

	<p>DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES ORGANISMO DE INVESTIGACION JUDICIAL (OIJ) PODER JUDICIAL, COSTA RICA</p> <p>USO Y MANEJO DEL CROMATOGRAFO LÍQUIDO VANQUISH CON DETECTOR DE MASAS POR CUADRUPOLO-TRAMPA ORBITANTE (LC/MS Q-EXACTIVE) LC/MS-2</p>	<p>PROCEDIMIENTO DE OPERACIÓN NORMADO ESPECIFICO</p> <p>P-DCF-ECE-TOX-08</p>
	<p>VERSION: 02</p>	<p>Rige desde: 29/04/2022</p>

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

#### CONTROL DE CAMBIOS A LA DOCUMENTACIÓN

Versión	Fecha de Aprobación	Fecha de Revisión	Descripción del Cambio	SCD	Solicitado por
01	11/03/2020	29/04/2022	Versión Inicial del Procedimiento	003-2020	DAA
02	29/04/2022		Adaptación del procedimiento a nuevos prefiltros, nuevos métodos y mejoras a partir de auditorías	009-2022	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 02	PAGINA: 2 de 30
USO Y MANEJO DEL CROMATOGRFO LÍQUIDO VANQUISH CON DETECTOR DE MASAS POR CUADRUPOLO-TRAMPA ORBITANTE (LC/MS Q-EXACTIVE) LC/MS-2	P-DCF-ECE-TOX-08	

## 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 cuadrupolo-trampa orbitante LC/MS Q-Exactive.

## 2 Alcance

Este procedimiento es exclusivo para el equipo de Cromatografía Líquida acoplado con detector cuadrupolo-trampa orbitante Thermo Scientific (LC/MS-2).

El equipo consta de la bomba Vanquish con desgasificador incorporado, el automuestreador Vanquish con control de temperatura en la bandeja, un horno para columnas, el detector de masas por cuadrupolo-trampa orbitante Q-Exactive 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 mezclas 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 del HPLC Vanquish, Código M-EXT-ECE-TOX-91: Vanquish Column Compartments Operating Manual, 4827-3201 Revisión 2.0a September 2017.
- 3.2** Manuales del HPLC Vanquish, Código M-EXT-ECE-TOX-91: Vanquish Pumps Operating Manual, 4820-4405 Revisión 2.0a September 2017.
- 3.3** Manuales del HPLC Vanquish, Código M-EXT-ECE-TOX-91: Vanquish Split Samplers Operating Manual, 4828-5001 Revisión 2.1a September 2017.
- 3.4** Manuales del HPLC Vanquish, Código M-EXT-ECE-TOX-91: Vanquish UHPLC System Operating Manual, 4820-3601 Revisión 3.0a September 2017.
- 3.5** Manuales del LC-MS Q-exactive, Código M-EXT-ECE-TOX-92: Exactive Series Operating Manual, BRE0012255 Revision B July 2017.
- 3.6** Manuales del LC-MS Q-exactive, Código M-EXT-ECE-TOX-92: Ion Max and Ion Max-S API Source Hardware Manual, 97055-97044 Revisión E August 2009.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 02	PAGINA: 3 de 30
USO Y MANEJO DEL CROMATOGRFAO LÍQUIDO VANQUISH CON DETECTOR DE MASAS POR CUADRUPOLO-TRAMPA ORBITANTE (LC/MS Q-EXACTIVE) LC/MS-2	P-DCF-ECE-TOX-08	

**3.7** Manuales del LC-MS Q-exactive, Código M-EXT-ECE-TOX-92: Supplementary Information SPLITFLOW 310, Operating Instructions HIPACE 300 Turbopump, Leybold TURBOVAC I (x) Turbomolecular Pump Operating Instructions July 2017.

**3.8** Procedimiento Para la Elaboración de Procedimientos, Departamento de Ciencias Forenses. Organismo de Investigación Judicial (O.I.J.). Versión vigente.

**3.9** Q Exactive QuickStart Guide. Revision A-1288310. May 2011.

#### 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 Q-exactive

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 "B1", acetonitrilo u otro disolvente para la fase móvil "A2", metanol u otro disolvente de limpieza "A1", buffer "B2", 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 Q-Exactive (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-2)"

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).

Herramientas del LC-MS Q-exactive (ubicadas en gaveta debajo de la bomba).

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 Q-exactive (LC/MS-2): Cromatógrafo líquido Thermo Scientific, con bomba Vanquish S/N 8306242 con desgasificador por vacío en línea; Automuestreador Vanquish Split Sampler FT S/N 8306221; Compartimiento con temperatura controlada para la columna; Detector de masas por trampa de iones orbitante Q-Exactive S/N 02823L. Controlado por una computadora capaz de correr los programas "Thermo Q Exactive Tune" versión 2.9 y "Xcalibur" versión 4.1 o superior.

Lentes de seguridad.

P-DCF-GCG-JEF-001-R3, Versión 01

Emitido y Aprobado por Unidad de Gestión de Calidad

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 02	PAGINA: 4 de 30
USO Y MANEJO DEL CROMATOGRAFO LÍQUIDO VANQUISH CON DETECTOR DE MASAS POR CUADRUPOLO-TRAMPA ORBITANTE (LC/MS Q-EXACTIVE) LC/MS-2		P-DCF-ECE-TOX-08

Medidor de temperatura 0-50° C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ).

Membranas de filtración de nylon 47 mm con 0,22  $\mu\text{m}$  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  $>0^\circ\text{C}$  a  $10^\circ\text{C}$ .

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

Viales de polipropileno para filtración automática de muestras 12 x 32 mm con filtro de nylon de 0,22  $\mu\text{m}$  Mini-Uniprep Whatman UN203NPEAQU o similares.

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.

## 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  $\Omega/\text{cm}$  o agua calidad LC/MS. En el caso de calidad LC/MS debe pasarse el agua directamente a una botella limpia y pre enjuagada.

Disolución de calibración del Q Exactive para modo negativo: Pierce ESI Negative Ion Calibration Solution, Thermo Scientific 88324.

Disolución de calibración del Q Exactive para modo positivo: Pierce LTQ Velos ESI Positive Ion Calibration Solution, Thermo Scientific 88323.

Etanol al 95 % calidad industrial.

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.

P-DCF-GCG-JEF-001-R3, Versión 01

Emitido y Aprobado por Unidad de Gestión de Calidad

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 02	PAGINA: 5 de 30
USO Y MANEJO DEL CROMATOGRFAO LÍQUIDO VANQUISH CON DETECTOR DE MASAS POR CUADRUPOLO-TRAMPA ORBITANTE (LC/MS Q-EXACTIVE) LC/MS-2	P-DCF-ECE-TOX-08	

2	Análisis LC/MS	15 °C	26 °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

Nota 1 Si necesita apagar el Q Exactive de rutina o de emergencia, o encenderlo cuando se encuentra apagado refiérase al capítulo 6 del "Exactive Series Operating Manual" (3.5).

**7.1.1** Los pasos descritos en el apartado 7 son para la utilización del equipo con la interfase API con la sonda de HESI.

**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, apague la computadora, encienda el módulo de la bomba, el módulo del automuestreador y el compartimento de columna. Espere unos minutos para que el sistema se inicialice y luego encienda la computadora.

Nota 2 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-2 (Q Exactive) y llene con la fecha y hora, usuario y demás información que se solicita.

**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 26 °C.

**7.1.6** Abra el formulario "Lista de chequeo para uso de equipo instrumental (LC/MS-2)" (.pdf rellenable) y vaya completándolo.

**7.1.7** Revise el generador de nitrógeno que se encuentra a la derecha del LC, debajo de la mesa de trabajo, la luz indicadora "Service" debe estar apagada y la presión de salida en  $110 \pm 20$  p.s.i. Si al momento de la revisión el equipo está operando, espere a que el ciclo termine y se pause adecuadamente. Si la presión de nitrógeno es la esperada, indíquelo en la bitácora del equipo, sino repórtelo a la Líder Técnica o al encargado del equipo.

**7.1.8** Saque la bomba de vacío de piso de la mesa volteándola alrededor de 90°. Quite el cobertor metálico que la cubre. Revise que el nivel del aceite de la bomba de vacío de piso se encuentre entre la marca de mínimo y máximo como se ve en la siguiente figura.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 02	PAGINA: 6 de 30
USO Y MANEJO DEL CROMATOGRAFO LÍQUIDO VANQUISH CON DETECTOR DE MASAS POR CUADRUPOLO-TRAMPA ORBITANTE (LC/MS Q-EXACTIVE) LC/MS-2		P-DCF-ECE-TOX-08



Figura 1 Ventana de nivel de aceite de la bomba de piso

**7.1.9** Revise la bitácora para ver si es necesaria realizar el “gas ballast” de la bomba (debe hacerse cada semana como mínimo).

**7.1.10** Realice el “gas ballast” si es necesario, girando la válvula hasta la posición que se indica en la figura siguiente por 15 minutos, regrese la válvula a la posición original (cerrada), vuelva a poner el cobertor metálico y regrese luego la bomba a la posición original.



Figura 2 Válvula de “gas ballast” de la bomba de piso

**7.1.11** Si el nivel de aceite no es el correcto o tiene algún problema con el “gas ballast”, repórtelo a la Líder Técnica o al encargado del equipo.

**7.1.12** Antes de continuar, revise las luces indicadoras del Q Exactive (QE), las 3 primeras luces deben estar de color verde, como se indica en la imagen siguiente.



Figura 3 Luces indicadoras de estado del Q Exactive

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 02	PAGINA: 7 de 30
USO Y MANEJO DEL CROMATOGRFAO LÍQUIDO VANQUISH CON DETECTOR DE MASAS POR CUADRUPOLO-TRAMPA ORBITANTE (LC/MS Q-EXACTIVE) LC/MS-2	P-DCF-ECE-TOX-08	

**7.1.13** Si va a utilizar el LC

**7.1.13.1** Sume y anote en la bitácora de control de uso de equipo del LC/MS Q-Exactive 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.

**7.1.13.2** Revise que la columna que está instalada corresponda con la metodología que va a utilizar, si es necesario cambie de columna.

**7.1.14** Revise la botella de lavado de sellos que está encima del LC, si tiene menos de 100 mL proceda a preparar esta disolución como se indica en el Anexo 1.

**7.1.15** Inicie el programa "Q Exactive Tune" (QE Tune) mediante el acceso directo que se encuentra en el escritorio de la computadora que controla el equipo. Se abre una pantalla con la del Anexo 2.

**7.1.16** En el menú principal del "QE Tune" verifique las tres luces señaladas en rojo. Las dos primeras luces deben estar en color verde.



Figura 4 Menú principal del Q Exactive señalando los semáforos de estado.

**7.1.17** Ubique en panel de control del QE Tune la pestaña Vacuum, despliegue las opciones que están dentro de esta pantalla.

**7.1.18** Revise que las luces asociadas con el "fore vacuum" y "UHV" estén de color verde. Como se ve en la figura siguiente.

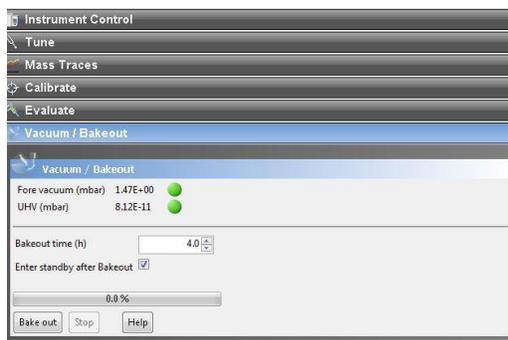


Figura 5 Indicadores del estado del vacío del QE

**7.1.19** Si las dos primeras luces del semáforo de estado o las luces de vacío mencionadas no están de color verde avise a la Líder Técnica o al Encargado del equipo.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 02	PAGINA: 8 de 30
USO Y MANEJO DEL CROMATOGRAFO LÍQUIDO VANQUISH CON DETECTOR DE MASAS POR CUADRUPOLO-TRAMPA ORBITANTE (LC/MS Q-EXACTIVE) LC/MS-2	P-DCF-ECE-TOX-08	

**7.1.20** Presione en el menú principal del QE Tune sobre la figura del detector Q- Exactive, aparecen tres símbolos, selecciones el símbolo verde para encender el detector de masas.



Figura 6 Encendido-pausa y apagado del QE

**7.1.21** Tome en cuenta que cuando encienda el instrumento, este empezará a escanear, el nitrógeno comenzará a fluir a la interfase HESI y el equipo aplicará alto voltaje a la sonda de HESI.

**7.1.22** Revise el estado de la calibración de exactitud de masa del equipo en el panel de control, en la pestaña "Calibrate" La calibración de exactitud de masa (Mass Calibration) debe realizarse cada 4 días idealmente. Si después de los 4 días el equipo no se va a utilizar puede dejarlo sin calibrar hasta que lo vaya a utilizar nuevamente. En la pantalla se indica la fecha de la última calibración. Si algún parámetro indica "overdue" significa que sobrepasó el tiempo límite de calibración. Ver figura siguiente.

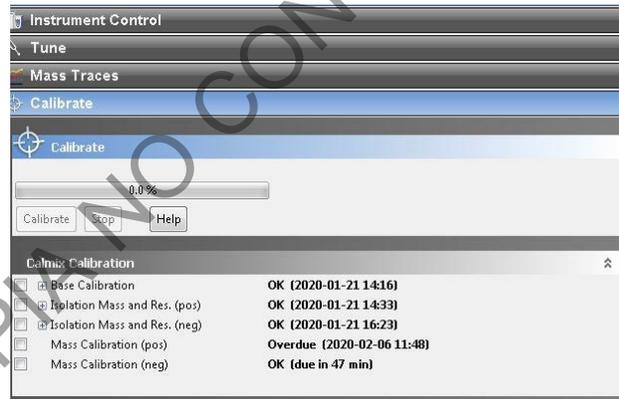


Figura 7 Indicación del estado de la calibración

**7.1.23** Si es necesario calibrar algún parámetro proceda según el siguiente cuadro. Si no, vaya a 7.5.12.

Calibración	Orden de apartados del PON
Solo "Mass Calibration (pos)"	7.2
Solo "Mass Calibration (neg)"	7.3
"Mass Calibration (pos)" + "Mass Calibration (neg)"	7.2 y 7.3

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 02	PAGINA: 9 de 30
USO Y MANEJO DEL CROMATOGRFAO LÍQUIDO VANQUISH CON DETECTOR DE MASAS POR CUADRUPOLO-TRAMPA ORBITANTE (LC/MS Q-EXACTIVE) LC/MS-2	P-DCF-ECE-TOX-08	

"Mass Calibration (pos)" + otro parámetro en modo positivo	7.2 y 7.4
"Mass Calibration (neg)" + otro parámetro en modo negativo	7.3 y 7.5
"Mass Calibration (pos)" + otro parámetro en modo positivo + "Mass calibration (neg)"	7.2, 7.4 y 7.3
"Mass Calibration (neg)" + otro parámetro en modo negativo + "Mass calibration (pos)"	7.2, 7.3 y 7.5
"Mass Calibration (pos)" + otro parámetro en modo positivo + "Mass calibration (neg)" + otro parámetro en modo negativo	7.2, 7.4, 7.3 y 7.5

**7.1.24** Realice siempre la calibración de exactitud de masa (Mass Calibration) si tiene que evaluar o calibrar algún otro parámetro.

## 7.2 Tune y calibración de exactitud de masa en modo positivo

**7.2.1** Instale la tubería de infusión para calibración entre la sonda HESI y la bomba de infusión con jeringa. Se encuentra en una bolsa rotulada como solo calibración.

**7.2.2** Saque de refrigeración la disolución de calibración del Q Exactive en modo positivo. Traslase a un vial de 2 mL 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 la jeringa de 500 µL para infusión directa rotulada como "calibración" con acetona y metanol.

**7.2.4** Cargue la jeringa con metanol, elimine las burbujas, inserte la aguja en el inyector manual y colóquela en el porta-jeringa de la bomba de infusión.

**7.2.5** Vaya al menú principal del QE Tune y ubique la jeringa de infusión, de un clic en la flecha que apunta hacia abajo, se despliega la siguiente pantalla.

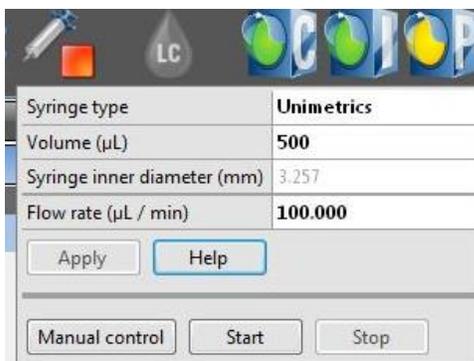


Figura 8 Parámetros de la bomba de infusión.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 02	PAGINA: 10 de 30
USO Y MANEJO DEL CROMATOGRAFO LÍQUIDO VANQUISH CON DETECTOR DE MASAS POR CUADRUPOLO-TRAMPA ORBITANTE (LC/MS Q-EXACTIVE) LC/MS-2	P-DCF-ECE-TOX-08	

- 7.2.6** En esta pantalla programe el tipo de jeringa como Unimetrics para la jeringa Thermo y el volumen de la jeringa que está utilizando, programe la velocidad de flujo en 150  $\mu\text{L}/\text{min}$  y seleccione "Apply" dos veces. Para encender el mecanismo de infusión presione "Start"
- 7.2.7** En el menú principal de QE Tune vaya a la opción "File" y seleccione "Load Tune File", cambie la carpeta por "C:/Xcalibur/Tune y seleccione el archivo "ESITune Cal.mstune."
- 7.2.8** Espere a que se termine de infundir el metanol. Cerciórese que la luz roja en el indicador "Stop" de la bomba de infusión esté encendida, retire la jeringa y cárguela con 100  $\mu\text{L}$  de la disolución de calibración. Programe el flujo de calibrador en 5  $\mu\text{L}/\text{min}$ .
- 7.2.9** Espere unos minutos hasta que en la pantalla de display del QE Tune aparezca una señal del calibrador como la de la imagen siguiente.

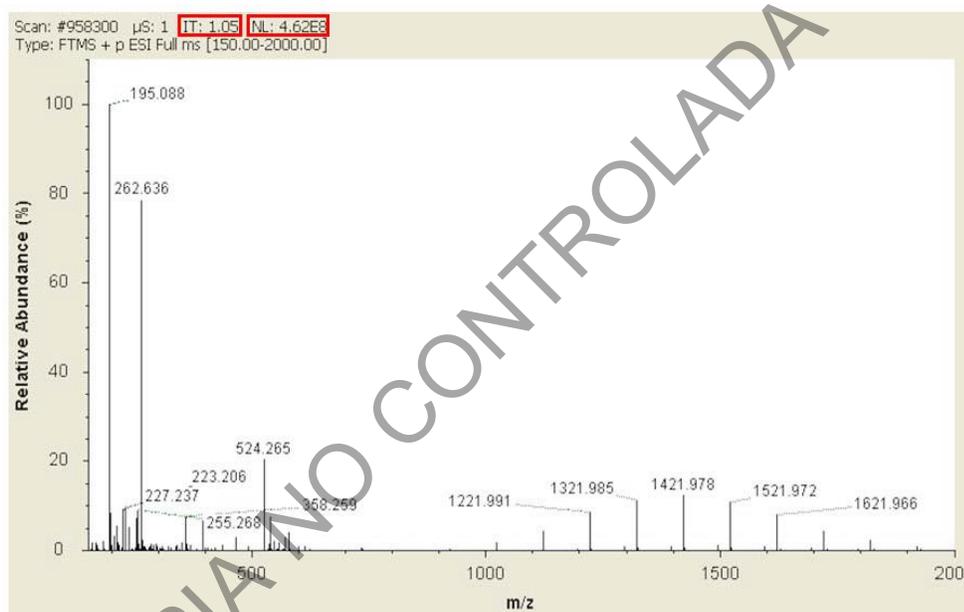


Figura 9 Señal esperada para el calibrador en modo positivo

- 7.2.10** Revise que el "IT" y el "NL" señalados en rojo en la figura anterior se encuentren en valores alrededor de 1 para "IT" y entre 1 y 5E8 para el "NL".
- 7.2.11** Revise también la variación del spray, para ello vaya a la pantalla "Instrument Status" al lado derecho del QE Tune, de un clic en el símbolo "+" para que se desplieguen todas las opciones. En "Current Scan" busque "TIC Variation". Esta variación debe estar en menos del 12% para poder seguir con el procedimiento, si no es así informe a la Líder Técnica o Encargado del equipo. Ver figura siguiente.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 02	PAGINA: 11 de 30
USO Y MANEJO DEL CROMATOGRAFO LÍQUIDO VANQUISH CON DETECTOR DE MASAS POR CUADRUPOLO-TRAMPA ORBITANTE (LC/MS Q-EXACTIVE) LC/MS-2	P-DCF-ECE-TOX-08	

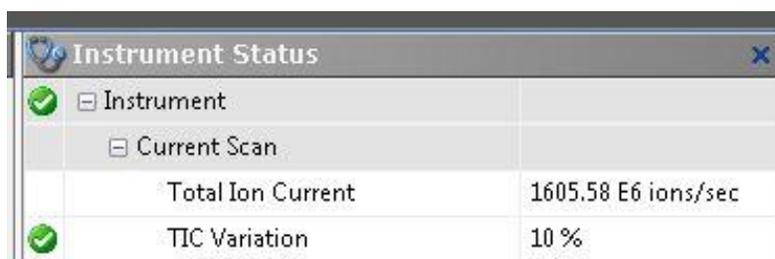


Figura 10 Indicador de variación del spray

**7.2.12** Vaya al panel de tareas del QE Tune en la Opción Tune seleccione "TIC" y luego "Tune", el equipo comienza el ajuste de inmediato. Al final se despliega una pantalla como la siguiente.

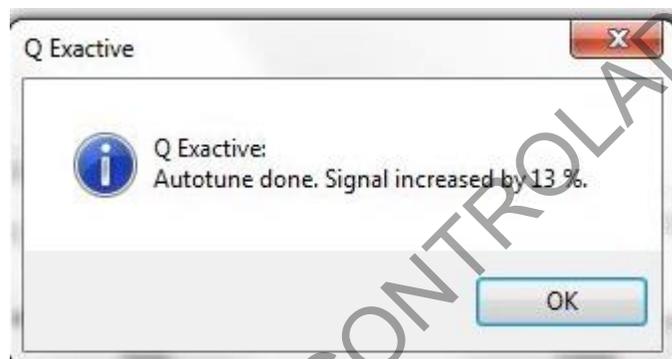


Figura 11 Resultado del ajuste "tune"

**7.2.13** Si la señal se incrementó al menos un 10%, salve el tune (en el menú del QE Tune, opción File, "Save Tune File") si el aumento fue menor al 10% o hubo una disminución no salve el tune.

**7.2.14** Vaya al panel de tareas del QE Tune en la Opción "Calibrate" escoja la opción "Mass Calibration (pos)", de un clic en "Calibrate". El equipo inicia de inmediato la calibración y al final despliega un mensaje como el siguiente.

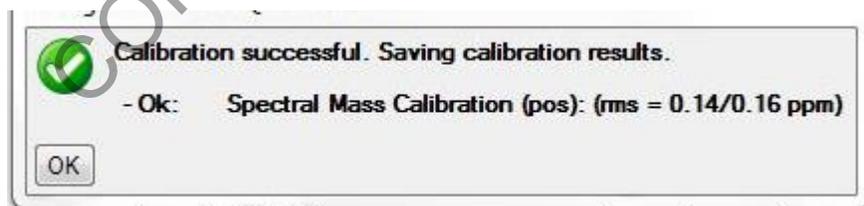


Figura 12 Resultado de la calibración de exactitud masa

**7.2.15** Siga el procedimiento en 7.4 antes de pasar a modo negativo (7.3), si necesita evaluar o calibrar otros parámetros en modo positivo.

**7.2.16** Lave la jeringa y la tubería infundiendo acetona y metanol a 150 µL/min si no va a realizar otra evaluación o calibración o si va a cambiar el calibrador.

### 7.3 Tune y calibración de exactitud de masa en modo negativo

**7.3.1** Este apartado del procedimiento solo es necesario si usted está trabajando con analitos que se ionizan negativamente, si no lo puede omitir.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 02	PAGINA: 12 de 30
USO Y MANEJO DEL CROMATOGRAFO LÍQUIDO VANQUISH CON DETECTOR DE MASAS POR CUADRUPOLO-TRAMPA ORBITANTE (LC/MS Q-EXACTIVE) LC/MS-2	P-DCF-ECE-TOX-08	

- 7.3.2** Saque de refrigeración la disolución de calibración del Q Exactive en modo negativo. Traslase a un vial de 2 mL 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.
- 7.3.3** Instale, si no lo ha hecho, la tubería de infusión para calibración.
- 7.3.4** Lave una la jeringa de 500 µL para infusión directa rotulada como "calibración" 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 de la bomba de infusión.
- 7.3.6** Vaya al menú principal del QE Tune y ubique la jeringa de infusión, de un clic para desplegar las condiciones de la infusión.
- 7.3.7** En esta pantalla programe el tipo de jeringa como Unimetrics para la jeringa Thermo y el volumen de la jeringa que está utilizando, programe la velocidad de flujo en 150 µL/min y seleccione "Apply". Para encender el mecanismo de infusión presione "Start"
- 7.3.8** En el menú principal de QE Tune vaya a la opción "File" y seleccione "Load Tune File", cambie la carpeta por "C:/Xcalibur/Tune y seleccione el archivo "ESITune Cal Neg.mstune".
- 7.3.9** Espere a que se termine de infundir el metanol y cargue la jeringa con 100 µL de la disolución de calibración. Programe el flujo de calibrador en 5 µL/min.
- 7.3.10** Espere unos minutos hasta que en la pantalla de display del QE Tune aparezca una señal del calibrador como la de la imagen siguiente.

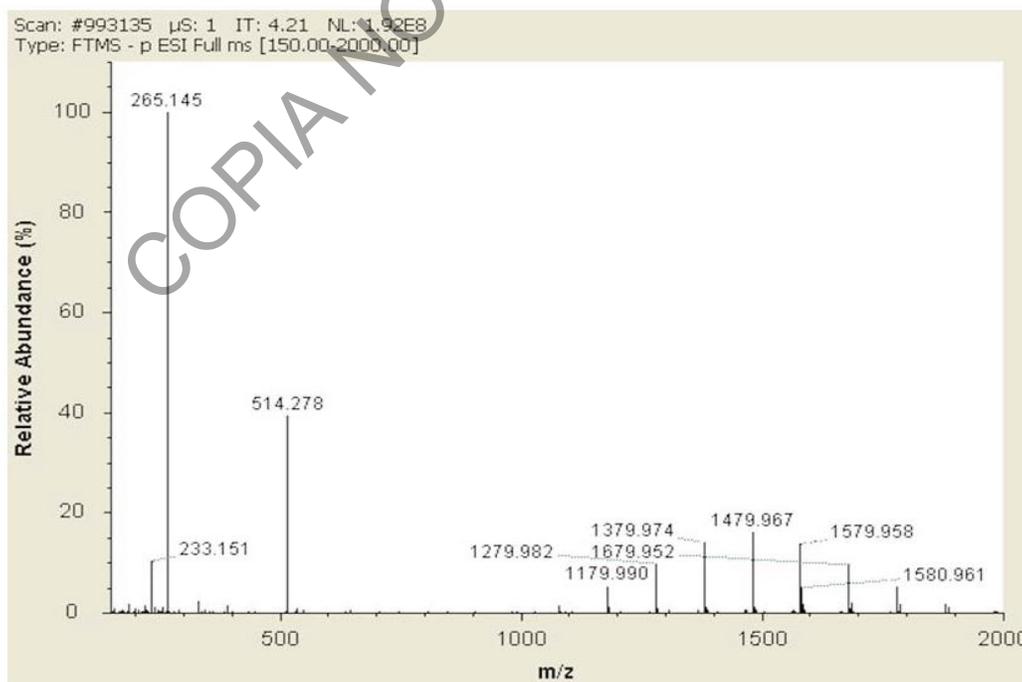


Figura 13 Señal para el calibrador en modo negativo

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 02	PAGINA: 13 de 30
USO Y MANEJO DEL CROMATOGRAFO LÍQUIDO VANQUISH CON DETECTOR DE MASAS POR CUADRUPOLO-TRAMPA ORBITANTE (LC/MS Q-EXACTIVE) LC/MS-2	P-DCF-ECE-TOX-08	

- 7.3.11** Revise que el "IT" y el "NL" señalados en rojo en la figura anterior se encuentren en valores alrededor de 4 para "IT" y entre 1 y 4E8 para el "NL".
- 7.3.12** Revise también que la variación del spray sea menor al 15% para poder seguir con el procedimiento, si no es así informe a la Líder Técnica o Encargado del equipo.
- 7.3.13** Vaya al panel de tareas del QE Tune en la Opción Tune seleccione "Tune", el equipo comienza el ajuste de inmediato.
- 7.3.14** Si la señal se incrementó al menos un 10%, salve el tune (en el menú del QE Tune, opción File, "Save Tune File") si el aumento fue menor al 10% o hubo una disminución no salve el tune.
- 7.3.15** Vaya al panel de tareas del QE Tune en la Opción "Calibrate" escoja la opción Mass Calibration (neg), de un clic en "Calibrate". El equipo inicia de inmediato la calibración. La nueva calibración queda almacenada automáticamente.
- 7.3.16** Siga el procedimiento en 7.5 si necesita evaluar o calibrar otros parámetros en modo negativo.
- 7.3.17** Lave la jeringa y la tubería infundiendo acetona y metanol a 150 µL/min si no va a realizar otra evaluación o calibración o si va a cambiar el calibrador.
- 7.4 Evaluación y calibración de otros parámetros en modo positivo.**
- 7.4.1** Cerciórese que la jeringa contenga al menos 100 µL de la disolución de calibración en modo positivo. Programe el flujo de calibrador en 5 µL/min.
- 7.4.2** Espere unos minutos hasta tener una buena señal para el calibrador según se indica en 7.2.9 a 7.2.12.
- 7.4.3** Vaya al panel de tareas del QE Tune en la Opción "Evaluate" y seleccione "Positive Ion Evaluation"
- 7.4.4** De un clic en "Evaluate", el equipo comienza la evaluación de inmediato. Al final se despliega una pantalla como la siguiente.

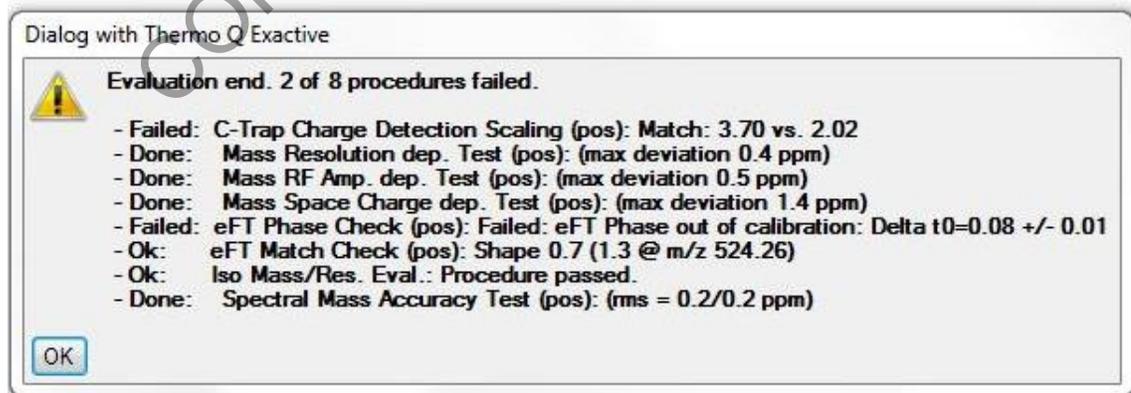


Figura 14 Resultado de la evaluación en modo positivo.

- 7.4.5** Si todos los parámetros indican "Done" o "OK" no es necesario realizar otra calibración al equipo, pase al punto 7.4.11

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 02	PAGINA: 14 de 30
USO Y MANEJO DEL CROMATOGRAFO LÍQUIDO VANQUISH CON DETECTOR DE MASAS POR CUADRUPOLO-TRAMPA ORBITANTE (LC/MS Q-EXACTIVE) LC/MS-2	P-DCF-ECE-TOX-08	

- 7.4.6** Si algún parámetro indica "Stopped" debe repetir la evaluación, si además en esa misma línea indica "Check failed: Calmix Quality..." valore cambiar el calibrador antes de repetir la evaluación.
- 7.4.7** Si algún parámetro indica "Failed" debe calibrarse ese parámetro.
- 7.4.8** Vaya al panel de tareas del QE Tune en la Opción "Calibrate" si necesita calibrar algún parámetro. Escoja la opción que corresponda a la evaluación fallida dentro de las siguientes opciones:

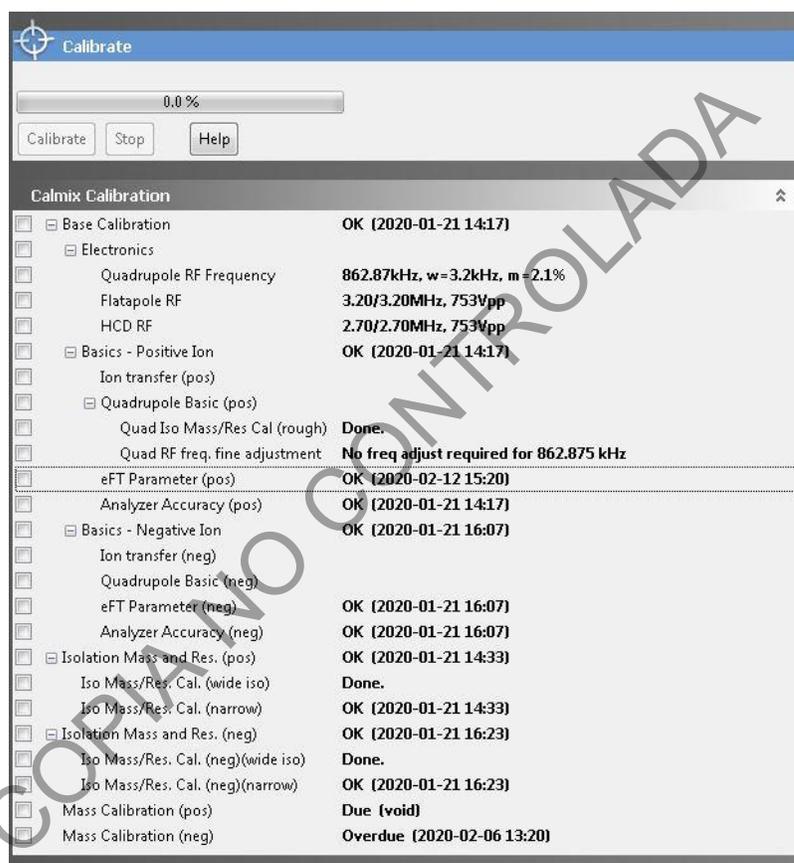


Figura 15 Opciones de calibración

- 7.4.9** De un clic en "Calibrate". El equipo inicia de inmediato la calibración y al final despliega un mensaje con el resultado de la calibración.
- 7.4.10** Si la calibración falla inténtelo de nuevo, si vuelve a fallar intente cambiando el calibrador y si no logra que pase, avise a la Líder Técnica o encargado del equipo.
- 7.4.11** Lave la jeringa y la tubería infundiendo acetona y metanol a 150 µL/min si no va a realizar otra evaluación o calibración o si va a cambiar el calibrador.
- 7.5 Evaluación y calibración de otros parámetros en modo negativo.**
- 7.5.1** Cerciórese que la jeringa contenga al menos 100 µL de la disolución de calibración en modo negativo. Programe el flujo de calibrador en 5 µL/min.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 02	PAGINA: 15 de 30
USO Y MANEJO DEL CROMATOGRAFO LÍQUIDO VANQUISH CON DETECTOR DE MASAS POR CUADRUPOLO-TRAMPA ORBITANTE (LC/MS Q-EXACTIVE) LC/MS-2	P-DCF-ECE-TOX-08	

- 7.5.2** Espere unos minutos hasta tener una buena señal para el calibrador según se indica en 7.3.9 a 7.3.12.
- 7.5.3** Vaya al panel de tareas del QE Tune en la Opción "Evaluate" y seleccione "Negative Ion Evaluation"
- 7.5.4** De un clic en "Evaluate", el equipo comienza la evaluación de inmediato. Al final se despliega una pantalla con el resultado
- 7.5.5** Si todos los parámetros indican "Done" o "OK" no es necesario realizar otra calibración al equipo, pase al punto 7.5.11
- 7.5.6** Si algún parámetro indica "Stopped" debe repetir la evaluación, si además en esa misma línea indica "Check failed: Calmix Quality..." valore cambiar el calibrador antes de repetir la evaluación.
- 7.5.7** Si algún parámetro indica "Failed" debe calibrarse ese parámetro.
- 7.5.8** Vaya al panel de tareas del QE Tune en la Opción "Calibrate" si necesita calibrar algún parámetro. Escoja la opción que corresponda a la evaluación fallida dentro de las opciones de calibración en modo negativo.
- 7.5.9** De un clic en "Calibrate". El equipo inicia de inmediato la calibración y al final despliega un mensaje con el resultado de la calibración.
- 7.5.10** Si la calibración falla inténtelo de nuevo, si vuelve a fallar intente cambiando el calibrador y si no logra que pase, avise a la Líder Técnica o encargado del equipo.
- 7.5.11** Lave la jeringa y la tubería infundiéndolo acetona y metanol a 150 µL/min si no va a realizar otra evaluación o calibración o si va a cambiar el calibrador.
- 7.5.12** 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 7.8. Si quiere hacer un tune de alto flujo con el analito y optimizar el MS/MS siga en 7.9.

## **7.6 Preparación de fase móvil.**

- 7.6.1** Revise las botellas que están en la bandeja superior del LC. Saque la tubería que está adentro de las botellas que necesite preparar y colóquela dentro de una bolsa ziploc nueva sin tocar ninguna superficie. Lleve las botellas a la capilla de extracción de gases.
- 7.6.2** Hay una botella para agua (B1), una para metanol u otro disolvente de limpieza(A1), una para acetonitrilo u otro disolvente para fase móvil (A2), una para el buffer (B2), 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. Las botellas deben lavarse periódicamente cuando sea necesario o ante cualquier suciedad visible con agua y jabón, se deben enjuagar con agua ultrapura y etanol, hornearse 1 hora a 120 ° C y enjuagarse con la sustancia que van a contener.
- 7.6.3** 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 3 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.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 02	PAGINA: 16 de 30
USO Y MANEJO DEL CROMATOGRAFO LÍQUIDO VANQUISH CON DETECTOR DE MASAS POR CUADRUPOLO-TRAMPA ORBITANTE (LC/MS Q-EXACTIVE) LC/MS-2	P-DCF-ECE-TOX-08	

**7.6.4** Coloque las botellas encima del equipo y ponga la tubería correspondiente dentro de la botella, asegúrese que el filtro llegue hasta el fondo.

### 7.7 Purga de líneas y de columna:

**7.7.1** Utilice la siguiente figura para identificar los componentes de la bomba.

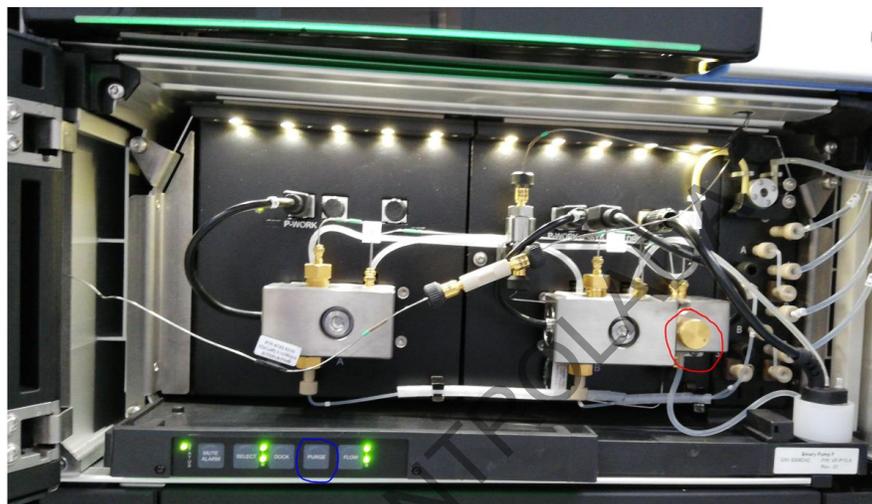


Figura 16 Bomba Vanquish, en rojo la válvula de purga, en azul el botón de purga

**7.7.2** Revise que la válvula de purga (círculo rojo) 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. Cerciórese 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.

**7.7.3** 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.

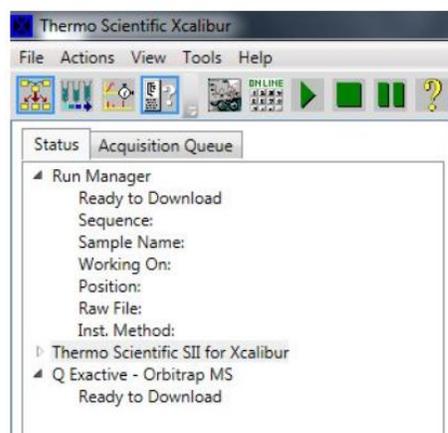


Figura 17 Ingreso a SII por Xcalibur

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 02	PAGINA: 17 de 30
USO Y MANEJO DEL CROMATOGRAFO LÍQUIDO VANQUISH CON DETECTOR DE MASAS POR CUADRUPOLO-TRAMPA ORBITANTE (LC/MS Q-EXACTIVE) LC/MS-2	P-DCF-ECE-TOX-08	

- 7.7.4** En el menú principal del SII vaya a "Home y revise que los tres módulos tengan un "check" e indiquen "connect"
- 7.7.5** 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 7.7.7, si no, cambie la opción "Idle" por "Active" y presione "enter".
- 7.7.6** 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.
- 7.7.7** En la pantalla de selección de flujos y canales (ver figura 18) seleccione los canales A1 y B1.
- 7.7.8** En el módulo de la bomba presione "PURGE" Ver Figura 16, botón señalado en azul. La bomba empieza a purgar los canales A1 y B1 por 5 minutos a 3 mL/min.
- 7.7.9** Espere a que termine la purga anterior y haga lo mismo para los canales A2 y B2.
- 7.7.10** Cierre la válvula de purga girando en el sentido del reloj hasta que llegue al final y presionando suave.
- 7.7.11** 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"
- 7.7.12** Vaya luego a "Pump Module" en "Flow/Pressure seleccione los canales y porcentajes de eluentes indicados en el cuadro siguiente. Ver Figura 18

Composición	Flujo (µL/min)	Tiempo (min)
Metanol u otro disolvente de lavado (A1) 100%	50% flujo trabajo de la columna*	5
Metanol u otro disolvente de lavado (A1) 100%	100 % flujo de trabajo de la columna	5
ACN u otro (A2) 100 %	100 % flujo de trabajo de la columna	5
ACN u otro (A2) /Agua (B1) 50%/50%	100 % flujo de trabajo de la columna	5
ACN u otro (A2) /Buffer u otro (B2) Proporción inicial del método.	100 % flujo de trabajo de la columna	10

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 02	PAGINA: 18 de 30
USO Y MANEJO DEL CROMATOGRAFO LÍQUIDO VANQUISH CON DETECTOR DE MASAS POR CUADRUPOLO-TRAMPA ORBITANTE (LC/MS Q-EXACTIVE) LC/MS-2	P-DCF-ECE-TOX-08	

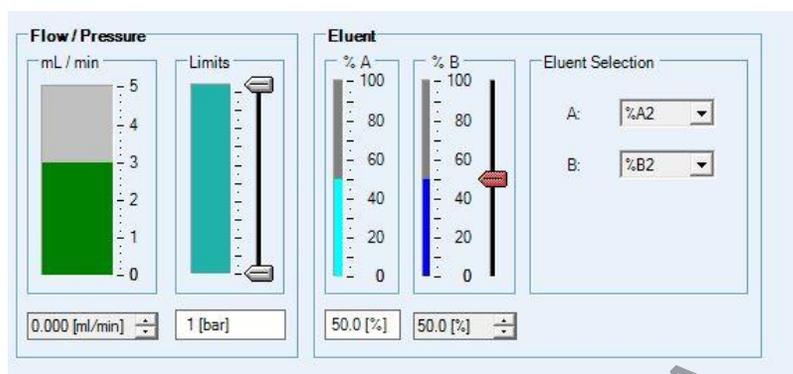


Figura 18 Pantalla de selección de flujos, canales y proporciones de la bomba Vanquish

**7.7.13** 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".

### 7.8 Infusión directa de bajo flujo para analitos para modo ESI

**7.8.1** Instale una tubería para infusión similar a la que se usa para la calibración (no debe utilizarse la de calibración).

**7.8.2** Saque de refrigeración la disolución de analito que desea inyectar al equipo por infusión y espere aproximadamente 15 minutos a que alcance temperatura ambiente. Se puede realizar la infusión tanto de compuestos individuales como de mezclas.

**7.8.3** 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.
- Debe tener una concentración de analito (os) menor o igual a 10 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.

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

**7.8.5** Cargue la jeringa con metanol, elimine las burbujas, inserte la aguja en el inyector manual y colóquela en el porta-jeringa de la bomba de infusión.

**7.8.6** Vaya al menú principal del QE Tune y ubique la jeringa de infusión, de un clic en la flecha que apunta hacia abajo, se despliega una pantalla similar a la de la figura 8.

**7.8.7** En esta pantalla programe el tipo de jeringa como Unimetrics para la jeringa Thermo y el volumen de la jeringa que está utilizando, programe la velocidad de flujo en 150 µL/min y seleccione "Apply" dos veces. Para encender el mecanismo de infusión presione "Start" y espere que se termine el metanol.

**7.8.8** 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).

**7.8.9** En el menú principal de QE Tune vaya a la opción "File" y seleccione "Load Tune File", cambie la carpeta por "C:/Xcalibur/Tune" y seleccione el archivo "ESITune Cal.mstune" si

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 02	PAGINA: 19 de 30
USO Y MANEJO DEL CROMATOGRAFO LÍQUIDO VANQUISH CON DETECTOR DE MASAS POR CUADRUPOLO-TRAMPA ORBITANTE (LC/MS Q-EXACTIVE) LC/MS-2	P-DCF-ECE-TOX-08	

va a realizar infusión de analito en modo positivo o el archivo "ESITune Cal Neg.mstune" si va a emplear modo negativo.

**7.8.10** Revise que la variación del spray sea menor al 12% (positivo) o 15% (negativo).

**7.8.11** Vaya al panel de control del QE tune, en "Instrument Control", en "Scan Parameters" seleccione la opción "Hot link" para que los cambios en los parámetros apliquen sin la necesidad de dar clic en "Apply" cada vez. En "Scan type" escoja "Full MS" y en "Scan Range", defina m/z máxima y mínima dependiendo del o los analitos de interés. Cambie la resolución en "Resolution" por 70.000. Ver figura siguiente.

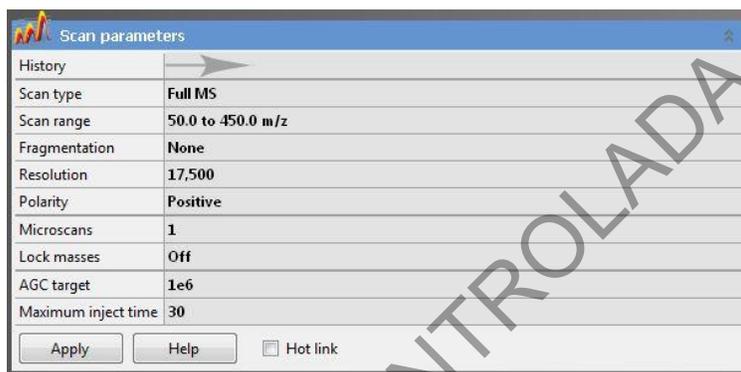


Figura 19 Parámetros de escaneo

**7.8.12** Vaya a "Instrument Control" en "HESI source" cambie los parámetros del spray para mejorar la señal del o los analitos.

Parámetro	Rango en que varía (flujo de 5 a 20 $\mu$ L/min)
Sheath gas flow rate	5-15
Auxiliar gas Flow rate	0-10
Spray voltage	3.5-4.0
Capillary temp °C	250-320
S-lens level	45-50
Heater temp °C	50-150

**7.8.13** Vaya al panel de tareas del QE Tune y seleccione la opción Tune. En "Mass" ingrese la masa del analito (con un decimal) que está infundiendo. En el caso de mezclas debe elegir alguno de los analitos (puede ser el que tenga una masa media dentro de la mezcla, o que sea un analito de especial interés).

**7.8.14** De un clic en "Tune" para que se ejecute el ajuste. Una vez concluido se genera un informe sobre la variación que sufrió la señal del analito.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 02	PAGINA: 20 de 30
USO Y MANEJO DEL CROMATOGRAFO LÍQUIDO VANQUISH CON DETECTOR DE MASAS POR CUADRUPOLO-TRAMPA ORBITANTE (LC/MS Q-EXACTIVE) LC/MS-2	P-DCF-ECE-TOX-08	

**7.8.15** Vaya al menú del QE Tune, opción File, "Save Tune File As"). Salve el tune file con algún nombre que referencia al analito o mezcla que está infundiendo.

**7.8.16** Programe la adquisición de señal del equipo para almacenar la información de la infusión. Vaya a "Instrument Control" en "Acquisition" complete la información según la figura siguiente.

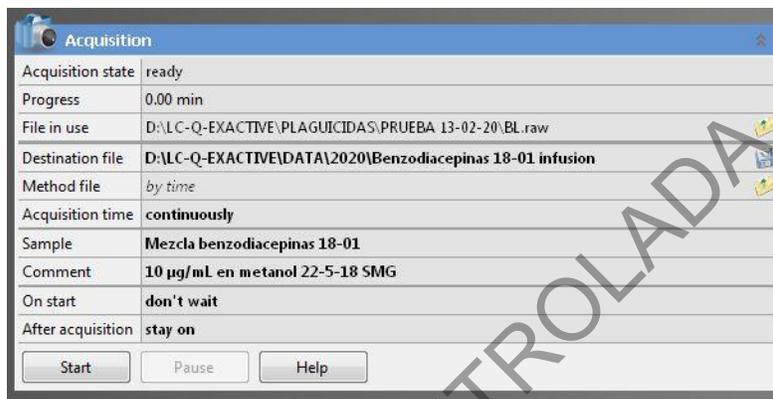


Figura 20 Programación de la adquisición de datos

**7.8.17** En "Destination file" cree y elija una carpeta en D:/LC-Q-EXACTIVE/DATA/AAAA que sea la fecha y una descripción de lo que va a contener. Como nombre de archivo utilice los datos de la mezcla o analito que está infundiendo. Llene la información de "Sample" y "Comment" como se ve en el ejemplo.

**7.8.18** Presione "Start" para empezar a grabar la información.

**7.8.19** Cambie el modo en "Scan type" por "Full MS – SIM" y en "Scan Range" ponga el rango de masa mínimo y máximo dependiendo de los analitos.

**7.8.20** Vaya de nuevo a "Scan Parameters" y en "Scan Range" en "Center" ingrese el m/z de la sustancia de interés con un decimal y en "Width" ingrese 1 m/z. El equipo pasa a modo SIM y despliega un espectro como el siguiente.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 02	PAGINA: 21 de 30
USO Y MANEJO DEL CROMATOGRAFO LÍQUIDO VANQUISH CON DETECTOR DE MASAS POR CUADRUPOLO-TRAMPA ORBITANTE (LC/MS Q-EXACTIVE) LC/MS-2	P-DCF-ECE-TOX-08	

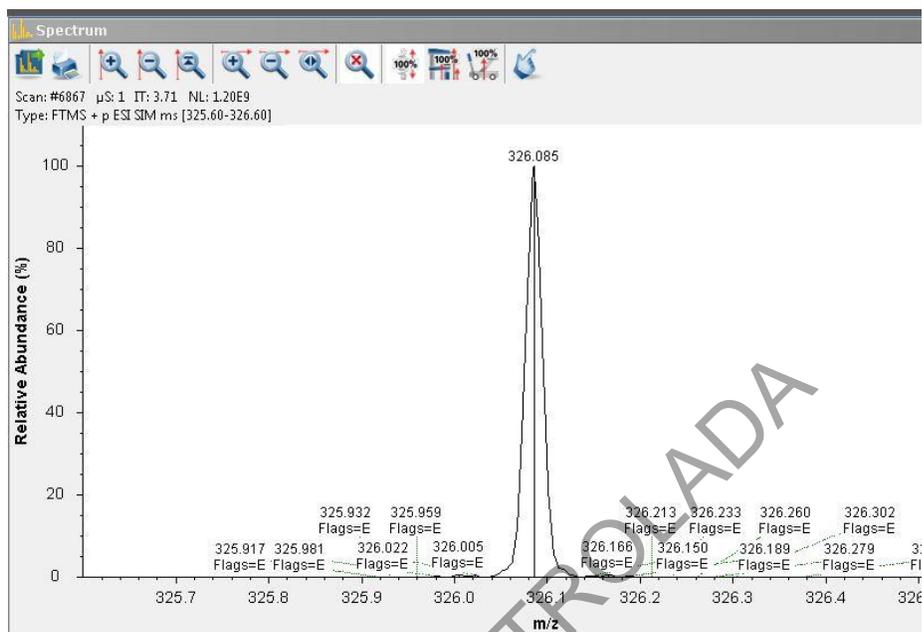


Figura 21 Espectro SIM de Midazolam (m/z 326.1).

- 7.8.21** La abundancia para el analito puede verse en la parte superior del espectro, la abundancia debe estar entre  $1 \times 10^6$  y  $5 \times 10^9$ . Si la abundancia es menor, pruebe optimizando más el "tune", si no logra una mejoría valore la infusión del analito más concentrado. En el caso de abundancia mayor al rango pruebe con el analito más diluido. Si detiene la infusión recuerde detener la adquisición de datos.
- 7.8.22** Si en el espectro aparecen varias señales con masas muy similares (diferencia menor 0.5 m/z) y con abundancia similar, cuando realice el experimento MS/MS va a obtener un espectro mezcla de esas sustancias, es necesario realizar la infusión individual si las dos o más sustancias son analitos de interés o cambiar el material de referencia si se trata de un interferente. Si va a detener la infusión recuerde detener antes la adquisición de datos.
- 7.8.23** Si la señal obtenida tiene la abundancia adecuada y solo el analito de interés está presente, vaya al panel de control del equipo en el QE tune, en "Instrument Control" vaya a "Scan parameters" en "Scan type" seleccione "AIF MS/MS" y en "Scan range" en "Center" ingrese la m/z del analito y en "Width" ingrese 1 m/z. En "Fragmentation" ingrese de un clic en HCD y escoja "CE" ingresando un valor de 10.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 02	PAGINA: 22 de 30
USO Y MANEJO DEL CROMATOGRAFO LÍQUIDO VANQUISH CON DETECTOR DE MASAS POR CUADRUPOLO-TRAMPA ORBITANTE (LC/MS Q-EXACTIVE) LC/MS-2	P-DCF-ECE-TOX-08	

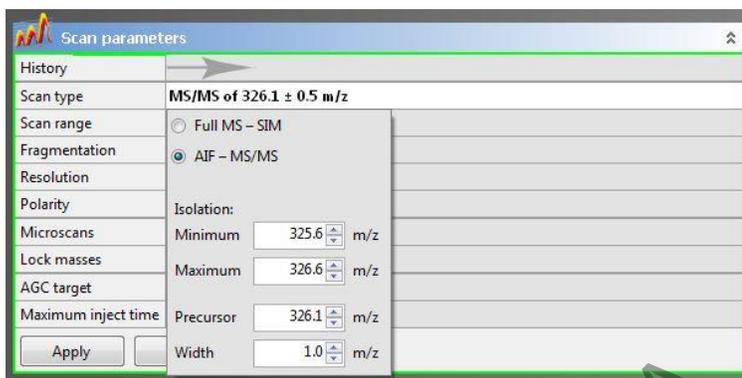


Figura 22 Parámetros de escaneo para MS/MS

**7.8.24** Cambie en "Scan range" el "Minimum" por 50 m/z.

**7.8.25** Cambie la fragmentación de 10 hasta 50 según sea necesario para que la abundancia del ion precursor disminuya hasta un 1-3%, pueden ser cambios de 10 en 10 o de 5 en 5 cuando esté cerca del valor meta. No escoja valores intermedios, solo múltiplos de 5.

**7.8.26** Vuelva a cambiar el modo de escaneo en "Scan Parameters" y escoja en "Scan type" "Full MS - SIM" y en "Scan Range" seleccione de nuevo el mínimo y máximo que definió para el analito o mezcla.

**7.8.27** Si va a seguir con otro analito en la misma mezcla repita los pasos 7.8.19 a 7.8.24.

**7.8.28** Detenga la adquisición de datos si va a cambiar la disolución que está infundiendo. Repita los pasos 7.8.16 a 7.8.24 si va a continuar con analitos o mezclas del mismo tipo de sustancias.

**7.8.29** Repita los pasos 7.8.2 a 7.8.24 para un analito o mezcla de analitos diferente.

**7.8.30** Lave la jeringa y la tubería infundiendo acetona y metanol a 150 µL/min si no va a realizar otra infusión.

## 7.9 Tuning de alto flujo con el analito y optimización MS/MS (ESI)

**7.9.1** 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.

Nota 4 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). Por lo tanto, debe conocerse esta información previamente. Debe prepararse el equipo como se indica en 7.1 a 7.7 con las disoluciones y condiciones esperadas para el método que se está desarrollando.

**7.9.2** 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 instalando una "T" que tenga como entradas la salida de la válvula selectora del LC/MS y la bomba de infusión y como salida la sonda de HESI. Ver figura siguiente.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 02	PAGINA: 23 de 30
USO Y MANEJO DEL CROMATOGRAFO LÍQUIDO VANQUISH CON DETECTOR DE MASAS POR CUADRUPOLO-TRAMPA ORBITANTE (LC/MS Q-EXACTIVE) LC/MS-2	P-DCF-ECE-TOX-08	

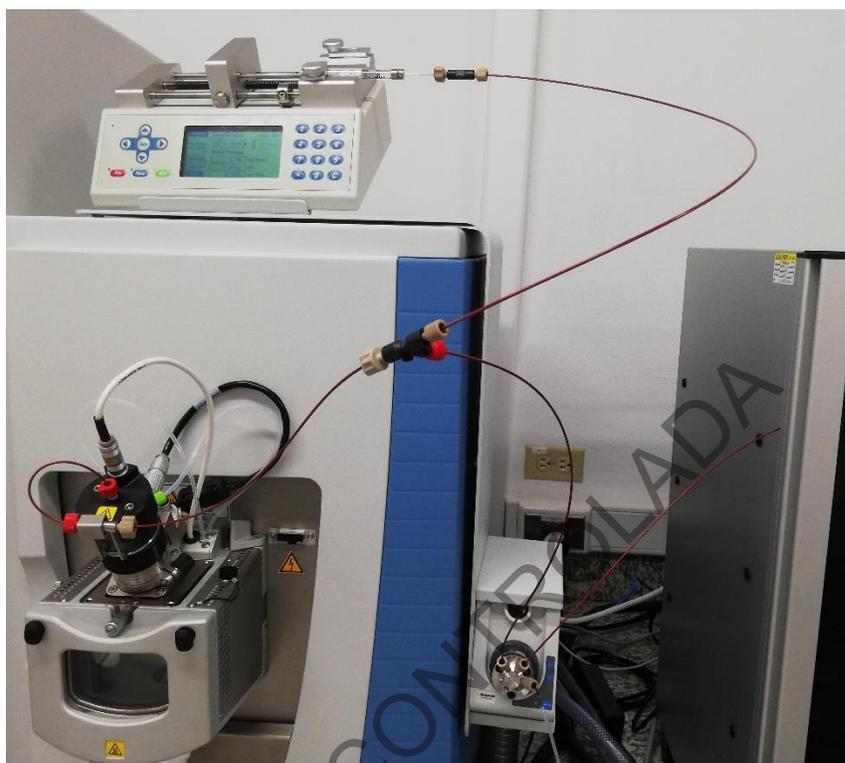


Figura 23 Conexión en "T" entre el LC, la bomba de infusión y el QE.

- 7.9.3** Saque de refrigeración la disolución de analito o mezcla que desea inyectar al equipo por infusión y espere aproximadamente 15 minutos 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 para realizar la infusión de mezclas de compuestos por familia o todos los analitos que cubre el método.
- 7.9.4** 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 o igual 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 a menos que halla sido preparada con disolventes calidad LC/MS.
- 7.9.5** Lave una jeringa de 500 µL para infusión directa con acetona y metanol.
- 7.9.6** Cargue la jeringa con metanol, elimine las burbujas, inserte la aguja en el inyector manual y colóquela en el porta-jeringa de la bomba de infusión.
- 7.9.7** Vaya al menú principal del QE Tune y ubique la jeringa de infusión, de un clic en la fecha que apunta hacia abajo, se despliega una pantalla similar a la de la figura 8.
- 7.9.8** En esta pantalla programe el tipo de jeringa como Unimetrics para la jeringa Thermo y el volumen de la jeringa que está utilizando, programe la velocidad de flujo en 150 µL/min

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 02	PAGINA: 24 de 30
USO Y MANEJO DEL CROMATOGRAFO LÍQUIDO VANQUISH CON DETECTOR DE MASAS POR CUADRUPOLO-TRAMPA ORBITANTE (LC/MS Q-EXACTIVE) LC/MS-2	P-DCF-ECE-TOX-08	

y seleccione "Apply" dos veces. Para encender el mecanismo de infusión presione "Start" y espere que se termine el metanol.

**7.9.9** En el menú principal de QE Tune vaya a la opción "File" y seleccione "Load Tune File", cambie la carpeta por "C:/Xcalibur/Tune" y seleccione el archivo "ESITune Cal.mstune" si va a realizar infusión de analitos en modo positivo o el archivo "ESITune Cal Neg.mstune" si va a emplear modo negativo.

**7.9.10** Cambie las condiciones del tuning según el flujo de columna que va a utilizar de acuerdo con la siguiente tabla:

Liquid flow rate (µL/min)	Ion transfer tube temperature (°C)	H-ESI vaporizer temperature (°C)	Sheath gas pressure (psi)	Auxiliary gas flow (arbitrary units)	Spray voltage (V)	Typical nitrogen gas consumption (L/min)
5	240	Off to 50	5	0	+3000 (-2500)*	<1
200	350	250 to 350	35	10	+3000 (-2500)	8
500	380	300 to 500	60	20	+3000 (-2500)	13
1000	400	500	75	30	+3000 (-2500)	17

\*Negative ion mode

Tabla 1 Condiciones del spray para ESI según el flujo de trabajo.

**7.9.11** Vaya al panel de control del QE tune, en "Instrument Control", en "Scan Parameters" seleccione la opción "Hot link" para que los cambios en los parámetros apliquen sin la necesidad de dar clic en "Apply" cada vez. En "Scan type" escoja "Full MS" y en "Scan Range", defina m/z máxima y mínima dependiendo del o los analitos de interés. Cambie la resolución en "Resolution" por 70.000. Ver figura 19.

**7.9.12** Vaya al menú del QE Tune, opción File, "Save Tune File As". Salve el tune file con el nombre que referencia al analito o mezcla que está infundiendo o el método en desarrollo y agregue también el flujo que está utilizando y la fecha. Por ejemplo: Escrutinio 04mar\_20 200 µL-min.

**7.9.13** Cambie la válvula del QE a posición 2 accionando la flecha azul hacia arriba. Ver figura siguiente:

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 02	PAGINA: 25 de 30
USO Y MANEJO DEL CROMATOGRAFO LÍQUIDO VANQUISH CON DETECTOR DE MASAS POR CUADRUPOLO-TRAMPA ORBITANTE (LC/MS Q-EXACTIVE) LC/MS-2	P-DCF-ECE-TOX-08	

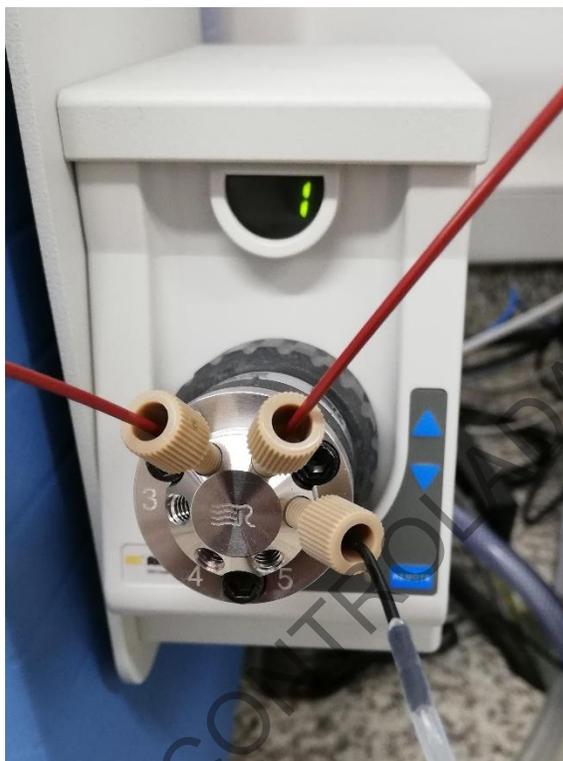


Figura 24 Válvula del QE.

**7.9.14** Vaya al software SII que controla el LC y programe el flujo y la composición de la fase móvil escogida para el método en desarrollo. Ver figura 18. Espere a que el flujo y la presión se estabilicen.

**7.9.15** Cargue la jeringa con el analito y colóquela en la bomba de infusión. Realice la infusión de analito comenzando con un flujo de 10  $\mu\text{L}/\text{min}$ , aumente hasta 20  $\mu\text{L}/\text{min}$  si la señal para el ion molecular es muy baja (M+H o M-H).

**7.9.16** Pase la válvula del QE a la posición 1.

**7.9.17** Revise que la variación del spray sea menor al 12% (positivo) o 15% (negativo).

**7.9.18** Cambie las condiciones en el tuning de manera que se obtenga una respuesta adecuada para el o los analitos de interés.

Nota 5. 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.

## 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.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 02	PAGINA: 26 de 30
USO Y MANEJO DEL CROMATOGRAFO LÍQUIDO VANQUISH CON DETECTOR DE MASAS POR CUADRUPOLO-TRAMPA ORBITANTE (LC/MS Q-EXACTIVE) LC/MS-2	P-DCF-ECE-TOX-08	

- 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 tres a cinco secuencias de rutina como mínimo.
- Sustituya el capilar de transferencia por uno nuevo o limpio y proceda a limpiar el capilar sucio según las indicaciones del encargado del equipo.
- Limpie los conos si es necesario según las indicaciones del encargado del equipo.

#### **7.10.3 Solución de problemas.**

- 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.

### **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.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 02	PAGINA: 27 de 30
USO Y MANEJO DEL CROMATOGRACO LÍQUIDO VANQUISH CON DETECTOR DE MASAS POR CUADRUPOLO-TRAMPA ORBITANTE (LC/MS Q-EXACTIVE) LC/MS-2	P-DCF-ECE-TOX-08	

## 12 Simbología.

AAAA: Año en formato de cuatro dígitos.

AGC: "Automatic Gain Control" o Control automático de la ganancia, es la cantidad de iones que se permite entrar en la trampa cada tiempo de inyección (IT).

APCI: "Atmospheric Pressure Chemical Ionization" o Ionización Química a Presión Atmosférica.

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

ALS: Automuestreador (del inglés "automatic liquid sampler")

CID: "Collision Induced Dissociation" o disociación inducida por colisiones.

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.

HESI: "Heated Electrospray" o ionización por electro-spray calentado.

HRMS: "High Resolution Mass Spectrometry"

IPA: Isopropanol.

IQ: Calificación de la instalación.

IT: "Injection time" o tiempo de inyección de iones, es la cantidad de tiempo que los iones se acumulan en la trampa de iones hasta alcanzar un AGC programado.

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

LC: Cromatografía líquida.

QE: Q Exactive.

m/z: relación masa/carga.

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

MS/MS: Espectrometría de masas-masas ó MS<sup>2</sup>.

MS: Espectrometría de masas.

Ms<sup>n</sup>: Espectrometría de masas en tandem con "n" niveles.

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

N/A: no aplica.

OQ/PV: Siglas de Operation-Qualification/Performance-Verification.

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

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

PON: Procedimiento de Operación Normado.

ppm: Partes por millón.

SCD: Solicitud Cambio Documental.

P-DCF-GCG-JEF-001-R3, Versión 01

Emitido y Aprobado por Unidad de Gestión de Calidad

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 02	PAGINA: 28 de 30
USO Y MANEJO DEL CROMATOGRAFO LÍQUIDO VANQUISH CON DETECTOR DE MASAS POR CUADRUPOLO-TRAMPA ORBITANTE (LC/MS Q-EXACTIVE) LC/MS-2	P-DCF-ECE-TOX-08	

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 Q Exactive: Disolución de varios compuestos que cubren el rango de masas del espectrómetro y que se utiliza para verificarlo y/o calibrarlo. Hay uno para ionización positiva y otro para ionización negativa.

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-2.

### 14 Anexos

No. de Anexo	Nombre del Anexo
1	Preparación de reactivos
2	Pantalla principal del QE Tune

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 02	PAGINA: 29 de 30
USO Y MANEJO DEL CROMATOGRAFO LÍQUIDO VANQUISH CON DETECTOR DE MASAS POR CUADRUPOLO-TRAMPA ORBITANTE (LC/MS Q-EXACTIVE) LC/MS-2	P-DCF-ECE-TOX-08	

**Anexo No. 1**

**PREPARACIÓN DE REACTIVOS**

**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

## Anexo 2

## Pantalla principal del QE Tune

Thermo Q Exactive — operational

File Windows Reports Help

Role: Advanced

**Instrument Control**

Scan parameters

History	
Scan type	Full MS
Scan range	150.0 to 2,000.0 m/z
Fragmentation	None
Resolution	35,000
Polarity	Positive
Microscans	1
Lock masses	Off
AGC target	1e6
Maximum inject time	50

Apply Help Hot link

HESI source

Sheath gas flow rate	10	actual	0
Aux gas flow rate	0		0
Sweep gas flow rate	0		0
Spray voltage (kV)	3.90		0.02
Spray current (µA)			0.00
Capillary temp. (°C)	320		320
S-lens RF level	60.0		
Aux gas heater temp (°C)	0		37

Source Auto-Defaults...

Apply Help Hot link

Acquisition

Acquisition state	standby
Progress	0.00 min
File in use	unknown
Destination file	D:\LC-Q-EXACTIVE\PLAGUICIDAS\MIX 2 (0.200ml-min)

Tune

Mass Traces

Calibrate

Evaluate

Vacuum / Bakeout

**Spectrum**

No spectrum obtained during program lifetime

Relative Abundance (%)

m/z

**Instrument Status**

Instrument

Messages

Priority	Source	Time	Description
		10:31:51.066-	Tune startup
		10:42:02.915-	New application as: e7cc6250-a2f1-4dd4-bef4-92d5f44f900c assigned id 3: 8DDTWM2\Thermo0 from: 8DDTWM2\ThermoFisher.Xcalibur.ExternalProcessHost32(1032)

Analysis Graphs

P-DCF-GCG-JEF-001-R3, Versión 01

Emitido y Aprobado por Unidad de Gestión de Calidad