

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

Espectrômetro de Massas AB Sciex TripleTOF 5600+ (Calibração)

Elaborado em 20/08/2015 por Thiago Rosa Sampaio

Revisado em 12/07/2016 por Alan Ribeiro Mól

OBJETIVO

Estabelecer metodologias básicas para aquisição de dados por infusão direta e por sequências utilizando o UHPLC.

1. CRIANDO MÉTODO DE VARREDURA (TOF MS)

- 1.1. Verifique se o perfil de hardware contendo o espectrômetro de massas e o UHPLC está ativo. Se necessário, faça a troca de perfil (Figura 1).
- 1.2. Na barra de navegação, abaixo de *Acquire*, dê um duplo clique em *Build Acquisition Method*. O modelo de edição de método irá abrir (Figura 2).
- 1.3. Na janela de *Acquisition Method Properties*, selecione no *Synchronization Mode*, o modo *LC Sync*.
- 1.4. No painel da aquisição do método clique em *Mass Spectrometer*.
- 1.5. Na aba *MS*, selecione o tipo de *scan* TOF MS para aquisição do espectro de massas.

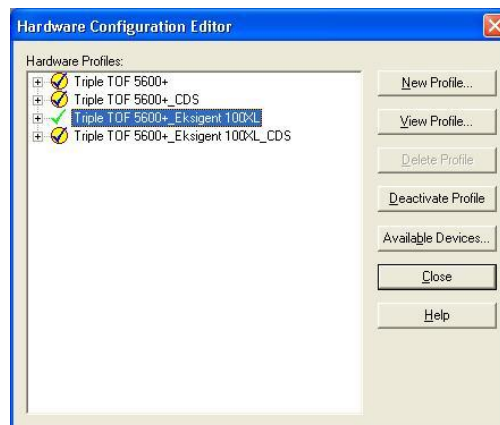


Figura 1. Selecionando perfil de hardware com UHPLC.

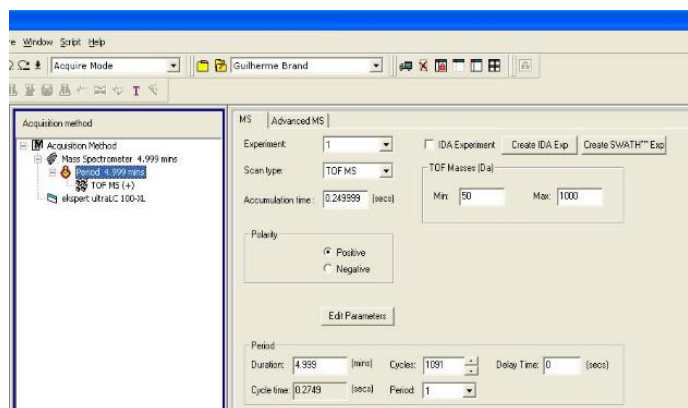


Figura 2. Tela para criação de método de MS

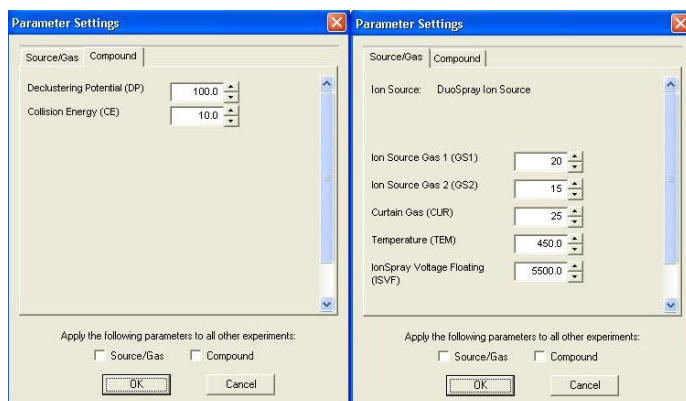


Figura 3. Parâmetros do método de MS

- 1.6. Selecione a polaridade e o tempo de duração do experimento de MS (normalmente, igual ao tempo da corrida cromatográfica).
- 1.7. Click em *Edit Parameters*, e edite os parâmetros (Figura 3). No modo TOF MS, não altere os valores de DP e CE.
- 1.8. Ajuste o valor de GS1 (Mín.30 e Máx. 50). Iniciar com o valor de 45.
- 1.9. Ajuste o valor de GS2 (Mín. 40 e Máx. 60). Iniciar com o valor de 45.
- 1.10. Ajuste o valor de CUR (Mín. 20 e Máx. 50). Iniciar com o valor de 25.
- 1.11. Ajuste o valor de Temperature (TEM) (Mín.400 e Máx. 750). Iniciar com o valor de 450.
- 1.12. Ajuste o valor de Voltage (ISVF) (Mín. 0 e Máx. 5500 V no modo positivo e Máx. -4500 V no modo negativo). Inicie com o valor de 5500 V para o modo positivo e -4500 V para o modo negativo.

2. CRIANDO UM MÉTODO DE FRAGMENTAÇÃO DIRECIONADO (TARGETED)

Para análises exploratórias ou que não sejam de quantificação, recomenda-se utilizar um método data-independente. Neste caso, pule para o item 3.

- 2.1. Adicione um experimento de MS/MS, clicando com o botão direito sobre o período e selecione a opção *Add experiment* (Figura 8).
- 2.2. No campo *Scan Type*, selecione *Product Ion*.

- 2.3. No campo *Product Of*, coloque a massa do analito de interesse.
- 2.4. Escolha um dos modos TOF: *High resolution* ou *High Sensitivity*. Note que o equipamento deve ser calibrado no mesmo modo, pois são calibrações independentes.
- 2.5. No quadro *TOF Masses*, defina a faixa de massas em que os fragmentos serão analisados.
- 2.6. Clique em *Edit Parameters*, e edite os parâmetros (DP e CE) para o composto de interesse. Estes parâmetros devem ser determinados anteriormente por infusão direta com a seringa e verificação das rampas.
- 2.7. Repita os procedimentos 2.1 a 2.4 para cada analito que desejar realizar a fragmentação.
- 2.8. Salve o método de aquisição (*File* → *Save*) e feche o método. Note que a parte referente ao método cromatográfico não contém nenhuma informação.

3. CRIANDO UM MÉTODO DE FRAGMENTAÇÃO DATA-DEPENDENTE (IDA OU DDA)

- 3.1. Para criação de um método IDA, primeiramente deverá ser criado um método TOF MS.
- 3.2. Adicione um experimento de *MS/MS*, clicando com o botão direito sobre o período e selecione a opção *Add experiment* (Figura 8).
- 3.3. No campo *Scan Type*, selecione *Product Ion*.
- 3.4. Selecione a caixa *IDA Experiment* ao lado do número do experimento.
- 3.5. Os parâmetros DP e CE neste modo são determinados automaticamente e não precisam ser modificados.
- 3.6. Na aba *Switch Criteria*, configure os parâmetros do *scan* como desejado (faixa de massas, estados de carga, contagem mínima e exclusão de íons repetidos).
- 3.7. Na aba *IDA Advanced*, o padrão é marcar apenas as caixas *Dynamic background subtract* e *Rolling collision energy*, deixando todas as outras desmarcadas.
- 3.8. Salve o método de aquisição (*File* → *Save*) e feche o método. Note que a parte referente ao método cromatográfico não contém nenhuma informação.

3.9. Adicionando o método de cromatografia ao método de MS

- 3.10. Primeiramente, feche o método que está em criação na janela do Analyst, se estiver aberto. A edição do método de MS e de LC ao mesmo tempo pode gerar conflitos no arquivo.
- 3.11. Abaixo de *Companion Software* clique em *ekspert ultraLC 100-XL*. O software para edição do método de LC será aberto.
- 3.12. No software do LC, abra o método recém salvo no Analyst indo no menu *File* → *Open*.
- 3.13. Para ajustar os parâmetros do método, clique na figura na região do equipamento que realiza a operação:
 - 3.13.1. Clique nas bombas para definir o fluxo da corrida, os frascos que serão utilizados e a proporção ou gradiente dos solventes.
 - 3.13.2. Clique no auto-amostrador para definir o volume de injeção e a temperatura do rack de amostras.
 - 3.13.3. Clique no forno para mudar a temperatura da coluna.
- 3.14. Edite os parâmetros de cada módulo do LC (amostrador automático, bombas e forno da coluna). Lembre-se que o tempo de corrida do método LC deve ser igual ao tempo do período do método de MS.
- 3.15. Salve o método LC e feche o software *ekspert ultra LC 100-XL*.
- 3.16. No software *Analyst* clique em *Acquire*. Na barra de menu clique em *File* → *Open* → *Acquisition Method* e selecione o método recém editado.
- 3.17. Observe que agora o seu método apresenta as informações referentes ao LC.
- 3.18. Salve o método e feche.

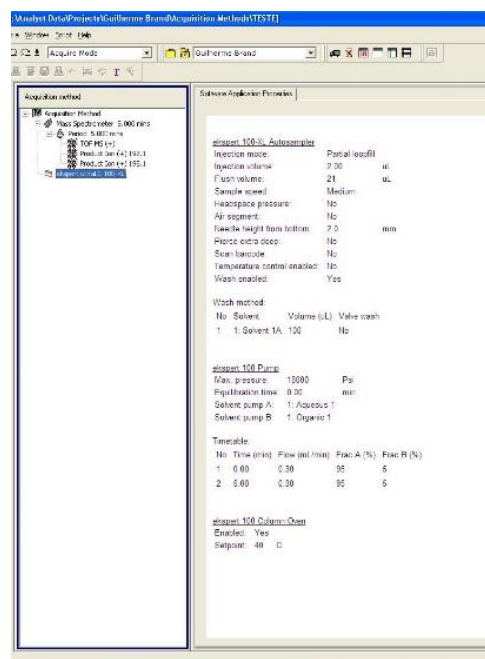


Figura 8. Parâmetros de LC mostrados dentro do editor de método de MS no software *Analyst*.