



# SOMMAIRE

| 1. I | njection en mode Infusion                                 | 2  |
|------|---|----|
| 1.1  | Préparation de l'échantillon à analyser                   | 2  |
| 1.2  | Mise en place de la seringue sur le spectromètre de masse | 2  |
| 1.3  | . Paramétrages du logiciel SQ 300 MS                      | 5  |
| 1.4  | Lancer l'infusion   | 7  |
| 2. 0 | Création d'une méthode dans Chromera en mode LC-UV-MS     | 14 |
| 2.1  | . Connecter la masse                                      | 15 |
| 2.2  | Créer une méthode pour la masse                           | 16 |
| 2.3  | Créer une méthode LC-UV-MS                                | 19 |
| 2.4  | Lancer une analyse  | 22 |
| 2.5  | Afficher les résultats de l'analyse                       | 25 |

| Rédigé par : M. MICHNICK | Vérifié par : M. IDOUMBIN | Approuvé par : M. LAMAUVE |
|--------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Date : 22/10/2015        | Date : 26/10/2015         | Date : 10/11/2015         |

| Eucée Saint-Paul IV | PROCEDURE D'UTILISATION           | Pr Bioch Ma 035              |
|---------------------|-----------------------------------|------------------------------|
|                     | Utilisation de la chaîne LC-UV-MS | Version : 1                  |
|                     | Chromera / Flexar SQ 300 MS       | Date d'émission : 12/11/2015 |
|                     | Perkin Elmer                      | Page 2 sur 25                |

# 1. INJECTION EN MODE INFUSION

Étape permettant de déterminer les ions majoritaires produits lors d'une ionisation en mode positif ou négatif d'un échantillon correctement préparé.

#### 1.1. Préparation de l'échantillon à analyser

- Les extraits injectés doivent être limpides et sans aucune matière en suspension →centrifugation 10 min à 10 000 g puis filtration au 0,22 μm. (si nécessaire)
- Les extraits doivent être **hydrosolubles**. Il est interdit d'injecter des échantillons gras, protéinés ou saturé en sucres.
- Les extraits doivent être **clairs** ou **très peu colorés** pour ne pas souiller la chambre d'ionisation du spectromètre de masse. Le cas échéant diluer les échantillons au maximum en eau milliQ si possible.

À défaut d'eau milliQ ultrapure (résistivité de 10 à 18,2 M $\Omega$ .cm soit conductivité entre 0,1 et 0,055  $\mu$ S/cm), utiliser une eau pure de résistivité comprise entre 1 et 10 M $\Omega$ .cm ( $\sigma$  entre 1,0 et 0,1  $\mu$ S/cm), l'utilisation d'eau pour batterie de voiture peut être une alternative de dépannage mais ne saurait être une solution sur le long terme sous peine de détérioration **irréversible** la colonne.

Pour conserver le détecteur ESI en bon état, les concentrations d'échantillons doivent être inférieures à 5 mg/L (5 ppm). Le cas échéant diluer les échantillons au maximum en eau milliQ si possible.

#### 1.2. <u>Mise en place de la seringue sur le spectromètre de masse</u>

#### Se référer à la procédure « **Procédure de démarrage et fermeture du spectromètre de masse SQ 300 FLEXAR Perkin Elmer** » pour démarrer la masse et l'ordinateur.

- 1. Rincer la seringue 2 fois au méthanol.
- 2. Aspirer 500 µL de l'échantillon à analyser.
- 3. Positionner l'embout sur la seringue et laisser dépasser le tuyau de 1-2 mm.



| Rédigé par : M. MICHNICK | Vérifié par : M. IDOUMBIN | Approuvé par : M. LAMAUVE |
|--------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Date : 22/10/2015        | Date : 26/10/2015         | Date : 10/11/2015         |



4. Visser l'embout du tuyau relié à la *probe* avec la seringue. Pour cela, bloquer le côté *probe* et tourner le côté seringue.



5. Positionner la seringue sur la masse en placant son extrémité en verre dans la fente et la bloquer à l'aide de la patte de fixation.



Fente de positionnement de la seringue

6. Monter le plateau en tirant sur le bouton de blocage et le placer à 1-2 mm de la seringue.



Bouton de blocage du plateau

| Rédigé par : M. MICHNICK | Vérifié par : M. IDOUMBIN | Approuvé par : M. LAMAUVE |
|--------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Date : 22/10/2015        | Date : 26/10/2015         | Date : 10/11/2015         |



| Rédigé par : M. MICHNICK | Vérifié par : M. IDOUMBIN | Approuvé par : M. LAMAUVE |
|--------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Date : 22/10/2015        | Date : 26/10/2015         | Date : 10/11/2015         |

| _                     | PROCEDURE D'UTILISATION           | Pr Bioch Ma 035              |
|-----------------------|-----------------------------------|------------------------------|
| CELucée Saint-Paul IV | Utilisation de la chaîne LC-UV-MS | Version : 1                  |
| académie La Réunion   | Chromera / Flexar SQ 300 MS       | Date d'émission : 12/11/2015 |
|                       | Perkin Elmer                      | Page 5 sur 25                |

#### 1.3. Paramétrages du logiciel SQ 300 MS

- 1. Ouvrir le logiciel en cliquant sur l'icône « SQ 300 MS Driver ».
- 2. Cliquer sur File  $\rightarrow$  Open Tune
- 3. Cliquer sur le *tune* le plus récent réalisé en *Neg1K* (si mode négatif) ou en *Pos1K* (si mode positif). Pour l'exemple choisi, le *tune* sélectionné est le dernier réalisé en mode positif le 01 oct 2014.

| 😵 SQ 300 MS Driver   |  |  |
|--|--|--|
| File View Instrument Collect Help  | Obeu Taue  |  |
| New Tune<br>New Method   | pos_10k_01_Apr_2014_11h41m<br>pos_10k_01_Oct_2014_10h29m<br>pos_10k_05_Apr_2012_09h09m                               |  |
| Open Data.<br>Open Tune<br>Open Method   | pos_10k_06_Sep_2013_10h56m<br>pos_10k_06_Sep_2013_12h10m<br>pos_10k_06_Sep_2013_16h37m<br>pos_10k_10_Apr_2012_07h45m |  |
| Print Setup  | pos_10k_10_Apr_2012_08h13m<br>pos_10k_11_Apr_2013_15h04m<br>pos_10k_30_May_2012_13h30m                               |  |
| 1 TP JPI_20150928-Vanillin-JPI_CAL test_1_1_2015-09-28-12-38-18<br>2 C:\ABData\Data\Snapshot                             | pos_1k_01_Apr_2014_11h31m<br>pos_1k_01_Apr_2014_10h19m   |  |
| 3 Test 01 Octobre 2014 2015-09-29 11H39M355<br>4 TP JPI_20150928-Vanillin-JPI_CAL 1ppm_1_1_2015-09-28-12-52-05           | pos_1k_05_Apr_2012_09h03m<br>pos_1k_06_Apr_2012_16h5tm<br>pos_1k_06_Sep_2013_10h19m                                  |  |
| 5 tests_20150928-test JPI_Ethylvanilline-2_1_1_2015-09-28-03-38-38<br>6 014878b6-aa4d-477e-929e-2ec5d1680780             | pos_1k_06_5ep_2013_10h46m<br>pos_1k_06_5ep_2013_12h00m<br>pos_1k_06_5ep_2013_15h27m                                  |  |
| 7 19466778-8200-4a50-9216-2899548ta0cf<br>8 TP JPI_20150928-Vanillin-JPI_CAL Ethyl vanilin 10ppm_1_1_2015-09-28-02-44-32 | pos 1k 06 5ep 2013 16h05m  |  |
| Exit   | OK Cancel  |  |





| Rédigé par : M. MICHNICK | Vérifié par : M. IDOUMBIN | Approuvé par : M. LAMAUVE |
|--------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Date : 22/10/2015        | Date : 26/10/2015         | Date : 10/11/2015         |

| _                     | PROCEDURE D'UTILISATION           | Pr Bioch Ma 035              |
|-----------------------|-----------------------------------|------------------------------|
| CELucée Saint-Paul IV | Utilisation de la chaîne LC-UV-MS | Version : 1                  |
| académie La Réunion   | Chromera / Flexar SQ 300 MS       | Date d'émission : 12/11/2015 |
|                       | Perkin Elmer                      | Page 6 sur 25                |

# 4. Procéder aux réglages dans la fenêtre A

| Calibration                        |  |   |
|------------------------------------|--|---|
| Calibration Points                 | (,118.01,2315.14021216691),(,322.05,6403 | Pulse counting Time (us) :                  |
| CAPEX and Skimmer                  |  | Puise counting time (µs).                   |
| Capillary Exit (Volts)             | Calibrated                               | - 100 en mode Scan                          |
| Skimmer (Volts)                    | Calibrated                               | - 300 000 en mode SIM                       |
| Channeltron Detector and PCDAU     |  |   |
| High Energy Dynode (Volts)         | -10000                                   |   |
| Detector Gain (Volts)              | -2545                                    |   |
| Signal Threshold (mV)              | 2  |   |
| Dwell and Delay Times              |  |   |
| Settling Time (ms)                 | 1.1                                      |   |
| Pulse Counting Time (μs)           | 100                                      | Acquisition mode : choisir le mode vou      |
| Linhal Variables                   |  | Acquisition mode. choisir le mode vou       |
| Acquisition Function               | Scan                                     | Scan ou SIM                                 |
| Low m/z                            | 100.000                                  | Low m/z : plus petite masse à détecter      |
| ligh m/z                           | 500.000                                  | (5 Da minimum)                              |
| Samples per mass                   | 10.0                                     |   |
| Sim with Span                      | No Span                                  | High m/z : plus grande masse à détecter     |
| Ion Polarity                       | Positive                                 | (3000 Da maximum)                           |
| ion Source                         |  | Samples per mass : laisser à 10             |
| Cylinder Lens (Volts)              | -4000                                    |   |
| Endplate (Volts)                   | -5000                                    | lon polarity : choisir le mode d'ionisation |
| Capillary Entrance (Volts)         | -6000                                    | voulu Positive ou Negative                  |
| Endplate Temperature               | High                                     | 5   |
| Drying Gas Temp. (*C)              | 300                                      |   |
| Drying Gas Flow Rate (L/m)         | 8  |   |
| Nebulizer Gas Pressure (PSI)       | 80                                       | Drying gas Temp (°C) : Régler à 300         |
| Left Sample Vial On                | True                                     | Drying gas Flow Rate (I /m) :               |
| Right Sample Vial On               | False                                    |   |
| QO                                 |  | - 8 si debit < 0,2 mL/min                   |
| Q0 RF Amplitude (Volts P-P)        | Calibrated                               | - 12 si 0,2 < débit < 0,5 mL/min            |
| Q0 Offset (Volts)                  | Calibrated                               |   |
| Q0 Exit Lens 1 (Volts)             | Calibrated                               |   |
| Q0 Exit Lens 2 (Volts)             | Calibrated                               |   |
| Q1                                 |  | A   |
| 01 Filter                          | Mass Filter                              | Suringo Mako : Chaisir la madàla da         |
| Q1 Resolution                      | Calibrated                               | Synnge wake . Choisin le modele de          |
| Q1 Coarse Resolution               | 0.27999999999999964                      | seringue utilisée, ici, une Hamilton        |
| Q1 Offset Voltage (Volts)          | Calibrated                               | Microliters Series Gastiaht                 |
| Q1 Ion Guide (Volts)               | Calibrated                               | Swinge Medel Chaisir la volume de           |
| Q1 Pole Polarity                   | Normal                                   | syringe woder: choisir le volume de         |
| Scan                               | C. C | seringue utilisée <i>, 500 μL</i> ici       |
| Scans Per Spectrum                 | 1  | Svringe Diameter (mm) : vérifier que        |
| Svringe Pump                       |  | volour oct bion 2.26                        |
| Suringe Make                       | Hamilton - Microliter Series Gastioht    | valeur est bien 3.20                        |
| Svringe Model                      | 500 ul                                   | Syringe Flow Rate (µL/min): entrer ur       |
| Svringe Diameter (mm)              | 3.26                                     | valeur comprise entre 5 et 50 uL/mi         |
| Swinge Flow Bate ( ul/min )        | 10                                       | généralement 10 en mode infusion            |
| eyninger ferr i face ( portini i j | 19                                       | generalement 10 en mode infusion            |

| Rédigé par : M. MICHNICK | Vérifié par : M. IDOUMBIN | Approuvé par : M. LAMAUVE |
|--------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Date : 22/10/2015        | Date : 26/10/2015         | Date : 10/11/2015         |



# 1.4. Lancer l'infusion

 Le gaz desséchant mets un peu de temps avant d'arriver à 300°C, il faut donc d'abord laisser le Syringe Flow Rate à 0 puis envoyer les informations de paramétrage à la masse en cliquant sur Apply → Tune.

| SQ 300 MS Driver - pos_1k_01_0ct_2014_10h19m             |  |
|--|--|
| File Edit View Instrument Apply Collect Tune Window Help |  |
| 1 D 😅 🖬 🖸 🖂 🔪 Ture                                       |  |
| 💯 pos_1k_01_0ct_2014_10h19m:1                            |  |

2. Vérifier la montée en température du gaz en cliquant sur **Instrument**  $\rightarrow$  **Status**.

| Source                  |           |           |
|-------------------------|-----------|-----------|
| Drying Gas Temperature: | 84 °C     |           |
| APCI Heater             | 56 °⊂     |           |
| Corona Current:         | 0.0 uA    |           |
| Instrument Operation    |           | Lamps     |
| Vacuum State:           | Unknown   | Power: (  |
| Diverter Valve State:   | Load      | Vacuum: 📢 |
| Pressure                |           | Ready: (  |
| Analyzer Vacuum: 1.10e  | -005 mBar | Close     |

3. Lorsque la température atteint 300°C, régler le débit à la valeur souhaitée (entre 5 et 50  $\mu$ L) et cliquer sur **Apply**  $\rightarrow$  **Tune**. Le pousse seringue se met en fonction, son voyant vert doit s'allumer.

| SQ 300 MS Driver - pos_1k_01_      | _0ct_2014_10h19m                                   |        |
|------------------------------------|--|--------|
| File Edit View Instrument Apply Co | llea Tune Window Help                              |        |
| D 📽 🖬 🖂 🖂 🔣 Tune                   | . • • • <b>•</b> • <b>?</b> •?                     | . O. I |
| B pos_1k_01_0ct_2014_10h19         | m:1  |        |
| Created for: ESI                   |  |        |
| Calibration                        |  |        |
| Calibration Points                 | (,118.01,2315.14021216691),(,322.05,6403.849037291 |        |
| CAPEX and Skimmer                  |  |        |
| Capillary Exit (Volts)             | Calibrated   |        |

Le cas échéant, appuyer directement sur le bouton poussoir.

4. Commencer l'enregistrement des ions détectés en appuyant sur l'icône Start Collecting

| 😵 🗅<br>File | 50, 30<br>Edit | 0 MS<br>View | Driver -  <br>Instrumer | po<br>It | Apply               | 01_00i<br>Collect | 1_20<br>Tun |
|-------------|----------------|--------------|-------------------------|----------|---------------------|-------------------|-------------|
| : C         | ) 🚅            |              |                         | 1        | 4                   |                   | X           |
|             | pos_           | _1k_(        | ) start colle           | cti      | <mark>ng 1</mark> 0 | h19m:1            |             |
| 0           | Created        | for: E       | SI                      |          |                     |                   |             |
| I           | E Cal          | ibrati       | on                      |          |                     |                   |             |

| Rédigé par : M. MICHNICK | Vérifié par : M. IDOUMBIN | Approuvé par : M. LAMAUVE |
|--------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Date : 22/10/2015        | Date : 26/10/2015         | Date : 10/11/2015         |

| _                     | PROCEDURE D'UTILISATION           | Pr Bioch Ma 035              |
|-----------------------|-----------------------------------|------------------------------|
| CELucée Saint-Paul IV | Utilisation de la chaîne LC-UV-MS | Version : 1                  |
| académie La Réunion   | Chromera / Flexar SQ 300 MS       | Date d'émission : 12/11/2015 |
|                       | Perkin Elmer                      | Page 8 sur 25                |

Une fois lancé, l'enregistrement commence, la **fenêtre B** montre l'intensité du signal détecté et la **fenêtre C** montre les ions détectés.



Si le signal est trop fort ou trop faible, régler la direction du spray à l'aide de la molette de réglage. Pour une infusion, on règle généralement le spray à **7-8 mm** vers la droite.



| Rédigé par : M. MICHNICK | Vérifié par : M. IDOUMBIN | Approuvé par : M. LAMAUVE |
|--------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Date : 22/10/2015        | Date : 26/10/2015         | Date : 10/11/2015         |



Voici un exemple de résultat obtenu en faisant varier la position de la probe



5. Déterminer les principaux ions détectés en réalisant un instantané en cliquant sur Collect -> Snapshot



Les fenêtres B et C s'ouvrent et correspondent aux enregistrements effectués depuis le début de l'analyse.



| Rédigé par : M. MICHNICK | Vérifié par : M. IDOUMBIN | Approuvé par : M. LAMAUVE |
|--------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Date : 22/10/2015        | Date : 26/10/2015         | Date : 10/11/2015         |

|                       | PROCEDURE D'UTILISATION           | Pr Bioch Ma 035              |
|-----------------------|-----------------------------------|------------------------------|
| CELucée Saint-Paul IV | Utilisation de la chaîne LC-UV-MS | Version : 1                  |
| académie La Réunion   | Chromera / Flexar SQ 300 MS       | Date d'émission : 12/11/2015 |
|                       | Perkin Elmer                      | Page 10 sur 25               |

Activer la fenêtre B en cliquant dessus et sélectionner à l'aide de la souris une zone du signal reçu pendant une période stable du signal d'environ 1 minute puis sélectionner **Average Spectra** 



Une nouvelle fenêtre C apparait, avec beaucoup moins de bruit de fond que la précédente, les ions principaux et secondaires sont repérables à ce stade.

Pour obtenir des informations sur les pics détectés, cliquer sur **Evaluation**  $\rightarrow$  **Peak Detect...** 



Une fenêtre apparait, vous pouvez à ce niveau décider de restreindre les masses à scanner en choisissant **Partial Spectrum** et en indiquant les limites à prendre en compte, *160* et *250* dans notre exemple. Valider vos réglages en cliquant sur **OK** 

| Full Spectrum     Pirtial Spectrum     tart (m/z): 160 End (m | n/z): 250      |
|---|----------------|
| Selection Criteria  |                |
| S/N greater than:   |                |
| Abs. Ampl. greater than threshold                             |                |
| Rel. Ampl. greater than (% of max p                           | eak):          |
| Abs. Area greater than:                                       | 0              |
| Rel. Area greater than (% of max pe                           | eak):          |
| FWHM greater than (m/z):                                      | 0.01           |
| FWHM less than (m/z):   | 0.01           |
| No. Highest Peaks:  | 1              |
| Max Valley (% above baseline):                                | 25             |
| m/z Assignment  |                |
| Centroid of the Top (% peak ampl):                            | 25             |
| -Display  | Feature Search |
| Display Results   | Sequential     |
| ОК  | Cancel         |
|   |                |

Rédigé par : M. MICHNICK Date : 22/10/2015

| N | Approuvé par : M. LAMAUVE |
|---|---------------------------|
|   | Date : 10/11/2015         |

| PROCEDURE D'UTILISATION           | Pr Bioch Ma 035   |
|-----------------------------------|---|
| Utilisation de la chaîne LC-UV-MS | Version : 1   |
| Chromera / Flexar SQ 300 MS       | Date d'émission : 12/11/2015  |
| Perkin Elmer                      | Page 11 sur 25  |
|                                   | PROCEDURE D'UTILISATION<br>Utilisation de la chaîne LC-UV-MS<br>Chromera / Flexar SQ 300 MS<br>Perkin Elmer |

Une nouvelle fenêtre montrant les informations de chaque pic détecté s'affiche.



Très souvent, le nombre de pics est bien trop élevé et il est nécessaire de régler le seuil de base afin de ne pas traiter les pics trop petits. Pour cela, cliquer sur **Evaluation**  $\rightarrow$  **Threshold...** puis entrer un seuil adéquat, ici 10 000 000 pour éliminer tous les pics inférieurs à ce seuil.



Appliquer les réglages en cliquant sur Evaluation -> Substract Threshold

| File Edit View | Evaluation Instrument Collect \ | Vindow Help             |                          |                      |                         |              |
|----------------|---------------------------------|-------------------------|--------------------------|----------------------|-------------------------|--------------|
|                | Aerosol                         |                         |                          |                      |                         |              |
| 100            | Baseline                        |                         |                          | True of Original     |                         |              |
| La pos_1K_0    | Subtract Baseline               |                         |                          | Test of Octobre a    | 2014-2015-04-30 06H5/MC | 195.5qu:2    |
| Created for L. | Threshind                       |                         |                          |                      |                         |              |
| E Calibratio   | Subtract Thre hold              |                         |                          | F                    |                         |              |
| E Calibration  | Smooth                          | 118.01.2315.14021216691 | 11.322.05.6403.849037291 | 100                  |                         |              |
| E CAPEX a      | Peak Detect                     |                         |                          | E                    | Materia and Ma          | NATAN        |
| Capillary E    | Provide Peak Deconvolution      | alibrated               |                          | 1 90 <del>[</del>    | A La standa MT          | ist.         |
| Skimmer (      | Charge State Deconvolution      |                         |                          |                      |                         |              |
| 🗆 Channel      |                                 | -                       |                          |                      |                         |              |
| High Ener      | Save                            |                         |                          |                      | TIC                     |              |
| Detector (     | Run                             |                         |                          |                      | Scan 1                  |              |
| Signal Thu     | Save Spectra to Library         |                         |                          |                      | SCarl I                 |              |
| Dwell. N       | Run Library Search              |                         |                          |                      |                         |              |
| Setting        | 71 159 51241612 020             |                         |                          |                      | Macc                    |              |
| Puise L -      | /1.130, 31341013.939            |                         |                          |                      | GEN /4 96969 - 6 2025   | 0            |
| Acquici        | E                               |                         |                          | •                    | 0214 (4100300 012320.   | ./           |
| Low ma         | 50.00M E                        |                         | 134                      |                      |                         |              |
| High m         | 45.00M-E                        |                         | 220                      |                      |                         |              |
| Sample P       | 40.00M-                         |                         |                          |                      |                         |              |
| Sim with 8     | 35.00M-E                        |                         |                          |                      |                         |              |
| lon Pol.       | 30.00M                          |                         |                          |                      |                         |              |
| 🗉 Ion So 💩     |                                 | countire ch             | nici                     |                      |                         |              |
| Cylinde y      | 25.00M Seunae                   | coupure ch              |                          | 227.08               |                         |              |
| Endplat 5      | 20.00M                          | /                       |                          |                      |                         |              |
| Capillar, 8    | 15.00M-E                        |                         |                          |                      |                         |              |
| Endplat        | 10.00M-                         |                         |                          |                      |                         |              |
| Drying         | 5.00M-E                         | 171.99                  | 170.99 194.93 2          | 228.08 248.07        |                         |              |
| Druinge        | O ODINE I LA LA                 | in al sela da sela 🕺    | Kar I da da              | . 1 Kn 1. 1. 1.      | آ ا با آم ا آم          | 1 1 .        |
| Nebuliz        | 0.001                           | 150                     | 000                      | 050                  |                         |              |
| Left Sa        | 100                             | 150                     | 200                      | 250                  | 300<br>m/z              | 3            |
| Right S        |                                 |                         |                          |                      |                         |              |
| 500            | Card m/z Max Ampl m/z           | Charge Mono M           | ass Average Mass Wi      | dth (m/z) Res. Power | Noise S/N I             | Max Abs Ampl |
| Q0 Hr 1        | 169.9657 169.90                 | 97 0 0                  | 0.0000 0.0000            | 0.5810 292.53        | 30865.80 762.61         | 24069859.82  |
| GITT INSTA     | 1 (no cons) (no co              |                         |                          |                      |                         |              |

| Rédigé par : M. MICHNICK | Vérifié par : M. IDOUMBIN | Approuvé par : M. LAMAUVE |
|--------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Date : 22/10/2015        | Date : 26/10/2015         | Date : 10/11/2015         |

| _                     | PROCEDURE D'UTILISATION           | Pr Bioch Ma 035              |
|-----------------------|-----------------------------------|------------------------------|
| CELucée Saint-Paul IV | Utilisation de la chaîne LC-UV-MS | Version : 1                  |
| académie La Réunion   | Chromera / Flexar SQ 300 MS       | Date d'émission : 12/11/2015 |
|                       | Perkin Elmer                      | Page 12 sur 25               |

Relever les informations qui vous intéressent, notamment les rapports m/z des principaux ions détectés ou bien enregistrer vos résultats avec **Evaluation**  $\rightarrow$  **Save...**.

Une fois terminé, arrêter la collecte des informations en cliquant sur Stop Collecting



Arrêter l'infusion en réglant le débit à  $0 \,\mu L/min$  puis cliquer sur **Apply**  $\rightarrow$  **Tune** 

| (,118.01,2315.14021216691),(,322.05,6403 |
|--|
|  |
| Calibrated                               |
| Calibrated                               |
|  |
| -10000                                   |
| -2545                                    |
| 2  |
|  |
| 1.1                                      |
| 100                                      |
|  |
| Scan                                     |
| 100.000                                  |
| 500.000                                  |
| 10.0                                     |
| No Span                                  |
| Positive                                 |
|  |
| -4000                                    |
| -5000                                    |
| -6000                                    |
| High                                     |
| 300                                      |
| 8  |
| 80                                       |
| True                                     |
| False                                    |
|  |
| Calibrated                               |
| Calibrated                               |
| Calibrated                               |
| Calibrated                               |
|  |
| Mass Filter                              |
| Calibrated                               |
| 0.279999999999964                        |
| Calibrated                               |
| Calibrated                               |
| Normal                                   |
| Toma                                     |
| 1  |
| J.J.                                     |
| Hamilton Minediter Carine Carinet        |
| mamilton - microliter Series Gastight    |
| 2.00 µ                                   |
| 3.26                                     |
|  |

| Rédigé par : M. MICHNICK | Vérifié par : M. IDOUMBIN | Approuvé par : M. LAMAUVE |  |  |
|--------------------------|---------------------------|---------------------------|--|--|
| Date : 22/10/2015        | Date : 26/10/2015         | Date : 10/11/2015         |  |  |

| -                     | PROCEDURE D'UTILISATION           | Pr Bioch Ma 035              |  |
|-----------------------|-----------------------------------|------------------------------|--|
| CELUCÉE Saint-Paul IV | Utilisation de la chaîne LC-UV-MS | Version : 1                  |  |
| académie La Réunion   | Chromera / Flexar SQ 300 MS       | Date d'émission : 12/11/2015 |  |
|                       | Perkin Elmer                      | Page 13 sur 25               |  |

- 6. Une fois l'infusion terminée, rincer 2-3 fois la seringue avec du méthanol puis refaire une infusion avec du méthanol en remettant le débit à 10  $\mu$ L/min puis **Apply**  $\rightarrow$  **Tune**. Laisser infuser au moins **200**  $\mu$ L de façon à bien rincer la *probe*.
- 7. Arrêter le rinçage en remettant le débit à  $0 \mu L/min$  puis **Apply**  $\rightarrow$  **Tune**. Régler le spectromètre de masse en Standby avant d'aller dans le logiciel Chromera en cliquant sur **Instrument**  $\rightarrow$  **Standby**



Vérifier que l'appareil est bien en Standby en regardant l'information affichée dans le coin inférieur droit



8. Fermer la fenêtre **SANS ENREGISTRER** les changements effectués dans le tune.



- 9. Déconnecter la seringue de la *probe*, la rincer avec du méthanol et la remettre pleine de méthanol en place sur la masse.
- 10. Si vous voulez réaliser une LC/MS, relier la *probe* à l'HPLC en utilisant les mêmes règles de serrage vues au 1.2.4.

| Rédigé par : M. MICHNICK | Vérifié par : M. IDOUMBIN | Approuvé par : M. LAMAUVE |
|--------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Date : 22/10/2015        | Date : 26/10/2015         | Date : 10/11/2015         |

| _                     | PROCEDURE D'UTILISATION           | Pr Bioch Ma 035              |
|-----------------------|-----------------------------------|------------------------------|
| CELucée Saint-Paul IV | Utilisation de la chaîne LC-UV-MS | Version : 1                  |
| académie La Réunion   | Chromera / Flexar SQ 300 MS       | Date d'émission : 12/11/2015 |
|                       | Perkin Elmer                      | Page 14 sur 25               |

### 2. CREATION D'UNE METHODE DANS CHROMERA EN MODE LC-UV-MS

La procédure décrite ci-dessous se veut volontairement succincte, elle ne traite donc pas de l'utilisation d'une gamme étalon, de l'optimisation d'une méthode, du retraitement par lot ni de la création d'un format de rapport. Pour de plus amples informations à ces sujets, se référer à la documentation officielle « **Chromera User's guide.pdf** »

1. Ouvrir le logiciel Chromera LC-UV-MS en cliquant sur l'icône du bureau. Une fenêtre s'ouvre vous indiquant que le logiciel se connecte aux différents appareils

| Ģ | Device Connections |            |            | X     |
|---|--------------------|------------|------------|-------|
|   | Device             | Connected? |            | Tries |
|   | MS                 |            | connecting | 0     |
|   | UV.                |            | connecting | 0     |
|   | Pompe              |            | connecting | 0     |

Une fois les appareils connectés, la fenêtre devient

| Device Connections |            |            |       |
|--------------------|------------|------------|-------|
| Device             | Connected? |            | Tries |
| MS                 |            | Disconnect | 1     |
| UV                 |            | Disconnect | 1     |
| Pompe              |            | Disconnect | 1     |

Si une connexion a échouée (case non cochée), éteindre l'appareil qui n'a pas réussi à se connecter, attendre 30 secondes puis le rallumer et essayer de le connecter à nouveau en appuyant sur **Connect**.

2. Si tout est OK, la fenêtre suivante apparait :

|                         | 13-13-11-00倍差1型人公日本  |                           |                           |  |
|-------------------------|--|---------------------------|---------------------------|--|
|                         | Gallec uv Ms   | 1                         |                           |  |
| un Time                 | AbsorbanceData: 0 · · 0  | C PILL OF CALLOR          |                           |  |
| Control Mode            |  | Direct Control            |                           |  |
| Manual Control          | 000  | MS: Stop MS Equil         |                           |  |
| Sequer Manual Cont A    | -0.05  | MS: Vent MS               |                           |  |
|                         | -0.10  | MS: Diverter Valve: Diver | at .                      |  |
|                         | 0.15   | MS: Tune Control          | _                         | _  |
| No.                     | g -020   | UV: Autozero              | F                         |  |
| Pix 1                   | g -025   | CILIV: Turn Lang Off      |                           |  |
| D                       | 8 -0.30  | Start LC Pump             |                           |  |
| D                       | -0.35  |                           |                           |  |
|                         | -0.40  |                           |                           |  |
| Reference Plots         | 0.0 0.5 1.0 1.5 2.0 2.5 3.0 3.5 4.0 4.5  | 5.0                       |                           |  |
| Manual Control Devices  | Time (min)   |                           |                           |  |
| in an a contra o crites | Manual Control   | 5                         |                           |  |
|                         | 2  |                           |                           |  |
|                         |  | iquence Status            | MS: Cylinder Current (nA) | MS: Operate  |
|                         | Manine Revelue Method Lane   |                           | 0.0 nA                    | Ready  |
|                         | Start Browne for method. None  | 5. Vacuum State           | UV: Satipling Rate        | MS: MS Detector St   |
|                         | MS: Vent MS  | andby                     | 5.0 ptc/s                 | Standby  |
|                         | Apply  | 7. Detector Status        | HS: Drying Gas Temper.    | Elapsed Time   |
|                         | MS: Standby  | 1009                      | Into C                    |  |
|                         | Not a second sec | and Residue               | 55 °C                     | Treeson humber   |
|                         | Appy Browne for metho  | S. MS Andrew Slight       | Firm Step Tree            | Baunda   |
|                         | UV: UV Settings Wavelength (nn) Sampling Rate (pts/a)  | Acquiring                 | 0.0 min                   | and the second s |
|                         | Apply 250 5  | / Wavelength              | MS: Source Door           | Pump Flow  |
|                         | Pump Settings Flow (mL/min) 2A () 28 ()  | 4 nm                      | Closed                    | 0.000 mL/min   |
|                         | Apply 1.000 5.0 95.0   | S: Capilay Entrance.      | A% ()                     | Pump Elapsed Time  |
| Run Time                | Purge Purge Flow (mL/min) 100% A () 100% B ()  | AnD                       | 95.0                      | 0.2 min  |
| Method                  |  | / Absorbance              | HS: Analyzer Piessure [   |  |
| Sequence                |  | 0000 mAU                  | 0.00 Torr                 |  |
| Post Ru                 |  | mp Status                 | BXQ                       |  |
|                         |  | hutdown                   | 5.0                       | G  |
|                         |  | S: End Plate Current (    | MS: Foreine Pressure (_   | _  |
| Reprocess               |  | 1 - 0                     | C - 1 1 1 1               |  |
| Reprocess               |  | An U                      |                           |  |
| Reports                 | 8  | JnA                       |                           |  |

#### A : Mode de contrôle :

- **Manual control**  $\rightarrow$  permet de contrôler directement les instruments
- **Single Run**  $\rightarrow$  lancer une injection unique
- Sequence  $\rightarrow$  lancer une série d'injection
- B : Choix des graphes affichés dans la fenêtre D
- C : Mode d'utilisation du logiciel :
  - **Run time**  $\rightarrow$  choisir le mode de contrôle souhaité
  - **Method** → créer/éditer une méthode
  - Sequence → créer/éditer une série d'injection

| Rédigé par : M. MICHNICK | Vérifié par : M. IDOUMBIN | Approuvé par : M. LAMAUVE |  |  |
|--------------------------|---------------------------|---------------------------|--|--|
| Date : 22/10/2015        | Date : 26/10/2015         | Date : 10/11/2015         |  |  |

| Cucée Saint-Paul IV | PROCEDURE D'UTILISATION           | Pr Bioch Ma 035              |
|---------------------|-----------------------------------|------------------------------|
|                     | Utilisation de la chaîne LC-UV-MS | Version : 1                  |
| académie La Réunion | Chromera / Flexar SQ 300 MS       | Date d'émission : 12/11/2015 |
|                     | Perkin Elmer                      | Page 15 sur 25               |

- Post Run → analyser les données
- **Reprocess**  $\rightarrow$  recalculer le chromatogramme
- **Reports**  $\rightarrow$  choisir les données à afficher dans le rapport d'analyse
- D : Graphe en temps réel
- E : Paramètres de réglage du mode de contrôle sélectionné dans la fenêtre A
- F : Panneau de contrôle permettant de démarrer la pompe, allumer/éteindre la lampe UV...
- G : Panneau des états de l'appareil en temps réel

#### 2.1. Connecter la masse

| Cliquer sur Run Ti | $me \rightarrow$ Manual Cont              | ol                      |                |              |             |
|--------------------|---|-------------------------|----------------|--------------|-------------|
|                    | 😑 Control Made                            | 1                       |                |              |             |
| (                  | Manual Contri     Single Run     Sequence | 0.00<br>-0.05<br>-0.10  |                |              |             |
|                    | Plots  Plot 1                             | -0.15<br>-0.20<br>-0.25 |                |              |             |
|                    |   | -0.30<br>-0.35<br>-0.40 |                |              |             |
|                    | Reference Plots                           | 0.0 0.5                 | 1.0            | 1.5          | 2.0         |
|                    | Manual Control Devices                    | Manual Control          |                |              |             |
|                    |   | Manual Control          |                | -            |             |
|                    |   | 2                       |                |              |             |
|                    |   |                         |                |              |             |
|                    |   |                         |                |              |             |
|                    |   | Monitor Baseline        | Method M       | ethod Name   |             |
|                    |   | Start Browse            | for method     | None         |             |
|                    |   | MS- Vent MS             |                |              |             |
|                    |   | Apply                   |                |              |             |
|                    |   | MC. Charles             | -              |              |             |
|                    |   | Andu                    |                |              |             |
|                    |   |                         | _              |              |             |
|                    |   | MS: Uperate             | Method name    | Brows        | e           |
|                    |   | Appiy                   |                | browse for n | nethod      |
|                    |   | UV: UV Settings         | Wavelength (nm | Sampling I   | Rate (pts/s |
|                    |   | Apply                   | 250            | 5            |             |
|                    |   | Pump Settings           | Flow (mL/min)  | %A ()        | %B ()       |
|                    |   | 1                       | 1 1 000        | 5.0          | I 95.0      |
|                    |   | Apply                   | 1.000          |              | 00.0        |
|                    | Run Time                                  | Purge Pump              | Flow (ml /min) | 100% 4.0     | 100% B 0    |
| (                  | 🔊 Run Time                                | Purge Pump<br>Apply     | Flow (mL/min)  | 100% A ()    | 100% B ()   |

- Cliquer sur Browse for method  $\rightarrow$  ESI Operate method  $\rightarrow$  Open  $\rightarrow$  Apply

| Select Operate         | e Method       |                      |    | ? 🔀      | Man | ual Control                      |                             |                          |                          |
|------------------------|----------------|----------------------|----|----------|-----|----------------------------------|-----------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Look in                | : 🕞 🖂          | <u> </u>             | 00 | <u>۶</u> | 2   |                                  |                             |                          |                          |
| My Recent<br>Documents | ESI Operate I  | lethod               |    |          |     | Monitor Baseline                 | Method<br>Browse for method | Method Name<br>None      |                          |
| Desktop                |                |                      |    |          | -   | MS: Vent I<br>Apply<br>MS: Stand | 4S                          |                          |                          |
| My Documents           |                |                      |    |          |     | Apply<br>MS: Opera<br>Apply      | te Method n.<br>C:\Docume   | ame Bro<br>nts an Browse | owse<br>for metho        |
|                        |                |                      |    |          | -   | Apply                            | Wavelengtl<br>250           | n (nm) Samplii           | ng Rate (pts/s)<br>5 🛛 💭 |
| My Computer            |                |                      |    |          |     | Pump Settin                      | ngs Flow (mL/m              | in) %A()                 | %B ()                    |
|                        | File name:     | ESI Operate Method   |    | Open     | D   | Purge Pun                        | p Flow (mL/m                | in) 100% A ()            | 100% B ()                |
| My Network             | Files of type: | method files (*.sqm) |    | Cuncer   |     | Apply                            | 1.000                       |                          |                          |

| Rédigé par : M. MICHNICK | Vérifié par : M. IDOUMBIN | Approuvé par : M. LAMAUVE |
|--------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Date : 22/10/2015        | Date : 26/10/2015         | Date : 10/11/2015         |

| -                     | PROCEDURE D'UTILISATION           | Pr Bioch Ma 035              |
|-----------------------|-----------------------------------|------------------------------|
| CELucée Saint-Paul IV | Utilisation de la chaîne LC-UV-MS | Version : 1                  |
| académie La Réunion   | Chromera / Flexar SQ 300 MS       | Date d'émission : 12/11/2015 |
|                       | Perkin Elmer                      | Page 16 sur 25               |

- Vérifier dans le panneau des états (G) que le MS Detector State affiche bien Operate
- La température de la masse doit absolument être à **300°C** lors d'une injection en mode LC-MS, ne connecter le tuyau provenant de la colonne à la masse qu'à cette condition.

#### 2.2. <u>Créer une méthode pour la masse</u>

1. Cliquer sur **Method** puis cliquer sur **File**  $\rightarrow$  **Create/Edit MS Method**. Le logiciel SQ 300 MS Driver s'ouvre.

| ile View Tools Display Actions He | elp               |
|-----------------------------------|-------------------|
| New Method                        |                   |
| Create/Edit MS Method/Tune        | 20150929-test SP4 |
| OpeCreate/Edit MS Method/Tune     | Method Name       |
| Save Method As                    | 20150929-test SP4 |
| Extract Method from Recults       |                   |
| Bup Time                          |                   |
| Run nine                          |                   |
| Method                            |                   |
| Sequence                          |                   |
| Sequence                          |                   |

2. Dans SQ 300 MS Driver, cliquer sur **New method**  $\rightarrow$  **ESI** 

| SQ 300 MS Driver - [Acquisition Method COM]                     | New Acquisition Method 🛛 🛛 🔀                      |
|---|---|
| New Tune<br>New Method<br>Open Data<br>Open Tune<br>Open Method | Source O ESI O APCI O Dual ESI<br>Time Periods: 1 |
| Close<br>Save Ctrl<br>Save As                                   | I+s OK Cancel                                     |
| Print Ctr   | 14-P  |

Renseigner le champ *Description* en indiquant le nom de votre méthode puis enregistrer votre méthode avec File → Save method. Donner un nom explicite, une astuce pour se repérer rapidement est de commencer le nom de la méthode par la date en utilisant le format YYMMJJ.

| Chromera - L C_UV_MS (Administrator)  File View Tools Display Actions Help  File View Tools 000 MS Driver  Method  File Edit View Instrument Apply Collect  Fil | VA 그로 (기 1 그로 🧟 - 🦜 - 티 4a (또 <i>프</i><br>Tune Window Help<br>• 문 ( <i>급</i> ) 😵 🛠 |   |
|---|--|---|
| MS<br>W Ponp<br>Ponp<br>W UV<br>UV<br>UV<br>UV<br>UV<br>UV<br>UV<br>UV<br>V<br>V<br>V<br>V<br>V<br>V<br>V<br>V<br>V<br>V<br>V<br>V<br>V   | Description: Sumio - Procedure LC-L<br>Top polarity out to delay 0.7 is second (   | NY-MS         0.102.00)         Save Acquisition Method         IS-10-06 - Procedure Sumial         02.04-14 Screening ion 290         02.05-2.01         02.05-2.02         150930-methode screening         20150928-husion vaniline SM         20150928-busion Vaniline SM         Public Scon Aplanedon         MF_Lest_peg_Scon         MF_Lest_peg_Scon         MF_Lest_peg_Scon         MF_Lest_peg_Scon         MF_Lest_peg_Scon         MF_Lest_peg_Scon         MF_Lest_peg_Scon         MF_Lest_peg_Scon         MF_Lest_peg_Scon         MF_Lest_peg_Scon |

| Rédigé par : M. MICHNICK | Vérifié par : M. IDOUMBIN | Approuvé par : M. LAMAUVE |
|--------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Date : 22/10/2015        | Date : 26/10/2015         | Date : 10/11/2015         |



3. Cliquer sur le point vert et régler la durée totale d'analyse qui devra être la même que celle indiquée dans Chromera. Dans notre exemple, le **Time Period 1** est réglé à 10 minutes.

| 😵 SQ 300 MS Driver - [Acquisition Method   | COW]                          |
|--|-------------------------------|
| File Edit View Instrument Apply Collect  | Tune Window Help              |
|  | 19 12 🥱 🦿 🕅                   |
| <ul> <li>Method: 10.00m</li> <li>Time Period 1: 10.00m</li> <li>Scan (±): 5.80,3000.00,29.95s</li> <li>Diverter Valve</li> </ul> | Duration 10 Timebase Min Save |

- 4. Appeler les bons réglages en fonction du mode d'ionisation choisi. Pour cela :
  - Sélectionner Scan (+) en cliquant sur le point bleu



- Appeler le bon tune par Edit  $\rightarrow$  Import  $\rightarrow$  Pos1K et sélectionner le dernier tune réalisé.



| Rédigé par : M. MICHNICK | Vérifié par : M. IDOUMBIN | Approuvé par : M. LAMAUVE |
|--------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Date : 22/10/2015        | Date : 26/10/2015         | Date : 10/11/2015         |



5. Effectuer les réglages selon vos besoins. Dans l'exemple ci-dessous, l'acquisition se fait en mode SIM (car pics connus lors d'une infusion) pour une m/z de 226, avec une ionisation en mode positif.

| reated for: ESI              |                           | Pulse Counting Time (μs) :                            |
|------------------------------|---------------------------|---|
| Signal Threshold (mV)        | 0                         |   |
| Dwell and Delay Times        |                           | - 300 000 en mode SIM                                 |
| Settling Time (ms)           | la:                       | 100 on mode Scan                                      |
| Pulse Counting Time (µs)     | 300000                    |   |
| 3 Global Variables           |                           |   |
| Acquisition Function         | Sim                       | Acquisition Function : Mode SIM ou Scan               |
| Low m/z                      | 226.000                   |   |
| High m/z                     | 3000.000                  |   |
| Samples per mass             | 10.0                      | Low m/z : 226 pour notre exemple en mode SIM          |
| Sim with Span                | No Span                   |   |
| Ion Polarity                 | Positive                  |   |
| I Ion Source                 |                           | <b>Ion Polarity</b> : Mode positif dans notre exemple |
| Cylinder Lens (Volts)        | - 500                     |   |
| Endplate (Volts)             | -5000                     |   |
| Capillary Entrance (Volts)   | -6000                     | Ne pas modifier les autres paramètres                 |
| Endplate I emperature        |                           |   |
| Drying Gas Temp. (*C)        | 300                       |   |
| Drying Gas Flow Rate (L/m)   | 12                        |   |
| Nebulizer Gas Pressure (PSI) | SU                        | Drving Gas Temp. (°C) : doit être à 300°C             |
| Dialet Sample Vial On        | False                     |   |
|                              | T dise                    |   |
| 00 BE Applitude (Volts P.P)  | Single=600.00             | Drving Gas Flow Rate (L/mL) :                         |
| Q0 Offset (Volts)            | Single=-8.00              |   |
| Q0 Exit Lens 1 (Volts)       | Single=-0.40              | - 12 si debit entre 0,2 et 0,5 mL/min                 |
| Q0 Exit Lens 2 (Volts)       | Single=-90.00             | - 8 si débit < 0.2 mL/min                             |
| 3 Q1                         |                           |   |
| Q1 Filter                    | Mass Filter               |   |
| Q1 Resolution                | Single=0.00               | Nebulizer Gas Pressure (PSI) : doit être à 80         |
| Q1 Coarse Resolution         | 0                         |   |
| Q1 Offset Voltage (Volts)    | Single=-1.00              |   |
| Q1 Ion Guide (Volts)         | Single=-12.60             |   |
| Q1 Pole Polarity             | Reversed                  |   |
| 3 Scan                       |                           |   |
| Scans Per Spectrum           | 1                         |   |
| Syringe Pump                 |                           |   |
| Syringe Make                 | Harvard - Stainless Steel |   |
| Syringe Model                | 8 cc                      |   |
| Syringe Diameter (mm)        | 9.5                       |   |
| Syringe Flow Rate ( µl/min ) | 0                         |   |

Low m/z

Minimum: 5.000 Maximum: 3000.000 Step: 0.050

| Rédigé par : M. MICHNICK | Vérifié par : M. IDOUMBIN | Approuvé par : M. LAMAUVE |
|--------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Date : 22/10/2015        | Date : 26/10/2015         | Date : 10/11/2015         |



Créer autant de points de réglages que de masses à détecter. Pour cela, faire des copies du point de réglage déjà défini. Cliquer le point bleu à copier puis sur Edit → Copy. Cliquer ensuite sur le point vert et sur Edit → Paste.

| Time Peri<br>Sim (<br>verter Valv | ed 1: 10.00m<br>+): 226.00,30<br>e | 0.00ms           |       |       | Diverter Va      | eriod 1: 10.00m<br>1 (+): 226.00,300.0<br>alve |
|-----------------------------------|------------------------------------|------------------|-------|-------|------------------|--|
| File                              | Edit View Ins                      | trument Apply    | Ci Ci | File  | Edit View        | Instrument Apply                               |
|                                   | Undo                               | Ctrl+Z           | 1     | : D 🖬 | Undo             | Ctrl+Z   |
|                                   | Cut<br>Copy                        | Ctrl+X<br>Ctrl+C |       |       | Cut<br>Copy      | Ctrl+X<br>Ctrl+C                               |
|                                   | Insert<br>Delete                   | Ctri+v           | ns    |       | Insert<br>Delete | n  |
|                                   | Up<br>Down                         |                  |       |       | Up<br>Down       |  |
|                                   | Sort<br>Autotune Upo               | date             |       |       | Sort<br>Autotune | Update   |
|                                   | Import<br>Export                   |                  |       |       | Import<br>Export |  |
|                                   | Tune Compar                        | e                |       |       | Tune Cor         | npare  |

7. Après avoir réglé les masses des différents ions à détecter (2 dans notre exemple), enregistrer votre méthode en cliquant sur **File** → **Save** 

| File Edit View Instrument Apply Collect Tun                          | File Edit View Instrument Apply       |
|--|---------------------------------------|
|  | [ New Tune<br>New Method              |
| Method: 10.00m<br>Sm (+): 170.00,300.58ms<br>Sm (+): 226.00,300.58ms | Open Data<br>Open Tune<br>Open Method |
|  | Save                                  |
|  | Dave As                               |
|  | Print<br>Print Preview                |

Une fois sauvegardé, fermer le logiciel SQ 300 MS Driver et retourner dans le logiciel Chromera

#### 2.3. <u>Créer une méthode LC-UV-MS</u>

- Cliquer sur File → New Method
- Donner un nom à votre méthode, indiquer le groupe auquel appartient le type d'analyse et donner une description claire de la méthode (Type de colonne, Types d'éluants...).

| File | View Tools Display Actions  |
|------|-----------------------------|
|      | New Method                  |
|      | Create/Edit MS Method/Tune  |
| 17   | Open Method                 |
| 诊    | Save Method                 |
| 16   | Save Method As              |
|      | Extract Method from Results |
| 8    | Print Preview Method        |
| 10   | Print Method                |
|      | Exit                        |

| Rédigé par : M. MICHNICK | Vérifié par : M. IDOUMBIN | Approuvé par : M. LAMAUVE |
|--------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Date : 22/10/2015        | Date : 26/10/2015         | Date : 10/11/2015         |



1. Indiquer à Chromera la méthode pour la masse à utiliser en cliquant sur  $MS \rightarrow Browse$  for Method...



- Cliquer sur la méthode que vous venez de sauvegarder dans SQ 300 MS Driver.



2. Régler le détecteur UV. Sélectionner **UV** dans Instruments, développer la fenêtre en cliquant sur le sigle (+) puis procéder au réglage de la longueur d'onde voulue.

| 🔄 Chromera - LC_UV_MS (Administrator)   |   |
|---|---|
| File View Tools Display Actions Help  |   |
| 21 ] 🖞 🛱 😪 🗞 🗋 🖉 🔛 📄 🕴  | ◎ 🖄 III 🖾 🗟 🕄 🕄 Š • 🗄 🖄 🕷 🗭   |
| Proc  | edure LC-MS   |
| Method  |   |
| Procedure LC:MS     MS     Promo     MS     Promo     W     Promo     Promo | Device Channel Name Sampling Rate (pts/s) End Time (min)<br>V UV 1 5 10.0<br>Elapsed Time (min) Variation gth (nm) Autozero<br>0.0 254<br>*<br>Description TE1 TE2 TE Time (min)<br>* |

| Rédigé par : M. MICHNICK | Vérifié par : M. IDOUMBIN | Approuvé par : M. LAMAUVE |
|--------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Date : 22/10/2015        | Date : 26/10/2015         | Date : 10/11/2015         |



3. Régler la pompe. Cliquer sur **Pompe** dans Instruments, développer la fenêtre en cliquant sur le sigle (+) et procéder aux réglages souhaités (gradient/isocratique, temps, % des éluants A et B...)

| 1. 🛍 🛱 😪 🗞 🗋 🕘 🔁 🔛 👘              | 100   | <b>1 111 111</b> |           | - 🕹 🕯    | 📕 • 🚹 😒 🎆        | P              |                |          |     |      |
|-----------------------------------|-------|------------------|-----------|----------|------------------|----------------|----------------|----------|-----|------|
| B LO                              | _UV_N | IS : Pr          | ocedure L | C-MS     |                  |                |                |          |     |      |
| thod                              |       |                  |           |          |                  |                |                |          | _   |      |
| Procedure LC-MS                   |       |                  |           |          |                  |                |                |          |     |      |
| insuchents                        |       | Device           | In Use    | Transil  | ion   Total time | (min) Run Time | Reconciliation | Advanced |     |      |
| - 🛄 UV                            | F     | ompe             |           | Gradient | 9.5              | 4              | ~              |          |     |      |
| Channels                          |       | Step             | Step Typ  | ре       | Step Time (min)  | Flow (mL/min)  | %A             | %B       | C   | arve |
| ⊖ III UV                          | •     | 0                | Equil     |          | 0.5              | 0.450          | 95.0           | 5.0      |     |      |
|                                   |       | 1                | Run       | ~        | 6.0              | 0.450          | 35.0           | 65.0     | 1.0 |      |
|                                   |       | 2                | Run       | ~        | 0.1              | 0.450          | 0.0            | 100.0    | 1.0 |      |
| - 1 PER(0.0:10.0)PSIM(226.0).0.0, |       | 3                | Run       | ~        | 1.0              | 0.450          | 0.0            | 100.0    | 1.0 |      |
| Peaks                             |       | 4                | Run       | ~        | 0.1              | 0.450          | 95.0           | 5.0      | 1.0 | 6    |
|                                   | 4-1   | 5                | Run       |          | 2.3              | 0.450          | 95.0           | 5.0      | 1.0 | -    |
| 🖻 📀 MS                            | *     |                  |           | ~        |                  |                |                |          |     |      |
| - 3 PER(0.0:10.0)PSIM(170.0),0.0, |       | 241              |           |          | VI SANATA PARA   | 0.14           |                |          |     |      |

Si le temps total de l'ensemble des étapes est différent du temps indiqué dans la méthode pour la masse, un message d'erreur s'affiche vous proposant de ramener le temps d'analyse dans la méthode pour la masse égale au temps total indiqué. Cliquer sur **No** et contrôler vos temps.

| Run Time Reconciliation   | X   |
|---|---|
| The pump run time is less than the data acquisition end time for the following device: The deter <9.5>? | tor MS end time is 10.0.Do you want the end time of the above to be reduced to be the same as the pump run time |

4. Lorsque tous les paramètres sont bien réglés, enregistrer votre méthode avec Save Method

| ic view roois Dispidy Actions   | Help  |         |       |            |          |                  |         |                        |          |      |       |
|---------------------------------|-------|---------|-------|------------|----------|------------------|---------|------------------------|----------|------|-------|
| New Method                      |       |         |       | 2          | 3.       | 🏅 • 🚹 🖄 🕷        | P       |                        |          |      |       |
| Create/Edit MS Method/Tune      | LC UV | MS : Pr | oced  | lure LC    | C-MS     |                  |         |                        |          |      |       |
| Open Method                     |       |         |       |            |          |                  | _       |                        | _        | _    |       |
| Save Method                     |       |         |       |            |          |                  |         |                        |          |      |       |
| Cause Mal Save method           |       | Device  |       | In Use     | Transit  | ion Total time I | (min) B | un Time Reconciliation | Advanced |      |       |
| Extract Method from Besults     | B P   | ompe    |       | <b>v</b> 0 | aradient | 10.0             |         |                        |          |      |       |
| Drink Drawiew Mathad            |       | Step    | 1     | Step Typ   | e        | Step Time (min)  | Flow (m | IL/min) %A             | %B       | 1    | Curve |
| Princ Preview Method            |       | 0       | Equil |            | ~        | 0.5              | 0.450   | 95.0                   | 5.0      |      |       |
| Print Method                    |       | 1       | Run   |            | -        | 6.0              | 0.450   | 35.0                   | 65.0     | 1.0  |       |
| Exit                            | -     | 2       | Run   |            | ~        | 0.1              | 0.450   | 0.0                    | 100.0    | 1.0  |       |
| 1 PER(0.0:10.0)PSIM(226.0),0.0, | '  -  | 3       | Run   |            | ~        | 1.0              | 0.450   | 0.0                    | 100.0    | 1.0  |       |
| 🕀 🤽 Peaks                       |       | 4       | Run   |            | ~        | 0.1              | 0.450   | 95.0                   | 5.0      | 1.0  |       |
|                                 |       | 5       | Run   |            | ~        | 2.8              | 0.450   | 95.0                   | 5.0      | 1.0  |       |
| C C MS                          | *     |         |       |            | ~        |                  |         |                        |          |      |       |
| ma da ma                        |       | 19      | Q2 17 |            | 1000     | 2                | 3.00    | 12 c                   |          | - 23 |       |

| Rédigé par : M. MICHNICK | Vérifié par : M. IDOUMBIN | Approuvé par : M. LAMAUVE |
|--------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Date : 22/10/2015        | Date : 26/10/2015         | Date : 10/11/2015         |



Date d'émission : 12/11/2015

Pr Bioch Ma 035

Version:1

# 2.4. Lancer une analyse

Afin de mettre les appareils en conditions d'équilibre avant de lancer une analyse, aller dans l'onglet **Run Time** et choisir **Manual Control**.

#### Dans la fenêtre Control Panel

- Cliquer sur UV : Turn Lamp On afin d'allumer la lampe du détecteur (Au cas où la lampe n'était pas encore allumée) (cadre bleu)

#### Dans la fenêtre Manual Control

- Mettre la longueur d'onde utilisée dans votre méthode au niveau de UV : UV Settings et cliquer sur Apply (cadre vert)
- Mettre le débit de la pompe de votre méthode ainsi que les pourcentages initiaux de votre gradient %A et %B et ensuite cliquer sur **Apply**. Attention bien vérifier que le SQ300 soit en mode **Operate** et que la source soit chauffée à 300°C sinon ne pas connecter la sortie de la colonne vers le spectromètre de masse pendant le temps d'équilibre. (cadre violet)

#### Dans la fenêtre Status Panel,

- vérifier que vos paramètres ont bien été pris en compte avant de lancer les analyses :

MS Operate : Ready MS : MS detector State : Operate MS : Drying Gas Temperature : 300°C UV :Wavelength : Longueur d'onde souhaitée de votre méthode Pump Flow : Débit souhaité dans votre méthode Pump Status : Running A % : % souhaité dans votre méthode B % : pourcentage souhaité dans votre méthode.

Après 10min d'équilibration de vos différents équipements, vous pouvez lancer votre analyse en sélectionnant **Single Run** → **Open Method** ...



| Rédigé par : M. MICHNICK | Vérifié par : M. IDOUMBIN | Approuvé par : M. LAMAUVE |
|--------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Date : 22/10/2015        | Date : 26/10/2015         | Date : 10/11/2015         |

|                       | PROCEDURE D'UTILISATION           | Pr Bioch Ma 035              |
|-----------------------|-----------------------------------|------------------------------|
| CELucée Saint-Paul IV | Utilisation de la chaîne LC-UV-MS | Version : 1                  |
| académie La Réunion   | Chromera / Flexar SQ 300 MS       | Date d'émission : 12/11/2015 |
|                       | Perkin Elmer                      | Page 23 sur 25               |

- Choisir la méthode que vous avez créez et cliquez sur **Open**.

| Ta Dal | ia Selec | tor - Single Method              |                      |                         |               |            |
|--------|----------|----------------------------------|----------------------|-------------------------|---------------|------------|
| Oper   | n 📜      | Organize • Actions •             |                      |                         |               |            |
| 😑 Me   | thod Gro | oup : tests (9 items)            |                      |                         |               |            |
|        | Select   | Method Name                      | Created Date/Time    | Last Edited Date/Time 🗸 | Author        | Editor     |
|        |          | Procedure LC-MS                  | 9/30/2015 10:08:16 A | 9/30/2015 10:08:52 AM   | Administrator | Administra |
|        |          | 20150920 10 10 004               | 9/29/2015 2:31:02 PM | 9/29/2015 3:31:30 PM    | Administrator | Administra |
|        |          | 20150928-test JPI                | 9/28/2015 3:17:13 PM | 9/28/2015 4:03:44 PM    | Administrator | Administra |
|        |          | Full Scan ESI+ 100-500 Aplamedom | 4/1/2015 5:33:37 PM  | 4/1/2015 5:38:07 PM     | Administrator | Administra |

- Une fois ouverte, la méthode est affichée et apparait dans la fenêtre de gauche.
- Avant d'activer la méthode, il faut renseigner les différents champs (n° échantillon...), pour cela, cliquer sur la **fiole bleue** et entrer les informations
- Cliquer sur **Apply** pour lancer la méthode aux instruments de la chaîne HPLC.



- Une fois lancée, L'ordinateur fait les tests de connexion avec tous les appareils. Lorsque le checklist est terminé, le message « *Waiting for manual injection* » en bas à droite vous prévient que l'appareil est près et attend l'injection.

| nt Device Situa | ation:            |               |                    | Current Device Situ | ation:            |        |                   |
|-----------------|-------------------|---------------|--------------------|---------------------|-------------------|--------|-------------------|
| Device          | Ready for Acquire | Status        | Ignore This Device | Device              | Ready for Acquire | Status | Ignore This Devic |
| MS              |                   | Equil         |                    | MS                  |                   | Equil  |                   |
| UV              |                   | Ready         |                    | UV                  |                   | Ready  |                   |
| Pompe           |                   | Equilibrating |                    | Pompe               |                   | Ready  |                   |
|                 |                   |               |                    | ALL D               | EVICES AF         | ENOV   | KEADY             |

| Rédigé par : M. MICHNICK | Vérifié par : M. IDOUMBIN | Approuvé par : M. LAMAUVE |
|--------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Date : 22/10/2015        | Date : 26/10/2015         | Date : 10/11/2015         |

|                       | PROCEDURE D'UTILISATION           | Pr Bioch Ma 035              |
|-----------------------|-----------------------------------|------------------------------|
| Celucée Saint-Paul IV | Utilisation de la chaîne LC-UV-MS | Version : 1                  |
| académie La Réunion   | Chromera / Flexar SQ 300 MS       | Date d'émission : 12/11/2015 |
|                       | Perkin Elmer                      | Page 24 sur 25               |

- Injecter au moins **40 μL** d'échantillon pour une boucle de **20 μL**. Attention à ne pas injecter la bulle qui est presque toujours présente près du piston. Basculer la vanne d'injection en position **Inject**.
- Laisser la vanne dans cette position pendant le temps d'analyse puis rebasculer en position **Load** en fin d'analyse.





Pendant l'analyse, on observe en temps réel tous les graphes sélectionnés dans la fenêtre Plot



| Rédigé par : M. MICHNICK | Vérifié par : M. IDOUMBIN | Approuvé par : M. LAMAUVE |
|--------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Date : 22/10/2015        | Date : 26/10/2015         | Date : 10/11/2015         |



# 2.5. Afficher les résultats de l'analyse.

- Cliquez sur Post Run dans l'onglet des méthodes puis File  $\rightarrow$  Open data

| S | lect    | Batch Name                 |            | Batch Group   | Batch Description  | Created Date/Time         | Reprocessed By     | Reprocessed        | Batch Type      |         |
|---|---------|----------------------------|------------|---------------|--------------------|---------------------------|--------------------|--------------------|-----------------|---------|
| - |         | Procedure LC-MS            |            | tests         | Ecriture procedure | 9/30/2015 11:19:59 AM     |                    |                    | Acquired        |         |
|   | -       | Southers Name              |            | Analyst       | Sample Type        | Acquisition Date/Time     | Sample Description | Reprocessed        | Instrument Name | Method  |
|   |         | Injection 2                |            | Administrator | Sample             | 9/30/2015 11:19:59 AM     | Ecriture procedure |                    | LC_UV_MS        | Procedu |
| S | lect    | Batch Name                 |            | Batch Group   | Batch Description  | Created Date/Time         | Reprocessed By     | Reprocessed        | Batch Type      | 1       |
| - |         | Procedure LC-MS            |            | tests         | Ecriture procedure | 9/30/2015 10:58:03 AM     |                    |                    | Acquired        |         |
|   | -       | Procedure 01               |            | tests         | Ecriture procedure | 9/30/2015 10:24:20 AM     |                    |                    | Acquired        |         |
|   | H       | 20150929-test SP4          |            | taoto         | Dosage vanilline   | 9/29/2015 3:19:40 PM      |                    |                    | Acquired        |         |
|   |         | 20150929-test vaniline     |            | tests         | Dosage vanimite    | 9/29/2015 3:18:34 PM      |                    |                    | Acquired        |         |
|   | T       | 20150929-test vanilline    |            | tests         | Dosage TP          | 9/29/2015 2:41:25 PM      |                    |                    | Acquired        |         |
|   |         | 20150928-test JPI          |            | tests         |                    | 9/28/2015 3:52:37 PM      |                    |                    | Acquired        |         |
|   |         | 20150928-test JPI          |            | tests         |                    | 9/28/2015 3:38:38 PM      |                    |                    | Acquired        |         |
|   |         | 20150928-test JPI          |            | tests         |                    | 9/28/2015 3:23:59 PM      |                    |                    | Acquired        |         |
|   |         | Full Scan ESI+ 100-500 Apl | amedom     | tests         |                    | 4/1/2015 5:34:34 PM       |                    |                    | Acquired        |         |
|   | Π       | Dosage caf etalon          |            | tests         |                    | 6/1/2012 3:30:05 PM       | Administrator      | 6/1/2012 4:50:2    | Acquired        |         |
|   |         | Dosage caf etalon          |            | tests         |                    | 6/1/2012 3:23:53 PM       |                    |                    | Acquired        |         |
|   |         | 2012 06 01                 |            | tests         | etalonnage cafeine | 6/1/2012 12:40:59 PM      | Administrator      | 6/1/2012 12:53:    | Acquired        |         |
|   |         | 2012 06 01                 |            | tests         | etalonnage cafeine | 6/1/2012 12:22:40 PM      | Administrator      | 6/1/2012 12:52:    | Acquired        |         |
|   |         | guanti cafein              |            | tests         | Gamme d etalonna   | 6/1/2012 11:26:51 AM      |                    |                    | Acquired        |         |
|   |         | 4-hydroxybenzaldehyde      |            | tests         |                    | 5/31/2012 6:05:15 PM      |                    |                    | Acquired        |         |
|   |         | vanilin sim jpi            |            | tests         |                    | 5/31/2012 3:43:44 PM      |                    |                    | Acquired        |         |
|   |         | vanilin_sim_jpi            |            | tests         |                    | 5/31/2012 3:15:08 PM      |                    |                    | Acquired        |         |
|   |         | sdcaf                      |            | tests         |                    | 5/31/2012 11:43:23 AM     | Administrator      | 5/31/2012 12:3     | Acquired        |         |
|   |         | sdcaf                      |            | tests         |                    | 5/31/2012 11:40:43 AM     |                    |                    | Acquired        |         |
|   |         | sdcaf                      |            | tests         |                    | 5/31/2012 11:24:34 AM     |                    |                    | Acquired        |         |
|   |         | sdcaf                      |            | tests         |                    | 5/31/2012 11:02:41 AM     |                    |                    | Acquired        |         |
|   | ion IIV | 1                          | Pump Press | ire?          | 1 PEB(0.0:10.0)P   | SIM(170 0) 0 0 CAL 300000 | 3 PEB(0.0-10.0)PSU | M(226 0) 0 0 CAL 3 | 00000           |         |

- Cliquer sur les données qui vous intéressent et cliquer sur **Open**, les résultats s'affichent. Le tableau des pics peut être imprimé ou exporté vers Excel.

| Chromera - LC_UV_MS (Administrator) |         |               |                |                |                 |                |                    |  |       |
|-------------------------------------|---------|---------------|----------------|----------------|-----------------|----------------|--------------------|--|-------|
| File View Tools Display Actions H   | qle     |               |                |                |                 |                |                    |  |       |
| 1, 3 8 & M 0 2 2 1 0                | 🙆 👬 🖄   |               | 🕹 • 🎝 • 🗈 😂 🕯  |                | 🗁 🛵 📩 Sc        | ale All Charts |                    |  |       |
| (J)                                 | Batch   | : Procedure   | LC-MS          |                |                 |                |                    |  |       |
| Post Run                            |         |               |                |                |                 |                |                    |  |       |
| 🕀 Views                             |         |               |                | Inject         | ion 2: UV       | 1:1            |                    |  |       |
| General Views                       | 60-5    |               |                |                |                 |                |                    |  |       |
| - Single Plot                       | 00-     | 1             |                |                |                 |                |                    |  |       |
| - Stacked Plots                     | -       | 1             |                |                |                 |                |                    |  |       |
| Overlay                             | 50-     | -             |                |                |                 |                |                    |  |       |
|                                     | -       | 1             |                |                |                 |                |                    | c  |       |
|                                     | -       | f =           |                |                |                 |                |                    | E  |       |
|                                     | 40-     | 107           |                |                |                 |                | -                  | 3.13                                     |       |
|                                     | -       | T             |                |                |                 |                | -Bi                | I E .                                    |       |
| 🖃 Data                              | 20      | 1 1           |                |                |                 |                | 281                | 46                                       |       |
| Procedure LC-MS                     | 5 -     |               |                |                |                 |                | 1                  | 00 00                                    |       |
|                                     | mAl -   |               |                |                |                 |                | t                  | · = / 1 = ·                              | .e    |
|                                     | 8 20-   | 11 //         |                |                |                 |                | = ·=               | 64 1                                     | ie 🖁  |
|                                     | - pau   | 11 11         |                |                |                 | -E             | in min             | in i | 75r   |
| Pompe                               | - DSOI  |               |                |                |                 | 10             | 6.76               | 13 88                                    | 9.4   |
| B V MS                              | ≪ 10-   |               |                |                |                 | 5.6            | °I II              |  |       |
| PER(0.0:10.0)PSIM                   | -       | 111           |                |                |                 | 1              | *A 11              | V Lan                                    | X     |
| M 3 PERIOUTION SIM                  | -       |               | 1              |                |                 | Λ              | Non                | ×  |       |
|                                     | 0-      |               | 1 xex          |                |                 | 1 mm           |                    |  |       |
|                                     | -       | 111/          | /              |                |                 |                |                    |  |       |
|                                     | -10-    |               |                |                |                 |                |                    |  |       |
|                                     | 1       |               |                |                |                 |                |                    |  |       |
|                                     | -       | ××            |                |                |                 |                |                    |  |       |
|                                     | -20-    | 11111         |                |                | 1 1 1 1 1       | 11111          |                    |  |       |
|                                     | 0       | 1             | 2              | 3 4            | 5<br>Time (min) | 6              | 7                  | 8  | ə 10  |
|                                     |         | 36, 1 : 10.32 |                |                | Title (mill)    |                |                    |  |       |
|                                     | Result  | (S            |                |                |                 |                |                    |  |       |
|                                     |         | Channel       | Det Time       | Company Mana   | A               | Li ulului      | Einel American     | Figure Assessment Harity                 | TP.   |
|                                     | -       | Criariner     | riec rine      | Component Hame | Alea            | rieigin        | T IT I AT ANTIOUTR | T inal 24hour Conics                     |       |
|                                     |         |               | 5.691          |                | 4215152         | 7196.44        |                    |  |       |
|                                     | -       | UV 1          | 6.576          |                | 38431.37        | 6745.09        |                    |  |       |
| 🕥 Run Time                          | -       | UV 1          | 6.781          |                | 35725.42        | 7386.69        |                    |  |       |
| ×211                                |         | UV 1          | 7.126          |                | 1905.06         | 503.45         |                    |  |       |
| Method                              | -       | UV 1          | 7.281          |                | 113416.03       | 24404.61       |                    |  |       |
| Sequence                            | -       | UV 1          | 7.949          |                | 59822.55        | 10540.49       |                    |  |       |
|                                     |         | UV 1          | 8.133          |                | 189713.79       | 30232.38       |                    |  |       |
| Man Post Run                        | - T     | 001           | 8.287<br>0.40E |                | 7495 22         | 20653.88       |                    |  |       |
| Reprocess                           | - T     | UV 1          | 8.716          |                | 3720.57         | 966.12         |                    |  |       |
|                                     |         | UV 1          | 8.846          |                | 67358.66        | 16262.38       |                    |  |       |
| C Reports                           | 1       | UV 1          | 9.475          |                | 6438.58         | 884.91         |                    |  | 10    |
| »                                   |         | tona.         | 10.000         |                | 100.00 0.       |                | 1                  |  | li li |
|                                     | Results |               |                |                |                 |                |                    |  |       |

| Rédigé par : M. MICHNICK | Vérifié par : M. IDOUMBIN | Approuvé par : M. LAMAUVE |
|--------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Date : 22/10/2015        | Date : 26/10/2015         | Date : 10/11/2015         |