la fase móvil propuesta para evitar la precipitación
- Purgue todos los canales de disolventes con 2-propanol y deje que el desgasificador bombee durante dos horas más
- A fin de evitar la contaminación, no recicle el disolvente de lavado de sellos
- Cambie semanalmente el disolvente de lavado de sellos
- Se recomienda encarecidamente la utilización de Kit de cabeza de botella para lavado de sellos.
- A fin de evitar la contaminación, no recicle el disolvente de lavado de sellos
- Cambie semanalmente el disolvente de lavado de sellos
- Se recomienda encarecidamente la utilización de Kit de cabeza de botella para lavado de sellos
- Evite encendidos/apagados innecesarios de la lámpara.
- Utilice una jeringuilla para llenar las líneas de disolvente vacías

<div>Laboratorios Bonin</div> <div></div>	<div>PROCEDIMIENTO ESTÁNDAR DE OPERACIÓN</div> <div>USO Y LIMPIEZA DEL EQUIPO HPLC HITACHI CHROMASTER.</div> <div>ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD</div>	<div>Código:</div> <div>PEO-AC-109-05</div>
		<div>Versión: 5</div>
		<div>Vigencia 30/11/2022</div> <div>Vencimiento: 30/11/2024</div>
		<div>Página 11 de 12</div>

6.4 Limpieza General del Equipo:

- 6.4.1 Pasar un paño de papel mayordomo sobre la superficie externa del equipo HPLC HITACHI Chromaster, para remover el polvo acumulado. Con cuidado, limpiar cada uno de los módulos, utilizando papel mayordomo.
- 6.4.2 Para realizar la limpieza interna del equipo, retirar la columna y colocar un 'Volumen muerto'. Encender el equipo, acceder a mantenimiento (Maintenance), establecer un flujo de 2 ml/min en la vía de Agua y encender la bomba. El equipo iniciará a bombear agua en el sistema. Chequear si hay fugas en el sistema, mantener el flujo durante 5 minutos, luego cambiar el agua por metanol u Acetonitrilo durante 5 minutos y detener la bomba.
- 6.4.3 Anotarse en el **FO-AC-020 Control de limpieza de Equipo** correspondiente al equipo HPLC Hitachi Chromaster para dejar constancia de la limpieza.
- 6.4.4 Frecuencia de limpieza: una vez por semana

7 REVISIÓN DE ESTE DOCUMENTO

El presente documento deberá revisarse el 30/11/2024 o antes de su vencimiento si fuere necesario.

8 BIBLIOGRAFÍA


Manual de operación del equipo Hitachi Chromaster.

9 ARCHIVO

El presente documento será archivado el original en Gestión de Calidad bajo condiciones adecuadas, además, se emiten dos copias controladas para el área de Aseguramiento de Calidad siendo los responsables el Asistente de Documentación y Analista Físicoquímico.

10 ANEXOS

CODIGO	NOMBRE
No aplica.	

Laboratorios Bonin 	PROCEDIMIENTO ESTÁNDAR DE OPERACIÓN USO Y LIMPIEZA DEL EQUIPO HPLC HITACHI CHROMASTER. ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD	Código: PEO-AC-109-05
		Versión: 5
		Vigencia 30/11/2022 Vencimiento: 30/11/2024
		Página 12 de 12

11 CONTROL DE REGISTROS

CODIGO Y NOMBRE DEL REGISTRO	RESPONSABLE DE SU ARCHIVO	MODO DE INDIZACION Y ARCHIVO	ACCESO AUTORIZADO	TIEMPO DE CONSERVACION
FO-AC-058 Control de uso de Equipo HPLC Hitachi Chromaster.	Departamento de Aseguramiento de Calidad	En libro	Departamento de Aseguramiento de calidad	5 años
FO-AC-020 Control de limpieza de equipo	Departamento de Aseguramiento de Calidad	En fólder	Departamento de Aseguramiento de calidad	5 años
FO-AC-137 Control de cambios de agua para equipo HPLC	Departamento de Aseguramiento de Calidad	En libro	Aseguramiento de Calidad	5 años

12 CAMBIOS EN EL DOCUMENTO

Versión	DESCRIPCIÓN DEL CAMBIO
1	Inclusión del numeral “6.1.3. Observación: Cambiar el agua a diario, dejando constancia del cambio en el FO-CC-137 Control de cambios de agua para equipo HPLC.”
2	Se modificó el numeral 6.1.7. En el menú Manual Set, puede hacer pasar soluciones por la columna con el fin de acondicionar el equipo previo a un análisis o bien, para realizar lavados de la columna, el lavado se debe realizar al menos 30 minutos por cada solvente y si las fases móviles tienen varios días de preparación deben filtrarse previo a su uso.
3	Inclusión del numeral 6.3 Precauciones para el uso del HPLC.
4	Se agregó el numeral 6.4.4 Frecuencia de limpieza