


| | | |
|---|--|---|
|  | DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES ORGANISMO DE INVESTIGACION JUDICIAL (OIJ) PODER JUDICIAL, COSTA RICA | PROCEDIMIENTO DE OPERACIÓN NORMADO ESPECIFICO P-DCF-ECE-TOX-07 |
| | USO Y MANEJO DEL CROMATOGRAFO LÍQUIDO VANQUISH CON DETECTOR DE MASAS POR TRAMPA DE IONES (LC/MS-1) | |
| VERSION: 03 | Rige desde: 19/04/2024 | PAGINA: 1 de 25 |

| | |
|--|--|
| Elaborado o modificado por: Dr. Diego Arias Alfaro Jefatura, Sección Toxicología | Revisado por Líder Técnico: Dra. María de los Ángeles Sancho Brenes Líder Técnico de Sección/Unidad de Confirmatorios/Plaguicidas |
| Visto Bueno Encargado de Calidad: Dr. Marco Martínez Esquivel Encargado de Calidad de la Sección de Toxicología | Aprobado por: Dr. Diego Arias Alfaro Jefatura, Sección Toxicología |

CONTROL DE CAMBIOS A LA DOCUMENTACIÓN

| Versión | Fecha de Aprobación | Fecha de Revisión | Descripción del Cambio | SCD | Solicitado por |
|---------|---------------------|-------------------|--|----------|----------------|
| 01 | 20/05/2019 | 01/08/2019 | Versión Inicial del Procedimiento | 009-2019 | DAA |
| 02 | 01/08/2019 | 19/04/2024 | Cambio uso lista de chequeo para uso equipo, cambio redacción, cambio labores de mantenimiento | 021-2019 | DAA |
| 03 | 19/04/2024 | | Cambio en LC y software | 003-2024 | DAA |

**ESTE PROCEDIMIENTO ES UN DOCUMENTO CONFIDENCIAL
PARA USO INTERNO DEL DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES
SE PROHÍBE CUALQUIER REPRODUCCIÓN QUE NO SEA PARA ESTE FIN**

La versión oficial digital es la que se mantiene en la ubicación que la Unidad de Gestión de Calidad defina. La versión oficial impresa es la que se encuentra en la Unidad de Gestión de Calidad. Cualquier otro documento impreso o digital será considerado como copia no controlada

| | | |
|--|------------------|-----------------|
| DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES | VERSIÓN 03 | PAGINA: 2 de 25 |
| USO Y MANEJO DEL CROMATOGRFO LÍQUIDO VANQUISH CON DETECTOR DE MASAS POR TRAMPA DE IONES (LC/MS LTQ XL) | P-DCF-ECE-TOX-07 | |

1 Objetivo

El objetivo de este procedimiento es brindar una guía para el uso rutinario y manejo general del cromatógrafo líquido Vanquish con detector de masas por trampa de iones LC/MS LTQ XL (LC/MS-1).

2 Alcance

Este procedimiento es exclusivo para el equipo de Cromatografía Líquida acoplado a trampa de iones de Thermo Scientific.

El equipo consta de la bomba cuaternaria Vanquish con desgasificador incorporado, el automuestreador Vanquish con control de temperatura en la bandeja, un horno para columnas Vanquish, el detector de masas por trampa de iones LTQ XL y el software Xcalibur, todo de la marca Thermo Scientific.

El procedimiento incluye el uso rutinario del equipo: preparación del equipo para el análisis (filtración de solventes, purga de líneas, purga de columna), calibración en rango normal de masas con mezcla de calibración por infusión, tuning general del equipo, programación de métodos de captura de datos, métodos de procesamiento de datos, programación de secuencias y análisis general de datos.

Incluye los aspectos de mantenimiento básicos que pueden ser realizados por el personal que utiliza rutinariamente el equipo. Cualquier otra labor de mantenimiento debe ser realizada por el encargado del equipo de la Sección de Toxicología o por el servicio técnico encargado del equipo, representante de Thermo Scientific.

Es necesario el entendimiento básico del idioma inglés escrito en las secciones donde se necesita revisar los manuales del equipo.

Cualquier cambio en la configuración del equipo debe acompañarse de una revisión de este procedimiento para asegurarse que todavía es aplicable.

3 Referencias

- 3.1 Manuales HPLC Vanquish/MS LTQ- XL, Thermo Scientific, 2011-2019, Código M-EXT-ECE-TOX-111: VANQUISH PUMPS FLEX _ CORE-OPERATING MANUAL. 4820.4405-EN Revisión 4.0 Diciembre 2019.
- 3.2 Manuales HPLC Vanquish/MS LTQ- XL, Thermo Scientific, 2011-2019, Código M-EXT-ECE-TOX-111: VANQUISH SPLIT SAMPLERS-OPERATING MANUAL. 4828.5001-EN Revisión 4.0, Diciembre 2019.
- 3.3 Manuales HPLC Vanquish/MS LTQ- XL, Thermo Scientific, 2011-2019, Código M-EXT-ECE-TOX-111: VANQUISH TCC OPERATING MANUAL. 4827.3201-EN Revisión 3.0 • Diciembre 2019.
- 3.4 Manuales HPLC Vanquish/MS LTQ- XL, Thermo Scientific, 2011-2019, Código M-EXT-ECE-TOX-111: LTQ Series Getting Started Guide, 97055-97073 Revision A July 2009. (versión digital).
- 3.5 Manuales HPLC Vanquish/MS LTQ- XL, Thermo Scientific, 2011-2019, Código M-EXT-ECE-TOX-111: LTQ Series Hardware Manual; 97055-97072 Revisión A April 2009 (versión digital).

| | | |
|---|------------------|-----------------|
| DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES | VERSIÓN 03 | PAGINA: 3 de 25 |
| USO Y MANEJO DEL CROMATOGRAFO LÍQUIDO VANQUISH CON DETECTOR DE MASAS POR TRAMPA DE IONES (LC/MS LTQ XL) | P-DCF-ECE-TOX-07 | |

4 Equipos y Materiales

Beakers de vidrio de 50 mL, 250 mL, 600 mL, (para mantenimiento, lavado de piezas).

Bitácora de control de uso de equipo del LC/MS LTQ XL

Bolsas plásticas cierre hermético tipo Ziploc o similar, nuevas.

Bomba de vacío 0-30 inHg.

Botella plástica de 4L para desechos del equipo.

Botellas de vidrio de 1 litro (reservorio de agua tipo I "D", acetonitrilo u otro disolvente para la fase móvil "C", metanol u otro disolvente de limpieza "A", buffer "B", disolución de lavado de jeringa y disolución de lavado de sellos).

[Cámara de bioseguridad clase II B2.](#)

Capilla de extracción de gases.

Consumibles varios del equipo LC/MS LTQ XL (prefiltros, sellos, capilares, tubería PEEK, entre otros).

Filtros de membrana de nylon o PTFE para jeringa de 7 o 13 mm con diámetro de poro de 0,22 µm nuevos.

[Formulario "Lista de chequeo para uso de equipo instrumental \(LC/MS-1\)"](#)

Gabacha de laboratorio.

Garrafa plástica de 2 galones para desechos de la interfase.

Guantes desechables de látex o nitrilo libres de polvo (manejo de solventes).

Horno para Cristalería, 20-240°C (± 10°C).

Insertos de vidrio con soporte de plástico para viales Agilent de 2 mL, parte No. 5181-1270 o similares desechables.

Jeringa de vidrio con émbolo con punta de teflón de 500 µL para LC.

[LC/MS LTQ XL \(LC/MS-1\): Cromatógrafo líquido Thermo Scientific, con bomba Vanquish Quaternary Pump F S/N 8311205 con desgasificador por vacío en línea, Automuestreador Vanquish Split Sampler FT, S/N 8310823, compartimiento con temperatura controlada para la columna Vanquish Column Compartment H S/N 6502823, detector de masas por trampa de iones LTQ XL S/N 21465. Controlado por una computadora capaz de correr los programas "LTQ Tune Plus" versión 2.6 y "Xcalibur" versión 2.1 o superior.](#)

Lentes de seguridad.

Medidor de temperatura 0-50° C.

Membranas de filtración de nylon 47 mm con 0,22 µm de diámetro para equipo de filtración de solventes, nuevas.

Pañuelos para tareas delicadas libres de pelusa Kimwipes o similares.

Refrigeradora con control de la temperatura de >0° C a 10° C.

Sistema de filtración de fase móvil para membranas de 47 mm.

P-DCF-GCG-JEF-001-R3, Versión 01

Emitido y Aprobado por Unidad de Gestión de Calidad

| | | |
|--|------------------|-----------------|
| DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES | VERSIÓN 03 | PAGINA: 4 de 25 |
| USO Y MANEJO DEL CROMATOGRFO LÍQUIDO VANQUISH CON DETECTOR DE MASAS POR TRAMPA DE IONES (LC/MS LTQ XL) | P-DCF-ECE-TOX-07 | |

Tapas metálicas de 18 mm certificadas para viales Head Space de 20 mL con septum de teflón, Agilent 5188-2759 o similar, nuevas.

Viales de vidrio de 1,8 mL 12 x 32 mm Thermo Scientific A4954-010 o viales de 2 mL de boca ancha para inyectores automáticos Agilent Technologies nuevos.

Viales de vidrio para Head Space de 20 mL para tapa rosca, Restek 22794 o similar, nuevos.

5 Reactivos y Materiales de Referencia

Acetona calidad p.a. r o calidad LC/MS.

Acetonitrilo calidad HPLC o LC/MS.

Ácido acético calidad HPLC o LC/MS.

Ácido fórmico calidad HPLC o LC/MS.

Agua desionizada.

Agua tipo I (Milli Q) con resistividad mínima de 18 Ω /cm o agua calidad LC/MS. En el caso de calidad LC/MS debe pasarse el agua directamente a una botella limpia y pre enjuagada.

Cilindro de Helio UAP.

Disolución de calibración del LTQ XL para rango normal de masas Pierce LTQ ESI Positive Ion Calibration Solution, Thermo Scientific 88322 o similar.

Disolución de lavado de jeringa (Ver Anexo 2).

Disolución de lavado de sellos (Ver Anexo 2).

Etanol al 95 % calidad industrial.

Isopropanol calidad HPLC o LC/MS.

Jabón para lavar cristalería Alconox alcalino o similar.

Líquido detector de fugas Swagelock Snoop, o similar.

Metanol calidad HPLC o LC/MS. En el caso de calidad LC/MS solo debe filtrarse el que está en uso, pero el nuevo debe pasarse directamente a la botella sin filtrar.

6 Condiciones Ambientales

| No. | Condición ambiental | Valor mínimo | Valor máximo | Otras características |
|-----|-----------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--|
| 1 | Filtración de la fase móvil | No es crítico para el proceso | No es crítico para el proceso | Capilla de extracción de gases o Cámara de bioseguridad Clase II B-2, limpiada con etanol al 95% y el área de trabajo forrada con papel. |

| | | |
|--|------------------|-----------------|
| DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES | VERSIÓN 03 | PAGINA: 5 de 25 |
| USO Y MANEJO DEL CROMATOGRFO LÍQUIDO VANQUISH CON DETECTOR DE MASAS POR TRAMPA DE IONES (LC/MS LTQ XL) | P-DCF-ECE-TOX-07 | |

| | | | | |
|---|----------------|-------|-------|---|
| 2 | Análisis LC/MS | 15 °C | 27 °C | La temperatura solo debe ser monitoreada si hay un fallo en el sistema de aire acondicionado en el cuarto donde se encuentra el equipo. |
|---|----------------|-------|-------|---|

7 Procedimiento

7.1 Preparación inicial

- 7.1.1** Los pasos descritos en el apartado 7 son para la utilización del equipo con la interfase API con la sonda de ESI.
- 7.1.2** Colóquese gabacha y guantes. Además, colóquese lentes de seguridad cuando vaya a manipular disolventes.
- 7.1.3** Si va a utilizar el cromatógrafo líquido y se encuentra apagado, primero apague la computadora, encienda el módulo de la bomba, el módulo del automuestreador y el compartimento de la columna. Espere para que el sistema se inicialice y luego encienda la computadora.

Nota 1 Si solo va a utilizar el detector de masas (calibración, tuning con analitos, pruebas por infusión) no es necesario que encienda el cromatógrafo líquido (bomba y automuestreador).

- 7.1.4** Ubique la bitácora de control de uso de equipo del LC/MS LTQ XL y llene con la fecha, usuario, hora de inicio, método y sistemas utilizados.
- 7.1.5** Revise la información del uso anterior del equipo para ver labores pendientes o si se presentó algún problema. Revise que la temperatura del termómetro ubicado en el cuarto donde se encuentra el equipo esté entre 15 y 27 °C.
- 7.1.6** Abra el formulario "Lista de chequeo para uso de equipo instrumental (LC/MS-1)" (.pdf rellenable) y vaya completándolo.
- 7.1.7** Revise la presión del cilindro de Helio que se encuentra fijado a la pared del laboratorio, la presión principal debe ser mayor a 400 p.s.i. y que la presión del regulador que está detrás del detector de masas tenga una presión de salida de 40 ± 5 p.s.i. Si es diferente proceda a ajustarla moviendo la válvula en el sentido de las agujas del reloj para aumentar la presión y al contrario para disminuirla.
- 7.1.8** Revise el generador de nitrógeno que se encuentra a la izquierda del cilindro de Helio, la luz indicadora "Service" debe estar apagada y la presión de salida en 100 ± 20 p.s.i. Si al momento de la revisión el equipo está operando, espere a que el ciclo termine y se pause adecuadamente.
- 7.1.9** Revise que el nivel del aceite de las bombas de vacío de piso se encuentren entre la marca de mínimo y máximo, si no es así repórtelo a la Líder Técnica o al encargado del equipo.
- 7.1.10** Si la presión de helio y de nitrógeno son las esperadas indíquelo en la bitácora del equipo.
- 7.1.11** Sume y anote en la bitácora de control de uso de equipo del LC/MS LTQ XL las inyecciones que se han realizado antes del último cambio de prefiltro, si el acumulado es muy cercano a 300 o mayor, cambie el prefiltro como se indica en 7.10.1.
- 7.1.12** Revise que la columna que está instalada corresponda con la metodología que va a utilizar, si es necesario cambie de columna como se indica en 7.10.4.

| | | |
|---|------------------|-----------------|
| DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES | VERSIÓN 03 | PAGINA: 6 de 25 |
| USO Y MANEJO DEL CROMATOGRAFO LÍQUIDO VANQUISH CON DETECTOR DE MASAS POR TRAMPA DE IONES (LC/MS LTQ XL) | P-DCF-ECE-TOX-07 | |

7.1.13 Inicie el programa "LTQ Tune" mediante el acceso directo que se encuentra en el escritorio de la computadora que controla el equipo. Se abre una pantalla con un menú como la siguiente.

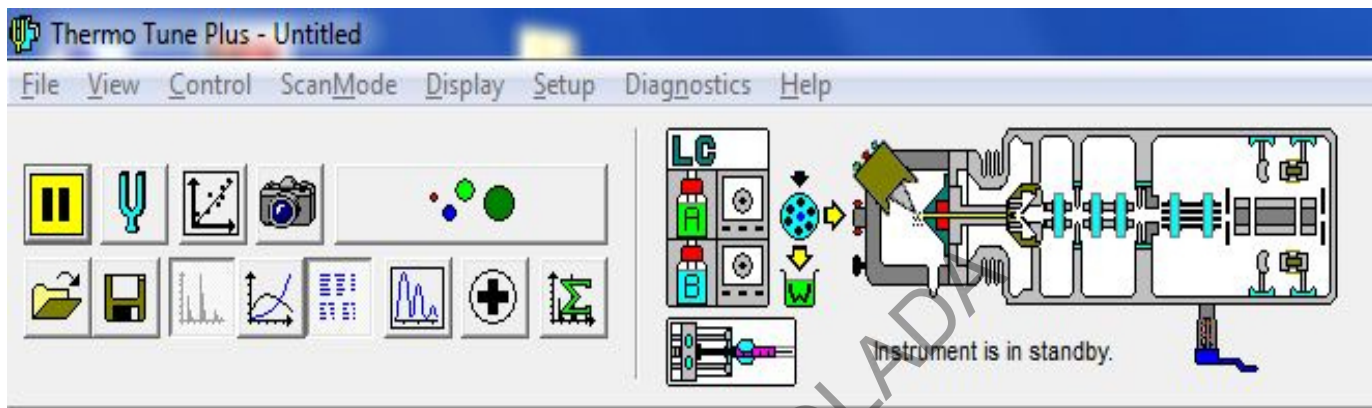



Figura 1 Menú del LTQ tune.

7.1.14 Ubique en la parte derecha de esta pantalla los parámetros del equipo. Observe los parámetros de vacío del "Ion Gauge" y del "Convectron", el nivel de vacío debe estar entre $0,6-1,5 \times 10^{-5}$ Torr y $0,7-1,5$ Torr respectivamente. Si el vacío no es el esperado comuníquelo al Líder Técnico.

7.1.15 Revise la bitácora de control de uso del equipo para ver si es necesario realizar la purga (ballast) de las bombas de vacío de piso, esta purga debe realizarse al menos cada 8 días. Para realizar la purga gire contra de las manecillas del reloj la válvula (Ver Anexo 4), espere aproximadamente 15 minutos y gire al favor de las manecillas del reloj hasta el final y devuélvase un octavo de vuelta. Indique lo realizado en la bitácora de control de uso de equipo, en la columna de observaciones.

7.1.16 Presione en el símbolo  para encender el detector de masas.

7.1.17 Revise la verificación y/o calibración del equipo seleccionando el símbolo . La verificación de todos los parámetros excepto "Positive Ion Mode-Electron Multiplier Gain" y "Negative Ion Mode-Electron Multiplier Gain" debe realizarse semanalmente y debe calibrarse los parámetros que no pasen la verificación como se indica en 7.3. Además, independientemente de si pasan o no la verificación todos los parámetros deben calibrarse una vez al mes.


7.2 Verificación de la calibración

7.2.1 Cambie la configuración del equipo siguiendo el procedimiento del manual: "LTQ Series Getting Started Guide" (3.4): "Setting Up the Syringe Pump for Tuning and Calibration" en la página 55. Este proceso se realiza en modo ESI.

7.2.2 Saque de refrigeración la disolución de calibración del LTQ XL para rango normal de masas ya sea comprada o preparada y trasvase a un vial limpio y seco nuevo aproximadamente 1 mL y rotule con fecha de trasvase y responsable. Utilice el calibrador trasvasado por un máximo de 1 mes. Puede utilizar el recipiente original del calibrador preparado cuando queden 3 mL o menos.

7.2.3 Lave una jeringa de 500 µL para infusión directa con acetona y metanol.

| | | |
|--|------------------|-----------------|
| DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES | VERSIÓN 03 | PAGINA: 7 de 25 |
| USO Y MANEJO DEL CROMATOGRFO LÍQUIDO VANQUISH CON DETECTOR DE MASAS POR TRAMPA DE IONES (LC/MS LTQ XL) | P-DCF-ECE-TOX-07 | |

- 7.2.4** Cargue la jeringa con metanol, elimine las burbujas, inserte la aguja en el inyector manual y colóquela en el porta-jeringa del mecanismo de infusión.
- 7.2.5** Vaya al software "LTQ Tune" y de un clic en "Syringe Pump"  aparece una pantalla como la siguiente.

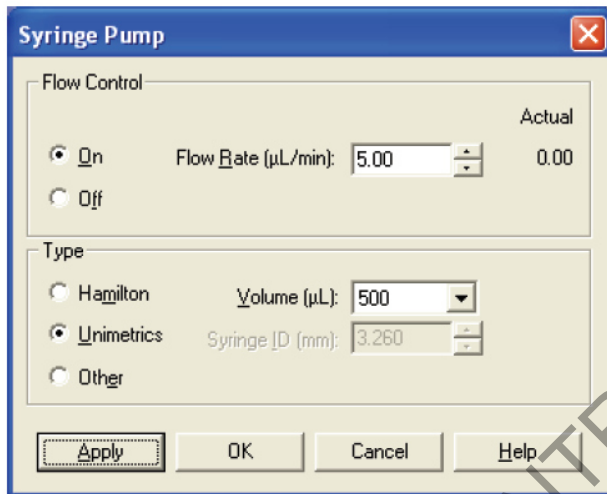


Figura 2 Parámetros de la bomba de jeringa.

- 7.2.6** En esta pantalla programe el tipo y el volumen de la jeringa que está utilizando, programe la velocidad de flujo (en $\mu\text{L}/\text{min}$) y seleccione "on" para encender el mecanismo de infusión. Para la purga del sistema con metanol y el lavado final utilice un flujo de $100 \mu\text{L}/\text{min}$, para la infusión de la disolución de calibración utilice $10\text{-}15 \mu\text{L}/\text{min}$.
- 7.2.7** En el programa "LTQ Tune" vaya al menú "file" seleccione "open", escoja el archivo de tuning: "ESITune_Pos". Espere unos dos minutos hasta que vea iones en la pantalla del software como los de la imagen siguiente.

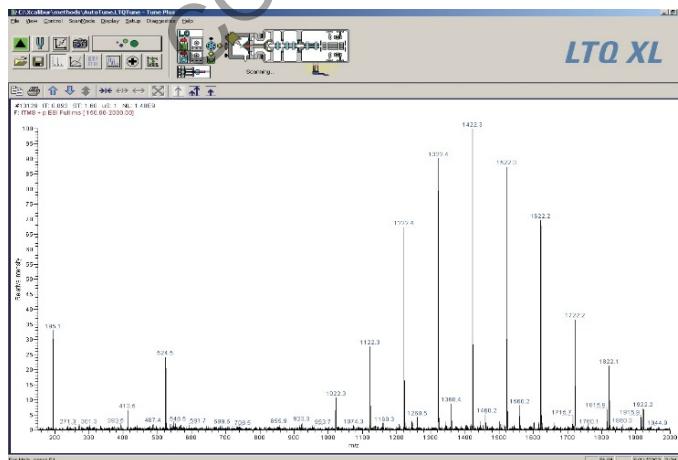


Figura 3 Señal esperada para el calibrador

| | | |
|--|------------------|-----------------|
| DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES | VERSIÓN 03 | PAGINA: 8 de 25 |
| USO Y MANEJO DEL CROMATOGRFO LÍQUIDO VANQUISH CON DETECTOR DE MASAS POR TRAMPA DE IONES (LC/MS LTQ XL) | P-DCF-ECE-TOX-07 | |

Nota 2 Si requiere cambiar los parámetros del tuning, vaya al manual: "LTQ Series Getting Started Guide" (3.4), en los procedimientos "Monitoring the Mass Spectrum of the Calibration Solution", "Tuning the Mass Spectrometer Automatically in the ESI Mode" (páginas 61 y 66 respectivamente).

Nota 3 Si solo va a utilizar el detector de masas (calibración, tuning con analitos, pruebas por infusión) no es necesario que encienda el cromatógrafo líquido (bomba y automuestreador).

7.2.8 Realice la verificación de la calibración con el sistema encendido, corriendo la disolución de calibración por infusión directa a un flujo de 10-15 µL/min, la jeringa debe contener al menos 300 µL de la disolución de calibración y debe estarse obteniendo un espectro de masas similar al de la figura No. 3 antes de continuar. Ver mayor detalle en Anexo 3.

7.2.9 Vaya a "Calibrate" en la pantalla principal del "LTQ Tune" para realizar la verificación de la calibración.

7.2.10 Seleccione la tercera pestaña "Check", se abre una pantalla como la siguiente.

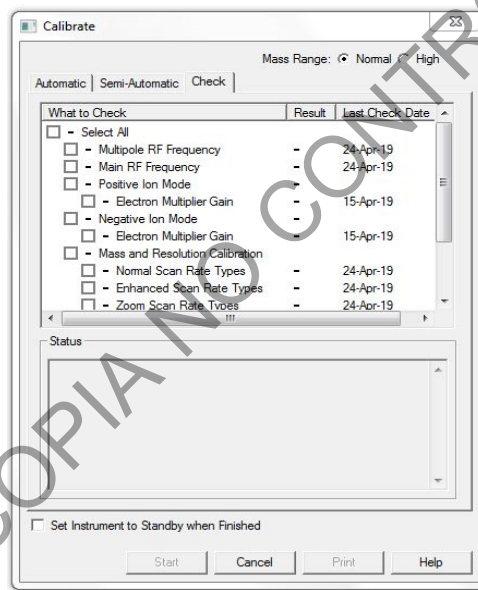


Figura 4 Pantalla de chequeo de la calibración y calibración

7.2.11 En esta pantalla seleccione todas las opciones de calibración excepto "Positive Ion Mode-Electron Multiplier Gain" y "Negative Ion Mode-Electron Multiplier Gain".

7.2.12 Seleccione la opción "Set Instrument to standby when finish" y presione "start" en esta pantalla. Espere alrededor de 20 minutos a que el proceso termine. Al finalizar hay una indicación en el espacio "Status" que dice "Calibration is OK" si todos los parámetros están correctos o "The Instrument is out of calibration" si algún parámetro está fuera de rango. Vaya a "Print" en la parte inferior derecha de esta pantalla e imprima como archivo .pdf

| | | |
|--|------------------|-----------------|
| DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES | VERSIÓN 03 | PAGINA: 9 de 25 |
| USO Y MANEJO DEL CROMATOGRFO LÍQUIDO VANQUISH CON DETECTOR DE MASAS POR TRAMPA DE IONES (LC/MS LTQ XL) | P-DCF-ECE-TOX-07 | |

el registro de calibración, guárdelo con la fecha en D:\Registro de calibración del LTQ XL en el año correspondiente.

7.2.13 Para todos los parámetros que están correctos de la calibración el software agrega un símbolo de check de color verde y para los que están fuera de rango una equis de color rojo.

7.2.14 Si algún parámetro está fuera de rango, vaya de nuevo a la pantalla de calibración lija la segunda pestaña "Semi-automatic" y seleccione el (los) parámetro (s) fuera de rango (equis color rojo) y dele "start" de nuevo pero esta vez no marque la opción: "Set Instrument to standby when finish"

7.2.15 Si algún parámetro no logra calibrarse correctamente, repita de nuevo la calibración de ese parámetro hasta que pase. Los nuevos parámetros de calibración válidos se guardarán automáticamente. Si algún parámetro requiere la calibración mensual vaya a 7.3 y omita el punto siguiente.

7.2.16 Lave la jeringa y la tubería infundiendo acetona y metanol a 100 µL/min.

7.3 Calibración

7.3.1 Si tiene dudas acerca de la calibración o si hay algún parámetro que no logra calibrar después de varios intentos, comuníquese con el encargado de equipo o con el Líder Técnico.


Nota 4: Si viene de realizar la verificación pase a realizar directamente la calibración en el punto 7.3.8

7.3.2 Cambie la configuración del equipo siguiendo el procedimiento del manual: "LTQ Series Getting Started Guide" (3.4): "Setting Up the Syringe Pump for Tuning and Calibration" en la página 55.

7.3.3 Saque de refrigeración la disolución de calibración del LTQ XL para rango normal de masas ya sea comprada o preparada y trasvase a un vial apropiado nuevo aproximadamente 1 mL y rotule con fecha de trasvase y responsable. Utilice el calibrador trasvasado por un máximo de 1 mes. Puede utilizar el recipiente original del calibrador preparado cuando queden 3 mL o menos.

7.3.4 Lave una jeringa de 500 µL para infusión directa con acetona y metanol.


7.3.5 Cargue la jeringa con metanol, elimine las burbujas, inserte la aguja en el inyector manual y colóquela en el porta-jeringa del mecanismo de infusión.

7.3.6 Vaya al software "LTQ Tune" y de un clic en "Syringe Pump"  En la pantalla que aparece, programe el tipo y el volumen de la jeringa que está utilizando, programe la velocidad de flujo (en µL/min) y seleccione "on" para encender el mecanismo de infusión (Ver Figura No. 2). Para la purga del sistema con metanol y el lavado final utilice un flujo de 100 µL/min, para la infusión de la disolución de calibración utilice 10 µL/min.

7.3.7 En el programa "LTQ Tune" vaya al menú "file" seleccione "open", escoja el archivo de tuning: "ESITune Pos". Espere unos dos minutos hasta que vea iones en la pantalla del software como los del Anexo 3. Para hacer cambios en los parámetros del tuning, vaya al manual: "LTQ Series Getting Started Guide" (3.4), en los procedimientos "Monitoring the

| | | |
|--|------------------|------------------|
| DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES | VERSIÓN 03 | PAGINA: 10 de 25 |
| USO Y MANEJO DEL CROMATOGRFO LÍQUIDO VANQUISH CON DETECTOR DE MASAS POR TRAMPA DE IONES (LC/MS LTQ XL) | P-DCF-ECE-TOX-07 | |

Mass Spectrum of the Calibration Solution”, “Tuning the Mass Spectrometer Automatically in the ESI Mode” (páginas 61, 66 respectivamente).

- 7.3.8** Realice la calibración con el sistema encendido, corriendo la disolución de calibración por infusión directa a un flujo de 10-15 µL/min, la jeringa debe contener al menos 300 µL de la disolución de calibración y debe estarse obteniendo un espectro de masas similar al del Anexo 3 antes de continuar.
- 7.3.9** Vaya a “Calibrate”  en la pantalla principal del “LTQ Tune” para realizar la calibración. Ver Figura No. 1.
- 7.3.10** Seleccione la segunda pestaña “Semi-automatic” en la pantalla de calibración y seleccione “Multipole RF Frequency” y “Main RF Frequency”. Asegúrese que no está seleccionada la opción “Set Instrument to standby when finish” y presione “start”.
- 7.3.11** Esta calibración tarda solo algunos segundos. Proceda cuando indique “Calibration is FINISHED” a revisar si los parámetros están correctos (símbolo de check de color verde) o fuera de rango (equis de color rojo).
- 7.3.12** Si la calibración es correcta vaya a “Print” en la parte inferior derecha de esta pantalla e imprima como archivo .pdf el registro de calibración, guárdelo con la fecha y una indicación del parámetro calibrado en D:\Registro de calibración del LTQ XL. Si no es correcta repítala.
- 7.3.13** Seleccione en la pantalla de calibración “Mass calibration” y “Mass and Resolution Calibration”. Asegúrese que no está seleccionada la opción “Set Instrument to standby when finish” y presione “start”. Esta calibración tarda alrededor de 10 minutos. Cuando indique “Calibration is FINISHED” proceda a revisar si los parámetros están correctos (símbolo de check de color verde) o fuera de rango (equis de color rojo). Vaya a “Print” en la parte inferior derecha de esta pantalla e imprima como archivo .pdf el registro de calibración, guárdelo con la fecha y una indicación del parámetro calibrado en D:\Registro de calibración del LTQ XL.
- 7.3.14** Repita si alguno de los parámetros está fuera de rango la calibración seleccionando solo ese parámetro.
- 7.3.15** Seleccione “Positive Ion Mode-Electron Multiplier Gain” en la pantalla de calibración. Asegúrese que no está seleccionada la opción “Set Instrument to standby when finish” y presione “start”. Esta calibración tarda alrededor de 10 minutos. Cuando indique “Calibration is FINISHED” proceda a revisar si los parámetros están correctos (símbolo de check de color verde) o fuera de rango (equis de color rojo). Vaya a “Print” en la parte inferior derecha de esta pantalla e imprima como archivo .pdf el registro de calibración, guárdelo con la fecha y una indicación del parámetro calibrado en D:\Registro de calibración del LTQ XL. Es común que esta calibración haya que repetirla 1 o 2 veces.
- 7.3.16** Seleccione luego “Isolation Waveforms” y “Activation Waveforms” en la pantalla de calibración. Asegúrese que no está seleccionada la opción “Set Instrument to standby when finish” y presione “start”. Esta calibración tarda alrededor de 5 minutos. Cuando indique “Calibration is FINISHED” proceda a revisar si los parámetros están correctos o fuera de rango. Imprima como archivo .pdf el registro de calibración, guárdelo con la fecha

| | | |
|--|------------------|------------------|
| DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES | VERSIÓN 03 | PAGINA: 11 de 25 |
| USO Y MANEJO DEL CROMATOGRFO LÍQUIDO VANQUISH CON DETECTOR DE MASAS POR TRAMPA DE IONES (LC/MS LTQ XL) | P-DCF-ECE-TOX-07 | |

y una indicación del parámetro calibrado en D:\Registro de calibración del LTQ XL. Es común que la calibración "Activation Waveforms" haya que repetirla 1 o 2 veces.

7.3.17 Si el trabajo que va a realizar después de la calibración incluye generación de iones con carga negativa prosiga en el punto siguiente si no pase al lavado.

7.3.18 Vaya al programa "LTQ Tune" al menú "file" seleccione "open", escoja el archivo de tuning: "ESITune Neg". Espere unos dos minutos. Para hacer cambios en los parámetros del tuning, vaya al manual: "LTQ Series Getting Started Guide" (3.4), en los procedimientos "Monitoring the Mass Spectrum of the Calibration Solution", "Tuning the Mass Spectrometer Automatically in the ESI Mode" (páginas 61 y 66 respectivamente).

7.3.19 Seleccione seguidamente "Negative Ion Mode-Electron Multiplier Gain" en la pantalla de calibración. Asegúrese que no está seleccionada la opción "Set Instrument to standby when finish" y presione "start". Esta calibración tarda alrededor de 10 minutos. Cuando indique "Calibration is FINISHED" proceda a revisar si los parámetros están correctos o fuera de rango. Imprima como archivo pdf el registro de calibración, guárdelo con la fecha y una indicación del parámetro calibrado en D:\Registro de calibración del LTQ XL en la subcarpeta del año que corresponda. Si un parámetro esta fuera de rango será necesario repetir calibración.

7.3.20 Lave la jeringa y la tubería infundiendo acetona y metanol a 100 µL/min.

7.3.21 En este punto hay que definir cual trabajo se va a realizar con el equipo: para infusión directa de bajo flujo para analitos vaya a 7.6. Si quiere hacer un tuning de alto flujo con el analito y optimizar el MS/MS siga en 7.7. Vaya al punto 7.4. para preparación de fase móvil.

7.4 Preparación de fase móvil.

7.4.1 Tome las botellas que se encuentran encima del cromatógrafo líquido, saque la tubería que está adentro y colóquela dentro de una bolsa ziploc nueva sin tocar ninguna superficie. Lleve las botellas a la capilla de extracción de gases.

7.4.2 Hay una botella para agua (D), una para metanol u otro disolvente de limpieza(A), una para acetonitrilo u otro disolvente para fase móvil (C), una para el buffer (B), una para la disolución de lavado de la jeringa del inyector y otra para la disolución de lavado de sellos. Respete el contenido de cada botella, no las intercambie. La botella para el agua y la del buffer siempre deben lavarse con agua y jabón, se deben enjuagar con etanol, hornearse 1 hora a 120 ° C y enjuagarse con la sustancia que van a contener.

7.4.3 Calcule la cantidad necesaria de cada disolvente o disolución según el método que vaya a utilizar y el número de muestras que vaya a correr. Tome en cuenta que el volumen mínimo para las botellas es de alrededor de 150 mL.

Nota 5 Cuando se utiliza disolventes calidad LC/MS, el agua tipo I recién recolectada o agua calidad LC/MS no es necesario filtrar los eluentes ni el lavado del ALS o de sellos.

7.4.4 Coloque en una capilla de extracción de gases el sistema de filtración para HPLC sobre papel kraft o aluminio. Coloque una membrana de nylon de 47 mm y 0,22 µm en el sistema y aplique vacío. En el caso de la disolución de lavado de la jeringa y la de lavado de sellos puede reutilizarse lo que hay en la botella, si es la misma que se necesita, filtrándolo de nuevo.

| | | |
|--|------------------|------------------|
| DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES | VERSIÓN 03 | PAGINA: 12 de 25 |
| USO Y MANEJO DEL CROMATOGRFO LÍQUIDO VANQUISH CON DETECTOR DE MASAS POR TRAMPA DE IONES (LC/MS LTQ XL) | P-DCF-ECE-TOX-07 | |

7.4.5 Filtre las disoluciones en el siguiente orden (enjuagando tres veces): metanol u otro disolvente que indique el método, disolución de lavado de la jeringa del autoinyector, disolución para lavado de sellos, acetonitrilo (u otro disolvente), agua, y buffer (según el método para el que está preparando el equipo).

7.4.6 Deposite el filtrado en las botellas del HPLC correspondientes. Coloque las botellas encima del equipo y ponga la tubería correspondiente dentro de la botella, asegúrese que el filtro llegue hasta el fondo.

7.5 Purga de líneas y de columna:

7.5.1 Utilice la siguiente figura para identificar los componentes de la bomba.

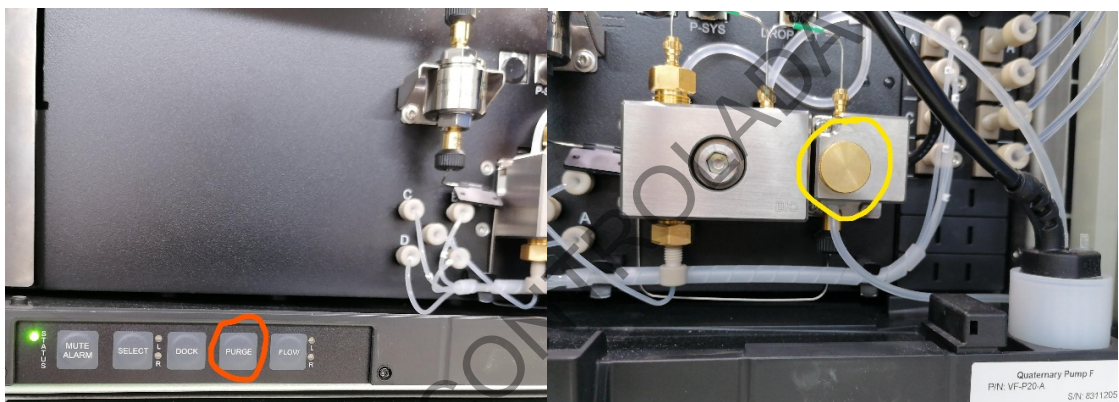


Figura 5 Bomba Vanquish Quaternary Pump

7.5.2 Revise que la válvula de purga (círculo amarillo) de la bomba del HPLC esté abierta girándola a la izquierda. Además, elimine si es necesario los desechos en recipientes dentro de una capilla de extracción de gases según el manual de salud y seguridad. Cerciérese que la línea de desechos esté conectada a la botella destinada para tal fin, si no es así conéctela Vacíe en la pila el agua de la botella plástica que se encuentra en la parte de atrás del generador de nitrógeno.

7.5.3 Ingrese al programa "Xcalibur" mediante el acceso directo en la computadora. En la parte derecha de la pantalla de un clic sobre "Thermo Scientific SII for Xcalibur". En la parte inferior aparece el ícono "Direct Control". De un clic en ese ícono. Ver figura siguiente.

| | | |
|--|------------------|------------------|
| DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES | VERSIÓN 03 | PAGINA: 13 de 25 |
| USO Y MANEJO DEL CROMATOGRFO LÍQUIDO VANQUISH CON DETECTOR DE MASAS POR TRAMPA DE IONES (LC/MS LTQ XL) | P-DCF-ECE-TOX-07 | |

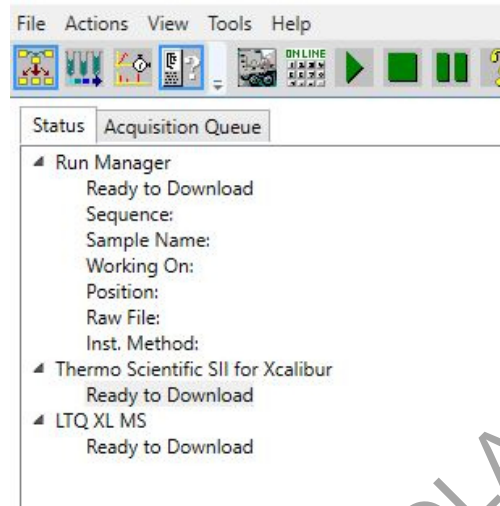


Figura 6 Ingreso a SII por Xcalibur

- 7.5.4** En el menú principal del SII vaya a "Home" y revise que los tres módulos tengan un "check" e indiquen "connect"
- 7.5.5** Revise si el equipo se quedó sin lavado de sellos en algún momento, para hacerlo vaya al menú principal del SII en la opción "Pump Module" –"More Options" en "Rear Seal Wash". Si en "status" dice "Operational" pase a 7.5.7, si no, cambie la opción "Idle" por "Active" y presione "enter".
- 7.5.6** Observe que el líquido del lavado de sellos empiece a fluir hasta que llegue al sensor ubicado en la parte inferior izquierda de la bomba. Salga de esta pantalla.
- 7.5.7** En la pantalla de selección de flujos y canales (ver figura 7) seleccione los canales A y D con un 50% para cada uno.
- 7.5.8** En el módulo de la bomba presione "PURGE" Ver Figura 5, botón señalado en naranja. La bomba empieza a purgar los canales A y D por 5 minutos a 3 mL/min.
- 7.5.9** Espere a que termine la purga anterior y haga lo mismo para los canales B y C.
- 7.5.10** Cierre la válvula de purga girando en el sentido del reloj hasta que llegue al final y presionando suave.
- 7.5.11** Purgue la botella de lavado del ALS (solo si la cambió). Para hacerlo vaya al menú principal del SII y vaya a "Sampler Module", en "Needle Wash" seleccione "Purge Needle Wash"

| | | |
|---|------------------|------------------|
| DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES | VERSIÓN 03 | PAGINA: 14 de 25 |
| USO Y MANEJO DEL CROMATOGRAFO LÍQUIDO VANQUISH CON DETECTOR DE MASAS POR TRAMPA DE IONES (LC/MS LTQ XL) | P-DCF-ECE-TOX-07 | |

7.5.12 Vaya luego a "Pump Module" en "Flow/Pressure" seleccione los canales y porcentajes de eluentes indicados en el cuadro siguiente. Ver Figura 7

| Composición | Flujo ($\mu\text{L}/\text{min}$) | Tiempo (min) |
|--|--------------------------------------|--------------|
| Metanol u otro disolvente de lavado (A) 100% | 50% flujo trabajo de la columna* | 5 |
| Metanol u otro disolvente de lavado (A) 100% | 100 % flujo de trabajo de la columna | 5 |
| ACN u otro (C) 100 % | 100 % flujo de trabajo de la columna | 5 |
| ACN u otro (C)/Agua (D) 50%/50% | 100 % flujo de trabajo de la columna | 5 |
| ACN u otro (C)/Buffer (B) 10%/90% | 100 % flujo de trabajo de la columna | 10 |

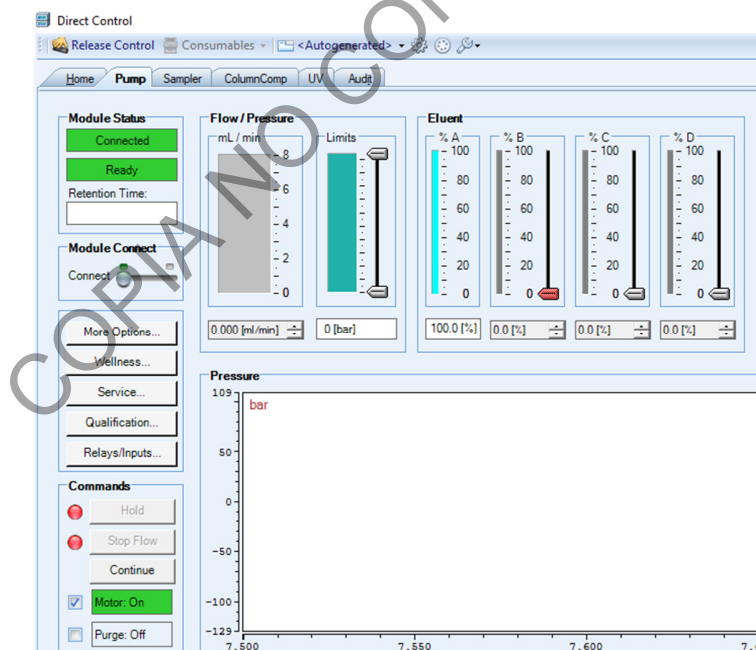



Figura 7 Pantalla de selección de flujos, canales y proporciones de la bomba Vanquish

7.5.13 Vaya a "Pump Module" y pare la bomba dando clic en "Stop Flow". Para que la bomba vuelva a funcionar es necesario dar un clic en "Continue"

| | | |
|--|------------------|------------------|
| DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES | VERSIÓN 03 | PAGINA: 15 de 25 |
| USO Y MANEJO DEL CROMATOGRFO LÍQUIDO VANQUISH CON DETECTOR DE MASAS POR TRAMPA DE IONES (LC/MS LTQ XL) | P-DCF-ECE-TOX-07 | |

7.6 Infusión directa de bajo flujo para analitos para modo ESI:

- 7.6.1** Cambie si es necesario la configuración del equipo siguiendo el procedimiento del manual: "LTQ Series Getting Started Guide" (3.4): "Setting Up the Syringe Pump for Tuning and Calibration" en la página 55. Es la misma configuración que se utiliza para la verificación/calibración.
- 7.6.2** Saque de refrigeración la disolución de analito que desea inyectar al equipo por infusión y espere aproximadamente 15 minutos a que alcance temperatura ambiente. Es preferible realizar la infusión de compuestos individuales, no de mezclas.
- 7.6.3** Tome en cuenta que para inyectarle al equipo directamente una disolución, esta debe de cumplir una serie de requisitos.
- Debe estar libre de matriz, debe contener solamente disolventes o buffer que sean compatibles con LC/MS (volátiles).
 - Debe tener una concentración de analito (os) menor a 100 µg/mL para evitar contaminaciones en el equipo.
 - Idealmente debe ser filtrada antes con un filtro de membrana de nylon o teflón de 0,22µm.
- 7.6.4** Lave una jeringa de 500 µL para infusión directa con acetona y metanol.
- 7.6.5** Cargue la jeringa con metanol, elimine las burbujas, inserte la aguja en el inyector manual y colóquela en el porta-jeringa del mecanismo de infusión.
- 7.6.6** Vaya al software "LTQ Tune" y de un clic en seleccione "Syringe Pump"  En la pantalla que aparece, programe el tipo y el volumen de la jeringa que está utilizando, programe la velocidad de flujo en 100 µL/min y seleccione "on" para encender el mecanismo de infusión (Ver Figura No. 2). Pase toda la jeringa con metanol y repita con acetona de la misma manera.
- 7.6.7** Realice la infusión de analito comenzando con un flujo de 5 µL/min, aumente hasta 20 µL/min si la señal para el ion molecular es muy baja (M+H o M-H)
- 7.6.8** En el menú principal del LTQtune vaya a la opción "File" y seleccione "Load Tune File" y seleccione el archivo "ESITune Pos.LTQtune" si va a realizar infusión de analito en modo positivo o el archivo "ESITune Neg.LTQtune" si va a emplear modo negativo.
- 7.6.9** Espere unos minutos hasta que aparezca la señal del analito (M+H ó M-H).
- 7.6.10** Utilice como base el tuning de calibración (ESITune Pos para ionización positiva y ESITune Neg para ionización negativa), optimice los parámetros de tuning para la masa del analito de interés siguiendo el manual: "LTQ Series Getting Started Guide" (3.4), en el capítulo 4: "Tuning with Your Analyte in the ESI Mode" si hay una mejoría en la intensidad de la señal de al menos un 15%, salve el archivo de tuning como se indica "Saving Your ESI Tune Method" en la página 70 utilizando como nombre: "Tune-analito-fecha.LTQtune". Si no hay mejoría vuelva a cargar el tuning ESITune-pos.LTQtune o ESITune Neg.LTQtune.

7.7 Tuning de alto flujo con el analito y optimización MS/MS (ESI):

- 7.7.1** Este proceso debe llevarse a cabo una vez que se haya realizado la infusión del analito en bajo flujo y por lo tanto se tenga un tuning específico para el analito o familia de compuestos.
- 7.7.2** En el proceso de desarrollo de un método de análisis por LC/MS es necesario crear un archivo de tuning específico para el analito (o por familia de compuestos) con las condiciones de flujo y la fase móvil que se va a tener en el método definitivo (alto flujo).

| | | |
|--|------------------|------------------|
| DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES | VERSIÓN 03 | PAGINA: 16 de 25 |
| USO Y MANEJO DEL CROMATOGRFO LÍQUIDO VANQUISH CON DETECTOR DE MASAS POR TRAMPA DE IONES (LC/MS LTQ XL) | P-DCF-ECE-TOX-07 | |

Por lo tanto, debe conocerse esta información previamente. Debe prepararse el equipo como se indica en 7.1 a 7.5 con las disoluciones y condiciones esperadas para el método que se está desarrollando.

- 7.7.3** Previo a la infusión en alto flujo debe cambiarse la configuración del equipo para poder introducir el analito por infusión y el flujo del LC al mismo tiempo en el MS. Cambie la configuración del equipo siguiendo el procedimiento del manual: "LTQ Series Getting Started Guide" (3.4): "Setting Up the Inlet for High-Flow Infusion in the ESI Mode" en la página 81 hasta la 88.
- 7.7.4** Saque de refrigeración la disolución de analito o mezcla que desea inyectar al equipo por infusión y espere a que alcance temperatura ambiente. En este caso ya se conoce cuál es el ion molecular del analito (normalmente M+H para iones positivos o M-H para iones negativos) y es posible mezclarlos siempre y cuando no tenga el mismo ion molecular y realizar la infusión de mezclas de compuestos por familia.
- 7.7.5** Tome en cuenta que para inyectarle al equipo directamente una disolución, esta debe de cumplir una serie de requisitos:
- Debe estar libre de matriz, debe contener solamente disolventes o buffer que sean compatibles con LC/MS (volátiles).
 - Debe tener una concentración de analito (os) menor a 100 µg/mL para evitar contaminaciones en el equipo.
 - Idealmente debe ser filtrada antes con un filtro de membrana de nylon o teflón de 0,22 µm.
- 7.7.6** En el programa "LTQ Tune" vaya al menú "file" seleccione "open", escoja el archivo de tuning que se desarrolló para el analito en bajo flujo ("Tune-analito-fecha.LTQTune") o use el archivo "ESI Tune pos" si no se hizo ninguno específico.
- 7.7.7** Cargue la jeringa con 500 µL de la disolución que desea infundir y vaya al software "LTQ Tune" y de un clic en "Syringe Pump" (Ver Figura 2). En la pantalla que aparece, programe el tipo y el volumen de la jeringa que está utilizando, programe la velocidad de flujo en 5 µL/min y seleccione "on" para encender el mecanismo de infusión.
- 7.7.8** Espere unos dos minutos hasta que vea los iones moleculares de los analitos en la pantalla del software. Optimice los parámetros de tuning para las masas de los analitos de interés siguiendo el manual: "LTQ Series Getting Started Guide" (3.4), en el capítulo 4: "Tuning with Your Analyte in the ESI Mode" página 90-95.
- 7.7.9** Para optimizar los parámetros de MS/MS y capturar datos del analito vaya al capítulo 5: "Acquiring ESI Sample Data Using Tune Plus" iniciando en la página 99 hasta 106 sin incluir "Setting Up the Inlet for Flow Injection Analyses in the ESI Mode" y siguientes.
- 7.7.10** De este experimento se obtienen las condiciones optimizadas para los parámetros de la ionización, así como la información de la energía de colisión y espectro MS/MS de los analitos. Esta información se utiliza para la elaboración de un método analítico como se indica en 7.9

7.8 Análisis de muestras mediante LC/MS con inyección en secuencia.


- 7.8.1** Este procedimiento se emplea para el análisis de muestras de rutina mediante LC/MS con ESI utilizando métodos de análisis y de procesamiento que fueron desarrollados con anterioridad y se encuentran optimizados. Siga el procedimiento indicado en 7.8 tanto para la secuencia de verificación del equipo como para la corrida de muestras de rutina.

| | | |
|--|------------------|------------------|
| DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES | VERSIÓN 03 | PAGINA: 17 de 25 |
| USO Y MANEJO DEL CROMATOGRFO LÍQUIDO VANQUISH CON DETECTOR DE MASAS POR TRAMPA DE IONES (LC/MS LTQ XL) | P-DCF-ECE-TOX-07 | |

- 7.8.2** Antes de seguir recuerde que necesita tener el equipo con la configuración correcta para inyectar mediante el LC, debe tener instalado el electrodo correcto (ESI) según el método a utilizar, además la columna analítica debe ser la indicada para el método.
- 7.8.3** Realizar los procedimientos de preparación del equipo (7.1 a 7.5).
- 7.8.4** Cierre el programa "LTQ Tune" y abra el programa "Xcalibur" mediante el acceso directo que se encuentra en el escritorio de la computadora que controla el equipo. Se abre una pantalla cuyo menú es el de la imagen siguiente. Seleccione en esta pantalla "Sequence Setup" (señala en círculo rojo).



Figura 8 Menú del Xcalibur

- 7.8.5** Utilice una secuencia anterior como machote para crear una secuencia nueva.
- 7.8.6** Modifique la secuencia que está usando como base según la cantidad de inyecciones (muestras y controles) y de la descripción de muestras y controles. El contenido tanto de la secuencia de verificación como de la secuencia de muestras de rutina está descrito en los Procedimientos específicos.
- 7.8.7** El orden de la secuencia de inyección está definido en el método analítico a utilizar, pero en general se inyecta primero una secuencia de verificación del sistema y si no se detectan problemas se inyecta la secuencia. Se inicia con la inyección de al menos un blanco de corrida (solo fase móvil), luego los controles negativo y positivo (s) de una matriz y luego las muestras de la matriz correspondiente. Si se tienen más de 10 muestra de una matriz es necesario repetir la inyección de un control positivo. Luego se hace lo mismo con las demás matrices y al final un blanco de corrida con el método de lavado.
- 7.8.8** Para la última línea cambie el método por el lavado automático ("Lavado ll x aa", donde ll se refiere al largo de la columna en mm y aa al ancho de la columna en mm).
- 7.8.9** Coloque los viales en el mismo orden que en la secuencia en las bandejas del automuestreador.
- 7.8.10** En la pantalla "Sequence Setup", en el menú "file" seleccione "save as" y guarde la secuencia como ddmmaa y la letra "A" si es la primera secuencia del día, "B" la segunda y así sucesivamente, además agregue más información que describa la secuencia. Debe guardarse en: D\LTQ-XL\Sequence\ año. Aparece la pantalla "File Summary Information" en el espacio "Comment" describa el tipo de análisis y la fecha de extracción.
- 7.8.11** Termine de llenar la información necesaria en la bitácora de control de uso de equipo del LC/MS LTQ XL. En la parte superior de la pantalla "Sequence Setup" busque el ícono  y de un clic para iniciar la secuencia.
- 7.8.12** Aparece una pantalla como la de la imagen siguiente. En esta solo debe cambiar los campos "Run Rows", ingrese en este el rango de líneas de la secuencia que se desea correr y en el campo "After Sequence Set System" seleccione la opción "Stand by". De un clic en "OK".

| | | |
|--|------------------|------------------|
| DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES | VERSIÓN 03 | PAGINA: 18 de 25 |
| USO Y MANEJO DEL CROMATOGRFO LÍQUIDO VANQUISH CON DETECTOR DE MASAS POR TRAMPA DE IONES (LC/MS LTQ XL) | P-DCF-ECE-TOX-07 | |

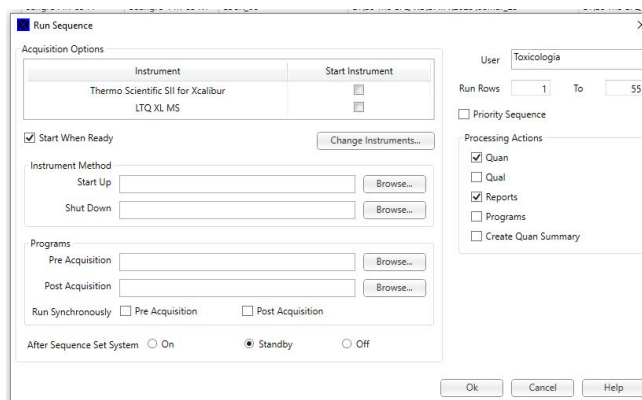


Figura 11 Pantalla de corrida de secuencias

7.8.13 Tenga en cuenta que, si en el método se está controlando la temperatura del automuestreador, el equipo no inyectará hasta que se alcance y establezca esta temperatura. Termine de llenar el formulario "Lista de chequeo para uso de equipo instrumental (LC/MS)" y guárdelo en D:\LC-MS LTQ-XL\LISTA DE CHEQUEO con la fecha como nombre del archivo.

7.9 Desarrollo de un método analítico LC/MS:

7.9.1 El equipo utiliza un método de análisis que incluye los parámetros para la bomba y el automuestreador del LC y para el espectrómetro de masas. Para el desarrollo del método para la bomba y el automuestreador refiérase 3.1 y 3.2. Utilice la información sobre la fase móvil, el flujo, el tipo de columna, la temperatura de la columna, el volumen de inyección y todos los parámetros de la referencia que está utilizando.

7.9.2 Para los parámetros del LTQ-XL vaya al manual "LTQ Series Getting Started Guide" (3.4) en el capítulo "What Types of Experiments Can I Perform with the LTQ Series Mass Spectrometer?" en la página 14. Si tiene dudas consulte al encargado del equipo.

7.10 Mantenimiento y solución de problemas.

7.10.1 Cambio de prefiltro.

- Este prefiltro se ubica en el horno de la columna debajo de la columna, en la parte izquierda del LC. Debe cambiarse cada 300 inyecciones aproximadamente.
- Si el filtro está dentro de un portafiltros, para hacer el cambio desarme el portafiltros con la llave apropiada, sustituya la frita interna por una igual y ármelo de nuevo. Si se trata de un prefiltro de una sola pieza, sustitúyalo completo.

7.10.2 Limpieza del "Ion Transfer Capillary", "Ion Sweep Cone" y "Spray Cone"

- Este procedimiento debe realizarse cada dos a cuatro secuencias de rutina como mínimo.
- En el manual: "LTQ Series Getting Started Guide" (3.4) en las páginas 124-127 se describe el procedimiento para realizar esta tarea e instalar de nuevo los componentes.

7.10.3 Cambio de suministro de Helio.

- Para realizar el cambio el detector de masas debe estar en modo de reposo ("stand by"). En el programa "LTQ Tune" en la parte superior izquierda debe estar el símbolo



| | | |
|---|------------------|------------------|
| DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES | VERSIÓN 03 | PAGINA: 19 de 25 |
| USO Y MANEJO DEL CROMATOGRAFO LÍQUIDO VANQUISH CON DETECTOR DE MASAS POR TRAMPA DE IONES (LC/MS LTQ XL) | P-DCF-ECE-TOX-07 | |

- Cambie el cilindro cuando la presión este en 400 p.s.i. Si se está en medio de algún análisis o si tiene muestras pendientes, se puede terminar con este trabajo antes de cambiar el cilindro, pero este no debe bajar de 350 p.s.i.
- Traiga un nuevo cilindro de Helio hasta el cuarto de instrumentos y retire la capucha de protección y el sello plástico que está sobre la válvula de presión. Colóquelo al lado del cilindro que desea cambiar.
- Limpie con papel toalla impregnada con etanol al 95% la salida de la válvula del cilindro.
- Cierre la llave principal del cilindro de helio. Sustituya el cilindro por el nuevo e instale el manómetro. Abra la válvula principal del nuevo cilindro. La presión debe estar entre 1900 y 2500 p.s.i.
- Moje la conexión del manómetro con el cilindro con líquido detector de fugas Swagelock Snoop, espere para ver si se forman burbujas que indican fugas. Limpie este líquido con papel toalla desechable impregnada con etanol al 95 %.
- Anote en la bitácora de control de uso de equipo del LC/MS LTQ XL que se cambió el cilindro de Helio.

7.10.4 Cambio de columna cromatográfica.

- La columna cromatográfica está dentro del horno de la columna que se encuentra en la compuerta izquierda del automuestreador.
- Revise la columna que está instalada y cerciórese que difiere de la que necesita utilizar.
- Desconecte la columna de las tuberías de entrada y salida y el prefiltro. Gire en dirección contraria a las manecillas del reloj para aflojar.
- Conecte la columna que va a necesitar conectando las tuberías de entrada y salida y el prefiltro.
- Cuando efectúe el procedimiento de purga columna (7.5) revise que no hay fugas en las tuberías que acaba de conectar. Si hay fuga aprete un poco más las conexiones.

7.10.5 Mantenimiento del LTQ XL.

- Para desinstalar e instalar la interfase API refiérase al "LTQ Series Hardware Manual" (3.5) en las páginas 65-70.
- Busque la información para mantenimiento del electro de ESI en la página 86 del "LTQ Series Hardware Manual" (3.5).

7.10.6 Solución de problemas.

- Para diagnóstico de problemas en el LC Vanquish refiérase a los manuales de la bomba (3.1), Autoinyector (3.2) o termostato de columna (3.3)
- Para diagnóstico de problemas en el LTQ-XL refiérase al "LTQ Series Hardware Manual" (3.5), capítulo 7, páginas 151-153.
- Si se requiere realizar algún mantenimiento en el equipo para solucionar algún problema más allá del mantenimiento de rutina comuníquese con el encargado de equipo, quién a su vez contactará al servicio técnico si es necesario.

| | | |
|--|------------------|------------------|
| DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES | VERSIÓN 03 | PAGINA: 20 de 25 |
| USO Y MANEJO DEL CROMATOGRFO LÍQUIDO VANQUISH CON DETECTOR DE MASAS POR TRAMPA DE IONES (LC/MS LTQ XL) | P-DCF-ECE-TOX-07 | |

8 Criterios de Aceptación o Rechazo de Resultados.

Estos criterios deben estar definidos en los procedimientos de análisis que utilizan este equipo. Además, deben cumplirse todos los lineamientos indicados para espectrometría de masas indicados en el PON para el Manejo General de Casos en la Sección de Toxicología Forense.

9 Cálculos y evaluación de la incertidumbre.

N/A

10 Reporte de Análisis y Resultados.

N/A

11 Medidas de Seguridad y Salud Ocupacional.

- Si ocurre un derrame de algún reactivo refiérase al Manual de Seguridad y Salud Ocupacional del Departamento de Ciencias Forenses.
- Si ocurre contacto de algún reactivo con los ojos, acuda inmediatamente a la ducha para ojos que se encuentra en el laboratorio.
- Si ocurre algún derrame importante de disolventes o ácido en la ropa o la piel utilice la ducha que se encuentra en el laboratorio.
- Siempre que salga del área de laboratorios, deseche los guantes, lávese las manos y deje la gabacha en la entrada del mismo.

12 Simbología.

AAAA: Año en formato de cuatro dígitos.

API: "Atmospheric Pressure Ionization" o ionización a presión atmosférica.

AS: Automuestreador (del inglés "autosampler")

DCF: Departamento de Ciencias Forenses.

ddmmmaa: se refiere a día mes y año, como por ejemplo 07dic06.

ESI: "Electrospray ionization" o ionización por electro-spray.

IPA: Isopropanol.

LC/MS: cromatografía líquida acoplada con espectrometría de masas.

LC: Cromatografía líquida.

M+H: Indica el peso molecular de un compuesto más un protón.

MS/MS: Espectrometría de masas-masas ó MS².

MS: Espectrometría de masas.

NL: "Normalization Level" o nivel normalizado, es la abundancia relativa del pico base en LC/MS.

P-DCF-GCG-JEF-001-R3, Versión 01

Emitido y Aprobado por Unidad de Gestión de Calidad

| | | |
|--|------------------|------------------|
| DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES | VERSIÓN 03 | PAGINA: 21 de 25 |
| USO Y MANEJO DEL CROMATOGRFO LÍQUIDO VANQUISH CON DETECTOR DE MASAS POR TRAMPA DE IONES (LC/MS LTQ XL) | P-DCF-ECE-TOX-07 | |

N/A: no aplica.

p.a.: calidad para análisis o calidad reactivo.

p.a.r.: calidad para análisis de residuos o calidad cromatográfica.

PON: Procedimiento de Operación Normado.

SCD: Solicitud Cambio Documental.

SGC: Sistema de Gestión de Calidad.

UAP: Ultra alta pureza.

UGC: Unidad de Gestión de Calidad

UHP: Ultra High Purity

13 Terminología:

Analito: sustancia o componente que se desea determinar.

Blanco de corrida: inyección de fase móvil en el LC/MS para demostrar ausencia de analitos de interés antes de la inyección de una muestra incógnita.

Disolución de calibración del LTQ XL: Disolución de varios compuestos que cubren el rango de masas del espectrómetro y que se utiliza para verificarlo y/o calibrarlo. Puede comprarse preparado o prepararse.

Espectro de masas: Patrón de fragmentación del analito que presenta los diferentes iones en los que la molécula se fragmentó.

Estándar interno: sustancia de comportamiento similar a los analitos de interés que se agrega a todas las muestras/blancos/patrones para evidenciar las pérdidas de analitos que ocurran durante el proceso de análisis.

Muestra incógnita: muestra que se desea analizar en el LC/MS LTQ XL.

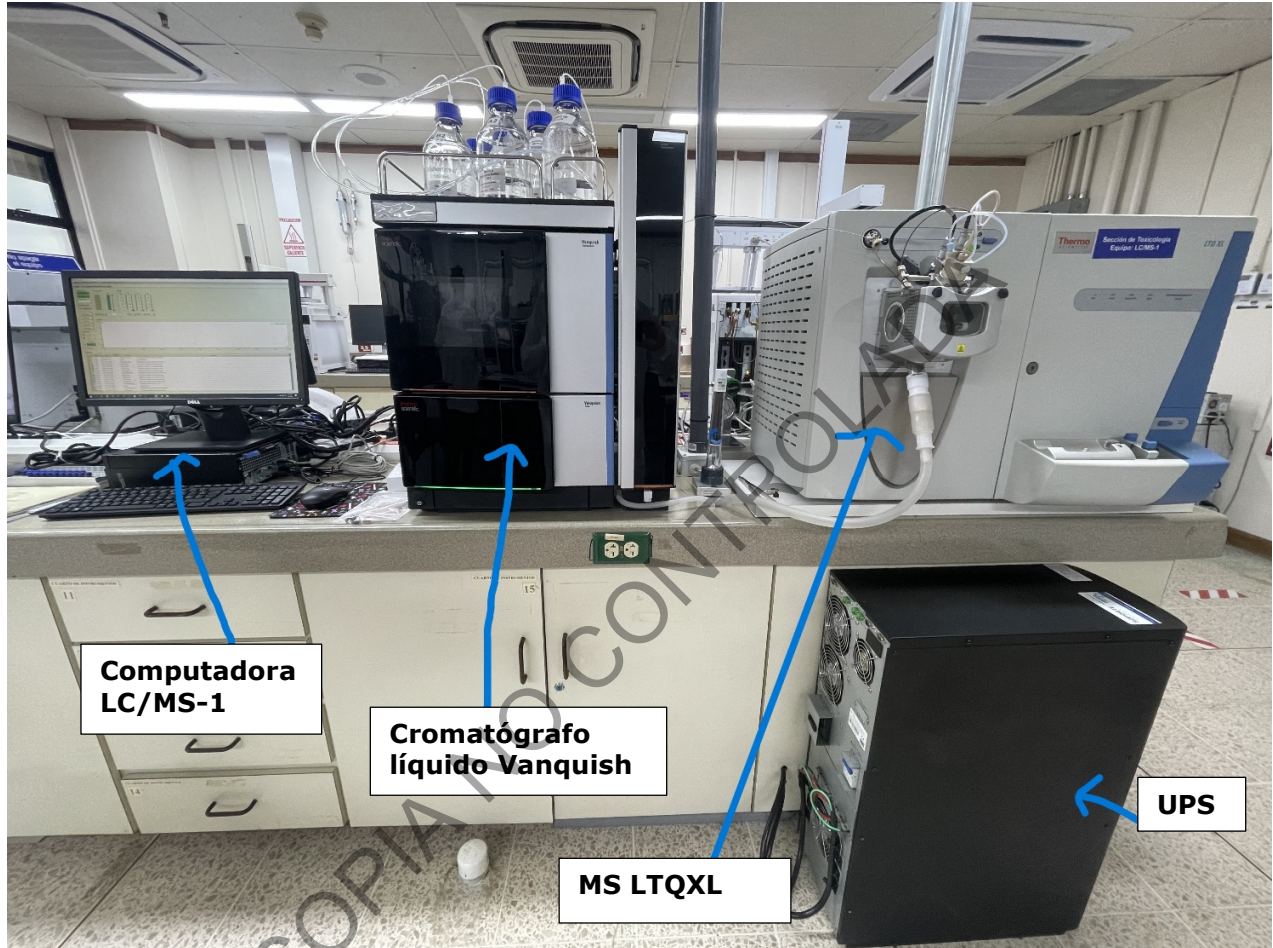
14 Anexos

| No. de Anexo | Nombre del Anexo |
|--------------|---|
| 1 | Vista general del LC/MS-1 |
| 2 | Preparación de reactivos |
| 3 | Espectro observado en el "Tune Plus" para disolución de calibración de rango normal de masas del LTQ XL |
| 4 | Esquema de la bomba de vacío de piso |

| | | |
|---|------------------|------------------|
| DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES | VERSIÓN 03 | PAGINA: 22 de 25 |
| USO Y MANEJO DEL CROMATOGRAFO LÍQUIDO VANQUISH CON DETECTOR DE MASAS POR TRAMPA DE IONES (LC/MS LTQ XL) | P-DCF-ECE-TOX-07 | |

Anexo 1

Vista general del LC/MS-1



| | | |
|---|------------------|------------------|
| DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES | VERSIÓN 03 | PAGINA: 23 de 25 |
| USO Y MANEJO DEL CROMATOGRAFO LÍQUIDO VANQUISH CON DETECTOR DE MASAS POR TRAMPA DE IONES (LC/MS LTQ XL) | P-DCF-ECE-TOX-07 | |

Anexo 2
PREPARACION DE REACTIVOS

Disolución de lavado de jeringa (50:50) Agua:Isopropanol

En una probeta mida 500 mL de Isopropanol HPLC o LCMS, pase a la botella de lavado de jeringa del LC/MS. Mida luego 500 mL de Agua tipo I y deposítelos en la misma botella.

Disolución de lavado de sellos (90:10) Agua:Metanol

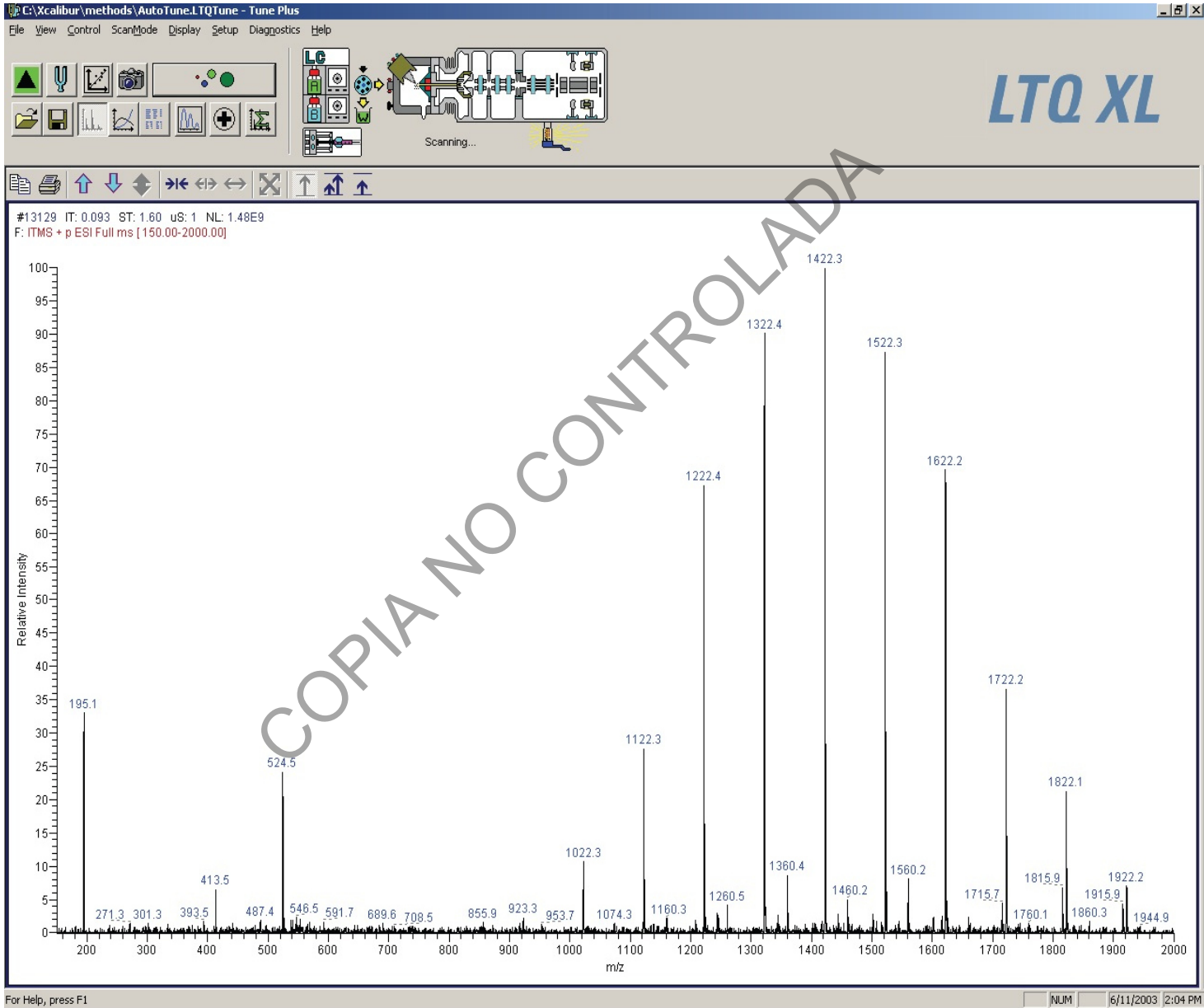
En una probeta mida 100 mL de Metanol p.a.r, pase a la botella de lavado de sellos del LC/MS. Mida luego 900 mL de Agua tipo I y deposítelos en la misma botella.

COPIA NO CONTROLADA

| | | |
|--|------------------|------------------|
| DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES | VERSIÓN 03 | PAGINA: 24 de 25 |
| USO Y MANEJO DEL CROMATOGRFO LÍQUIDO VANQUISH CON DETECTOR DE MASAS POR TRAMPA DE IONES (LC/MS LTQ XL) | P-DCF-ECE-TOX-07 | |

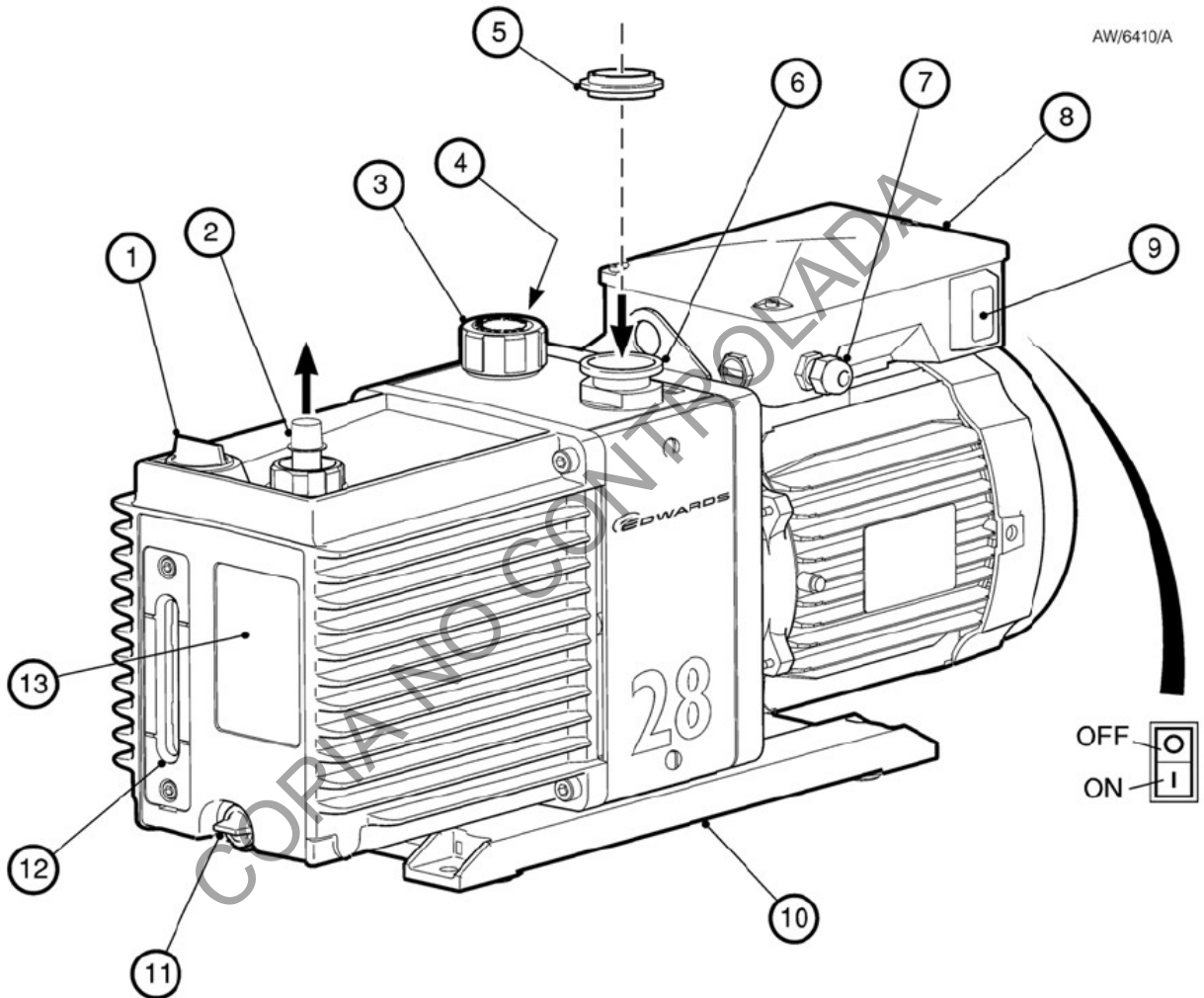
Anexo 3

Espectro observado en el "Tune Plus" para disolución de calibración de rango normal de masas del LTQ XL



| | | |
|---|------------------|------------------|
| DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES | VERSIÓN 03 | PAGINA: 25 de 25 |
| USO Y MANEJO DEL CROMATOGRAFO LÍQUIDO VANQUISH CON DETECTOR DE MASAS POR TRAMPA DE IONES (LC/MS LTQ XL) | P-DCF-ECE-TOX-07 | |

Anexo 4
Esquema de las bombas de vacío de piso



3-Válvula de purga (ballast)

12-Ventana para visualización del aceite.