BYUBUCA DE COOTA ACA TODRE AUDICAL ACA ORGANISTICA DE MYESTICACIÓN ANDRA 1973	DEPARTA ORGANISMO POI USO Y MANEJO D CON DETECTOR ORBITA	AMENTO DE CIENCIAS FORENSES D DE INVESTIGACION JUDICIAL (OIJ) DER JUDICIAL, COSTA RICA DEL CROMATOGRAFO LÍQUIDO VANQUISH & DE MASAS POR CUADRUPOLO-TRAMPA NTE (LC/MS Q-EXACTIVE) LC/MS-2	PROCEDIMIENTO DE OPERACIÓN NORMADO ESPECIFICO P-DCF-ECE-TOX-08
VE	RSION: 03	Rige desde: 05/05/2025	PAGINA: 1 de 30

Elaborado o modificado por:	Revisado por Líder Técnico:
Dr. Diego Arias Alfaro Jefatura, Sección Toxicología	Dra. María de los Ángeles Sancho Brenes Líder Técnico de Sección/Unidad de Confirmatorios/Plaguicidas
Visto Bueno Encargado de Calidad:	Aprobado por:
Dr. Marco Martínez Esquivel Encargado de Calidad de la Sección de Toxicología	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	11/03/2020	29/04/2022	Versión Inicial del Procedimiento	003- 2020	DAA
02	29/04/2022	05/05/2025	Adaptación del procedimiento a nuevos prefiltros, nuevos métodos y mejoras a partir de auditorías	009- 2022	DAA
03	05/05/2025		Descripción de la filtración de eluentes y limpieza de capilla y cámara de bioseguridad. Hallazgos auditoría interna	003- 2025	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 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-I	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 03	PAGINA: 3 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-I	ECE-TOX-08

- **3.7** Manuales del LC-MS Q-exactive, Código M-EXT-ECE-TOX-92: Suplementary 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.

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, capilar de transferencia).

Filtros de membrana de nylon o PTFE de 47 mm con diámetro de poro de 0,2 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).

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.

Medidor de temperatura digital de al menos 10-40° C (división escala 0,1°C) o similar.

Papel Kraft o similar.

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

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

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 4 de 30
USO Y MANEJO DEL CROMATOGRAFO LÍQUIDO VANQUISH CON DETECTOR DE MASAS POR CUADRUPOLO-TRAMPA ORBITANTE (LC/MS O-EXACTIVE) LC/MS-2	P-DCF-I	ECE-TOX-08

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.

Agua desionizada.

Agua tipo I (Milli Q) con resistividad mínima de 18 Ω /cm o agua calidad LC/MS.

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.

Metanol calidad HPLC o LC/MS.

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.
2	Análisis LC/MS	15 °C	26 °C	La temperatura no debe ser registrada porque se cuenta con un sistema de aire acondicionado que controla la temperatura, si se da un fallo en el sistema de aire acondicionado no debe utilizarse 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.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 5 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-I	ECE-TOX-08

- **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 el aire acondicionado esté funcionando y que la temperatura del Medidor de temperatura digital ubicado en el cuarto donde se encuentra el equipo esté entre 17 y 24 °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 ± 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 las 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.



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.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES

VERSIÓN 03

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 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

7.1.13Si 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.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES

VERSIÓN 03

USO Y MANEJO DEL CROMATOGRAFO LÍQUIDO VANQUISH CON DETECTOR DE MASAS POR CUADRUPOLO-TRAMPA ORBITANTE (LC/MS Q-EXACTIVE) LC/MS-2



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.
- **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

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	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-I	ECE-TOX-08

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.

🕤 Instrument Control		
کر Tune		
Mass Traces		
> Calibrate		
🗘 Calibrate		
0.0 % Calibrate Stop Help		
Calmix Calibration		*
Base Calibration Solation Mass and Res. (pos) Solation Mass and Res. (neg) Mass Calibration (pos) Mass Calibration (neg)	OK (2020-01-2114:16) OK (2020-01-2114:33) OK (2020-01-2116:23) Overdue (2020-02-0611:48) OK (due in 47 min)	DP

Figura 7 Indicación del estado de la calibración

7.1.23Si 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 у 7.3
"Mass Calibration (pos)" + otro parámetro en modo positivo	7.2 у 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 у 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

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

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 9 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-E	ECE-TOX-08

7.2Tune 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. Trasvase 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.

Syringe type	Unimetrics
Volume (µL)	500
Syringe inner diameter (mm	3.257
Flow rate (µL / min)	100.000
Apply Help	ר

Figura 8 Parámetros de la bomba de infusión.

- **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 μL/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 μL de la disolución de calibración. Programe el flujo de calibrador en 5 μL/min.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	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	

7.2.9 Espere unos minutos hasta que en la pantalla de display del QE Tune aparezca una señal del calibrador como la de la imagen siguiente.



- **7.2.10**Revise que el "IT" y el "NL" señalados en rojo en la figura anterior se encentren en valores entre 1 y 3 para "IT" y entre 4 E7 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.

D9 I	nstrument Status	*
0	🗄 Instrument	
	🖂 Current Scan	
	Total Ion Current	1605.58 E6 ions/sec
0	TIC Variation	10 %

Figura 10 Indicador de variación del spray

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	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	

7.2.12Vaya 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.



- 7.2.13Si 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.
- **7.3.2** Saque de refrigeración la disolución de calibración del Q Exactive en modo negativo. Trasvase 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 μ L para infusión directa rotulada como "calibración" con acetona y metanol.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	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	

- **7.3.5** 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

- **7.3.11**Revise que el "IT" y el "NL" señalados en rojo en la figura anterior se encentren en valores entre 0,5 y 5 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.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	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	

- 7.3.14Si 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.

í í	Evaluation end. 2 of 8 procedures failed.
	- Failed: C-Trap Charge Detection Scaling (pos): Match: 3.70 vs. 2.02
2	- Done: Mass Resolution dep. lest (pos): (max deviation 0.4 ppm)
	- Done: Mass nr Ando. dep. test (pos). (nat deviation 0.3 ppn)
	- Failed: eFT Phase Check (pos): Failed: eFT Phase out of calibration: Delta t0=0.08 +/- 0.01
	- Ok: eFT Match Check (pos): Shape 0.7 (1.3 @ m/z 524.26)
	- Ok: Iso Mass/Res. Eval.: Procedure passed.
	- Done: Spectral Mass Accuracy Test (pos): (rms = 0.2/0.2 ppm)

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
- **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:

USO Y MANEJO DEL CROMATOGRAFO LÍQUIDO VANQUISH CON DETECTOR DE MASAS POR CUADRUPOLO-TRAMPA ORBITANTE (LC/MS Q-EXACTIVE) LC/MS-2

4	7	
4	プ Calibrate	
	0.0 %	
С	alibrate Stop Help	
C	Calmix Calibration	
1	Base Calibration	OK (2020-01-21 14:17)
1	Quadrupole BE Frequency	862.87kHz. w=3.2kHz. m=2.1%
1	Flatapole RF	3.20/3.20MHz, 753Vpp
1	HCD RE	2.70/2.70MHz, 753Vpp
	🖃 Basics - Positive Ion	OK (2020-01-21 14:17)
	Ion transfer (pos)	
1	Ouadrupole Basic (pos)	
	Quad Iso Mass/Res Cal (rough)	Done.
	Quad RF freq. fine adjustment	No freq adjust required for 862.875 kHz
	eFT Parameter (pos)	OK (2020-02-12 15:20)
	Analyzer Accuracy (pos)	OK (2020-01-21 14:17)
	🖃 Basics - Negative Ion	OK (2020-01-21 16:07)
1	Ion transfer (neg)	
	Quadrupole Basic (neg)	
1	eFT Parameter (neg)	OK (2020-01-21 16:07)
	Analyzer Accuracy (neg)	OK (2020-01-21 16:07)
	🖃 Isolation Mass and Res. (pos)	OK (2020-01-21 14:33)
	Iso Mass/Res. Cal. (wide iso)	Done.
	Iso Mass/Res. Cal. (narrow)	OK (2020-01-21 14:33)
	🖃 Isolation Mass and Res. (neg)	OK (2020-01-21 16:23)
	Iso Mass/Res. Cal. (neg)(wide iso)	Done.
	Iso Mass/Res. Cal. (neg)(narrow)	OK (2020-01-21 16:23)
	Mass Calibration (pos)	Due (void)
	Mass Calibration (neg)	Overdue (2020-02-06 13:20)

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.

7.5Evaluación y calibración de otros parámetros en modo negativo.

7.5.1 Cerciórese que la jeringa contenga al menos 100 μ L de la disolución de calibración en modo negativo. Programe el flujo de calibrador en 5 μ L/min.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	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-I	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 infundiendo acetona y metanol a 150 µL/min si no va a realizar otra evaluación o calibración o si va a cambiar el calibrador.
- **7.5.12** 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 sin tocar ninguna superficie. Lleve las botellas a la capilla de extracción de gases o cámara de bioseguridad previamente limpiada con etanol al 95% y papel sobre la superficie.
- 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 desionizada 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 con excepción de la botella de lavado de sellos para lo que aplica lo indicado en 7.1.14.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 16 de 30
USO Y MANEJO DEL CROMATOGRAFO LÍQUIDO VANQUISH CON DETECTOR DE MASAS POR CUADRUPOLO-TRAMPA ORBITANTE (LC/MS O-EXACTIVE) LC/MS-2	P-DCF-ECE-TOX-08	

Nota 3 Cuando se utiliza disolventes calidad LC/MS, HPLC prefiltrados, agua tipo I o agua calidad LC/MS no es necesario filtrar los eluentes. Si necesita filtrar los eluentes proceda según lo indicado en el Anexo 1. Para el lavado del ALS y de sellos pueden utilizarse disolventes calidad HPLC, LC/MS o p.a.r. y no es necesario filtrar.

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 del HPLC y los desechos de la interfase (garrafa de 2 galones conectada a la interfase) en recipientes dentro de una capilla de extracción de gases según el Manual de Seguridad y Salud Ocupacional. 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 03	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 selecione los canales y porcentajes de eluentes indicados en el cuadro siguiente. Ver Figura 18

Composición	mposición Flujo (µL/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 03 PAC

USO Y MANEJO DEL CROMATOGRAFO LÍQUIDO VANQUISH CON DETECTOR DE MASAS POR CUADRUPOLO-TRAMPA ORBITANTE (LC/MS Q-EXACTIVE) LC/MS-2



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

7.7.13Vaya 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"

Nota 4 la infusión directa de bajo flujo (7.8) y el tuning de alto flujo (7.9) no son procedimientos de rutina, se realizan para estudiar analitos nuevos para ver si se pueden incorporar a un método.

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 invectarle 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 $\mu\text{g/mL}$ 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 μ L/min, aumente hasta 20 μ L/min si la señal para el ion molecular es muy baja (M+H o M-H).

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	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-I	ECE-TOX-08

- **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 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.

🔊 Scan paramet	ers D		
History			
Scan type	Full MS		
Scan range	50.0 to 450.0 m/z		
Fragmentation	None		
Resolution	17,500		
Polarity	Positive		
Microscans	1		
Lock masses	Off		
AGC target	1e6		
Maximum inject time	30		
Apply	Help Hot link		

Figura 19 Parámetros de escaneo

7.8.12Vaya 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 µL/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

7.8.13Vaya 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).

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	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-I	ECE-TOX-08

- **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.
- **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.

C Acquisitic	n. 🔹			
Acquisition state	ready			
Progress	0.00 min			
File in use	D:\LC-Q-EXACTIVE\PLAGUICIDAS\PRUEBA 13-02-20\BL.raw			
Destination file	D:\LC-Q-EXACTIVE\DATA\2020\Benzodiacepinas 18-01 infusion			
Method file	by time			
Acquisition time	continuously			
Sample	Mezcla benzodiacepinas 18-01			
Comment	10 µg/mL en metanol 22-5-18 SMG			
On start	don't wait			
After acquisition	stay on			
Start	Pause Help			

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 03	PAGINA: 21 de 30
USO Y MANEJO DEL CROMATOGRAFO LÍQUIDO VANQUISH CON DETECTOR DE MASAS POR CUADRUPOLO-TRAMPA ORBITANTE (LC/MS O-EXACTIVE) LC/MS-2	P-DCF-I	ECE-TOX-08



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

- 7.8.21La abundancia para el analito puede verse en la parte superior del espectro, la abundancia debe estar entre 1 x 106 y 5 x 109. 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.
- 7.8.22Si 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 03	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-I	ECE-TOX-08

🔊 Scan paramet	ers			*
History	\rightarrow			
Scan type	MS/MS of 32	6.1 ± 0.5 m/z		
Scan range	🗇 Full MS – S	SIM		
Fragmentation	AIF - MS/N	vis		
Resolution				
Polarity	Isolation:			
Microscans	Minimum	325.6 🌲 r	n/z	
Lock masses	Maximum	326.6 🛋 r	m/7	
AGC target			10/2	
Maximum inject time	Precursor	326.1 🌲 r	n/z	
Apply	Width	1.0 🌲 r	n/z	

Figura 22 Parámetros de escaneo para MS/MS

- **7.8.24**Cambie en "Scan range" el "Minimum" por 50 m/z.
- 7.8.25Cambie 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.

7.9Tuning 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 5 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 03 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



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 μ g/mL para evitar contaminaciones en el equipo.
 - Idealmente debe ser filtrada antes con un filtro de membrana de nylon o teflón de 0,22 μ m 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 03	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-I	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)	lon 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 mo	ode					

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

- 7.9.11Vaya 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 valvula del QE a posición 2 accionando la flecha azul hacia arriba. Ver figura siguiente:

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES

VERSIÓN 03 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 μ L/min, aumente hasta 20 μ L/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 6. 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.

7.10.1Cambio 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 03	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-I	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.

7.10.3Solución 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.

12 Simbología.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 27 de 30
USO Y MANEJO DEL CROMATOGRAFO LÍQUIDO VANQUISH CON DETECTOR DE MASAS POR CUADRUPOLO-TRAMPA ORBITANTE	P-DCF-ECE-TOX-08	

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).

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

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

CE: "Colission Energy" o energía de colisión.

DCF: Departamento de Ciencias Forenses.

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

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

HPLC: "High Performance Liquid Chromatography" o Cromatografía Liquida de Alto Rendimiento.

IT: "Inyection 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 MS².

MS: Espectrometría de masas.

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

N/A: no aplica.

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

PON: Procedimiento de Operación Normado.

SCD: Solicitud Cambio Documental.

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.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	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	

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
C	OPIA NO CONTROLAT

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 29 de 30
USO Y MANEJO DEL CROMATOGRAFO LÍQUIDO VANQUISH CON DETECTOR DE MASAS POR CUADRUPOLO-TRAMPA ORBITANTE (LC/MS O-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, HPLC o LCMS pase a la botella de lavado de sellos del LC/MS. Mida luego 900 mL de Agua tipo I o LC/MS y deposítelos en la misma botella.

Filtración de fase móvil (solo necesaria cuando no se cuente con disolventes calidad LC/MS o HPLC prefiltrados)

En una capilla de extracción de gases o Cámara de Bioseguridad previamente limpiada con etanol al 95% y con papel sobre la superficie de trabajo y equipada con bomba de vacío, coloque el sistema de filtración de fase móvil para HPLC de vidrio para membranas de 47 mm. Coloque un filtro de membrana de nylon o PTFE de 47 mm y 0,2 µm en el sistema y aplique vacío.

Filtre los eluentes que necesiten filtración según lo indicado en la Nota 3 del procedimiento en el siguiente orden (enjuagando dos veces con el disolvente que va a filtrar para eliminar el anterior y desechando este enjuague): acetonitrilo, metanol y agua (solo los que lo necesiten). Entre un líquido y el otro deposite el filtrado en las botellas del HPLC correspondientes.

CORIANO

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 30 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 2

Pantalla principal del QE Tune



P-DCF-GCG-JEF-001-R3, Versión 01

Emitido y Aprobado por Unidad de Gestión de Calidad