

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 uma metodologia básica para calibração do equipamento, utilizando seus acessórios e software de controle.

1. CALIBRAÇÃO VIA INFUSÃO DIRETA

1.1. Instalando a seringa no sistema

1.1.1. Conecte a agulha na seringa *gas-tight* (1,0 mL), aspire a solução de calibrante (modo positivo ou negativo). Caso haja bolhas dentro da seringa, remova-as.

1.1.2. Retire a agulha da seringa.

1.1.3. Conecte a seringa a tubulação ligada ao espectrômetro.

1.1.4. Pressione o botão de liberação do lado direito da base da bomba de seringa e abaixe a base para inserir a seringa. Coloque a seringa cuidadosamente na posição e utilize a trava para prendê-la ao sistema (Figura 1). Nunca solte a trava bruscamente, prenda a seringa com cuidado.

1.1.5. Depois de travar a seringa, mova-a para cima o máximo possível.

1.1.6. Mova a base da bomba de seringa para cima até que a base encoste no êmbolo da seringa.

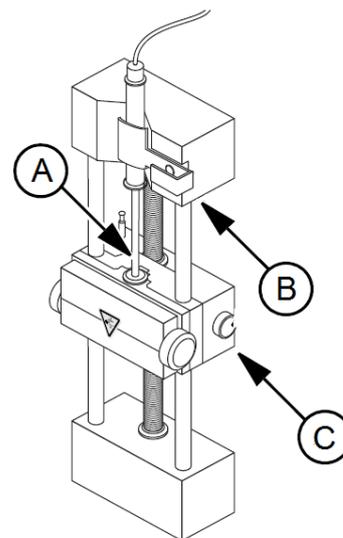


Figura 1. Conectando a seringa ao sistema. A: êmbolo da seringa. B: Trava para soltar e prender a seringa. C: Botão para liberar a base da seringa.

1.2. Ativando o perfil do hardware

1.2.1. Abra o software Analyst.

1.2.2. Com o aplicativo aberto selecione a opção *Hardware Configuration* na seção *Configure*.

1.2.3. Na tela a seguir selecione o perfil *Triple TOF 5600+*.

1.2.4. Depois de selecionado o perfil, clique em *Activate Profile*, após alguns segundos o ícone ✓ aparecerá ao lado do perfil selecionado.

1.2.5. Na mesma tela clique na opção *Close*.

1.3. Calibração manual do modo TOF MS usando o *Tune method editor*

1.3.1. Verifique se o spray está estável e se a solução de calibração correta está sendo utilizada.

1.3.2. No software Analyst, na barra de navegação, abaixo de *Tune and Calibrate*, clique duas vezes em *Manual Tuning*.

1.3.3. Na caixa de seleção 2A, selecione a opção *Syringe Pump Method* (Figura 2).

1.3.4. No campo *Syringe Diameter (mm)*, sempre coloque o valor de 4.6. Não ligue a seringa se este valor não estiver correto.

1.3.5. No campo *Flow Rate*, coloque o valor de 10.0.

1.3.6. Na lista *Unit*, selecione $\mu\text{L}/\text{min}$.

1.3.7. No item 2A, selecione a opção *MS Method* (Figura 3).

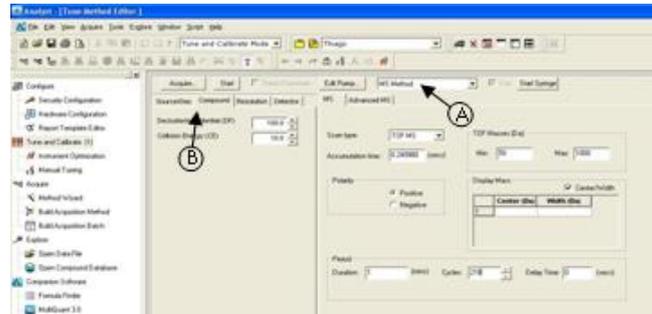


Figura 2. Tela para calibração manual (*Syringe Pump Method*). Figura 3. Tela para calibração manual (*MS Method*).

1.3.8. Da lista de *Scan type*, selecione *TOF MS*.

1.3.9. Ajuste a faixa de massas do TOF para os valores desejados. Os valores padrão são Min. 50 Da e Max. 1000 Da.

1.3.10. Selecione a polaridade desejada (*Positive* ou *Negative*).

1.3.11. Ajuste a duração para 0.5 min.

1.3.12. No item 2, selecione a aba *Source/Gas* (Figura 4).

1.3.13. Ajuste o valor de GS1 (0 a 60). Valor padrão: 20.

1.3.14. Ajuste o valor de GS2 (0 a 50). Valor padrão: 15.

1.3.15. Ajuste o valor de CUR (10 a 50). Valor padrão: 25.

1.3.16. Ajuste o valor de Temperatura (TEM) (0 a 750). Valor padrão: 0 (Temperatura ambiente).

1.3.17. Ajuste o valor de Voltagem (ISVF) (0V a 5500V em modo positivo, -4500V a 0V em modo negativo). Valores padrão: 5500V e -4500V para os modos positivo e negativo, respectivamente.

1.3.18. No item 2, selecione a aba *Compound*, não faça alterações no valores de *Declustering Potential* (DP) e *Collision Energy* (CE).

1.3.19. Após ajustar todos estes parâmetros clique no botão *Start Syringe* (Figura 5). A amostra será injetada no espectrômetro, aguarde um minuto para garantir que a solução chegue à fonte de ionização.

1.3.20. Clique em *Start*, para iniciar a detecção no espectrômetro.

1.3.21. Após o término da leitura selecione uma faixa com sinal estável do gráfico de *TIC* e então dê um duplo clique para mostrar o espectro de massas médio.

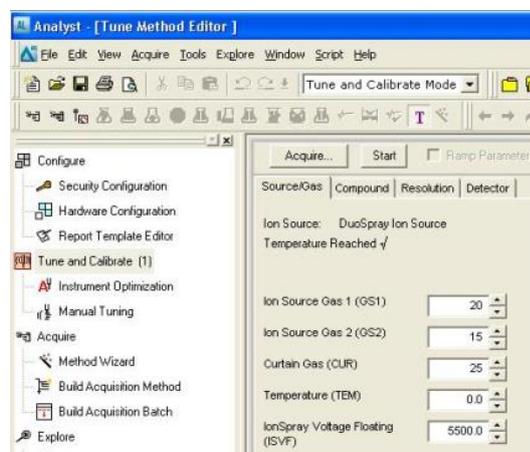


Figura 4. Tela para calibração manual (*Source/Gas*).

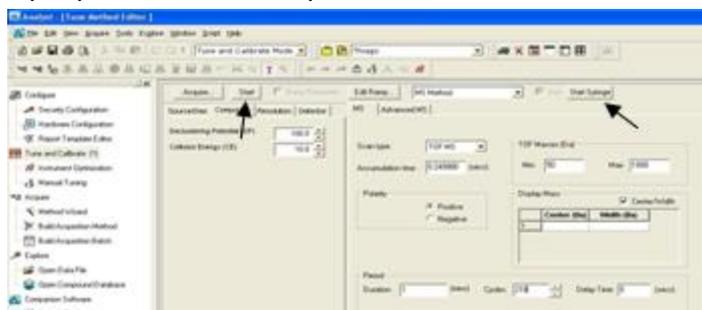


Figura 5. Tela para calibração manual (*Start Syringe*).

1.3.22. No espectro de massas médio clique com o botão direito e então selecione *Re-Calibrate TOF*.

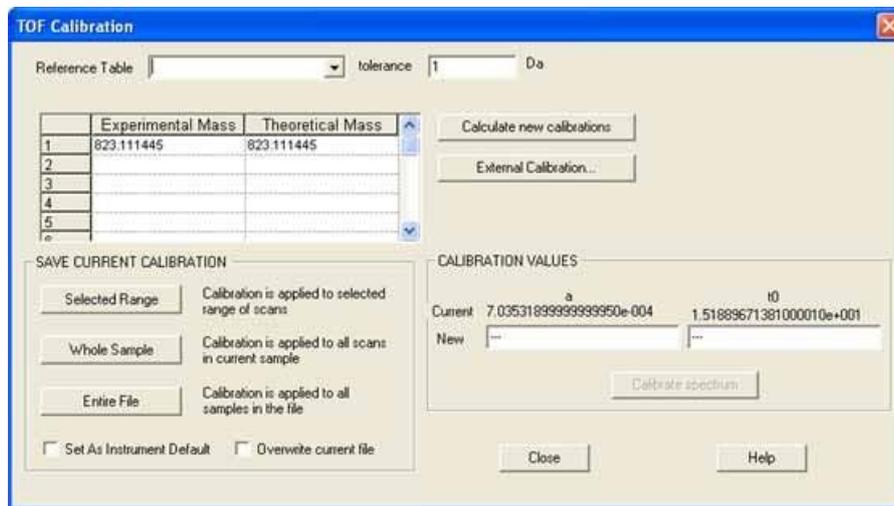


Figura 6. Tela para calibração manual (*Re-calibrate TOF*).

- 1.3.23. Na caixa de dialogo *TOF Calibration*, em *Reference Table*¹, selecione a solução calibrante injetada (*APCI Solution Positive Mode* para modo positivo ou *APCI Solution Negative Mode* para modo negativo).
- 1.3.24. Clique em *Calculate new calibrations*. Os parâmetros de calibração baseados no experimento e nas massas teóricas são calculados. O equipamento estará calibrado se o erro de calibração calculado for menor que 0,5 ppm.
- 1.3.25. Clique em *Calibrate spectrum*.
- 1.3.26. Clique em *Entire File*, dê OK em todas as outras janelas que aparecerão.
- 1.3.27. Clique em *Close*.
- 1.3.28. Repita os procedimentos a partir do item 1.3.20 até que o equipamento esteja calibrado no modo TOF MS.
- 1.3.29. Para calibrar o modo MS/MS, da lista de *Scan type*, selecione *Product of*.
- 1.3.30. No campo *Product of* coloque o valor referente à massa do calibrante (609 para modo positivo ou 403 para modo negativo).
- 1.3.31. No item B da figura 3, selecione a aba *Compound* e altere os valores de *Declustering Potential (DP)* e *Collision Energy (CE)*, de acordo com o descrito na tabela de referência.
- 1.3.32. Clique em *Start* para iniciar a detecção no espectrômetro.
- 1.3.33. Após o término da leitura selecione uma faixa do gráfico de TIC e então dê um duplo clique para mostrar o espectro de massas médio.
- 1.3.34. No espectro de massas médio dos fragmentos, clique com o botão direito e então selecione *Re-Calibrate TOF*.
- 1.3.35. Na caixa de dialogo *TOF Calibration*, em *Reference Table*¹, selecione a solução calibrante injetada (*APCI Solution Positive Mode* para modo positivo ou *APCI Solution Negative Mode* para modo negativo).
- 1.3.36. Clique em *Calculate new calibrations*. Os parâmetros de calibração baseados no experimento e nas massas teóricas são calculados. O equipamento estará calibrado se o erro de calibração calculado for menor que 0,5 ppm.
- 1.3.37. Clique em *Calibrate spectrum*.
- 1.3.38. Clique em *Entire File*, dê OK em todas as outras janelas que aparecerão.
- 1.3.39. Clique em *Close*.

¹ Para editar a tabela de referência (*reference table*), na barra de menu, clique em *Tools* → *Settings* → *Tuning options*. Na janela *Tuning options*, clique em *Reference*, selecione a tabela de referência que será utilizada para calibração (*APCI solution positive mode* para modo positivo ou *APCI solution negative mode* para modo negativo).

- 1.3.40. Repita os procedimentos a partir do item 1.3.32 até que o equipamento esteja calibrado no modo MS/MS.
- 1.3.41. Ao terminar a calibração, clique em *Stop Syringe*.
- 1.3.42. Desconecte a seringa do equipamento e transfira a solução calibrante para o respectivo eppendorf.
- 1.3.43. Limpe a seringa com isopropanol, descarte o isopropanol utilizado e coloque a seringa novamente no espectrômetro.

1.4. Desativando o perfil do hardware

- 1.4.1. Após fechar todas as janelas dentro do software Analyst, selecione a opção *Hardware Configuration* na seção *Configure*.
- 1.4.2. Clique em *Deactivate Profile* para desativar o perfil ativo e depois em *Close*.

2. CALIBRAÇÃO USANDO *BATCH EDITOR* VIA UHPLC

2.1. Preparando o método cromatográfico para calibração

- 2.1.1. Crie um método de MS com dois experimentos, um de *TOF MS* e outro de *Product Ion* (consulte o POP de criação de métodos).
- 2.1.2. No experimento *TOF MS*, confira se a faixa de massa, a polaridade e as condições da fonte estão de acordo com os parâmetros que serão utilizados para analisar as amostras.
- 2.1.3. No experimento *Product Ion*, tenha certeza de que a faixa de massa, a polaridade e os parâmetros da fonte do método de calibração estão de acordo com os parâmetros que serão utilizados para analisar as amostras. Verifique se o precursor utilizado no campo *Product Of* coincide com a massa do íon precursor selecionado na tabela de referência de calibração.
- 2.1.4. Verifique se a energia de colisão (*CE*) necessária para a produção dos fragmentos está inserida na tabela de referência de calibração.
- 2.1.5. Verifique se os tempos de retenção obtidos no método do LC estão de acordo com os valores inseridos na tabela de referência de calibração. Caso seja a primeira vez que o método é utilizado, será necessário realizar uma corrida exploratória para identificar os tempos de retenção de cada calibrante.

2.2. Realizando a calibração do instrumento via UHPLC

- 2.2.1. Conecte a tubulação de saída do UHPLC no espectrômetro de massas.
- 2.2.2. Na barra de navegação, abaixo de *Acquire*, duplo-clique em *Build Acquisition Batch*.
- 2.2.3. Crie o batch contendo a quantidade de amostras que deseja analisar.
- 2.2.4. Clique na aba *Calibrate* (Figura 7).

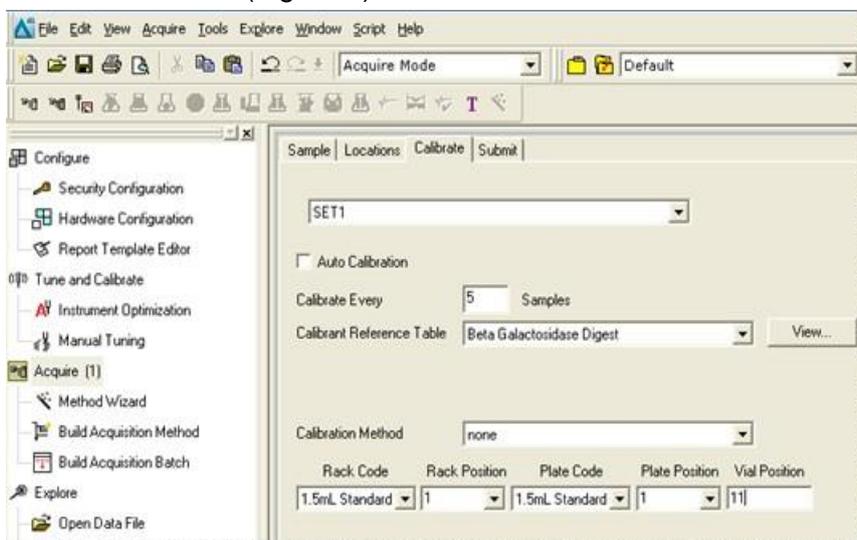


Figura 7. Tela para calibração via Batch Editor (*Re-calibrate TOF*).

- 2.2.5. Na aba *Calibrate*, selecione o conjunto (set).
- 2.2.6. Selecione a caixa *Auto Calibration*.
- 2.2.7. Selecione o número de amostras a serem adquiridas entre amostras de calibração.
- 2.2.8. Selecione a tabela de referência *Calibrant Reference Table* que será utilizado para calibrar o sistema.
Nesta janela a tabela de referência pode ser vista, mas não editada. Para editar a tabela de referência, clique em *Tools* → *Settings* → *Tuning Options*. Na janela *Tuning Options*, clique em *Reference*.
- 2.2.9. Selecione o método de calibração criado. Especifique a posição do vial com a solução calibrante.
- 2.2.10. Clique na aba *Submit* para iniciar o batch.
- 2.2.11. Clique em *View* → *View Queue* para acompanhar o andamento da fila de análises.
- 2.2.12. Quando o batch é submetido, as corridas de calibração são inseridas na fila. Cada conjunto de amostras começa com uma corrida de calibração. Dados de calibração são salvos em um arquivo de dados separado para cada corrida de calibração. O arquivo é salvo na pasta (Cal Data) e com o nome Cal, seguido da data (YYYY/MM/DD), da hora da injeção e do índice da corrida (Ex: Cal201603171038341.wiff).
- 2.2.13. Para acompanhar os dados adquiridos em tempo real, selecione o modo *Explore*, e então vá em *File* → *Open*, e abra o arquivo referente a corrida em execução.
- 2.2.14. Ao final da corrida, o ícone na fila do batch indica o resultado da calibração. O ícone ✓ indica que a calibração foi realizada com sucesso e a calibração de massas foi atualizada. O ícone ∅ indica que a corrida foi realizada com sucesso, mas que a calibração de um ou mais íons falhou.