

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

Espectrômetro de Massas AB Sciex TripleTOF 5600+ (Calibração)

Elaborado em 20/08/2015 por Thiago Rosa Sampaio

Revisado em 30/06/2016 por Alan Ribeiro Mól

OBJETIVO

Estabelecer metodologias básicas para otimização dos parâmetros de composto e de fonte para análises quantitativas e qualitativas.

1. OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DO ANALITO

1.1. Verificando a presença do analito e se preparando para otimização por infusão direta

- 1.1.1. Antes de começar, consulte o método de calibração caso haja dúvidas sobre a utilização da seringa.
- 1.1.2. Calibre o instrumento utilizando a seringa, e então troque seu conteúdo pela solução contendo o analito que será analisado.
- 1.1.3. No software Analyst, na barra de navegação, abaixo de *Tune and Calibrate*, clique duas vezes em *Manual Tuning*.
- 1.1.4. No item 1, selecione a opção *Syringe Pump Method* (Figura 1).
- 1.1.5. No campo *Syringe Diameter (mm)*, sempre coloque o valor de **4.6**. Não ligue a seringa se este valor não estiver correto.
- 1.1.6. No campo *Flow Rate*, coloque o valor de **10.0**.
- 1.1.7. Na lista *Unit*, selecione **$\mu\text{L}/\text{min}$** .
- 1.1.8. No item 1, selecione a opção *MS Method* (Figura 1).
- 1.1.9. Da lista de *Scan type*, selecione *TOF MS* (Figura 2).
- 1.1.10. Ajuste a faixa de massas do TOF para Min. 50 e Máx. 1000.
- 1.1.11. Selecione a polaridade desejada (*Positive ou Negative*). Sempre calibre o instrumento com a polaridade que deseja usar para as amostras.
- 1.1.12. Ajuste a duração para 0.5 min.
- 1.1.13. Selecione a aba *Source/Gas* (Figura 3).
- 1.1.14. Ajuste o valor de *GS1* (Mín. 0 e Máx. 60). Iniciar com o valor de **20**.
- 1.1.15. Ajuste o valor de *GS2* (Mín. 0 e Máx. 50). Iniciar com o valor de **15**.
- 1.1.16. Ajuste o valor de *CUR* (Mín. 20 e Máx. 50). Iniciar com o valor de **25**.
- 1.1.17. Ajuste o valor de *Temperature (TEM)* (Mín. 0 e Máx. 750). Iniciar com o valor de **0** (Temperatura ambiente).
- 1.1.18. Ajuste o valor de *IonSpray Voltage Floating (ISVF)* (Mín. 0 e Máx. 5500 V no modo positivo e Máx. -4500 V no

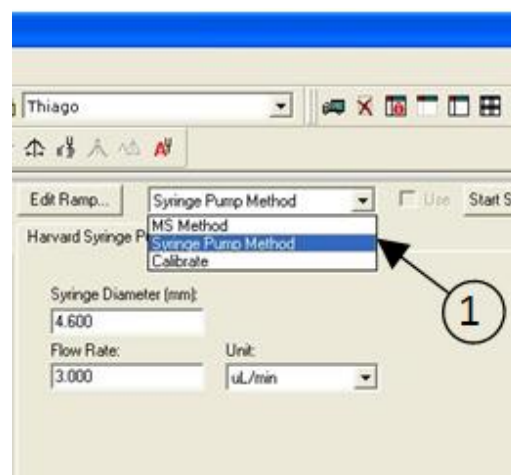


Figura 1. Tela para calibração manual.

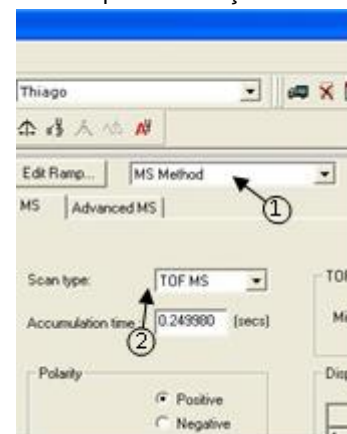


Figura 2. Caixa para seleção de experimento de MS.

modo negativo). Inicie com o valor de **5500 V** para o modo positivo e **-4500 V** para o modo negativo.

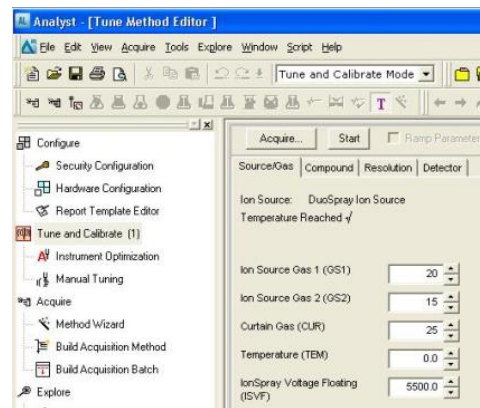


Figura 3. Tela para aquisição manual (Source/Gas).

- 1.1.19. Selecione a aba *Compound*, e faça alterações nos valores de *Declustering Potential (DP)* e *Collision Energy (CE)* somente se necessário.
- 1.1.20. Após ajustar todos estes parâmetros clique no botão *Start Syringe*. A amostra será injetada no espectrômetro, aguarde 1 minuto para garantir que a solução chegue até a fonte de ionização.
- 1.1.21. Clique em *Start*, para iniciar a detecção do espectrômetro.
- 1.1.22. Após o término da leitura selecione uma faixa do gráfico de TIC e então de um duplo clique para mostrar o espectro de massas médio.
- 1.1.23. Verifique se seu analito está presente no espectro de massas. Caso deseje armazenar o espectro obtido, utilize a opção *Acquire* para adquirir o espectro de massas. Na caixa de diálogo da aquisição coloque o nome do arquivo no qual será salvo o espectro.

1.2. Otimizando o *Declustering Potential (DP)*

- 1.2.1. Da lista de *Scan type*, selecione *TOF MS* para realizar um experimento de varredura.
- 1.2.2. Se a seringa estiver parada, clique em *Start Syringe* para iniciar a infusão da solução.
- 1.2.3. Ajuste a faixa de massas de forma que ela contemple as massas dos analitos de interesse.
- 1.2.4. Clique em *Edit Ramp* para configurar a rampa de DP que será utilizada.
- 1.2.5. Em *Parameter*, selecione *Declustering Potential*. Os valores de *Start*, *Stop* e *Step* podem ser deixados no padrão, ou seja, 0, 300, 1, respectivamente. Clique em OK.
- 1.2.6. Ajuste a duração do experimento para 0.5 minutos.
- 1.2.7. Clique em *Start* e a varredura será iniciada.
- 1.2.8. Após a aquisição, selecione a região central do TIC e dê dois cliques para obter o espectro de massas médio.
- 1.2.9. Procure o pico do analito de interesse, selecione-o e dê dois cliques para abrir o XIC.
- 1.2.10. Observe no XIC em qual DP houve maior intensidade de sinal. Este valor deve ser registrado para uso posterior.

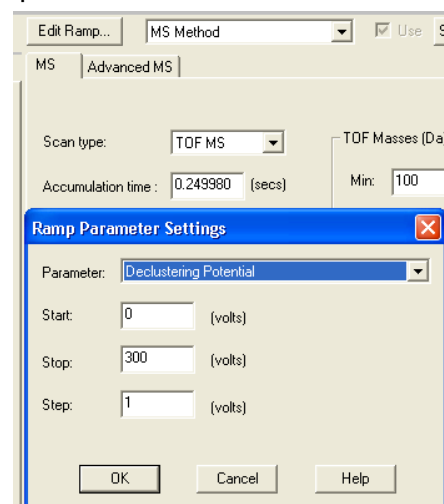


Figura 4. Configurando a rampa de DP.

1.3. Otimizando a *Collision Energy (CE)*

- 1.3.1. Da lista de *Scan type*, selecione *Product Ion* e no campo abaixo insira a massa do analito.
- 1.3.2. Ajuste a faixa de massas de forma que ela contemple as massas dos fragmentos do analito.
- 1.3.3. Na aba *Compound*, insira o valor de DP otimizado anteriormente.
- 1.3.4. Clique em *Edit Ramp* para configurar a rampa de CE que será utilizada.
- 1.3.5. Em *Parameter*, selecione *Collision Energy*. Os valores de *Start*, *Stop* e *Step* podem ser deixados no padrão, ou seja, 0, 150, 1, respectivamente. Clique em OK.
- 1.3.6. Ajuste a duração do experimento para 0.5 minutos.
- 1.3.7. Clique em *Start* e a varredura será iniciada.

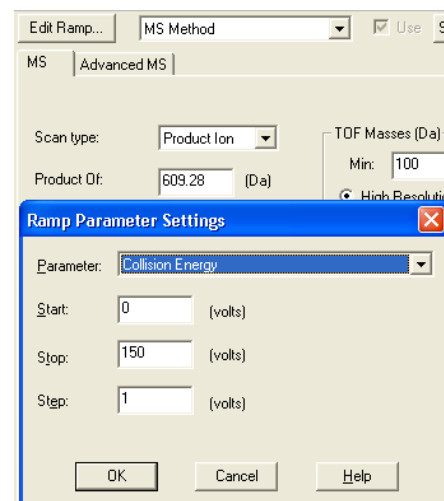


Figura 5. Configurando a rampa de CE.

- 1.3.8. Após a aquisição, selecione uma pequena região do TIC e dê dois cliques para obter o espectro de massas médio. Verifique os diferentes fragmentos formados para cada faixa de CE, e suas intensidades relativas.
- 1.3.9. Defina qual fragmento será utilizado para quantificação, sendo o critério principal a intensidade do sinal.
- 1.3.10. Extraia o XIC do pico do fragmento escolhido selecionando-o e dando dois cliques.
- 1.3.11. Observe no XIC em qual CE houve maior intensidade de sinal. Este valor deve ser registrado para uso posterior.

1.4. Finalizando a otimização dos parâmetros

- 1.4.1. Após otimizar os valores de DP e CE, é recomendado a aquisição dos espectros com os parâmetros ótimos. Para isso, utilize o botão *Acquire*
- 1.4.2. Para parar a seringa clique em *Stop Syringe*.
- 1.4.3. Desconecte a seringa do equipamento e guarde/descarte a amostra.
- 1.4.4. Limpe a seringa com isopropanol e descarte o isopropanol utilizado no frasco de resíduos.

1.5. Otimização dos parâmetros do analito pelo UHPLC

1.5.1. FAZER – CRIAÇÃO DE VÁRIOS METODOS

2. OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DA FONTE DE IONIZAÇÃO

2.1. Otimizar GS1, GS2, CUR e TEM