

Sistema LC 1290 Agilent Infinity

Manuale del sistema e guida
di riferimento rapido



Agilent Technologies

Informazioni legali

© Agilent Technologies, Inc. 2009-2011, 2012

Nessuna parte di questo manuale può essere riprodotta in alcun formato o con alcun mezzo (inclusa l'archiviazione e la scansione elettroniche o la traduzione in una lingua straniera) senza previo consenso scritto di Agilent Technologies, Inc. secondo le disposizioni di legge sul diritto d'autore degli Stati Uniti, internazionali e locali applicabili.

Codice del manuale

G4220-94301

Edizione

05/2012

Stampato in Germania

Agilent Technologies
Hewlett-Packard-Strasse 8
76337 Waldbronn

Questo prodotto può essere utilizzato come componente di un dispositivo diagnostico in vitro qualora sia stato registrato presso le autorità competenti e sia conforme alle disposizioni di legge vigenti. In caso contrario è destinato esclusivamente ad usi generici di laboratorio.

Garanzia

Le informazioni contenute in questo documento sono fornite allo stato corrente e sono soggette a modifiche senza preavviso nelle edizioni future. Agilent non rilascia alcuna altra garanzia, esplicita o implicita, comprese le garanzie implicite di commerciabilità ed idoneità ad uno specifico, relativamente al presente manuale e alle informazioni in esso contenute. Salvo il caso di dolo o colpa grave, Agilent non sarà responsabile di errori o danni diretti o indiretti relativi alla fornitura o all'uso di questo documento o delle informazioni in esso contenute. In caso di separato accordo scritto tra Agilent e l'utente con diverse condizioni di garanzia relativamente al contenuto di questo documento in conflitto con le condizioni qui riportate prevarranno le condizioni dell'accordo separato.

Licenze tecnologia

I componenti hardware e o software descritti in questo documento vengono forniti con licenza e possono essere utilizzati o copiati solo in conformità ai termini di tale licenza.

Indicazioni di sicurezza

AVVERTENZA

L'indicazione **AVVERTENZA** segnala un rischio. Richiama l'attenzione su una procedura operativa o analoga operazione che, se non eseguita correttamente o non rispettata, può provocare danni al prodotto o la perdita di dati importanti. Non eseguite mai alcuna operazione ignorando l'**AVVERTENZA**, fatelo solo dopo aver compreso e applicato completamente le indicazioni di Agilent.

ATTENZIONE

L'indicazione **ATTENZIONE** segnala un rischio serio. Richiama l'attenzione su una procedura operativa o analoga operazione che, se non eseguita correttamente o non rispettata, può provocare lesioni personali o morte. Non eseguite mai alcuna operazione ignorando l'indicazione **ATTENZIONE**, fatelo solo dopo aver compreso e applicato completamente le indicazioni di Agilent.

In questa guida...

Il presente manuale contiene informazioni sul sistema LC Agilent 1290 Infinity.

1 Introduzione alla cromatografia liquida a prestazioni ultra-elevate (UHPLC)

Nel presente capitolo viene fornita un'introduzione al sistema LC Agilent 1290 Infinity e ai principi su cui esso si basa.

2 Sistema LC Agilent 1290 Infinity - Descrizione del prodotto

Nel presente capitolo sono presentate le caratteristiche del sistema LC 1290 Infinity.

3 Ottimizzazione del sistema LC Agilent 1290 Infinity

Il presente capitolo mostra come applicare la teoria e utilizzare le caratteristiche del sistema LC per sviluppare separazioni ottimizzate.

4 Configurazione e installazione del sistema

Il presente capitolo riporta informazioni su installazione del software, configurazioni dello stack e preparazione del sistema per l'utilizzo.

5 Guida introduttiva

Nel presente capitolo vengono fornite informazioni sull'acquisizione e sull'analisi dei dati con il sistema LC Agilent 1290 Infinity.

6 Appendice

Nel presente capitolo vengono fornite ulteriori informazioni di natura legale, sulla sicurezza e sull'impostazione di un metodo.

Sommario

1	Introduzione alla cromatografia liquida a prestazioni ultra-elevate (UHPLC)	7
	Teoria dell'impiego di particelle più piccole nella cromatografia liquida	8
	Vantaggi delle colonne impaccate con particelle inferiori a 2 micron	15
	Riscaldamento per attrito	19
2	Sistema LC Agilent 1290 Infinity - Descrizione del prodotto	23
	Nuove caratteristiche del sistema LC Agilent 1290 Infinity	24
	Componenti del sistema	28
3	Ottimizzazione del sistema LC Agilent 1290 Infinity	41
	Volume di ritardo e volume extra-colonna	42
	Configurazione del volume di ritardo ottimale	44
	Come ottenere volumi di iniezione maggiori	53
	Come ottenere una maggiore produttività	55
	Come ottenere una maggiore risoluzione	58
	Come ottenere una maggiore sensibilità	61
	Come ridurre al minimo l'effetto memoria	70
	Come prevenire ostruzioni della colonna	72
4	Configurazione e installazione del sistema	75
	Installazione del software	76
	Installazione del modulo	78
5	Guida introduttiva	95
	Informazioni sulla guida introduttiva	96
	Preparazione del sistema	97
	Acquisizione dei dati nella schermata Metodo e controllo analisi	103
	Analisi dei dati	110

6 Appendice 117

Informazioni per la sicurezza 118

Informazioni sui solventi 121

Agilent Technologies su Internet 122

Impostazione di un metodo con la funzione Edit Entire Method 123



1

Introduzione alla cromatografia liquida a prestazioni ultra-elevate (UHPLC)

Teoria dell'impiego di particelle più piccole nella cromatografia liquida 8

Vantaggi delle colonne impaccate con particelle inferiori a 2 micron 15

Riscaldamento per attrito 19

Nel presente capitolo viene fornita un'introduzione al sistema LC Agilent 1290 Infinity e ai principi su cui esso si basa.



Teoria dell'impiego di particelle più piccole nella cromatografia liquida

Introduzione

Nel 2003 Agilent ha introdotto per la prima volta sul mercato le colonne di silice porosa con particelle da 1,8 μm , le prime rappresentanti di una classe di colonne ora nota come colonne "STM" o colonne con particelle di dimensioni "inferiori a due micron". Destinati all'uso con il sistema LC Rapid Resolution della Serie Agilent 1200, lanciato nel 2006, questi materiali di impaccamento sono stati introdotti nelle colonne ZORBAX RRHT in grado di resistere alla pressione di 600 bar. Nel 2009 la gamma è stata ampliata con l'introduzione delle colonne RRHD, in grado di operare di routine alla pressione di 1200 bar, da utilizzare con il sistema LC Agilent 1290 caratterizzato da un esteso intervallo di potenza operativa fino alla pressione di 1200 bar e a velocità di flusso fino a 5 ml/min.

Queste colonne con particelle di dimensioni inferiori a due micron (1,8 μm) possono essere impiegate per perseguire i due seguenti obiettivi principali.

1 Cromatografia più rapida

Le colonne corte con particelle inferiori a due micron offrono la possibilità di ridurre drasticamente i tempi di analisi aumentando la velocità di flusso senza abbassare le prestazioni in termini di separazione.

2 Risoluzione superiore

Le colonne lunghe con particelle inferiori a due micron offrono un'efficienza superiore e, quindi, la maggiore risoluzione necessaria per la separazione di campioni complessi. Una minore dispersione implica anche meno diluizione dei picchi dell'analita, con conseguente guadagno in termini di sensibilità, in particolare per LC/MS.

La pressione necessaria per guidare il solvente attraverso una colonna contenente particelle STM aumenta rapidamente al crescere della velocità di flusso quando si desiderano separazioni più rapide e aumenta molto rapidamente al crescere della lunghezza della colonna quando si desidera una risoluzione più elevata. La diffusione delle colonne STM, quindi, è stata contestuale allo sviluppo dei sistemi UHPLC, ovvero sistemi HPLC che offrono pressioni superiori rispetto ai consueti 400 bar in vigore sin dagli esordi dell'HPLC. I sistemi di

cromatografia liquida a prestazioni ultra elevate (o a pressioni ultra-elevate) offrono inoltre volumi di ritardo ridotti e la rapida raccolta dati necessaria per picchi stretti derivanti dalla cromatografia rapida o ad alta risoluzione. Il sistema LC Agilent 1290 Infinity rappresenta una pietra miliare nell'ambito dell'UHPLC, poiché è il primo sistema che può includere completamente e spaziare su tutte le più diverse gamme di prestazioni offerte dai sistemi UHPLC preesistenti sul mercato.

Teoria

Nell'HPLC l'efficienza di separazione può essere descritta grazie all'equazione di van Deemter (**Figura 1**, pagina 10). Questa deriva dal modello dell'altezza dei piatti teorici usato per misurare la dispersione degli analiti durante la loro discesa attraverso la colonna. H indica l'altezza equivalente a un piatto teorico (talvolta HETP), d_p indica le dimensioni delle particelle del materiale di impaccamento della colonna, u_0 è la velocità lineare della fase mobile e A , B e C sono costanti relative alle diverse forze di dispersione. La costante A indica la diffusione vorticoso o i percorsi di flusso multipli attraverso la colonna; B indica la diffusione molecolare lungo l'asse (longitudinale) della colonna; C indica il trasferimento di massa dell'analita tra le fasi mobile e stazionaria. La separazione è tanto più efficiente quanto più è basso il valore di H . Gli effetti di ogni singolo termine e dell'equazione combinata sono mostrati nella **Figura 1**, pagina 10, dove in grafico viene riportata l'altezza dei piatti rispetto alla velocità di flusso lineare attraverso la colonna. Questo tipo di rappresentazione grafica è chiamata curva di Van Deemter e viene usata per stabilire la velocità di flusso ottimale (punto minimo della curva) per ottenere la migliore efficienza di separazione da una colonna.

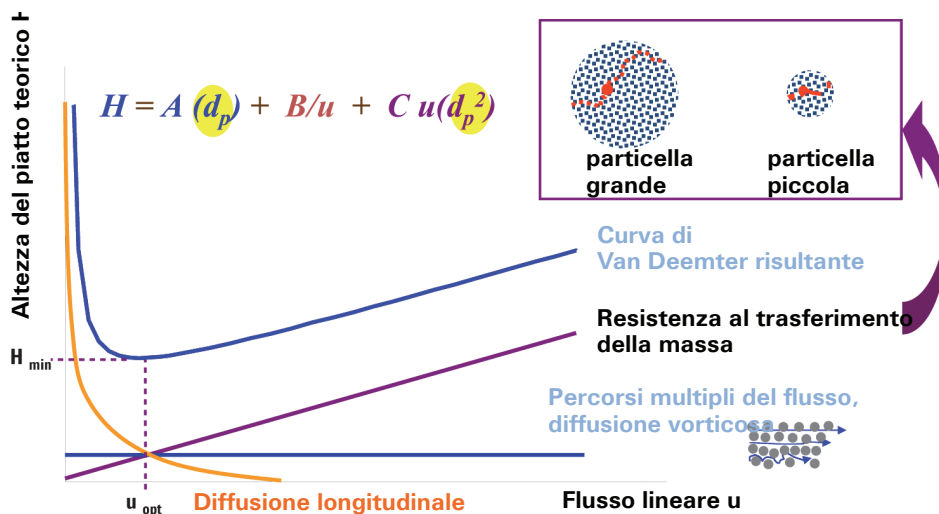


Figura 1 Curva ipotetica di Van Deemter

I grafici di van Deemter nella [Figura 2](#), pagina 11 indicano che la riduzione delle dimensioni delle particelle aumenta l'efficienza. Il passaggio da particelle di dimensioni pari a 3,5 μm e 5,0 μm comunemente usate a particelle da 1,8 μm offre un miglioramento significativo delle prestazioni. Le particelle da 1,8 μm forniscono valori di altezza dei piatti da due a tre volte inferiori ed efficienze proporzionalmente superiori. Ciò permette di utilizzare una colonna più corta senza sacrificare la risoluzione e di conseguenza anche il tempo di analisi risulta ridotto di un fattore pari a due o tre. L'aumento di efficienza deriva in larga misura dalla riduzione dei percorsi di flusso multipli grazie alle minori dimensioni delle particelle, fattore che comporta un valore minore della costante A (diffusione vorticoso). Inoltre, particelle più piccole implicano tempi di trasferimento di massa più brevi, riducendo il termine C, e si può rilevare come l'effetto globale sia una perdita di efficienza molto ridotta man mano che la velocità di flusso aumenta (la pendenza della retta diminuisce). Ciò significa che la separazione su particelle di dimensioni inferiori può essere ulteriormente accelerata aumentando le velocità di flusso senza ridurre significativamente l'efficienza.

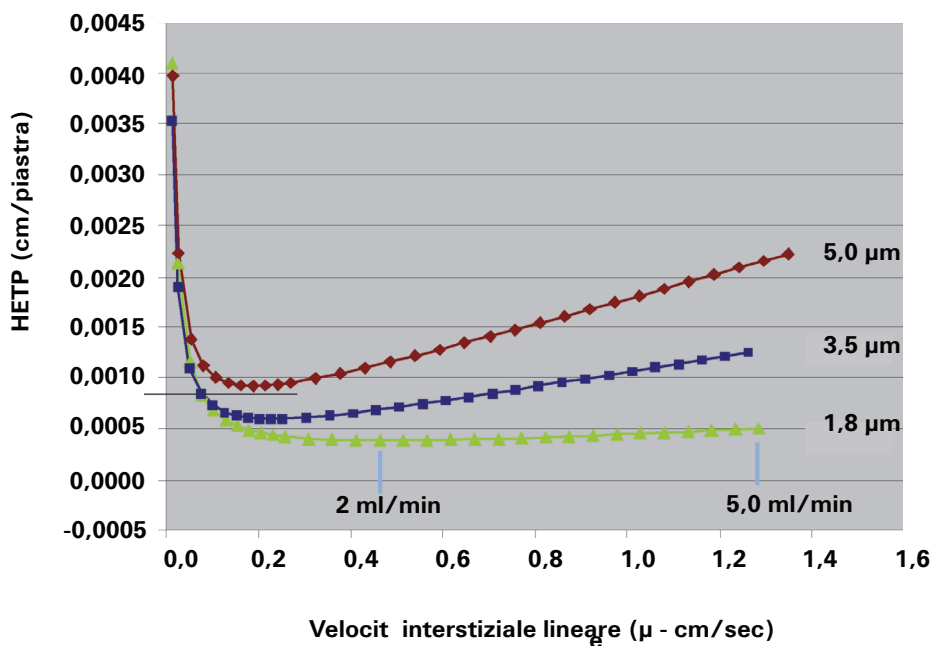


Figura 2 Curva di Van Deemter per particelle di diverse dimensioni

1 Introduzione alla cromatografia liquida a prestazioni ultra-elevate (UHPLC)

Teoria dell'impiego di particelle più piccole nella cromatografia liquida

Una separazione cromatografica può essere ottimizzata in base a parametri fisici della colonna di HPLC quali: dimensione delle particelle, dimensione dei pori, morfologia delle particelle, lunghezza e diametro della colonna, velocità del solvente e temperatura. Inoltre, si può prendere in considerazione la termodinamica di una separazione e le proprietà del soluto e delle fasi mobile e stazionaria (percentuale di solvente organico, forza ionica e pH) possono essere regolate in modo da ottenere la minor ritenzione e la più alta selettività possibili.

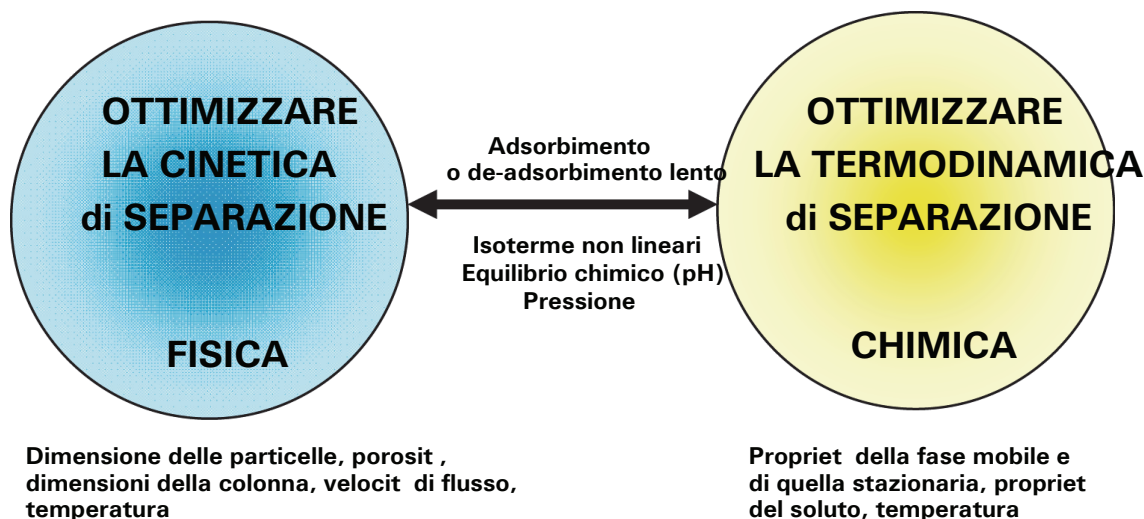


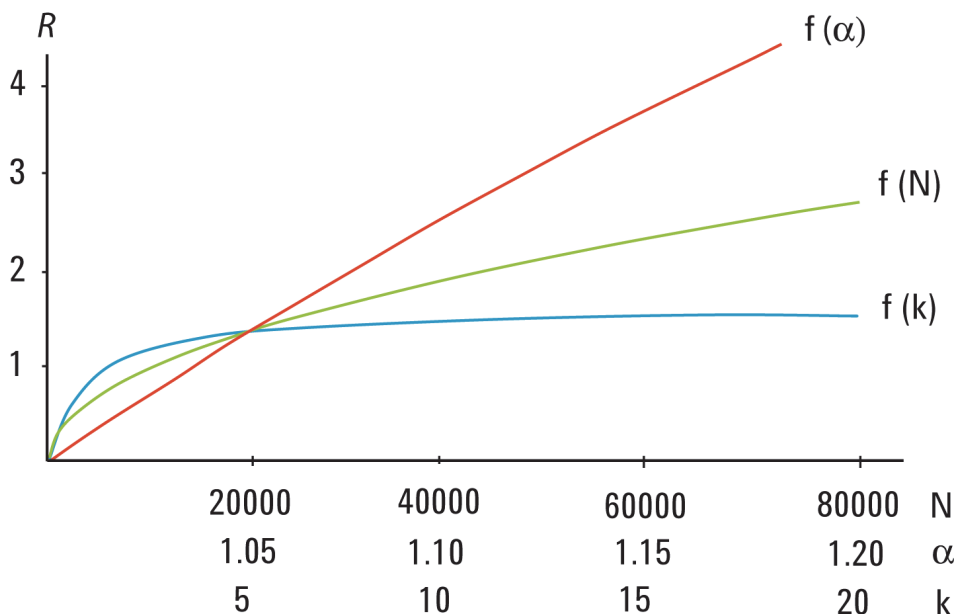
Figura 3 Selezione delle condizioni ottimali per l'HPLC

La risoluzione può essere descritta in funzione di tre parametri:

- efficienza della colonna o piatti teorici (N);
- selettività (α);
- fattore di ritenzione (k).

In base all'equazione della risoluzione (**Figura 4**, pagina 13), la selettività ha l'impatto più preponderante sulla risoluzione (**Figura 5**, pagina 13). Ciò significa che la selezione delle proprietà adatte delle fasi stazionaria e mobile e della temperatura è un fattore critico per ottenere una buona separazione.

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \cdot \left[\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right] \cdot \left[\frac{k_2'}{k_2' + 1} \right]$$

Figura 4 Equazione della risoluzione**Figura 5** Effetto del numero dei piatti, del fattore di separazione e del fattore di ritenzione su R

Non è importante se il metodo di separazione mediante risoluzione rapida sia di nuova concezione o semplicemente trasferito da un metodo convenzionale esistente, ciò che conta è avere a disposizione una vasta scelta di chimiche per la fase stazionaria in un'ampia tipologia di formati di colonna.

Agilent ha già immesso sul mercato più di 140 colonne ZORBAX Rapid Resolution High Throughput (RRHT) da 1,8 μm (14 opzioni di scelta per la selettività; lunghezze da 15 a 150 mm; diametri interni da 2,1, 3,0 4,6 mm) e con il lancio del sistema LC Agilent 1290 Infinity la gamma STM è stata ampliata alle colonne Rapid Resolution High Definition (RRHD) da 1200 bar. Ciò permette di scegliere la fase stazionaria ottimale in modo da ottenere la massima selettività. La risoluzione, la velocità di flusso e il tempo di analisi possono essere ottimizzati selezionando la colonna di diametro e lunghezza appropriati; la

1 Introduzione alla cromatografia liquida a prestazioni ultra-elevate (UHPLC)

Teoria dell'impiego di particelle più piccole nella cromatografia liquida

possibilità di operare con colonne STM più lunghe non è mai stata così accessibile.

Molti laboratori conducono un ampio processo di screening per selezionare la migliore combinazione di fase stazionaria, fase mobile e temperatura per le loro separazioni. Agilent offre soluzioni di sviluppo dei metodi per entrambi i sistemi LC delle serie 1200 e 1290 Infinity. Queste soluzioni offrono l'automazione completa di questi processi di selezione che richiedono tempo, rendendo le operazioni di sviluppo e di trasferimento del metodo più semplici e affidabili.

Le colonne ZORBAX RRHD e RRHT da 1,8 μm utilizzano la stessa chimica delle colonne ZORBAX con particelle da 3,5 e 5 μm . Di conseguenza, per qualsiasi particolare fase delle colonne ZORBAX, le particelle da 5,0, 3,5 e 1,8 μm forniscono identica selettività, favorendo un semplice, rapido e sicuro trasferimento bidirezionale del metodo tra LC convenzionale, UHPLC e LC preparativa.

Vantaggi delle colonne impaccate con particelle inferiori a 2 micron

Cromatografia più rapida

I vantaggi di avere analisi di durata più breve sono molti. Oggi i laboratori ad alta produttività hanno capacità superiore e analizzano un maggior numero di campioni in meno tempo. Più campioni in meno tempo significa anche costi inferiori. Per esempio, riducendo il tempo di analisi da 20 min per campione a 5 min, il costo per 700 campioni è ridotto del 79 % (Tabella 1, pagina 15).

Tabella 1 Risparmio di tempo e di costi su 700 analisi

Durata del ciclo	Ciclo di 20 min	Ciclo di 5 min
Analisi	700	700
Costo/analisi appr. ¹	\$ 10,58	\$ 2,24
Costo/700 analisi appr. ¹	\$ 7.400	\$ 1.570
Risparmio dei costi	-	\$ 5.830
Tempo ²	10 giorni	2,5 giorni

¹ solventi = \$ 27/l, smaltimento = \$ 2/l, mano d'opera = \$ 30/h

² 24 ore al giorno

Il calcolatore del risparmio Agilent fornisce un metodo semplice per calcolare il risparmio dei costi grazie al passaggio dall'HPLC convenzionale all'UHPLC che utilizza colonne con particelle di dimensioni pari a 1,8 µm. Questo calcolatore è disponibile sul sito web di Agilent Technologies insieme a un calcolatore di trasferimento del metodo: www.chem.agilent.com. I risultati sono presentati sia in forma grafica che in tabella.

Analisi di durata più breve forniscono anche risposte più rapide. Questo è un fattore importante nel controllo della procedura e nei test a risposta rapida. Invece di attendere ore per rilasciare un unico lotto di un farmaco, l'idoneità del sistema, la sua calibrazione e l'analisi dei campioni possono essere eseguiti complessivamente in meno di un'ora. Le risposte rapide sono importanti

1 Introduzione alla cromatografia liquida a prestazioni ultra-elevate (UHPLC) Vantaggi delle colonne impaccate con particelle inferiori a 2 micron

anche per gli operatori nella chimica di sintesi che utilizzano sistemi LC/MS ad accesso aperto per la conferma del composto e il controllo della reazione. Analisi di durata più breve possono inoltre accelerare significativamente il processo di sviluppo del metodo.

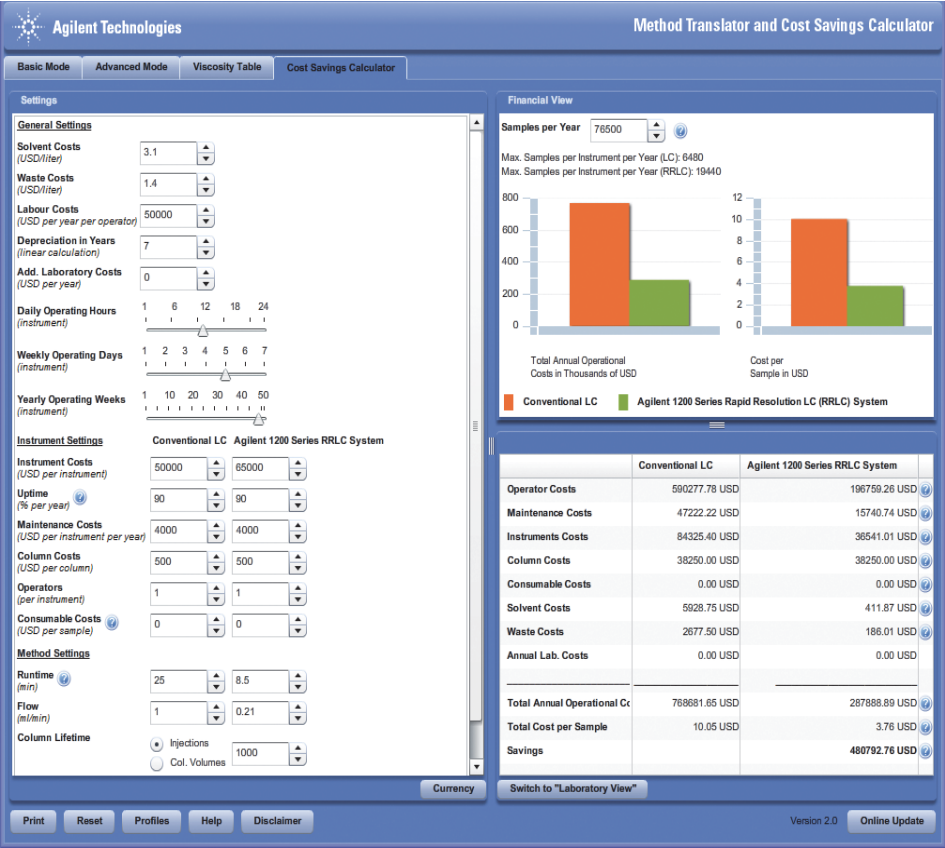


Figura 6 Calcolatore del risparmio dei costi

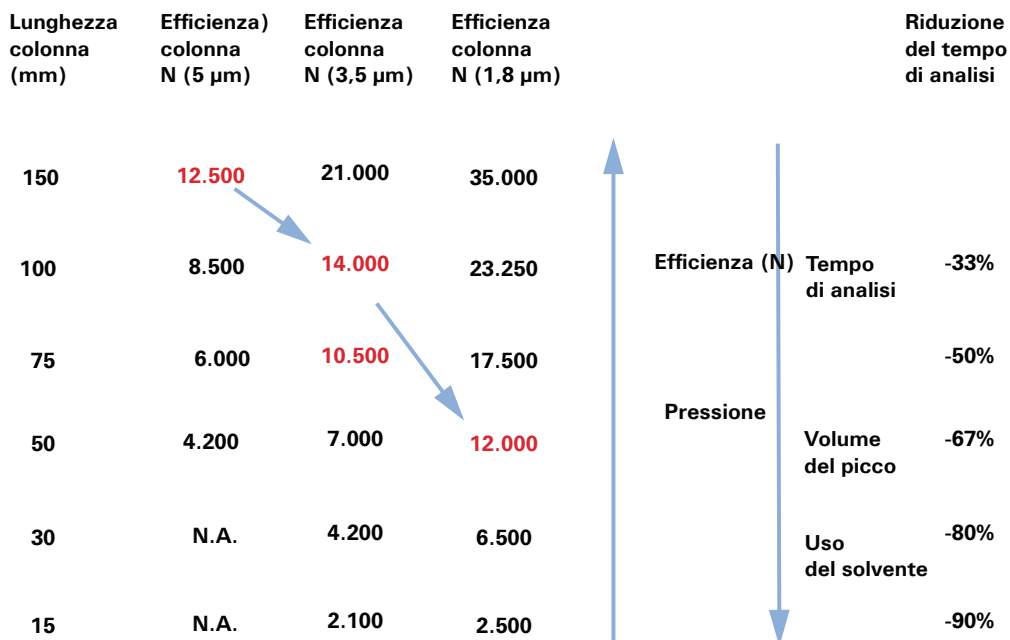


Figura 7 Relazione tra dimensioni delle particelle, efficienza e tempo di analisi

1 Introduzione alla cromatografia liquida a prestazioni ultra-elevate (UHPLC)

Vantaggi delle colonne impaccate con particelle inferiori a 2 micron

Risoluzione superiore

Le colonne lunghe impaccate con particelle più piccole offrono un'efficienza migliore e una risoluzione superiore. Questi sono fattori importanti per l'analisi di campioni complessi negli studi di metabolomica o proteomica. Anche applicazioni come la determinazione del profilo delle impurità possono avvantaggiarsi del maggior potere di separazione. Analogamente, l'analisi LC/MS per i farmaci nei liquidi biologici può trarre vantaggi dalla superiore capacità dei picchi, a causa della ridotta interferenza da parte della soppressione ionica. In generale, un potere di separazione superiore offre maggiore affidabilità nei risultati analitici.

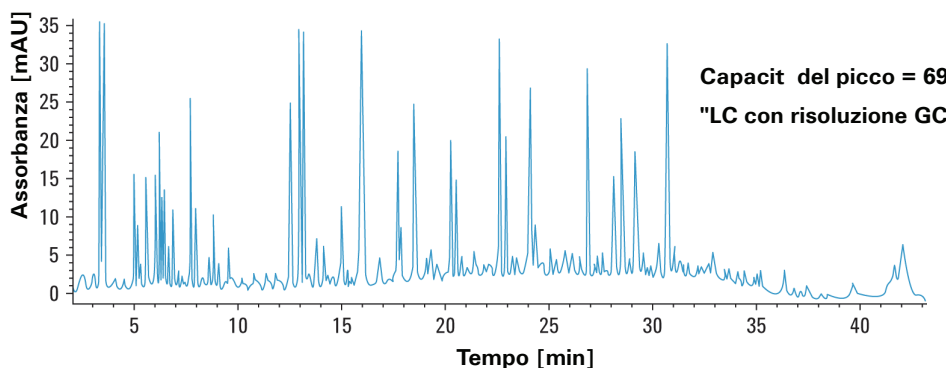


Figura 8 Nell'analisi di un digerito triptico di BSA si possono raggiungere capacità di picco superiori a 700 usando una colonna ZORBAX RRHT SB-C18 (2,1 x 150 mm, 1,8 μm)

Riscaldamento per attrito

La forzatura della fase mobile attraverso la colonna a pressioni e velocità di flusso più elevate genera calore. I gradienti (radiale e longitudinale) di temperatura risultanti possono influenzare l'efficienza della colonna.

$$Power = F * p$$

dove F è la velocità di flusso e p è la pressione.

Una potente stabilizzazione termica della colonna (per esempio mediante l'uso di un bagno termostato) genera un forte gradiente radiale di temperatura, che comporta una perdita significativa di efficienza della colonna. La stabilizzazione termica della colonna sfruttando l'aria statica riduce il gradiente radiale di temperatura e quindi riduce le perdite di efficienza, tuttavia va accettata una maggiore temperatura in uscita dalla colonna. L'aumento della temperatura può influenzare la selettività. A valori minori di contropressione, i cali di prestazione dovuti al riscaldamento per attrito risultano minimizzati, tanto che le colonne di diametro interno pari a 4,6 o 3 mm con particelle inferiori a 2 micron presentano ancora efficienze superiori rispetto alle rispettive colonne di diametro interno pari a 2,1 mm.

Un esempio di trasferimento di un metodo in gradiente a una colonna STM di diametro interno pari a 2,1 mm in cui la separazione è stata velocizzata è mostrato nella [Figura 9](#), pagina 20. L'analisi iniziale sulla colonna da 2,1 mm era avvenuta a una velocità di flusso di 0,22 ml/min generando una pressione di 380 bar a una temperatura impostata su 37 °C e con la separazione di tutti i picchi ottenuta in 12,5 min (cromatogramma non mostrato). Il flusso è stato ora aumentato a 0,66 ml/min e i tempi di gradiente regolati verso il basso per un fattore di tre generando una pressione di 1020 bar con eluizione di tutti i picchi in 4,2 min ([Figura 9](#), pagina 20 in alto). Queste impostazioni dovrebbero fornire la stessa separazione, ma tra i picchi 7 e 8 e tra il picco 5 e il picco principale si osserva perdita di risoluzione dovuta al riscaldamento all'interno della colonna che causa una variazione di sensibilità per questi composti. È stato scoperto che impostando il termostato della colonna a una temperatura inferiore di 5 °C era sufficiente per compensare l'effetto di innalzamento termico all'interno della colonna e ripristinare la separazione ([Figura 9](#), pagina 20 in basso). La pressione aumentava a 1070 bar, a ulteriore indicazione che la temperatura all'interno della colonna era inferiore.

1 Introduzione alla cromatografia liquida a prestazioni ultra-elevate (UHPLC)

Riscaldamento per attrito

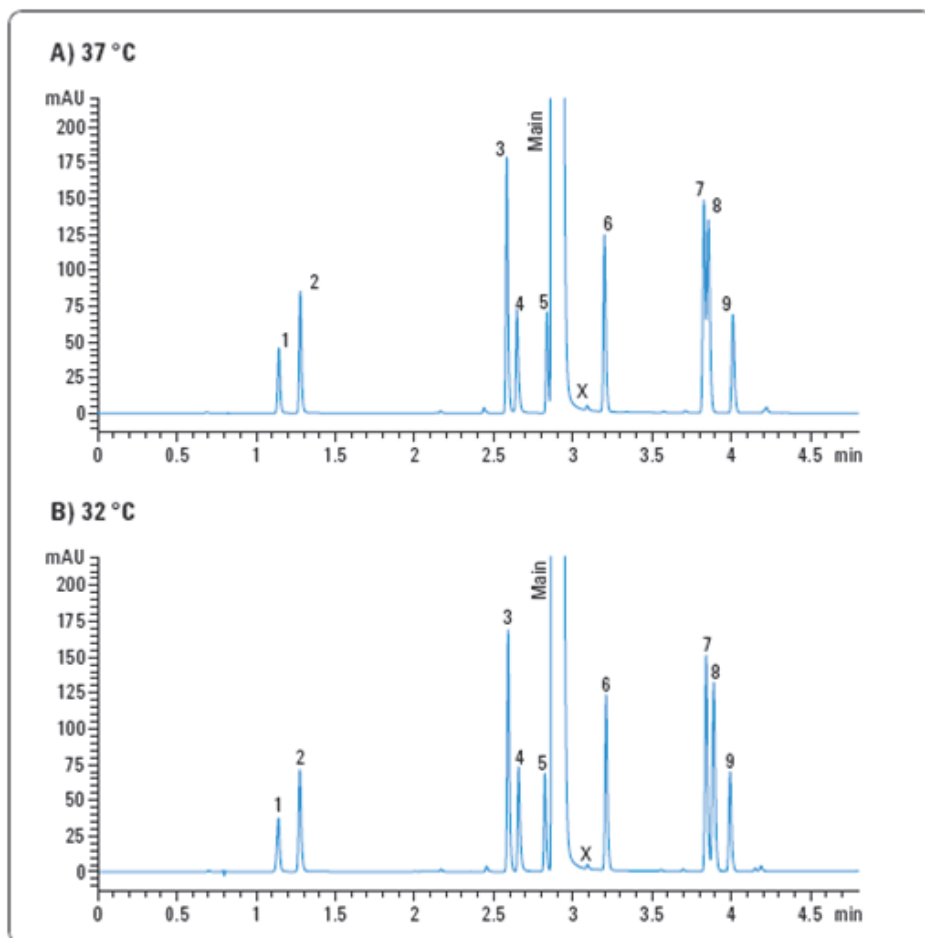


Figura 9 Influenza della generazione di calore per attrito sulla selettività ed effetto dell'abbassamento della temperatura della colonna

Riepilogando, l'uso di materiale di impaccamento con particelle inferiori a due micron offre i seguenti vantaggi: aumento dell'efficienza, risoluzione superiore e separazioni più rapide. Il sistema LC Agilent 1290 Infinity e le colonne RRHD aumentano lo spazio di separazione disponibile e permettono di conseguire ulteriori vantaggi di questo tipo. Le caratteristiche del sistema LC 1290 Infinity sono discusse nella sezione “[Sistema LC Agilent 1290 Infinity - Descrizione del prodotto](#)”, pagina 23 mentre la sezione “[Ottimizzazione del](#)

sistema LC Agilent 1290 Infinity” , pagina 41 illustra come applicare la teoria e utilizzare queste caratteristiche per sviluppare separazioni ottimizzate.

1 **Introduzione alla cromatografia liquida a prestazioni ultra-elevate (UHPLC)**

Riscaldamento per attrito



2 Sistema LC Agilent 1290 Infinity - Descrizione del prodotto

Nuove caratteristiche del sistema LC Agilent 1290 Infinity 24

Componenti del sistema 28

Nel presente capitolo sono presentate le caratteristiche del sistema LC 1290 Infinity.



Nuove caratteristiche del sistema LC Agilent 1290 Infinity

Il sistema LC Agilent 1290 Infinity è stato progettato per offrire la più alta flessibilità di esecuzione della cromatografia liquida analitica utilizzando tutti i tipi di tecnologie di colonna attualmente disponibili nonché quelle che potranno emergere in futuro. Il sistema LC 1290 Infinity è caratterizzato dalla più ampia gamma di parametri di funzionamento, così da potervi replicare le impostazioni dei metodi utilizzati in precedenza su qualsiasi sistema preesistente per HPLC analitica o UHPLC di qualsiasi produttore. Per raggiungere questo obiettivo, il sistema LC Agilent 1290 Infinity offre alcune idee di concezione radicalmente nuova, pur mantenendo la sua caratteristica affidabilità ben progettata che ha reso i sistemi HPLC di Agilent la linea di maggior successo nel mercato HPLC.

Che cosa offre questo sistema

- Velocità di flusso da 0,05 ml/min a 5 ml/min per cromatografia convenzionale o rapida con tutte le colonne analitiche di diametro interno da 1 a 5 mm e tutti i tipi di materiali di impaccamento.
- L'intervallo di pressione fino a 1200 bar (>17400 psi) consente una cromatografia rapida sulle colonne corte, un'elevata risoluzione sulle colonne lunghe utilizzando materiale di impaccamento con particelle inferiori a due micron e una scelta più ampia della viscosità della fase mobile.
- Volumi di ritardo ultra-ridotti per ottenere i gradienti più rapidi nell'ambito della rivelazione spettrometrica di massa o rivelazione con ultravioletto/luce visibile.
- Possibilità di eseguire qualsiasi metodo trasferito da un altro sistema di HPLC analitica o UHPLC.
- Sofisticato controllo della pompa che permette di ottenere un rumore cromatografico e un rumore acustico molto bassi per risultati superiori e un ambiente di lavoro migliore.
- Sistema di degassaggio e valvola di spurgo automatica integrati nel modulo pompa.
- Autocampionatore a volume variabile con ridotto volume di ritardo, effetto memoria minimo e opzione di funzionamento come autocampionatore a ciclo fisso.

- Nuovo modulo Flexible Cube che aggiunge funzioni all'autocampionatore, come lo spurgo della sede dell'ago e il funzionamento a ciclo fisso.
- Comparto colonna termostata a fruibilità migliorata e soluzioni con valvole integrate, con un intervallo di pressione fino a 1.200 bar (17.400 psi).
- Rivelatore a serie di diodi con sensibilità notevolmente incrementata e stabilità della linea di base che utilizza un sistema a cella a cartuccia con guide d'onda ottiche a fluido.
- Velocità di campionamento fino a 160 Hz con informazioni spettrali complete.
- Nuova gamma di colonne ZORBAX RRHD con particelle inferiori a due micron per funzionamento a pressioni fino a 1200 bar.
- Miscelazione assistita per il tamponamento automatico del pH e miscelazione additiva nella Pompa quaternaria 1290 Infinity.

L'innovazione più significativa è rappresentata dall'intervallo di pressioni e dalle velocità di flusso utilizzabili da sistema. Questi limiti operativi possono essere descritti in termini di intervallo di potenza (flusso x pressione) dello strumento, più facilmente comprensibile quando rappresentato in forma grafica ([Figura 10](#), pagina 26). Dal diagramma si evince che l'intervallo di potenza della pompa del sistema 1290 Infinity consente di operare fino a 1200 bar e a un flusso fino a 2 ml/min, riducendo a 800 bar quando il flusso aumenta fino a 5 ml/min. Questi limiti operativi, nei quali rientrano tutti i sistemi di UHPLC preesistenti sul mercato, rendono possibile il trasferimento diretto dei metodi operati da tutti questi sistemi al sistema 1290 Infinity.

2 Sistema LC Agilent 1290 Infinity - Descrizione del prodotto

Nuove caratteristiche del sistema LC Agilent 1290 Infinity

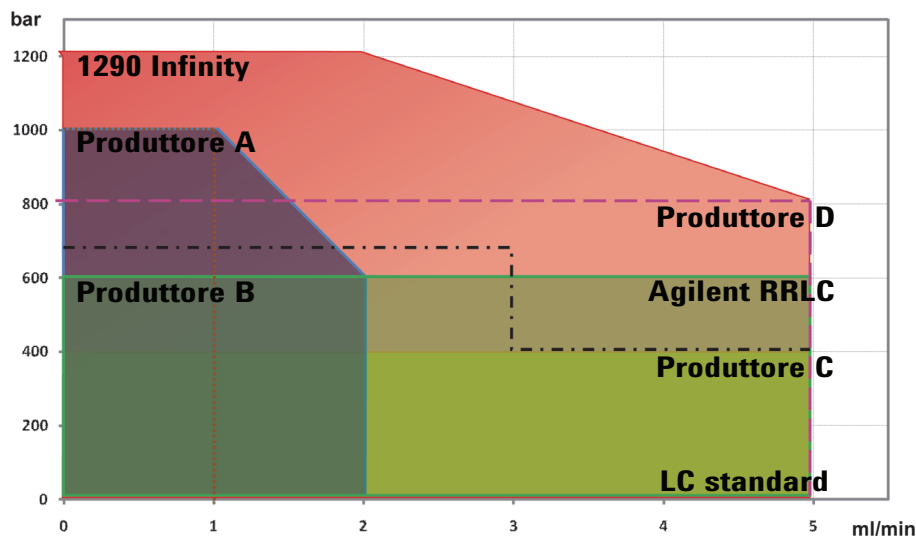


Figura 10 Intervallo di potenza dei sistemi UHPLC (area operativa data da pressione x velocità di flusso)

L'intervallo di pressione offre la possibilità di lavorare con le più recenti particelle di dimensioni inferiori a due micron, impaccate in colonne lunghe se si desidera una risoluzione elevata e in colonne corte se si desidera una separazione rapida a velocità di flusso aumentate. L'intervallo della velocità di flusso non solo consente di utilizzare i metodi tradizionali ma anche materiali di impaccamento porosi in superficie (o pellicolari), come per esempio le particelle Poroshell, a velocità di flusso elevate. Di recente, l'interesse per questo tipo di materiali di impaccamento è aumentato perché rappresentano un approccio alternativo ai materiali STM per separazioni a elevata efficienza. L'intervallo della velocità di flusso consente anche di scegliere la colonna di diametro più adatto per la separazione, partendo dai 2 mm per le applicazioni che necessitano di un flusso lento, come richiesto da alcuni sistemi MS, per arrivare ai 5 mm di diametro interno (tipicamente 4,6 mm) per la tradizionale LC o per aumentare la capacità di carico. L'intervallo della velocità di flusso è convalidato anche da recenti risultati che dimostrano il vantaggio di usare velocità massime di flusso per aumentare l'efficienza nelle separazioni in gradiente. (Fare riferimento a *Petersson et al., J.Sep.Sci., 31, 2346-2357, 2008, Maximizing peak capacity and separation speed in liquid chromatography*).

Il nuovo rivelatore a serie di diodi offre nuovi livelli di sensibilità combinati a eccellenti caratteristiche della linea di base e a semplicità d'uso grazie al design innovativo della cella.

L'autocampionatore offre il consolidato schema Agilent per il convogliamento del flusso per l'iniezione di volumi variabili con basso effetto memoria adattato alle pressioni più elevate, applicazioni di volumi minori. Un modulo del tutto nuovo, il Flexible Cube, può essere aggiunto all'autocampionatore per disporre dell'iniezione a ciclo fisso ottenendo il volume di ritardo più basso in assoluto e altre migliorie come lo spurgo della sede dell'ago.

Componenti del sistema

Pompa binaria Agilent 1290 Infinity

La Pompa binaria Agilent 1290 Infinity è dotata di una nuova tecnologia per superare i problemi di pompaggio di solventi per LC a pressione ultra-elevata e a velocità di flusso alte: pistoni guidati da motori con alta capacità di carico; nuovi materiali per i pistoni stessi, non solo per sopportare il carico di lavoro ma anche per trasferire attivamente il calore dalle guarnizioni; scambiatori di calore microfluidici e il Jet Weaver, un miscelatore microfluidico. La pompa è in grado di erogare il flusso nell'intervallo 0,05 – 5 mL/min a pressioni fino a 1200 bar.

Il modulo della Pompa binaria Agilent 1290 Infinity contiene due pompe identiche ad alta pressione (1200 bar); un degassatore a due canali per i solventi e una valvola di selezione dei solventi in ingresso a quattro canali, una valvola di spurgo automatico e un miscelatore di piccoli volumi, il Jet Weaver, integrato in un'unica sede. Il degassatore aumenta la stabilità del flusso, in particolare a velocità di flusso lente, e la sensibilità del rivelatore.

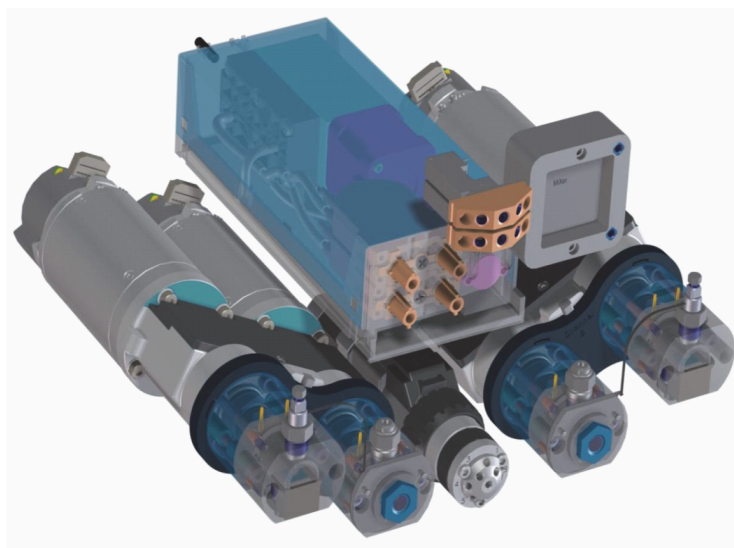


Figura 11 Pompa binaria Agilent 1290 Infinity

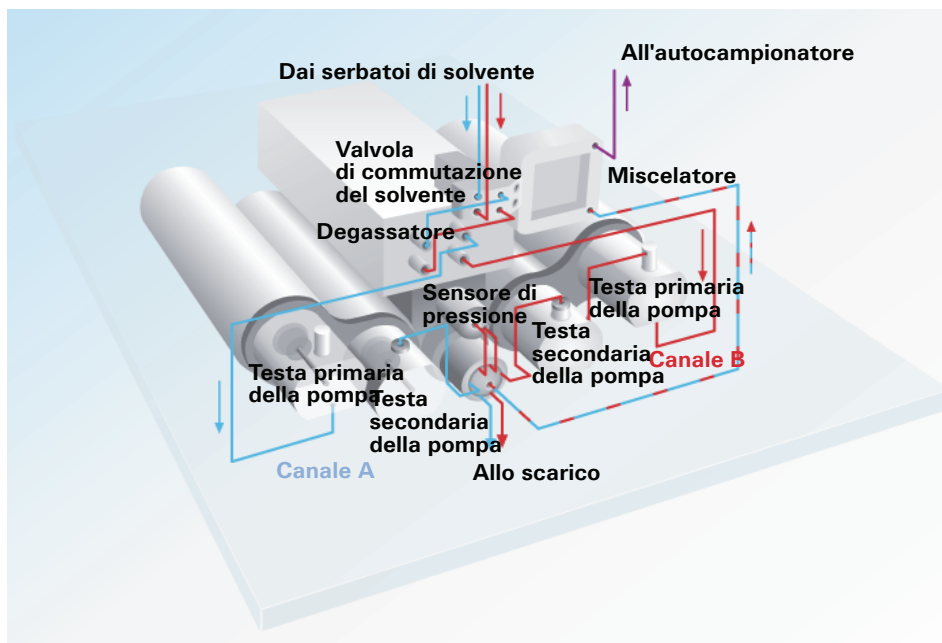


Figura 12 Identificazione delle parti e schema della Pompa binaria 1290 Infinity

Ciascuna testa delle pompe è un modello con due pistoni in serie caratterizzato da un nuovo controllo del firmware e da un nuovo materiale per il pistone, il carburo di silicio, che rimuove efficientemente il calore dalla pompa. Il capillare che congiunge il pistone primario al pistone secondario è dotato di uno scambiatore di calore integrato per rimuovere il calore che si genera a pressioni e flussi elevati. Ogni testa delle pompe è dotata di valvola di ingresso passiva e di valvola di uscita passiva sulla camera del pistone primario. I pistoni sono guidati in modo indipendente e preciso da un motore a 65000 passi che sostituisce 300 picolitri per passo.

Il movimento dei pistoni è sotto controllo intelligente grazie a un ciclo di ritorno che assicura che questo smorzamento attivo della pulsazione della pressione fornisca un flusso privo di ondulazioni. I pistoni si autoregolano per il controllo delle caratteristiche di compressibilità del solvente e le caratteristiche idrauliche del sistema per mantenere uno stato privo di ondulazioni. Tutto ciò, abbinato al controllo uniforme del moto, che riduce la pulsazione della pressione causata dal movimento del pistone, e alla miscelazione efficiente di piccoli volumi, assicura il più basso rumore possibile della pompa sulle tracce UV. Un microprocessore dedicato all'interno della pompa si

occupa del controllo uniforme del moto e dell'ottimizzazione del movimento dei pistoni offrendo un'ottimizzazione in tempo reale basata su parametri statici e dinamici. In aggiunta alle prestazioni cromatografiche, queste caratteristiche rendono la pompa molto silenziosa quando è in funzione.

Quando si usano soluzioni tampone concentrate come fase mobile, è disponibile un sistema di lavaggio attivo delle tenute della pompa per prolungarne la durata.

Una valvola di selezione del solvente consente di formare miscele binarie (isocratiche o gradienti) da uno dei due solventi per ogni canale. I gradienti binari vengono creati a livello della valvola di spurgo mediante miscelazione ad alta pressione dei solventi dalla pompa A e dalla pompa B. La valvola di spurgo consente, sotto controllo del software, di selezionare la via di scarico per spurgare nuovi solventi attraverso la testa della pompa. Alla valvola di spurgo è collegato un sensore che controlla la pressione del sistema.

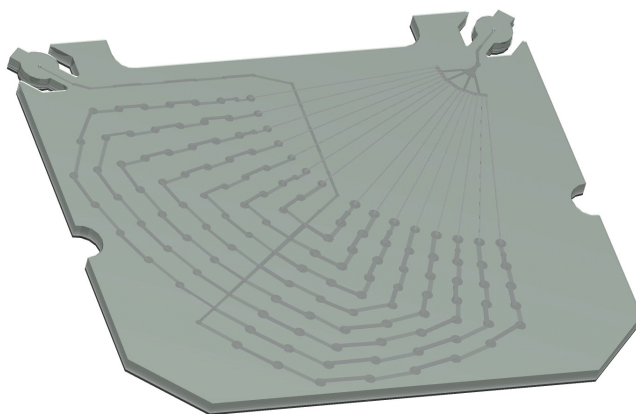


Figura 13 Il miscelatore Jet Weaver

Il percorso idraulico della pompa è stato ottimizzato in modo da minimizzare il ritardo dei gradienti e incorpora un sistema di miscelazione innovativo che utilizza la tecnologia microfluidica. Il dispositivo di miscelazione, noto come Jet Weaver, impiega una rete di canali microfluidici multistrato ($120\ \mu\text{m} \times 120\ \mu\text{m}$) a garanzia di una miscelazione accurata del flusso. Il dispositivo Jet Weaver è caratterizzato anche da due volumi standard: $35\ \mu\text{L}$ per le normali applicazioni di rivelazione con UV e $100\ \mu\text{L}$ per le situazioni più complesse come l'uso di TFA nella rivelazione con UV. In queste applicazioni particolarmente complesse, per ottenere un rumore della linea di base decisamente basso è disponibile anche un Jet Weaver da $380\ \mu\text{L}$. Per la rivelazione MS

spesso è possibile lavorare senza Jet Weaver e ottenere una miscelazione sufficiente usando solo il volume di base di 10 µl del percorso idraulico della pompa. Applicazioni tipiche prevedono metodi ad alta produttività con gradienti rapidi su colonne ad alta risoluzione da 2,1 mm.

La Pompa binaria 1290 Infinity è predisposta per montare sbarre delle valvole aggiuntive ai lati sinistro e destro della pompa. Queste sbarre delle valvole possono montare fino ad altre due valvole di selezione dei solventi per un fattore di 12 volte. Ciò permette di arrivare a un massimo di 26 solventi per gradienti binari per lo sviluppo del metodo analitico. È disponibile una speciale "guida cluster" che integra le valvole di selezione del solvente esterne nell'interfaccia utente della pompa e consente una selezione facile e intuitiva dei solventi in base al loro nome.

Pompa quaternaria Agilent 1290 Infinity

Al contrario, la Pompa quaternaria 1290 Infinity è dotata di una sola testa della pompa e di una valvola multicanale del gradiente (MCGV) per porzionare gli eluenti in funzione del gradiente programmato. In base a questo principio di miscelazione a bassa pressione, i solventi si incontrano nel weaver d'ingresso e quindi vengono già miscelati prima e dentro la testa della pompa.

La testa della pompa è identica a quella della Pompa binaria 1290 Infinity e quindi presenta lo stesso tipo di prestazioni e gli stessi dettagli tecnici. Può anche essere dotata di un sistema di lavaggio attivo delle tenute della pompa per prolungarne la durata quando si usano soluzioni tampone concentrate.

Un sensore di pressione controlla la pressione durante l'analisi prima che i solventi entrino nella valvola multiuso, un selettore di flusso a 4 canali, che abilita le diverse funzionalità mostrate nelle figure sotto. La valvola multiuso è dotata di un filtro in linea, che verrà sempre usato durante le analisi, di un miscelatore opzionale Jet Weaver da 380 µL, di facile installazione, che garantisce la miglior miscelazione possibile dei solventi, di un capillare di restrizione opzionale e di un collegamento al sistema di scarico.

2

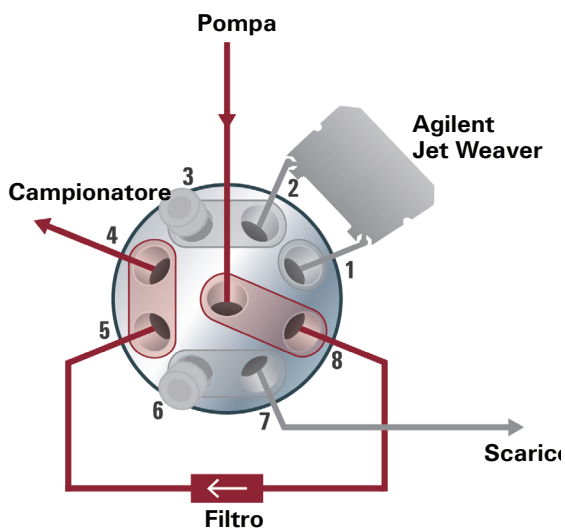
Tabella 2 Funzionalità della valvola

Figura 14 Applicazione standard

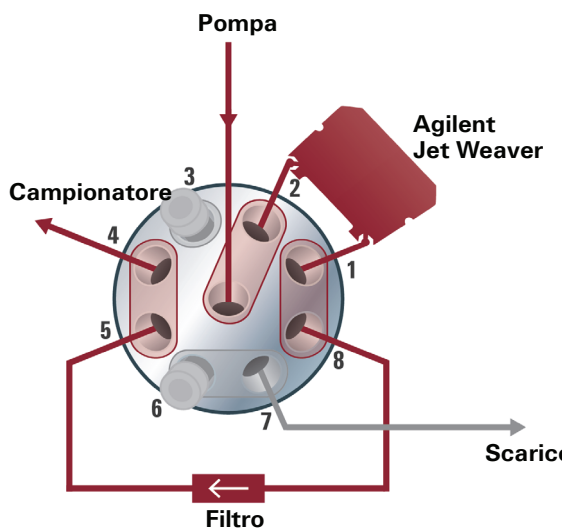


Figura 15 Configurazione per la miscelazione extra dei volumi

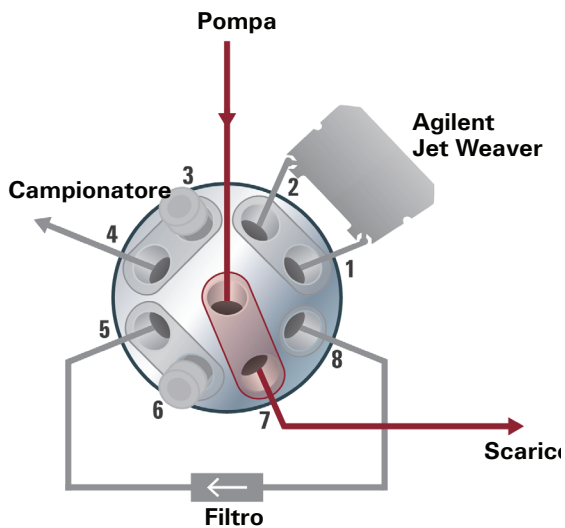


Figura 16 Valvola di spurgo automatico

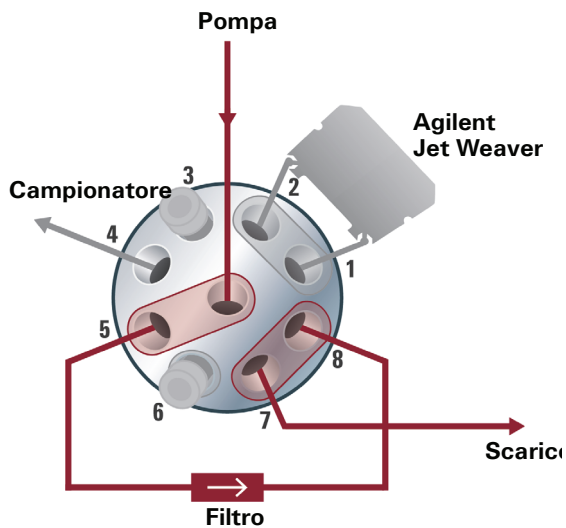


Figura 17 Spurgo del filtro in linea

L'applicazione standard (1) viene utilizzata per la maggior parte delle analisi, mentre la configurazione per la miscelazione extra dei volumi (2) si applica per qualsiasi tipo di applicazione critica sulla linea basale, dove le prestazioni di miscelazione e la linea di basa UV-dipendente possono essere significativamente incrementate mediante l'uso del miscelatore Agilent Jet Weaver. È installata una funzione di spurgo automatico (3), oltre alla possibilità di spurgare il filtro in linea (4). Ciò consente di pulire il filtro e di prolungarne la durata.

Autocampionatore Agilent 1290 Infinity

L'autocampionatore Agilent 1290 Infinity offre il consolidato schema Agilent per il convogliamento del flusso per l'iniezione di volumi variabili e lo porta a nuovi livelli di prestazioni. I nuovi materiali inerti della guarnizione del dispositivo di dosaggio e della sede dell'ago consentono di ottenere un effetto memoria estremamente basso. Il ridotto volume idraulico del circuito idraulico è adattato per gradienti più veloci e la possibilità di utilizzare iniezioni sovrapposte e la funzione di riduzione automatica del volume di ritardo (ADVR) contribuiscono a rendere i cicli più rapidi e a erogare ancora più velocemente il gradiente alla colonna. Il sistema aspira esattamente il volume di soluzione del campione impostato senza sprechi e raggiunge un'elevata riproducibilità su tutto l'intervallo compreso tra quantità inferiori al microlitro a volumi massimi di iniezione di 40 µl. Il capillare di iniezione standard installato consente iniezioni fino a 20 µl.

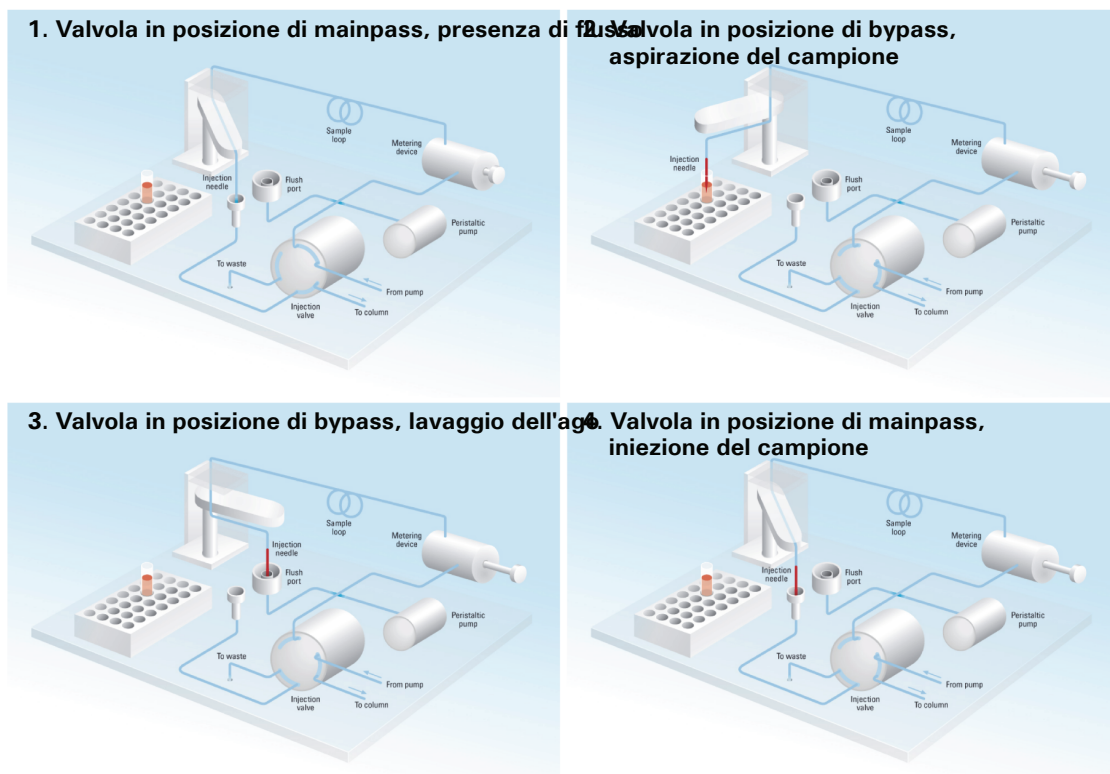


Figura 18 Schema delle fasi dell'iniezione con l'autocampionatore 1290 Infinity

Un modulo aggiuntivo opzionale completamente nuovo, il Flexible Cube, funziona insieme all'autocampionatore senza soluzione di continuità per fornire capacità aggiuntive. Grazie all'aggiunta del nuovo modulo Flexible Cube, comprendente una pompa della siringa da 500 µl, una valvola a bassa pressione e due valvole di commutazione per l'alta pressione, sono possibili nuove opzioni. Ad esempio, il sistema di iniezione a flusso continuo può essere sostituito da un ciclo di iniezione fisso usando la pompa della siringa e il sistema di valvole del Flexible Cube per riempire il loop di campionamento. Questa configurazione presenta il vantaggio di eliminare il volume di ritardo dall'autocampionatore e quindi può essere preferita in alcune situazioni di alta produttività con gradienti rapidi. Di contro, la flessibilità dell'iniezione a volume variabile non è attiva e parte del campione viene persa nel lavaggio del loop. Sono possibili altre attività, come lo spurgo automatico della sede dell'ago di iniezione dopo l'iniezione, grazie alle quali Flexible Cube permette di poter evitare problemi ricorrenti come l'effetto memoria dei composti difficili o le ostruzioni causate da campioni impuri.

Il vassoio portacampioni dell'autocampionatore è dotato di 10 posizioni fisse per fiale da 2 ml e due vassoi rimovibili, che possono essere uguali o diversi, selezionati da:

- vassoio per fiale da 2 ml con 54 posizioni;
- piastra a pozzetti da microtitolo con 96 posizioni (diverse altezze configurabili)
- piastra a pozzetti da microtitolo con 384 posizioni (diverse altezze configurabili)

Se necessario, l'autocampionatore può essere termostatato da 4 °C a 40 °C aggiungendo il modulo di controllo della temperatura dell'autocampionatore.

Comparto colonna termostato Agilent 1290 Infinity

Il comparto colonna termostato (TCC) Agilent 1290 Infinity controlla la temperatura tra i 10 °C al di sotto della temperatura ambientale e, rispettivamente, i 100 °C a 2,5 ml/min e gli 80 °C fino a 5 ml/min. La specifica della stabilità della temperatura è $\pm 0,05$ °C e la specifica dell'accuratezza è $\pm 0,5$ °C (con calibrazione).¹. Questi valori vengono raggiunti grazie alla combinazione data dalla conduzione derivante dal contatto con i vani del termostato, dalla temperatura dell'aria statica nell'ambiente della colonna e, molto più importante, pre-riscaldando (o raffreddando) la fase mobile facendola passare attraverso uno scambiatore di calore prima che entri nella colonna. In ogni TCC vi sono due zone di temperatura indipendenti che possono funzionare insieme per colonne lunghe fino a 300 mm o lavorare a diverse temperature per colonne corte lunghe 100 mm o meno.

Il modulo è dotato di uno scambiatore di calore a bassa dispersione da 1,6 µl e ogni kit di valvole contiene in aggiunta altri scambiatori di calore a bassa dispersione per ciascuna colonna supportata. Gli scambiatori di calore a bassa dispersione, fino a 4, possono essere montati in modo flessibile nel TCC. Per HPLC convenzionali, sono disponibili anche scambiatori di calore integrati da 3 µl e 6 µl.

Ogni TCC può ospitare un sistema di azionamento della valvola interna per facilitare le applicazioni di commutazione della valvola dalla semplice commutazione tra due colonne alla rigenerazione automatica delle colonne, alla preparazione del campione o allo spurgo della colonna. Ogni testa della valvola è dotata di un kit completo contenente tutti i capillari necessari, scambiatori di calore a bassa dispersione aggiuntivi e altre parti.

Le valvole di commutazione sono caratterizzate da un'eccellente semplicità d'uso quando si effettuano i collegamenti alla valvola. Se viene premuta, l'unità di azionamento della valvola a sostituzione rapida scivola in avanti diventando facilmente accessibile (vedere [Figura 19](#), pagina 37, a sinistra). A seconda dell'applicazione, le teste delle valvole alternative possono essere interscambiate dall'utente operando sul meccanismo di azionamento (vedere [Figura 19](#), pagina 37 a destra). Si noti il tag RFID sulla parte superiore della testa della valvola.

¹ Tutte le specifiche sono valide per l'acqua distillata alla temperatura ambiente 25 °C, con un valore preimpostato su 40 °C e un flusso di 0,2-5 ml/min.

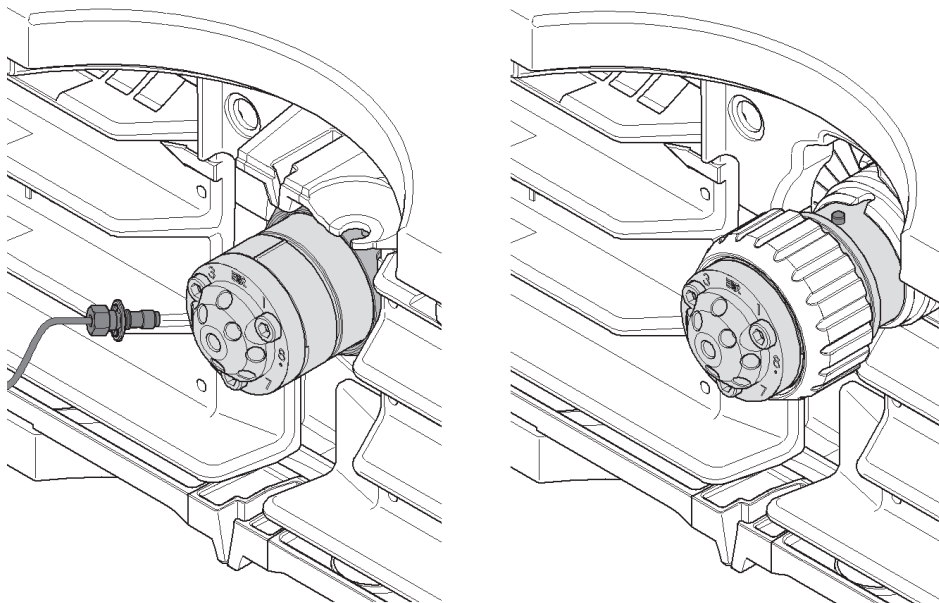


Figura 19 Valvola a sostituzione rapida nel TCC

Fino a tre TCC possono essere disposti “a cluster” per consentire applicazioni avanzate come la commutazione tra otto colonne per lo sviluppo automatizzato del metodo o per rendere disponibili colonne aggiuntive per diverse applicazioni. Quindi, la colonna da usare diviene un semplice parametro del metodo. Ciò richiede due teste di valvola a 8 posizioni/9 porte, una per ciascuno dei due TCC. I TCC “a cluster” sono rappresentati dal software nella forma di una unità con una interfaccia, per facilitare le operazioni.

Altri miglioramenti rispetto ai modelli precedenti sono il migliore isolamento termico, migliori guide dei capillari e un sensore di “sportello aperto” che permette ai metodi di stabilire che lo sportello deve essere chiuso, particolarmente utile per i metodi a temperature basse o alte.

Rivelatore a serie di diodi 1290 Infinity

Il nuovo modello ottico del Rivelatore a serie di diodi 1290 Infinity utilizza una cella a cartuccia con tecnologia delle guide d'onda ottiche a fluido e offre un'elevata sensibilità, un intervallo lineare ampio e una linea di base molto stabile per le applicazioni LC standard e ultra-rapide. La cella a cartuccia Agilent Max-Light aumenta drasticamente la trasmissione della luce grazie al principio della riflessione interna totale lungo un capillare di silice fusa non rivestito, raggiungendo un nuovo livello di sensibilità senza sacrificare la risoluzione mediante gli effetti di dispersione del volume della cella. Questo sistema minimizza le perturbazioni della linea di base causate dall'indice di rifrazione o dagli effetti termici e consente di ottenere un'integrazione più affidabile delle aree dei picchi.

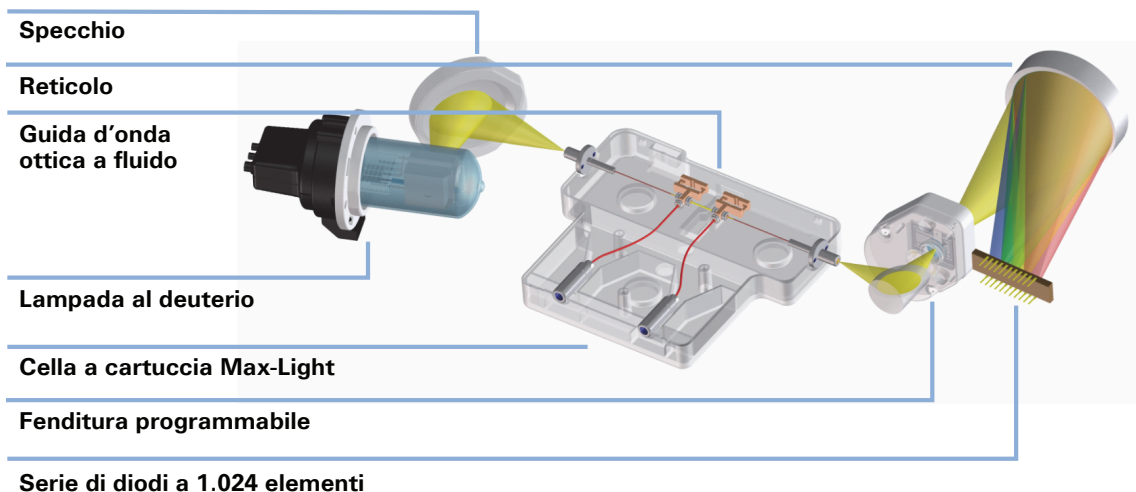


Figura 20 Percorso della luce lungo il Rivelatore a serie di diodi 1290 Infinity

Il modulo incorpora anche un controllo elettronico della temperatura per incrementare ulteriormente la resistenza agli effetti della temperatura ambientale. Sebbene il volume idraulico della cella a cartuccia Max-Light sia molto piccolo, la lunghezza del passo è quella standard da 10 mm. Tuttavia, per sensibilità ancora superiori è disponibile in alternativa la cella ad alta sensibilità Agilent Max-Light caratterizzata da una lunghezza del passo di 60 mm. Le celle si sostituiscono facilmente facendole scivolare dentro o fuori l'alloggiamento delle celle e si auto-allineano nello spazio ottico. La fonte luminosa del DAD è costituita da una lampada al deuterio che opera su una gamma di

lunghezze d'onda da 190 a 640 nm. Queste vengono rivelate da una serie di diodi comprendente 1.024 diodi. L'ingresso allo spettrografo è attraverso una fenditura ottica programmabile che può fornire una risoluzione spettrale da 1 a 8 nm. In genere questa opera a metà dell'intervallo, ma per ottimizzare il metodo può essere ristretta fino a 1 nm per risoluzioni spettrali elevate (raramente necessarie negli spettri UV delle fasi liquide) o aperta fino a 8 nm per ottenere la massima trasmissione della luce e il minimo rumore nel segnale.

I segnali cromatografici sono estratti dai dati della serie di diodi all'interno del firmware del modulo. Possono essere definiti fino a 8 segnali singoli, ciascuno comprendente una lunghezza d'onda del segnale, una larghezza di banda dei diodi raggruppati e, se necessario, una lunghezza d'onda e una larghezza di banda di riferimento. L'invio in uscita dei segnali può arrivare a 160 Hz (160 punti dati/secondo) per la registrazione accurata dei picchi cromatografici più rapidi (i più stretti). Contemporaneamente, il modulo può anche inviare in uscita gli spettri dell'intervallo completo al sistema di dati alla stessa frequenza di 160 Hz.

Per i laboratori certificati è importante che tutti i parametri del metodo vengano registrati. La fonte luminosa del DAD di 1290 Infinity non solo registra i valori di regolazione dello strumento, ma è dotata di tag RFID (tag di identificazione della radiofrequenza) integrati nella lampada e nella cartuccia della cella di flusso, cosicché il sistema registra l'identità e le variabili di questi importanti componenti.

2 Sistema LC Agilent 1290 Infinity - Descrizione del prodotto

Componenti del sistema



3

Ottimizzazione del sistema LC Agilent 1290 Infinity

Volume di ritardo e volume extra-colonna	42
Volume di ritardo	42
Volume extra-colonna	43
Configurazione del volume di ritardo ottimale	44
Come ottenere volumi di iniezione maggiori	53
Come ottenere una maggiore produttività	55
Come ottenere una maggiore risoluzione	58
Come ottenere una maggiore sensibilità	61
Come ridurre al minimo l'effetto memoria	70
Come prevenire ostruzioni della colonna	72

Il presente capitolo mostra come applicare la teoria e utilizzare le caratteristiche del sistema LC per sviluppare separazioni ottimizzate.



Volume di ritardo e volume extra-colonna

Il *volume di ritardo* è definito come il volume del sistema tra il punto di miscelazione della pompa e la sommità della colonna.

Il *volume extra-colonna* è definito come il volume tra il punto di iniezione e il punto di rilevazione, escluso il volume presente nella colonna.

Volume di ritardo

Nelle separazioni in gradiente, questo volume causa un ritardo tra il cambio della miscela nella pompa e il momento in cui il cambio raggiunge la colonna. Il ritardo dipende dal flusso e dal volume di ritardo del sistema. In effetti, questo significa che in ogni sistema HPLC, all'avvio di ogni esecuzione vi è un segmento isocratico aggiuntivo nel profilo del gradiente. Di solito il profilo del gradiente viene descritto in termini di impostazioni della miscela alla pompa e il volume di ritardo non viene citato, sebbene abbia un effetto sulla cromatografia. Questo effetto diventa più significativo a basse velocità di flusso e piccoli volumi di colonna e può avere un grande impatto sulla trasferibilità dei metodi in gradiente. È importante, quindi, che separazioni di gradiente rapide abbiano piccoli volumi di ritardo, specialmente con colonne di foro strette (ad esempio, con d.i. di 2,1 mm) come quelle utilizzate spesso nelle rilevazione spettrometrica di massa.

Il volume di ritardo di un sistema include il volume della pompa nel punto di miscelazione, le connessioni tra la pompa e l'autocampionatore, volume del percorso del flusso attraverso l'autocampionatore e le connessioni tra l'autocampionatore e la colonna.

Ad esempio, nei metodi HPLC che utilizzano un campione di 5 µm con flusso del materiale di 1 ml/min vengono di regola utilizzati in una colonna con d.i. di 4,6 mm e circa 0,2 ml/min in una colonna con d.i. di 2,1 mm (con la stessa velocità lineare nella colonna). Su un sistema con un volume di ritardo tipico di 1000 µl, che utilizza una colonna di 2,1 mm, si sarebbe un segmento isocratico iniziale “nascosto” di 5 min mentre su un sistema con un volume di ritardo di 600 µl, il ritardo sarebbe di 3 min. Questi volumi di ritardo sarebbero troppo alti per tempi di analisi di uno o due minuti. Con pacchetti infe-

riori a due μm , la velocità di flusso ottimale (secondo la curva di Van Deemter) è un po' più alta, quindi la cromatografia rapida può usare una velocità di flusso da tre a cinque volte superiori, producendo ritardi di circa un minuto. Tuttavia, il volume di ritardo deve essere ulteriormente ridotto per ottenere ritardi pari a una frazione del tempo di analisi desiderato. Questo viene ottenuto con il sistema LC Agilent 1290 Infinity grazie al ridotto volume di ritardo del percorso del flusso della pompa, al volume ridotto del miscelatore Jet Weaver e al volume ridotto del percorso del flusso attraverso l'autocampionatore.

Volume extra-colonna

Il volume extra-colonna è una sorgente di dispersione del picco che riduce la risoluzione di separazione e dovrebbe quindi essere ridotto al minimo. Colonne di diametro più piccolo richiedono volumi extra-colonna proporzionalmente più piccoli e mantengono minima la dispersione del picco.

In un cromatografo liquido il volume extra-colonna dipende dalla tubatura di connessione tra l'autocampionatore, la colonna e il rivelatore, nonché dal volume della cella di flusso nel rivelatore. Nel sistema Agilent 1290 Infinity LC, il volume extra-colonna è ridotto al minimo grazie alla tubatura di diametro interno ridotto (0,12 mm i.d.), al volume ridotto degli scambiatori di calore nel comparto della colonna e alla cella a cartuccia Max-Light nel rivelatore.

Configurazione del volume di ritardo ottimale

La [Tabella 3](#), pagina 44 e la [Tabella 4](#), pagina 45 mostrano i componenti che contribuiscono al volume di ritardo del sistema LC Agilent 1290 Infinity. Nella configurazione standard con la pompa binaria Agilent 1290 Infinity, il miscelatore Jet Weaver, l'autocampionatore 1290 Infinity e il comparto colonna termostato, il volume di ritardo del sistema è di circa 125 μL . Questo volume di ritardo standard è applicabile alla maggior parte delle applicazioni. Ad esempio, una separazione veloce su una colonna impaccata da 50 mm x 2,1 mm con particelle inferiori a due micron a una velocità di flusso moderata di 0,6 ml/min porta a un tipico tempo di ritardo del gradiente di circa 0,2 min, generalmente accettabile con tempi di gradiente nell'ordine di due o tre minuti (vedere [Tabella 6](#), pagina 45). È spesso utile considerare la velocità di flusso in termini di volumi di colonna, come può essere visto nella [Tabella 7](#), pagina 46 che con questa colonna 0,6 ml/min equivale a un flusso di circa 6 volumi di colonna al minuto attraverso il sistema, con un volume di ritardo corrispondente a circa 1,2 volte il volume della colonna.

Una configurazione caratterizzata da pompa quaternaria Agilent 1290 Infinity, autocampionatore 1290 Infinity e comparto colonna termostato ha un volume di ritardo di 430 μL , generando un tempo di ritardo di 0,7 min. Questo rappresenta il limite di accettabilità per tempi di gradiente di 3 min.

Tabella 3 Volumi di ritardo dei moduli LC 1290 Infinity

Componenti	Volume di ritardo (μL)
Pompa binaria	10
Miscelatore Jet Weaver (standard)	35
Pompa binaria + Jet Weaver	45
Pompa quaternaria	350
Pompa quaternaria + Jet Weaver V380	500
Autocampionatore (ciclo fisso di 5 μL)	5
Autocampionatore (standard, volume variabile)	80
Scambiatore di calore a bassa dispersione del comparto colonna	1,6
Tubi di collegamento, d.i. 0,12 mm, per 100 mm	1,1

Tabella 4 Volumi di ritardo delle configurazioni del sistema LC binario 1290 Infinity

Configurazioni di sistema ¹	Volume di ritardo (µl)
Pompa binaria + Autocampionatore a ciclo fisso (solo MS)	20
Pompa binaria + Jet Weaver + Ciclo fisso	55
Pompa binaria + Autocampionatore standard (solo MS)	90
Pompa binaria + Jet Weaver + Autocampionatore	125

¹ aggiunta di 5 µl per consentire le connessioni nelle configurazioni di sistema

Tabella 5 Volumi di ritardo delle configurazioni del sistema quaternario LC 1290 Infinity

Configurazioni di sistema ¹	Volume di ritardo (µl)
Pompa quaternaria + Autocampionatore a ciclo fisso (solo MS)	360
Pompa quaternaria + Autocampionatore standard (solo MS)	430
Pompa quaternaria + Jet Weaver V380 + Ciclo fisso	510
Pompa quaternaria + Jet Weaver V380 + Autocampionatore	580

¹ aggiunta di 5 µl per consentire le connessioni nelle configurazioni di sistema

Tabella 6 Tempi di ritardo del sistema perché il gradiente raggiunga la testa della colonna

Velocità di flusso (ml/min)	Volume di ritardo del sistema (microlitri)							
	20	55	90	125	360	395	430	465
	Tempi di ritardo (minuti)							
0,2	0,10	0,28	0,43	0,60	1,80	2,15	2,55	2,90
0,4	0,05	0,14	0,21	0,30	0,90	1,08	1,28	1,45
0,6	0,03	0,09	0,14	0,20	0,60	0,72	0,85	0,97
0,8	0,03	0,07	0,11	0,15	0,45	0,54	0,64	0,73
1,0	0,02	0,06	0,09	0,12	0,36	0,43	0,51	0,58

Tabella 6 Tempi di ritardo del sistema perché il gradiente raggiunga la testa della colonna

Velocità di flusso (ml/min)	Volume di ritardo del sistema (microlitri)							
1,5	0,01	0,04	0,06	0,08	0,24	0,29	0,34	0,39
2,0	0,01	0,03	0,04	0,06	0,18	0,22	0,26	0,29
3,0	0,01	0,02	0,03	0,04	0,12	0,14	0,17	0,19
4,0	0,01	0,01	0,02	0,03	0,09	0,11	0,13	0,15
5,0	0,00	0,01	0,02	0,02	0,07	0,09	0,10	0,12

Tabella 7 Volume approssimativo del liquido con dimensioni di colonna tipiche, presumendo una porosità = 0,6

Diametro colonna (mm)	Lunghezza colonna (mm)				
	30	50	100	150	250
	Volume colonna - Fase liquida (microlitri)				
2.1	62	104	208	312	520
3.0	127	212	424	636	1060
4.0	226	377	754	1131	1885
4.6	299	499	997	1496	2493

Per gradienti molto rapidi eseguiti in 0,5 min, raggiungibili solo dal sistema binario LC Agilent 1290 Infinity, il volume di ritardo del sistema può essere ridotto facilmente senza modificarne la configurazione fisica. Tale modifica si ottiene variando il comportamento dell'autocampionatore.

Il volume di ritardo dell'autocampionatore Agilent 1290 Infinity, pari a 80 µl, è associato al circuito idraulico che parte dalla valvola di iniezione, attraversa il dispositivo di dosaggio, l'ago, la sede dell'ago, i capillari di connessione e torna infine alla valvola di iniezione (vedere [Figura 18](#), pagina 34). Per eseguire un'iniezione, la valvola passa da mainpass a bypass in modo che il dispositivo

di dosaggio possa aspirare il campione nel capillare dell'ago. L'iniezione viene eseguita quando la valvola ritorna nella posizione di mainpass e il campione viene introdotto nella colonna. Durante l'analisi la valvola rimane in questa posizione cosicché l'autocampionatore è continuamente attraversato dal flusso e, pertanto, il gradiente deve fluire attraverso il volume di ritardo per raggiungere la colonna. Questo effetto può essere eliminato commutando la valvola di iniezione dalla posizione di mainpass a bypass dopo che è stata eseguita l'iniezione e il campione iniettato è stato introdotto nella colonna. In pratica questa operazione può essere eseguita pochi secondi dopo l'iniezione e viene attivata selezionando la funzione ADVR (Automatic Delay Volume Reduction) nel menu di impostazione dell'autocampionatore. Il fattore di eliminazione (in genere 5 volte il volume di iniezione) permette di disporre di un tempo sufficiente per eliminare il campione dall'iniettore prima della commutazione nella posizione di bypass. Ciò riduce efficacemente il volume di ritardo del sistema da 125 µl a 50 µl.

Quando si utilizza la funzione ADVR, tenere presente che il gradiente è già iniziato nella pompa al momento dell'iniezione. Se il gradiente ha già raggiunto l'autocampionatore, il risultato è un piccolo gradino nel gradiente. Ciò si verifica quando il volume di ritardo è inferiore al volume di eliminazione; non si tratta necessariamente di un problema ma può essere un fattore da tenere in considerazione quando si trasferisce un metodo. Se il fattore di eliminazione è 5 e il volume di iniezione è pari a 10 µl, l'autocampionatore consente il flusso di 50 µl prima della commutazione nella posizione di bypass; ciò significa che se il volume di ritardo è pari a 50 µl, il gradiente è appena riuscito a raggiungere la valvola di iniezione. Volumi di iniezione più piccoli non hanno alcun effetto mentre volumi di iniezione più grandi comportano la presenza di un piccolo gradino nel gradiente. Anche la velocità di flusso utilizzata incide sulla decisione se utilizzare o meno la funzione ADVR. A 0,2 ml/min il tempo di ritardo risparmiato è pari a 21 secondi mentre a 1,0 ml/min è pari a 4 secondi.

In genere è poco probabile che la funzione ADVR sia adatta alle applicazioni relative a composti che presentano problemi noti di effetto memoria.

Per ridurre al minimo la dispersione del picco e il volume di ritardo nel comparto colonna termostato, deve essere installato lo scambiatore di calore a bassa dispersione. Lo scambiatore di calore a bassa dispersione fa parte del kit di capillari raccomandato per la applicazioni a bassa dispersione. Il kit di capillari comune include anche capillari stretti con d.i. di 0,12 mm. Gli scambiatori di calore da 3 µl e da 6 µl servono per la compatibilità a ritroso e dovrebbero essere usati solo nel caso in cui sul sistema debba essere eseguito

un metodo convenzionale, sebbene in questo caso possa essere usato anche lo scambiatore di calore a bassa dispersione.

Per mantenere la risoluzione del rivelatore a serie di diodi Agilent 1290 Infinity, la cella a cartuccia Max-Light ha un basso volume di dispersione (volume σ 1,0 μ l) e non richiede ulteriore ottimizzazione del volume. Nelle situazioni in cui viene utilizzata la cella alternativa Agilent Max-Light ad alta sensibilità per ottenere una maggiore sensibilità, il volume di cella è ottimizzato per l'utilizzo di colonne con diametro interno di 3 mm e di 4,6 mm.

Per il funzionamento della pompa è consigliabile impostare il solvente corretto nella schermata di impostazione della pompa. Anche se il controllo intelligente adatta automaticamente al minimo il picco di pressione, la compressibilità del solvente può avere un effetto sul mantenimento di una velocità di flusso assolutamente corretta ad alta pressione. Questo assicura che siano sempre applicati i valori corretti di compressibilità per le fasi mobili utilizzate. Sono disponibili funzioni di calibrazione per le pompe binaria e quaternaria Agilent 1290 Infinity.

Nella Pompa binaria 1290 Infinity, il volume di ritardo fisico della pompa dipende principalmente dall'utilizzo del miscelatore Jet Weaver. Per la rivelazione UV, dovrebbe essere sempre usato Jet Weaver, ma per la rivelazione con spettrometria di massa l'utente può decidere di bypassare Jet Weaver rimuovendo 35 μ l dal volume di ritardo. Questo ha senso solo per il funzionamento a gradiente ultra-rapido (meno di 0,5 min) o per utilizzo con colonne di volume molto piccolo. Fare riferimento a [Tabella 6](#), pagina 45 per l'effetto sul tempo di ritardo del sistema. Se Jet Weaver viene bypassato, i tubi di collegamento all'autocampionatore provengono direttamente dalla valvola di spurgo. Assicurare che Jet Weaver sia stato sciacquato con solvente senza tamponi o altri additivi prima di scollegarlo.

Talvolta può essere consigliabile aumentare il volume di ritardo della pompa. Specificatamente questo può essere opportuno quando viene impiegata la rivelazione UV e alla fase mobile è stato aggiunto un composto con forte assorbimento UV. Questo può avere l'effetto di evidenziare qualsiasi rumore della pompa e l'esempio più comune è l'utilizzo di acido trifluoroacetico (TFA) per l'analisi di proteine e peptidi. L'effetto può essere mitigato aumentando il volume del miscelatore. Il miscelatore Jet Weaver ha due volumi alternativi nella stessa unità. Il passaggio dal volume minore, 35 μ l, al volume maggiore, 100 μ l, viene eseguito disinstallandolo, invertendo la parte anteriore con quella posteriore e reinstallandolo. Il volume di miscelazione (e perciò il volume di ritardo) viene aumentato di 65 μ l e le prestazioni di base con additivi come il TFA verranno migliorate. La configurazione di Jet Weaver viene

registrata automaticamente da un tag RFID collegato. Per le applicazioni particolarmente complesse che richiedono il più basso rumore possibile della linea di base agli UV, è consigliabile l'uso del miscelatore Jet Weaver da 380 μ L, che viene installato in modo analogo al miscelatore Jet Weaver standard.

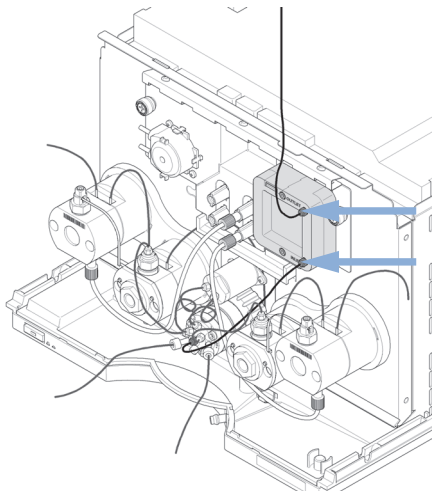
La procedura di sostituzione del Jet Weaver nella Pompa binaria 1290 Infinity è illustrata in [“Sostituzione di Jet Weaver nella Pompa binaria 1290 Infinity”](#), pagina 50.

A causa della diversa configurazione e del diverso principio di miscelazione della Pompa quaternaria Agilent 1290 Infinity, il volume di ritardo fisico è molto maggiore e nelle applicazioni standard non vi è la necessità di un miscelatore Jet Weaver aggiuntivo. Tuttavia è possibile installare un miscelatore Jet Weaver da 380 μ L opzionale per le applicazioni basali critiche, come le applicazioni con TFA. Il miscelatore Jet Weaver opzionale ha un alloggiamento diverso, adattato al modulo della Pompa quaternaria 1290 Infinity.

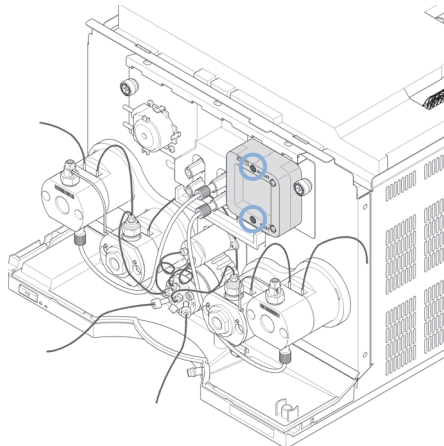
La procedura di installazione di un Jet Weaver nella Pompa quaternaria 1290 Infinity è illustrata in [“Installazione di Jet Weaver V380 nella Pompa quaternaria 1290 Infinity”](#), pagina 51.

Sostituzione di Jet Weaver nella Pompa binaria 1290 Infinity

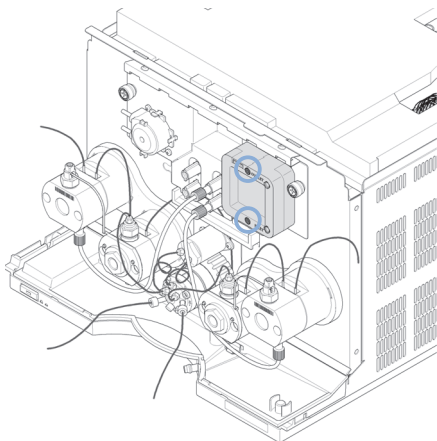
1 Rimuovere i collegamenti dei capillari dal Jet Weaver.



2 Svitare le viti esagonali che fissano Jet Weaver alla sede della pompa.



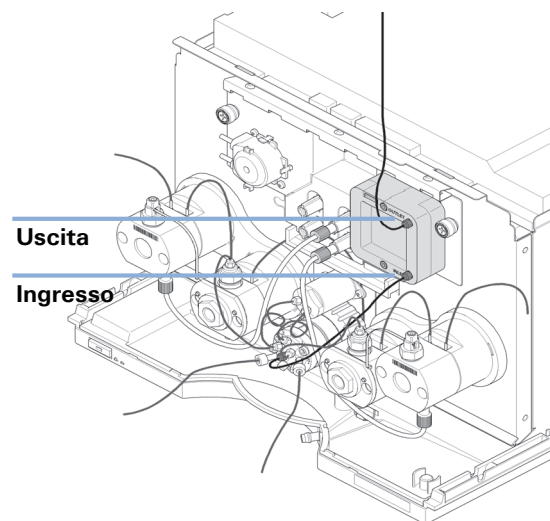
3 Installare il nuovo Jet Weaver.



NOTA

Il Jet Weaver ha un orientamento fronte-retro con volumi interni diversi (35 / 100 μ l) ottimizzati per un volume di ritardo basso o per le migliori prestazioni di miscelazione.

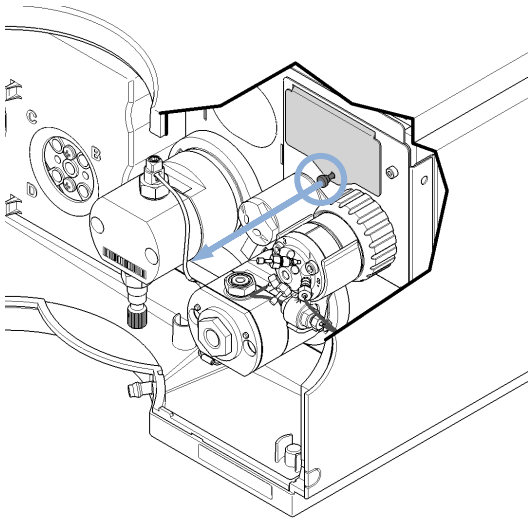
4 Installare nuovamente i collegamenti dei capillari.



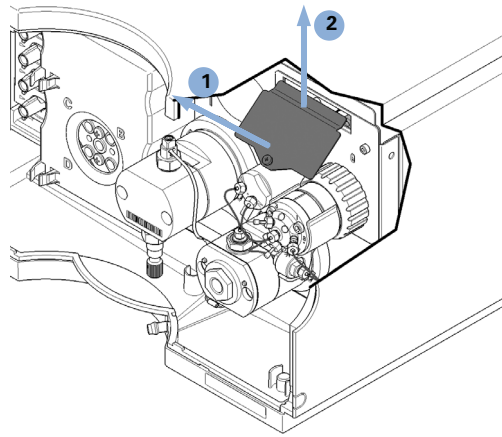
L'ingresso nella parte inferiore del Jet Weaver è collegato alla porta centrale della valvola della pompa da un capillare (lunghezza 300 mm, 0,17 mm d.i.). L'uscita sul lato superiore è collegata all'autocampionatore.

Installazione di Jet Weaver V380 nella Pompa quaternaria 1290 Infinity

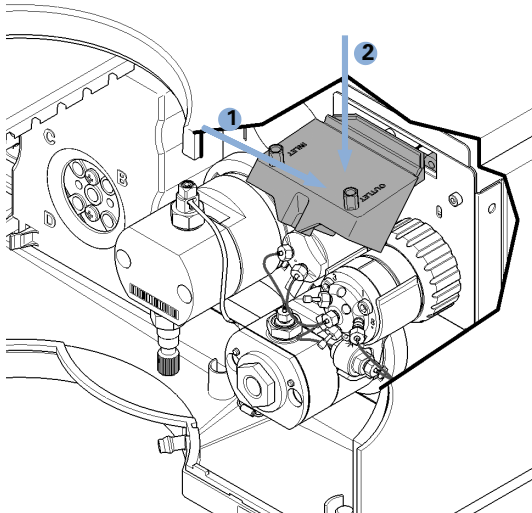
1 Svitare la vite del coperchio metallico del Jet Weaver.



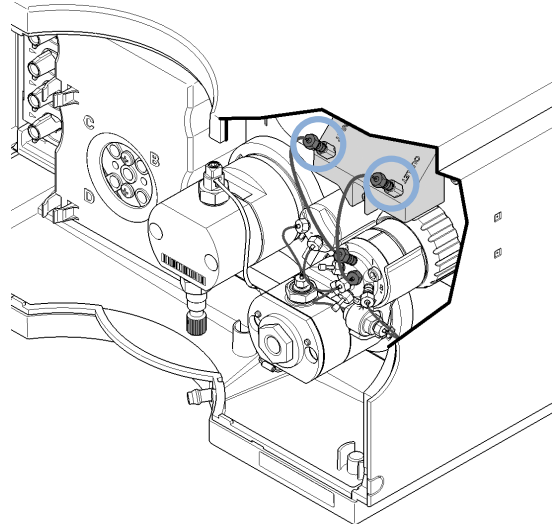
2 Rimuovere il coperchio metallico sollevandolo (1) ed estraendolo dal pannello anteriore (2).



3 Inserire il Jet Weaver nell'apertura sul pannello anteriore (1) e spingerlo verso il basso (2).



4 Montare entrambi i capillari di collegamento al Jet Weaver nell'orientamento corretto.



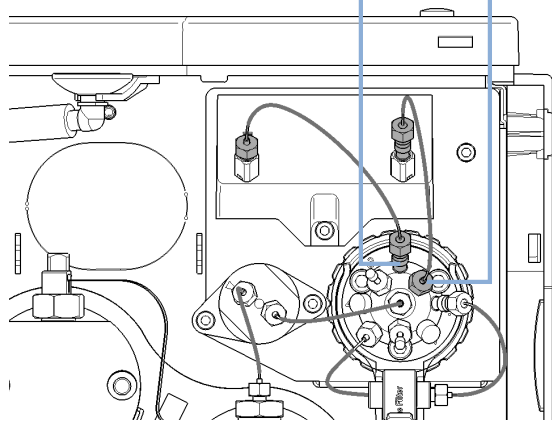
3 Ottimizzazione del sistema LC Agilent 1290 Infinity

Configurazione del volume di ritardo ottimale

- 5 Collegare il capillare d'ingresso del Jet Weaver alla porta 2 della valvola multiuso. Collegare il capillare di uscita alla porta 1.

Porta 1

Porta 2



Come ottenere volumi di iniezione maggiori

La configurazione standard dell'autocampionatore Agilent 1290 Infinity include un loop di campionamento dal volume variabile per un massimo di 20 µl iniezioni. Il dispositivo di misurazione può iniettare un volume massimo di 40 µl ed è possibile scambiare la cartuccia del loop di campionamento per consentire questa operazione (per ulteriori dettagli, fare riferimento al *manuale dell'autocampionatore 1290 Infinity*). Il volume di ritardo del sistema dovuto all'autocampionatore aumenterà di conseguenza.

Quando un metodo viene trasferito da una colonna superiore a una minore, è importante che la relativa traduzione consenta di ridurre il volume di iniezione in proporzione al volume della colonna per mantenere le prestazioni del metodo. In questo modo è possibile mantenere il volume dell'iniezione allo stesso volume della percentuale rispetto alla colonna. È particolarmente importante se il solvente di iniezione è più forte (più eluotropico) rispetto alla fase mobile iniziale e ogni aumento influenzerà la separazione, in particolare per quanto riguarda picchi di esecuzione preventivi (fattore di ritenzione ridotto). In alcuni casi si tratta della causa della distorsione del picco e la regola generale è quella di mantenere il solvente di iniezione allo stesso livello o a un livello ridotto rispetto alla composizione del gradiente iniziale. Tutto questo è rilevante in base a se, o a quanto, è possibile aumentare il volume di iniezione; all'utente spetta il compito di verificare l'aumento di dispersione (picchi più ampi o maggiormente alterati e risoluzione dei picchi ridotta) nel tentativo di aumentare la dimensione dell'iniezione. Se l'iniezione viene eseguita in un solvente debole, il volume può aumentare ulteriormente in quanto l'effetto è quello di concentrare l'analita sulla testa della colonna all'inizio del gradiente. Al contrario, se l'iniezione si trova in un solvente più forte rispetto alla fase mobile iniziale, allora il volume di iniezione migliorato distribuirà la banda di analita nella colonna anteriore al gradiente, provocando dispersione di picco e perdita di risoluzione.

Da tenere maggiormente in considerazione durante la determinazione del volume di iniezione è il diametro della colonna, poiché questo avrà un grosso impatto sulla dispersione del picco. Le altezze del picco possono essere maggiori in una colonna ristretta rispetto a un'iniezione maggiore in una colonna più ampia a causa della minore dispersione del picco. Con colonne dal diametro interno di 2,1 mm i volumi di iniezione potrebbero modificare l'intervallo fino a 5 - 10 µl, ma questo dipende dalla natura chimica dell'analita e dalla

3 Ottimizzazione del sistema LC Agilent 1290 Infinity

Come ottenere volumi di iniezione maggiori

fase mobile, come indicato sopra. È possibile ottenere un'indicazione rapida relativa al volume di iniezione massimo guardando il volume della colonna (vedere); nella separazione in gradiente è possibile raggiungere volumi di iniezione di circa 5 % del volume della colonna, mantenendo buona risoluzione e dispersione del picco.

Un modo per ottenere iniezioni maggiori è quello di utilizzare una colonna di intrappolamento selezionata da una valvola di commutazione per catturare e concentrare l'iniezione prima di modificarla, ad esempio trasferendola su una colonna analitica; per ulteriori informazioni fare riferimento a . È possibile posizionare la valvola nel comparto colonna termostata.

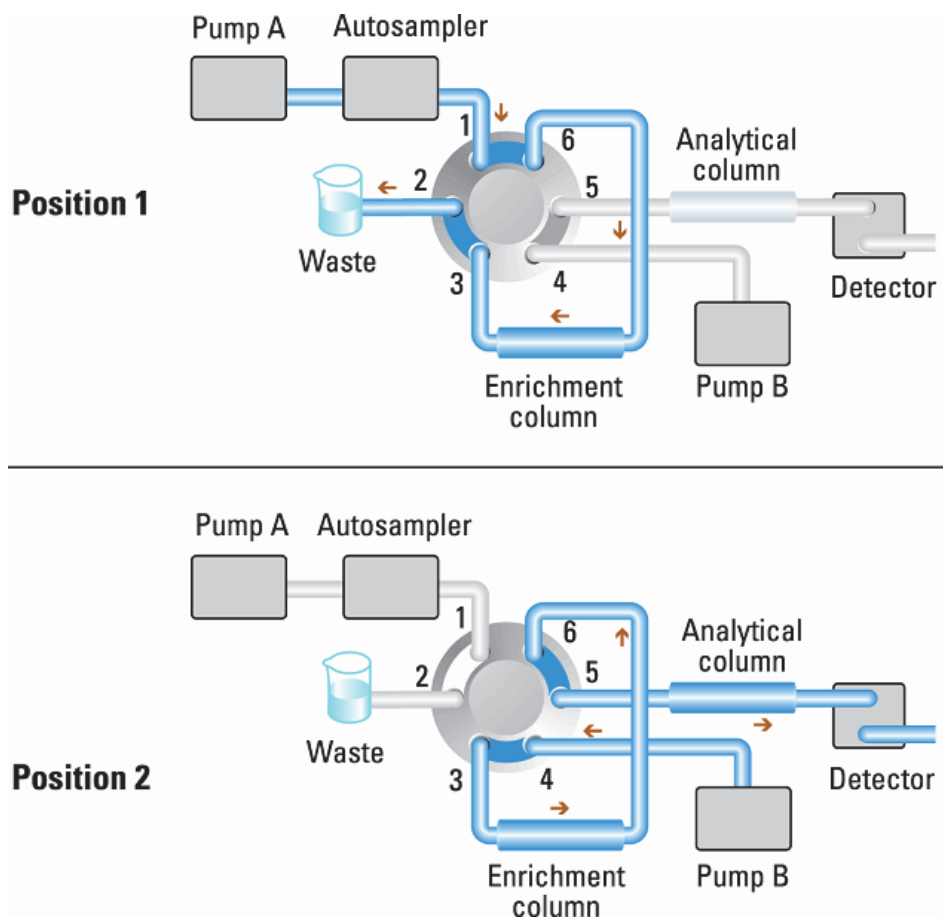


Figura 21 Arricchimento del campione

Come ottenere una maggiore produttività

Alcuni laboratori operano in un ambiente ad alta produttività (HT) dove il carico di lavoro richiede l'effettuazione di sequenze comprendenti centinaia di iniezioni, se non migliaia, per completare una lotto di lavoro. In queste situazioni è altamente desiderabile minimizzare i tempi di ciclo, in quanto pochi secondi risparmiati per ogni iniezione riducono in modo significativamente utile il tempo globale necessario per completare il lavoro. I punti chiave per ottenere tempi di ciclo rapidi e operazioni ad alta produttività sono:

- Uso di separazioni rapide
- Sovrapposizione delle iniezioni
- Riduzione al minimo del tempo di equilibratura
- Rigenerazione alternata delle colonne

Il primo passo per ottenere un'alta produttività è assicurare che i metodi usati abbiano tempi di ciclo brevi, cioè siano metodi cromatografici rapidi. L'uso di colonne brevi con impaccamento di particelle delle dimensioni di 1,8 μm è ideale per questo scopo a causa dell'elevata efficienza disponibile in una colonna breve. Se i metodi implicano una separazione isocratica, questo permette tempi di ciclo più rapidi in quanto non è richiesta alcuna equilibratura di colonna tra le analisi. Tuttavia, spesso vengono impiegati metodi gradiente a causa della diversità o della complessità dei campioni. Nello sviluppo del metodo, l'intervallo del gradiente dovrebbe essere mantenuto al valore minimo necessario per ottenere la separazione. In molti sistemi ad "accesso aperto", vengono usati gradienti che vanno dal 5 % al 95 % di solvente organico per ottenere la massima flessibilità quando si tratta una varietà di composti sconosciuti. In una situazione a elevata produttività, si dovrebbe valutare se sarà sufficiente una gamma più ristretta quando la gamma dei composti da analizzare è ridotta e questo non solo permetterà di ridurre il tempo di analisi, ma abbrevierà anche il tempo di equilibratura tra le analisi.

Il tempo di ciclo è composto da numerose parti: Tempo di ciclo = iniezione + separazione + equilibratura + elaborazione dati.

Con un grande numero di campioni da trattare, anche la più piccola riduzione del tempo di ciclo può portare a una grande riduzione nel tempo globale di completamento del lavoro. Per questa ragione l'elaborazione dati può essere

tenuta fuori linea per permettere al sistema di concentrarsi sull'analisi dei campioni e sulla raccolta dei dati.

L'iniezione può essere ottimizzata per aumentare la velocità, ricordando che un'estrazione troppo rapida del campione può ridurre la riproducibilità. Su questo punto possono essere ottenuti risparmi marginali, in quanto i volumi di campione usati tendono in ogni caso verso l'estremità inferiore dell'intervallo. Una parte significativa del tempo di iniezione è il tempo impiegato dai movimenti dell'ago dentro e fuori dalla fiala e nella porta di scarico. Queste manipolazioni possono essere eseguite mentre è in corso la separazione precedente. Questo metodo è noto come "iniezione sovrapposta" e può essere facilmente attivato dalla schermata di impostazione dell'autocampionatore nel software di controllo ChemStation. L'autocampionatore può essere impostato in modo da commutare sul bypass il flusso attraverso l'autocampionatore dopo che l'iniezione è stata eseguita e quindi, ad esempio dopo 3 o 4 minuti, avviare il processo di aspirazione del campione successivo e di preparazione dell'iniezione. Questo di solito consente di risparmiare da 0,5 minuti a 1 minuto per ogni iniezione. Per i composti appiccicosi è consigliabile farlo durante l'equilibratura della colonna, quando l'autocampionatore ha visto le condizioni iniziali di analisi del gradiente successivo.

La fase di equilibratura della colonna può rappresentare una parte significativa del tempo di ciclo. Di solito la colonna deve essere ripulita con un volume da tre a cinque volte superiore al volume della colonna per stabilizzarla in modo che sia pronta per la successiva iniezione e in alcune applicazioni questo può rappresentare almeno il 50 % del tempo di separazione. È un processo essenziale ma può essere staccato dal tempo di ciclo usando la rigenerazione alternata automatica delle colonne. Per questo sono necessarie una testa di valvola da 1200 bar a due posizioni e dieci porte nel compartimento della colonna; una seconda colonna analitica identica alla prima e una seconda pompa. Dato che viene usata una colonna nell'analisi di separazione, l'altra colonna viene scaricata della composizione iniziale del gradiente della fase mobile e, per avviare l'iniezione successiva, il percorso del flusso analitico viene commutato sulla colonna appena riequilibrata. Le due colonne si alternano quindi in questo modo per l'intera sequenza di iniezioni. La seconda pompa è necessaria solo per scaricare una miscela isocratica attraverso la colonna e può essere quindi più semplice delle pompe 1290 Infinity. Ad esempio una pompa isocratica Serie 1200 potrebbe essere sufficiente per questa attività. La configurazione è illustrata in [Figura 22](#), pagina 57.

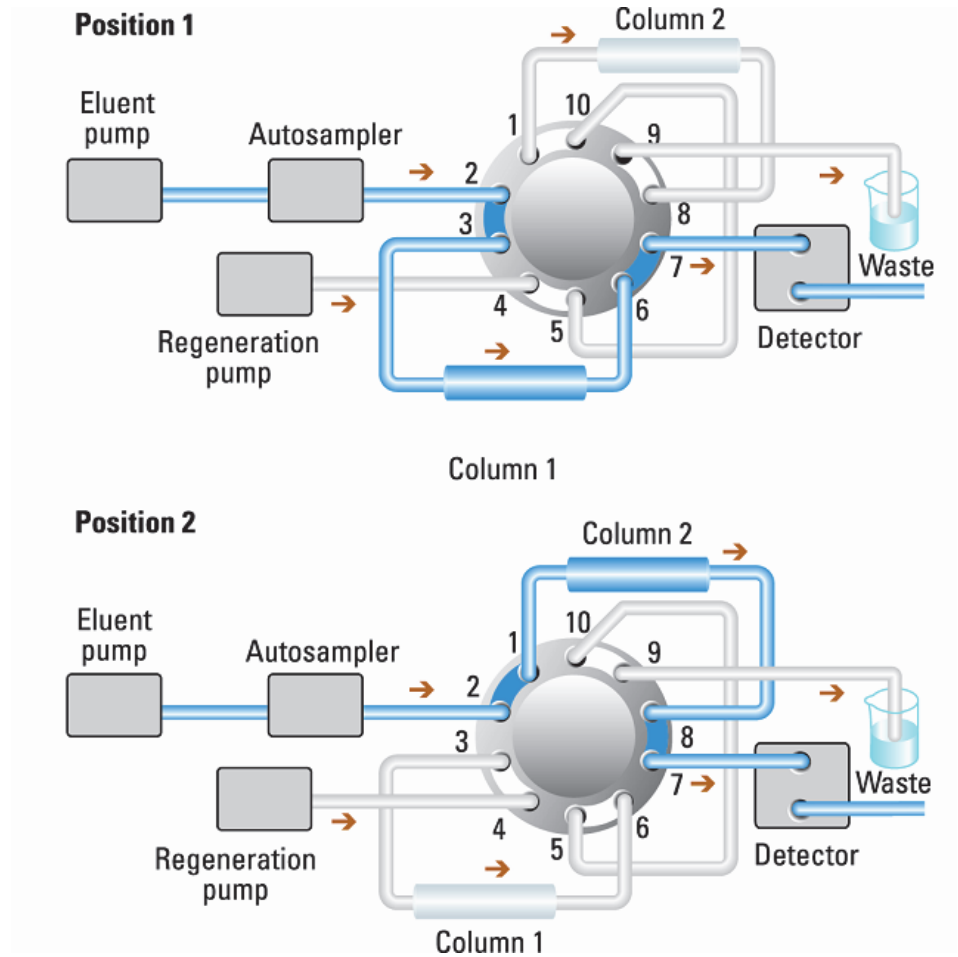


Figura 22 Rigenerazione alternata delle colonne

Come ottenere una maggiore risoluzione

Una maggiore risoluzione nel corso di una separazione consentirà di migliorare l'analisi qualitativa e quantitativa dei dati, separare un numero superiore di picchi o fornire indicatori ulteriori per velocizzare la separazione. In questa sezione viene indicato come aumentare la risoluzione esaminando i punti seguenti:

- Ottimizzazione della selettività
- Impaccamento particelle di dimensioni ridotte
- Colonne più lunghe
- Gradienti più profondi, flusso più veloce
- Volume colonna extra minimo
- Ottimizzazione volume e solvente di iniezione
- Acquisizione dati sufficientemente veloce

La risoluzione tra due picchi è descritta dall'equazione di risoluzione:

$$R_s = \frac{1}{4} \sqrt{N} \frac{(\alpha - 1)}{\alpha} \frac{(k_2 + 1)}{k_2}$$

dove

- R_s = risoluzione,
- N = conta su piastra (misura dell'efficienza della colonna),
- α = selettività (tra due picchi),
- k_2 = fattore di ritenzione del secondo picco (definito in precedenza fattore di capacità).

Il fattore che influisce maggiormente sulla risoluzione è la selettività, α ; variandolo, si modifica il tipo di fase stazionaria (C18, C8, fenile, nitrile, ecc), la fase mobile e la temperatura per aumentare le differenze di selettività tra i soluti da separare. Il lavoro che ne deriva viene eseguito al meglio con un sistema di sviluppo di metodi automatizzato che consente di stabilire, in un protocollo di indagine predeterminato, una vasta gamma di condizioni in diverse colonne e fasi mobili. Tale sezione indica come ottenere una risoluzione maggiore con qualunque fase stazionaria e mobile. Se nella decisione

riguardante le fasi è stato utilizzato un sistema di sviluppo di metodi automatizzato, è probabile che siano state utilizzate colonne brevi per un'analisi rapida in ogni fase dell'indagine.

L'equazione di risoluzione mostra che il fattore maggiormente significativo è l'efficienza o la conta su piastra, N , la cui ottimizzazione è possibile in diversi modi. N è inversamente proporzionale alle dimensioni delle particelle e direttamente proporzionale alla lunghezza di una colonna; in questo modo particelle di dimensioni minori e colonne più lunghe restituiranno una conta su piastra più elevata. La pressione aumenta dall'inverso del quadrato delle dimensioni delle particelle e proporzionalmente alla lunghezza della colonna. È per questo motivo che il sistema 1290 Infinity LC è stato progettato per arrivare a 1200 bar, così da consentire il funzionamento con particelle di meno di due micron potendo aumentare la lunghezza della colonna fino a 100 mm o 150 mm. È possibile inoltre trovare esempi di colonne da 100 mm e 150 mm, collegate così da raggiungere una lunghezza di 250 mm. L'aumento della risoluzione con la radice quadrata di N consente, al momento del raddoppio della lunghezza della colonna, di aumentare la risoluzione di un fattore di 1,4. Ciò che può essere ottenuto dipende dalla viscosità della fase mobile, in quanto è direttamente collegata alla pressione. Le miscele di metanolo generano una contropressione maggiore rispetto a quelle di acetonitrile. L'acetonitrile viene utilizzato più di frequente in virtù dei picchi migliori e più stretti, nonché della ridotta viscosità, anche se il metanolo garantisce solitamente una maggiore selettività (per molecole piccole inferiori a 500 Da). È possibile ridurre la viscosità aumentando la temperatura, ma è necessario prestare attenzione alla conseguente modificazione della selettività della separazione. Sarà sufficiente condurre un esperimento per verificare se tale processo porterà a una diminuzione o a un aumento nella selettività. Se flusso e pressione vengono aumentati, anche il riscaldamento frizionale all'interno della colonna aumenterà e di conseguenza verrà registrato un lieve aumento della dispersione e una variazione della selettività, entrambi visti come riduzione della risoluzione. Quest'ultimo caso può essere compensato riducendo la temperatura del termostato di alcuni gradi e sarà nuovamente la conduzione dell'esperimento a rivelare il risultato.

La curva di van Deemter mostra che il flusso ottimale attraverso la colonna STM è superiore rispetto a quello che si ottiene con particelle più grandi e non presenta picchi sostanziali all'aumento del flusso. Flussi tipici e ottimali per colonne STM sono: 2 ml/min per colonne con d.i. di 4,6 mm; e 0,4 ml/min per colonne con d.i. di 2,1 mm.

Nelle separazioni isocratiche l'aumento del fattore di ritenzione, k , fornisce una migliore risoluzione dovuta al tempo maggiore di ritenzione del soluto. Nelle separazioni in gradiente la ritenzione è descritta da k^* nella seguente equazione:

$$k^* = \frac{t_G}{\Delta\%B} \cdot \frac{F}{V_m} \cdot \frac{100}{S}$$

Dove:

- k^* = indica il valore k ,
- t_G = periodo di tempo di gradiente (o segmento di gradiente) (min),
- F = flusso (ml/min),
- V_m = volume di ritardo della colonna,
- $\Delta\%B$ = modifica della frazione del solvente B durante il gradiente,
- S = costante (ca. 4 - 5 per piccole molecole).

Viene mostrato che è possibile aumentare il fattore k e la relativa risoluzione ottenendo un gradiente più profondo (linea guida: modifiche da 2 a 5 %/min), un flusso più elevato e una colonna di volume minore. L'equazione mostra inoltre in che modo velocizzare un gradiente esistente: se il flusso è raddoppiato ma il gradiente dimezzato, k^* rimane costante e la separazione non sembra aver subito modifiche. Questo però accade solo nella metà dei casi. Una ricerca pubblicata recentemente ha mostrato come una colonna STM minore (a temperature superiori a 40 °C) possa generare una peak capacity maggiore rispetto a una colonna STM più lunga grazie all'esecuzione più veloce. (Fare riferimento a *Petersson et al., J.Sep.Sci, 31, 2346-2357, 2008, Maximizing peak capacity and separation speed in liquid chromatography*).

Ciascuna riduzione del volume della colonna extra ridurrà la dispersione e fornirà una risoluzione migliore. Tutto questo è già stato ottimizzato nel sistema 1290 Infinity LC con capillari con diametro interno ristretto (0,12 mm d.i. - verificare che venga utilizzata la lunghezza minore tra colonna e rivelatore) e cella di flusso cartuccia Max-light.

Infine, è necessario preservare qualunque miglioramento della risoluzione tramite una raccolta dei dati sufficientemente rapida per delineare in maniera accurata i picchi affilati.

Come ottenere una maggiore sensibilità

Ottenere una sensibilità maggiore

La sensibilità di un metodo di separazione è legata alla scelta delle fasi mobili e stazionarie, poiché è preferibile ottenere una buona separazione con picchi stretti e una linea di base stabile. La scelta della configurazione dello strumento provocherà determinati effetti, ma l'impatto maggiore sarà dato dalle impostazioni del rivelatore. Il presente capitolo analizza in che modo la sensibilità è influenzata da:

- Volume del miscelatore della pompa
- Colonne ristrette
- Cella di flusso del rivelatore
- Parametri rivelatore

Inoltre, trattando i parametri del rivelatore, verranno anche menzionati argomenti relativi come selettività e linearità.

Volume del miscelatore della pompa

Per ottenere un rumore di fondo ridotto con rivelazione UV, è consigliata la configurazione del volume di ritardo standard con il Jet Weaver da 35 µl per il modulo della pompa 1290 Infinity. Tale configurazione è adatta per la maggior parte delle applicazioni, ma quando viene utilizzato il TFA nella fase mobile, o in altre situazioni che richiedono maggiore miscelazione, è consigliato utilizzare il lato del miscelatore Jet Weaver con volume maggiore per minimizzare il rumore provocato dalla miscelazione.

Colonne

La sensibilità è specificata come rapporto segnale-rumore (signal-to-noise, S/N), necessità di aumento dell'altezza del picco e riduzione del rumore di fondo. Ogni riduzione della dispersione del picco garantirà il mantenimento dell'altezza del picco e sarà così possibile ridurre il volume extra della colonna tramite capillari di connessione corti e dal diametro interno ristretto e mediante raccordi installati correttamente. Colonne dal diametro interno più piccolo dovrebbero garantire un'altezza di picco maggiore ed essere quindi

3 Ottimizzazione del sistema LC Agilent 1290 Infinity

Come ottenere una maggiore sensibilità

adatte per applicazioni con limitate quantità di campione. Se è possibile iniettare la stessa quantità di campione in una colonna dal diametro interno più piccolo, la diluizione dovuta al diametro della colonna sarà minore e la sensibilità maggiore. Ad esempio, diminuendo il diametro interno della colonna da 4,6 mm a 2,1 mm sarà possibile ottenere un aumento teorico dell'altezza del picco di 4,7 times grazie alla riduzione della diluizione in colonna. Per un rivelatore dello spettrometro di massa, gli intervalli di flusso inferiori delle colonne ristrette possono offrire una maggiore efficienza di ionizzazione e di conseguenza elevata sensibilità.

Come ottenere una maggiore sensibilità del rivelatore

È possibile utilizzare una serie di parametri del rivelatore per ottimizzare le prestazioni. Nelle sezioni che seguono è descritto come i parametri del rivelatore incidono sulle caratteristiche delle prestazioni:

- La cella di flusso incide sulla sensibilità.
- La lunghezza d'onda e la larghezza di banda incidono su sensibilità, selettività e linearità.
- La larghezza della fenditura incide su sensibilità, risoluzione spettrale e linearità.
- L'ampiezza del picco incide su sensibilità e risoluzione.

Cella di flusso

La cella di flusso a cartuccia Max-Light possiede un cammino ottico standard di lunghezza pari a 10 mm ed è ottimizzata per ridurre al minimo volume e dispersione (σ volume 1,0 μ L). È caratterizzata da un'elevata trasmissione della luce per ridurre il rumore dovuto alla guida d'onda optofluidica. È adatta all'utilizzo con un'ampia gamma di colonne analitiche, dalle colonne narrow-bore corte alle colonne lunghe di diametro standard (4,6 mm). In genere il volume di dispersione del picco (calcolato con la formula ampiezza del picco x velocità di flusso) per questa cella dovrebbe essere superiore a circa 2 μ L (per esempio 0,02 min x 200 μ L/min = 4 μ L).

Il cammino ottico della cella ad alta sensibilità Max-Light è pari a 60 mm che si traduce in un aumento da tre a cinque volte dei valori segnale-rumore a seconda delle condizioni delle applicazioni. Il volume di dispersione aumenta in misura frazionale rispetto alla cella standard.

Lunghezza d'onda e larghezza di banda

Il rivelatore misura contemporaneamente l'assorbanza alle lunghezze d'onda comprese tra 190 nm e 640 nm tramite rivelazione a serie di diodi. Una lampada UV garantisce una buona sensibilità sull'intero intervallo di lunghezze d'onda. Il rivelatore a serie di diodi (DAD) può calcolare e inviare contemporaneamente al sistema di elaborazione dei dati fino a otto segnali cromatografici e spettri completi in corrispondenza di qualsiasi istante.

Un segnale o cromatogramma UV è un grafico dei dati di assorbanza in funzione del tempo ed è definito dalla lunghezza d'onda e dalla larghezza di banda specifiche.

- La lunghezza d'onda indica il centro della banda di rivelazione.
- La larghezza di banda definisce l'intervallo di lunghezze d'onda sul quale viene calcolata la media dei valori di assorbanza per produrre il risultato in corrispondenza di ogni istante.

Per esempio, un segnale alla lunghezza d'onda di 250 nm con una larghezza di banda pari a 16 nm è la media dei dati di assorbanza da 242 nm a 258 nm. Inoltre, per ogni segnale possono essere definite una lunghezza d'onda di riferimento e una larghezza di banda di riferimento. L'assorbanza media dalla larghezza di banda di riferimento centrata sulla lunghezza d'onda di riferimento viene sottratta dal valore equivalente alla lunghezza d'onda del segnale per produrre il cromatogramma risultante.

La lunghezza d'onda e la larghezza di banda del segnale possono essere scelte in modo che siano ottimizzate per:

- Rivelazione universale a banda larga
- Rivelazione selettiva a banda stretta
- Sensibilità per un analita specifico.

La rivelazione a banda larga o universale si basa sull'utilizzo di un'ampia larghezza di banda per rivelare ogni specie che assorbe in tale intervallo. Per esempio, per rivelare tutte le molecole che assorbono tra 200 nm e 300 nm, impostare un segnale a 250 nm con una larghezza di banda pari a 100 nm. Lo svantaggio è che la sensibilità non sarà ottimale per nessuna di tali molecole. La rivelazione a banda stretta o selettiva è utilizzata con maggiore frequenza. Si esamina lo spettro UV di una particolare molecola e si seleziona un massimo di assorbanza opportuno. Se possibile, è consigliabile evitare l'intervallo in cui i solventi presentano un forte assorbimento (al di sotto di 220 nm per il metanolo, al di sotto di 210 nm per l'acetonitrile). Per esempio, in [Figura 23](#), pagina 66, l'acido anisico possiede un buon massimo di assorbanza a 252 nm. Una larghezza di banda stretta compresa tra 4 nm e 12 nm in genere consente di ottenere una buona sensibilità ed è specifica per l'assorbanza in un intervallo stretto.

La banda stretta può essere ottimizzata per ottenere la sensibilità nei confronti di una molecola specifica. Via via che si aumenta la larghezza di banda il segnale si riduce, ma anche il rumore diminuisce ed è possibile ottenere un valore ottimale del rapporto segnale-rumore. Indicativamente, il valore otti-

male della larghezza di banda spesso è prossimo alla larghezza di banda naturale a metà altezza della banda di assorbimento nello spettro UV. Nell'esempio dell'acido anisico, il valore è pari a 30 nm.

La lunghezza d'onda analitica in genere è impostata su un massimo di assorbimento per aumentare la sensibilità nei confronti di una specifica molecola. Il rivelatore risponde in maniera lineare fino a 2 AU e oltre per molte applicazioni. Ciò offre un ampio intervallo di risposta lineare in funzione della concentrazione. Per l'analisi di campioni a concentrazione elevata, l'intervallo di risposta lineare può essere esteso impostando la lunghezza d'onda su un valore con assorbanza inferiore, come un minimo di lunghezza d'onda, o utilizzando una larghezza di banda più ampia, che in genere include valori di assorbanza più bassi. L'utilizzo di massimi e minimi di lunghezza d'onda per la quantificazione risale ai rivelatori UV convenzionali che, a causa delle tolleranze meccaniche nello spostamento dei reticoli, dovevano evitare le regioni dello spettro caratterizzate da pendenze ripide. I rivelatori a serie di diodi non sono interessati da questa limitazione, ma per convenzione i massimi e minimi vengono scelti di preferenza rispetto ad altre regioni dello spettro.

La larghezza di banda di riferimento in genere è impostata su una regione dello spettro UV in cui l'analita non presenta alcuna assorbanza. Questa impostazione è illustrata nello spettro dell'acido anisico in [Figura 23](#), pagina 66. Questo spettro è tipico di molte piccole molecole che contengono un cromoforo UV. Per ottenere i risultati migliori, il riferimento è stato impostato in modo da essere una banda larga il più vicina possibile alla lunghezza d'onda del segnale, ma in una regione ad assorbanza nulla. In genere si utilizzano larghezze di banda di riferimento comprese tra 60 nm e 100 nm. Il riferimento predefinito è 360 nm con una larghezza di banda pari a 100 nm. Si utilizza una larghezza di banda ampia per ridurre il rumore nel segnale di riferimento (secondo la teoria statistica l'errore, ossia in questo caso il rumore, si riduce in misura proporzionale alla radice quadrata del numero di determinazioni). È importante che la larghezza di banda di riferimento non si estenda a una parte dello spettro caratterizzata da assorbanza, poiché ciò ridurrebbe il segnale risultante così come la sensibilità. L'utilizzo di una lunghezza d'onda di riferimento può permettere di ridurre la deriva o variabilità nel cromatogramma associate alle variazioni dell'indice di rifrazione causate da fluttuazioni della temperatura ambiente o che si verificano durante il funzionamento in gradiente. L'effetto di un segnale di riferimento può essere valutato facilmente impostando due segnali altrimenti identici, uno con e uno senza un segnale di riferimento. Se nessuna regione dello spettro è caratterizzata da assorbanza nulla, è preferibile disattivare il segnale di riferimento.

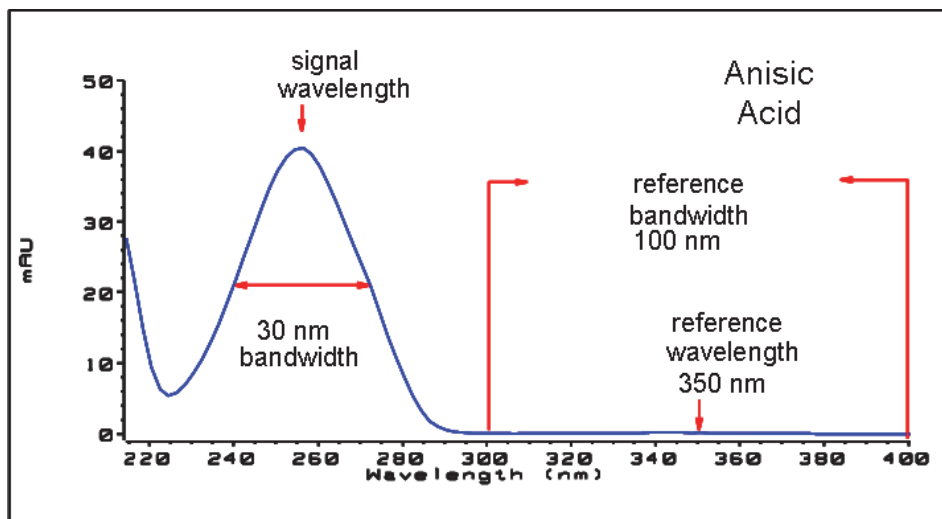


Figura 23 Spettro dell'acido anisico

Larghezza della fenditura (solo G4212A)

La trasmissione della luce nello spettrografo e la larghezza di banda ottica sono controllate dalla fenditura di ingresso ad apertura variabile. L'impostazione predefinita per la larghezza della fenditura è pari a 4 nm, un valore adeguato per la maggior parte delle applicazioni in quanto garantisce buone prestazioni generali. Le caratteristiche delle prestazioni interessate sono la sensibilità, la risoluzione spettrale e la linearità. Prendendo in considerazione una particolare lunghezza d'onda che entra nello spettrografo, la luce corrispondente colpisce in effetti una piccola fascia di diodi, la cui larghezza è proporzionale alla larghezza della fenditura di entrata. La descrizione della fenditura come avente una larghezza di 4 nm caratterizza questo comportamento: la luce incidente colpisce il numero di diodi che rilevano una larghezza di banda di 4 nm. Ne segue che la risoluzione ottica minima è pari a 4 nm e quindi la larghezza di banda della serie di diodi (o digitale) deve essere impostata su un valore pari o superiore a 4 nm. Per una sensibilità ottimale l'impostazione pari a 8 nm permette l'ingresso della maggior parte della luce e riduce al minimo il rumore, ma la risoluzione spettrale assume il valore minimo. Ciò di solito non costituisce un problema nel caso degli spettri UV, poiché le rispettive larghezze di banda naturali in genere sono maggiori di 25 nm senza alcuna struttura fine. La larghezza di banda ottica pari a 8 nm riduce l'intervallo di linearità rispetto a una fenditura di 4 nm e, pertanto, è importante che un metodo convalidato utilizzi sempre la larghezza di fenditura utilizzata per la

convalida. Per una risoluzione spettrale ottimale 1 nm è l'impostazione migliore. Ciò permette la risoluzione della struttura fine, per esempio nel caso dello spettro del benzene (vedere [Figura 24](#), pagina 67). Pochissimi sono i composti che presentano dettagli così fini negli spettri in soluzione. Il livello di luce sarà inferiore e quindi il segnale presenterà maggiore rumore; il livello di rumore dipende dalla lunghezza d'onda e dai solventi utilizzati nella fase mobile.

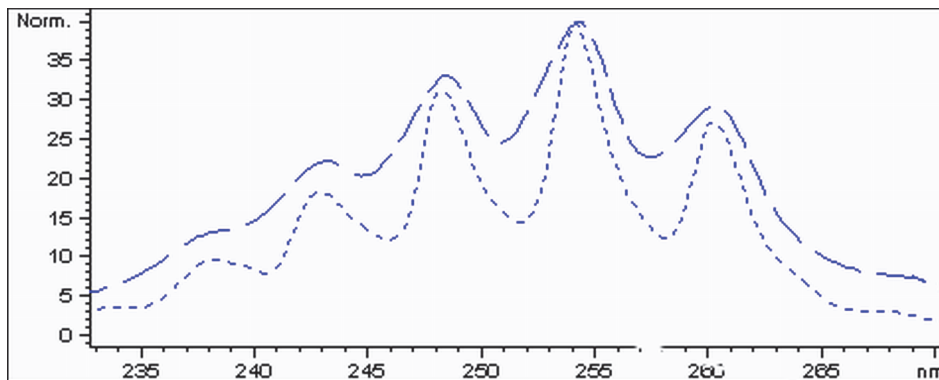


Figura 24 Benzene con ampiezza della fenditura di 1 e 4 nm (principio)

Il volume di iniezione e il solvente utilizzato per dissolvere il campione sono importanti nel controllo della dispersione. È necessario prestare attenzione a concentrare i composti in testa alla colonna per evitare la dispersione dei picchi causata dall'iniezione, che si traduce in una riduzione dell'altezza dei picchi. A tale scopo, è necessario dissolvere il campione in un solvente la cui composizione presenta una capacità di eluizione inferiore rispetto alla fase mobile. Una possibilità consiste nell'aumentare il volume di iniezione per incrementare la concentrazione dell'analita sulla colonna e quindi l'altezza del picco.

Fare riferimento ai commenti in [“Come ottenere volumi di iniezione maggiori”](#), pagina 53.

Ampiezza del picco, tempo di risposta e velocità di campionamento dati

L'impostazione dell'ampiezza del picco, il tempo di risposta e la velocità di campionamento nel rivelatore sono interconnessi. Le impostazioni disponibili sono riportate in . È importante impostarle correttamente per ottenere una sensibilità ottimale e mantenere la risoluzione ottenuta nella separazione.

Il rivelatore acquisisce internamente i punti dati più rapidamente di quanto sia necessario per un cromatogramma e li elabora per produrre il segnale visto dal sistema di elaborazione dei dati. Parte dell'elaborazione riduce i dati a una velocità di campionamento adeguata che permette di tracciare accuratamente i picchi cromatografici. Come accade con la maggior parte delle determinazioni analitiche, in effetti viene calcolata la media di gruppi di letture per ridurre l'errore nel risultato. Il rivelatore raggruppa i punti dati grezzi e produce i dati del segnale in uscita alla velocità di campionamento richiesta tramite un processo di filtraggio elettronico. Se la velocità di campionamento risultante è insufficiente (filtraggio eccessivo), le altezze dei picchi diminuiscono e si riduce anche la risoluzione tra i picchi; se è eccessiva, il rumore dei dati è superiore a quello necessario per ottenere profili accurati dei picchi stretti.

L'impostazione *ampiezza del picco* nel rivelatore permette all'utente di impostare correttamente questi parametri senza che sia necessaria alcuna conoscenza oltre alla visualizzazione dei risultati di integrazione del cromatogramma per determinare visivamente l'ampiezza dei picchi. L'impostazione dell'ampiezza del picco deve essere basata sull'ampiezza del picco più stretto osservato nel cromatogramma. Se si imposta un valore troppo ampio i picchi appaiono più bassi e più larghi (e potenzialmente meno risolti), mentre se si imposta un valore troppo stretto il rumore di fondo aumenta senza motivo. In pratica il software utilizza questo valore per impostare la *velocità di campionamento dati* in modo da raccogliere un numero sufficiente di punti dati sui picchi più stretti e 15-25 punti per picco. Il rivelatore DAD 1290 Infinity è in grado di campionare a una frequenza massima pari a 160 Hz, se necessario, il che consente l'acquisizione di un numero sufficiente di punti dati su un picco di larghezza pari a soli 0,1 s. L'impostazione del *tempo di risposta* è un altro modo per specificare come è impostato il filtraggio. È misurato in secondi ed è pari a circa un terzo del valore di ampiezza del picco (che è misurato in minuti). Indica in maniera efficace la velocità con cui il segnale tracciato risponde a un'improvvisa variazione nel segnale in ingresso.

Tabella 8 Ampiezza del picco - Tempo di risposta - Velocità di campionamento

Ampiezza del picco a metà altezza [min] ¹	Risposta [s]	Velocità di campionamento del segnale [Hz]
< 0,0015625	0,015625	160
> 0,0015625	0,03125	160
> 0,003125	0,0625	80
> 0,00625	0,125	40
> 0,0125	0,25	20
> 0,025	0,5	10
> 0,05	1,0	5
> 0,10	2,0	2,5
> 0,20	4,0	1,25
> 0,40	8,0	0,625
> 0,85	16,0	0,3125

¹ I valori nell'interfaccia utente potrebbero essere arrotondati.

Come ridurre al minimo l'effetto memoria

L'effetto memoria viene misurato quando i picchi residui provenienti da un'iniezione con contenuto attivo vengono rilevati in una successiva iniezione di solvente neutro (bianco). Tra le iniezioni attive verrà rilevato un effetto memoria che potrebbe portare a risultati errati. Il livello di tale effetto viene riportato come area del picco nella soluzione neutra espresso in percentuale dell'area nella precedente iniezione attiva. L'autocampionatore Agilent 1290 Infinity è ottimizzato per un effetto memoria ridotto grazie alla progettazione accurata del percorso del flusso e a un utilizzo dei materiali in cui l'assorbimento del campione viene ridotto. È possibile ottenere un effetto memoria di 0,002 % anche quando come rivelatore viene utilizzato uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo. Le impostazioni di funzionamento dell'autocampionatore consentono all'utente di configurare i parametri adatti per ridurre l'effetto memoria in tutte le applicazioni che presentano composti che potrebbero aderire al sistema.

È possibile utilizzare le seguenti funzioni dell'autocampionatore per ridurre l'effetto memoria:

- Lavaggio interno dell'ago
- Lavaggio esterno dell'ago
- Backflush della sede dell'ago
- Pulizia della valvola di iniezione

Il percorso del flusso, compreso l'interno dell'ago, viene lavato continuamente durante il normale funzionamento dello strumento, garantendo una buona eliminazione dell'effetto memoria nella maggior parte delle situazioni. La riduzione del volume di ritardo automatica (Automated delay volume reduction, ADVR) diminuirà il volume di ritardo, nonché il lavaggio dell'autocampionatore e non dovrebbe essere usato con gli analiti, in quanto l'effetto memoria potrebbe risultare un problema.

È possibile lavare l'esterno dell'ago tramite un vial di lavaggio in una posizione specifica o tramite la porta di lavaggio. Se viene scelto un vial di lavaggio all'interno di un vassoio specificato dall'utente, tale vial non dovrebbe essere dotato di setto e dovrebbe contenere un solvente adatto al lavaggio del campione dall'ago. Il setto non viene utilizzato per evitare di eliminare la contaminazione dall'ago a valle solo per riapplicarlo nella corsa ascendente. È

possibile immergere l'ago nel vial più volte. In questo modo verrà rimossa una piccola quantità di effetto memoria, ma per un lavaggio più efficace dell'esterno dell'ago è necessario utilizzare la porta di lavaggio.

La porta di lavaggio è posizionata sopra e dietro alla sede dell'ago e il solvente di lavaggio viene erogato dalla pompa peristaltica. Possiede un volume di 0,68 ml e la pompa peristaltica fornisce 6 ml/min, che indica che il volume della porta di lavaggio viene riempito completamente con solvente fresco in 7 s. Se è selezionata la porta di lavaggio, l'utente può impostare la durata di tempo di lavaggio dell'esterno dell'ago con solvente fresco. Può variare da due o tre secondi in situazioni normali in cui l'effetto memoria non è un problema a 10 - 20 s se si desidera un lavaggio più completo. È consigliato eseguire sempre il lavaggio dell'esterno dell'ago nella porta di lavaggio per evitare di contaminare la sede dell'ago. In tal caso, sarà necessario sottoporlo a backflush modificando manualmente i collegamenti di flusso per pulirlo. Questa è una delle operazioni che è possibile automatizzare tramite il modulo Flexible Cube.

È necessario lavare regolarmente la porta di lavaggio e i relativi tubi e pompa di erogazione del solvente per garantire un minore effetto memoria. Ad esempio, prima di utilizzare il sistema ogni giorno, adescare la pompa di lavaggio per tre minuti con il solvente adatto.

Se non è stato possibile in alcun modo eliminare l'effetto memoria, il problema può derivare dall'analita bloccato all'interno della valvola di iniezione. È possibile impostare la valvola di iniezione per eseguire movimenti aggiuntivi così da svuotare il percorso del flusso nella valvola se si riscontrano problemi con l'effetto memoria. Se i composti che causano problemi richiedono un'elevata percentuale di fase organica per l'eluizione, è consigliato passare la valvola di iniezione alla percentuale superiore di fase organica dopo aver eluito l'ultimo picco. È inoltre consigliato modificare nuovamente la valvola di iniezione dopo aver stabilizzato le condizioni iniziali per la fase mobile. In questo modo è garantito che la scanalatura di bypass nella guarnizione del rotore della valvola sia caratterizzata dalle condizioni di avvio del gradiente, fondamentale soprattutto per flussi inferiori a 0,5 ml/min.

Per i campioni per i quali l'esterno dell'ago non può essere pulito a sufficienza con acqua o alcol dalla pompa di lavaggio, utilizzare vial di lavaggio con un solvente adatto. Per la pulizia è possibile usare un programma dell'iniettore e più vial di lavaggio.

Come prevenire ostruzioni della colonna

Come per qualsiasi sistema HPLC, si deve prestare attenzione per evitare l'ostruzione completa o parziale della colonna o dei tubi del sistema in seguito a un uso inappropriato. I problemi causati dal materiale introdotto nel sistema in genere possono essere evitati eseguendo le seguenti azioni:

- filtrare i solventi
- filtrare i campioni
- sostituire regolarmente le fasi mobili
- far fluire dal sistema i sali della soluzione tampone

Una fonte inevitabile di particolati è il sistema stesso. Come per tutti i sistemi HPLC, dalle guarnizioni si distacca del materiale che verrà intrappolato dai frit nel sistema, determinando la necessità di sostituire periodicamente i frit. Anche le colonne impaccate con particelle inferiori a 2 micron necessitano di frit con pori di piccole dimensioni per impedire che il materiale di impaccamento venga trascinato via. Ciò comporta un immediato aumento del rischio di ostruzione di questi frit con particolati provenienti dal campione, dalla fase mobile e dallo strumento stesso.

Per ottenere i migliori risultati, applicare le seguenti semplici linee guida per l'uso.

- 1** Installare e far funzionare la colonna solo nella direzione di flusso indicata sulla colonna stessa.
- 2** Usare solo solventi di alta qualità, grado cromatografico.
- 3** Prima dell'uso, filtrare tutte le soluzioni tampone acquose e tutti i campioni attraverso un appropriato filtro da 0,2 µm.
- 4** Le bottiglie della soluzione tampone della fase mobile vanno sostituite ogni giorno o a giorni alterni. Non aggiungere fase mobile alla bottiglia; usare sempre una bottiglia nuova.
- 5** Non utilizzare una fase mobile a base di soluzione tampone altamente salina (>50 mM) insieme a concentrazioni elevate di acetonitrile perché potrebbe formarsi del precipitato.
- 6** Con fasi mobili a base di soluzioni tampone altamente concentrate utilizzare l'opzione di lavaggio delle tenute.

- 7** Si raccomanda l'uso di un filtro in linea (filtro in linea 1290 Infinity, diametro 2 mm, codice: 5067-4638) per intrappolare i particolari e prolungare la durata della colonna.
- 8** Cambiare il filtro quando la pressione aumenta del 10 %.
- 9** Spurgare le pompe (i collegamenti fino alla colonna) da tutte le fasi mobili a base di soluzioni tampone e farvi fluire 5 ml di solvente prima di collegare la colonna allo strumento.
- 10** Risciacquare la colonna con una fase mobile compatibile, iniziando lentamente a 0,1 ml/min per una colonna con diametro interno di 2,1 mm, a 0,2 ml/min per una colonna con diametro interno di 3,0 mm e a 0,4 ml/min per una colonna con diametro interno di 4,6 mm. Aumentare il flusso fino alla velocità desiderata nell'arco di 5 minuti.
- 11** Quando la pressione si è stabilizzata, collegare la colonna al rivelatore.
- 12** Prima dell'uso, equilibrare la colonna e il rivelatore con 10 volumi di colonna della fase mobile (vedere la [Tabella 7](#), pagina 46 per i volumi di colonna).
- 13** Evitare una pressione eccessiva. Prima di eseguire qualunque sequenza, controllare l'intervallo di pressione del proprio gradiente.
- 14** Se i campioni sono dissolti in un solvente altamente organico, valutare l'utilizzo di un programma di iniezione per aggiungere un plug di solvente più debole prima e dopo l'aliquota del campione, per ridurre il rischio di precipitazione nella fase mobile a base di soluzione tampone altamente concentrata.

3 Ottimizzazione del sistema LC Agilent 1290 Infinity Come prevenire ostruzioni della colonna



4 Configurazione e installazione del sistema

Installazione del software 76

Installazione del modulo 78

Ottimizzazione della configurazione dello stack (sistema LC
binario) 78

Ottimizzazione della configurazione dello stack (sistema LC
quaternario) 83

Adescamento della pompa 88

Spurgo della pompa 90

Collegamenti di flusso tra i moduli 93

Integrazione in rete 93

Il presente capitolo riporta informazioni su installazione del software, configurazioni dello stack e preparazione del sistema per l'utilizzo.



Installazione del software

Installazione del software di controllo e del sistema di dati

Per dettagli sulle procedure di installazione del software, fare riferimento al *Manuale del Rivelatore a serie di diodi 1290 Infinity* e ai manuali del software.

Installazione del software Agilent Lab Advisor

Per dettagli sulle procedure di installazione del software Agilent Lab Advisor, fare riferimento alla documentazione relativa al software sul DVD Lab Advisor.

Agilent Lab Advisor sostituisce e amplia le funzioni diagnostiche caratteristiche esclusive del precedente software ChemStation.

Agilent Lab Advisor è un'applicazione basata su Windows® che monitora gli strumenti del laboratorio in tempo reale e senza interruzioni e aumenta la produttività attraverso la notifica automatica delle necessità di manutenzione e di servizio mediante l'uso di contatori avanzati. Questo permette di risolvere un problema prima che esso possa avere effetto sui risultati. Il software include una suite estesa di informazioni e documentazione per l'utente, un set di calcolatori e di strumenti che facilitano la configurazione, la calibrazione e il mantenimento dello strumento, e test e operazioni diagnostiche periodici per verificare la correttezza delle prestazioni. Agilent Lab Advisor fornisce anche avvisi e soluzioni per tutti gli errori strumentali che potrebbero insorgere. Il software funziona con o senza i sistemi di dati Agilent.

Il software monitora:

- lo stato del modulo LC
- gli avvisi di manutenzione preventiva (per verificare la necessità di aggiornamento o sostituzione)

Inoltre, il software:

- rende automatici test utili

- tenta di identificare strumenti a interfaccia LAN attivati da o collegati al proprio PC o rete di laboratorio
- suggerisce automaticamente le parti da sostituire e le attività per la risoluzione dei problemi più frequenti dello strumento.

Installazione del modulo

Per dettagli sulle procedure di installazione per i moduli, fare riferimento ai manuali dei singoli moduli. Questi manuali contengono anche informazioni su specifiche, manutenzioni e parti.

Ottimizzazione della configurazione dello stack (sistema LC binario)

Configurazione in stack unico

Per garantire prestazioni ottimali, installare i moduli del sistema binario LC Agilent 1290 Infinity nella seguente configurazione (vedere [Figura 25](#), pagina 79 e [Figura 26](#), pagina 80). Questa configurazione ottimizza il percorso del flusso nel sistema, assicurando il minimo volume di ritardo e riducendo lo spazio necessario sul banco.

La pompa binaria Agilent 1290 Infinity dovrebbe essere installata sempre in fondo allo stack.

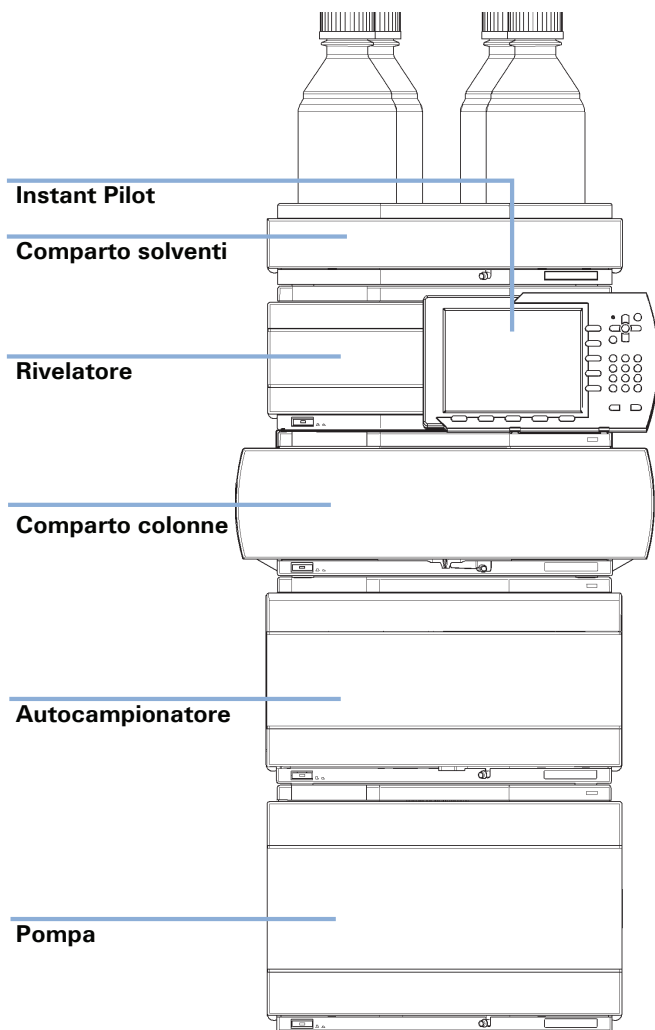


Figura 25 Configurazione dello stack consigliata per 1290 Infinity con pompa binaria (vista anteriore)

4 Configurazione e installazione del sistema

Installazione del modulo

LAN a ChemStation LC

Cavo del bus CAN
per Instant Pilot)

Segnale analogico
rivelatore (opzionale)

Cavo del bus CAN

Alimentazione CA

Figura 26 Configurazione dello stack consigliata per 1290 Infinity con pompa binaria (vista posteriore)

Configurazione in due stack

Se si aggiunge al sistema il termostato dell'autocampionatore, si consiglia di impiegare una configurazione in due stack; in questa configurazione entrambi i moduli pesanti (la pompa 1290 Infinity e il termostato) vengono collocati in fondo al rispettivo stack e si evita di utilizzare un solo stack di altezza elevata. Alcuni utenti preferiscono questa disposizione con altezza inferiore anche senza il termostato dell'autocampionatore. Tra la pompa e l'autocampionatore è richiesto un capillare leggermente più lungo. Vedere [Figura 27](#), pagina 81 e [Figura 28](#), pagina 82.

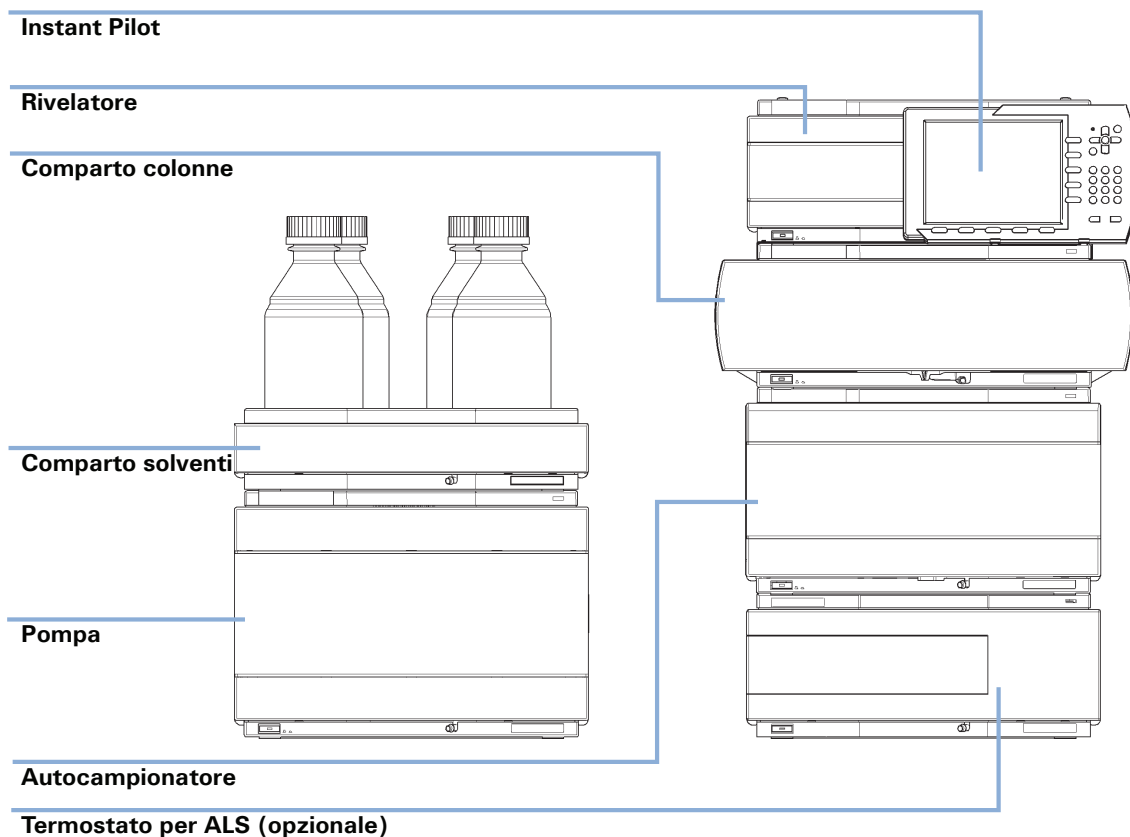


Figura 27 Configurazione in due stack consigliata per 1290 Infinity con pompa binaria (vista anteriore)

4 Configurazione e installazione del sistema

Installazione del modulo

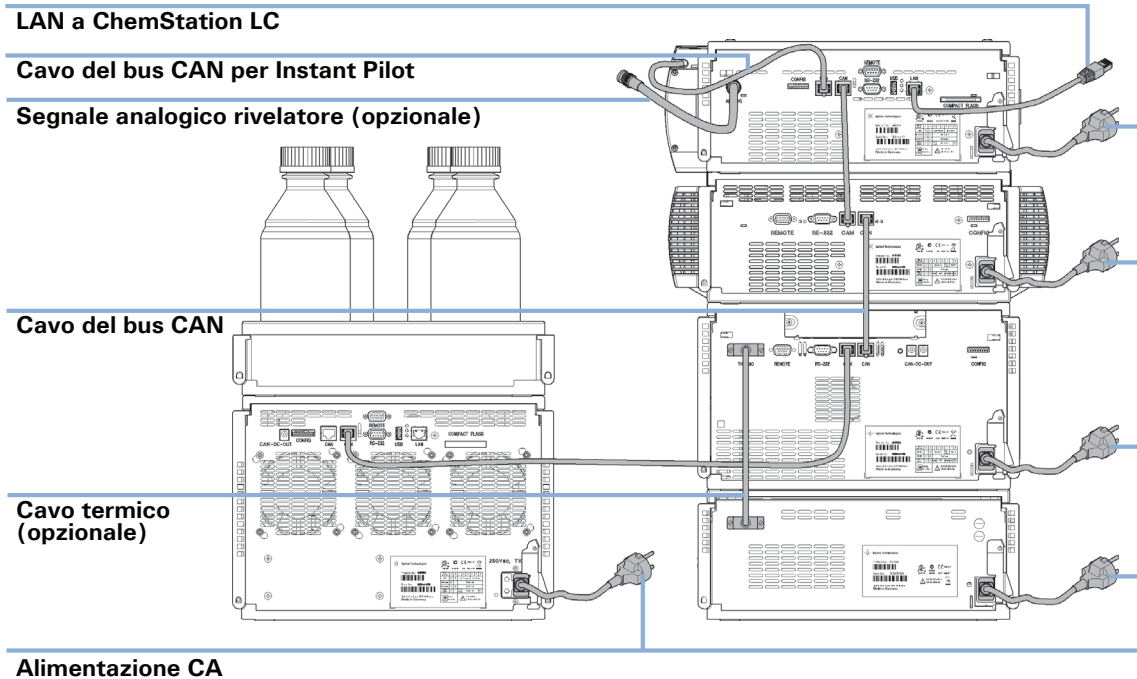


Figura 28 Configurazione in due stack consigliata per 1290 Infinity con pompa binaria (vista posteriore)

Ottimizzazione della configurazione dello stack (sistema LC quaternario)

Configurazione uno stack

Per ottenere prestazioni ottimali, installare i moduli del sistema LC quaternario Agilent 1290 Infinity nella configurazione descritta di seguito (vedere la [Figura 29](#), pagina 84 e la [Figura 30](#), pagina 85). Questa configurazione ottimizza il circuito idraulico, assicurando un volume di ritardo minimo e riducendo lo spazio necessario sul banco.

La pompa quaternaria Agilent 1290 Infinity deve essere installata sempre in fondo allo stack.

4 Configurazione e installazione del sistema

Installazione del modulo

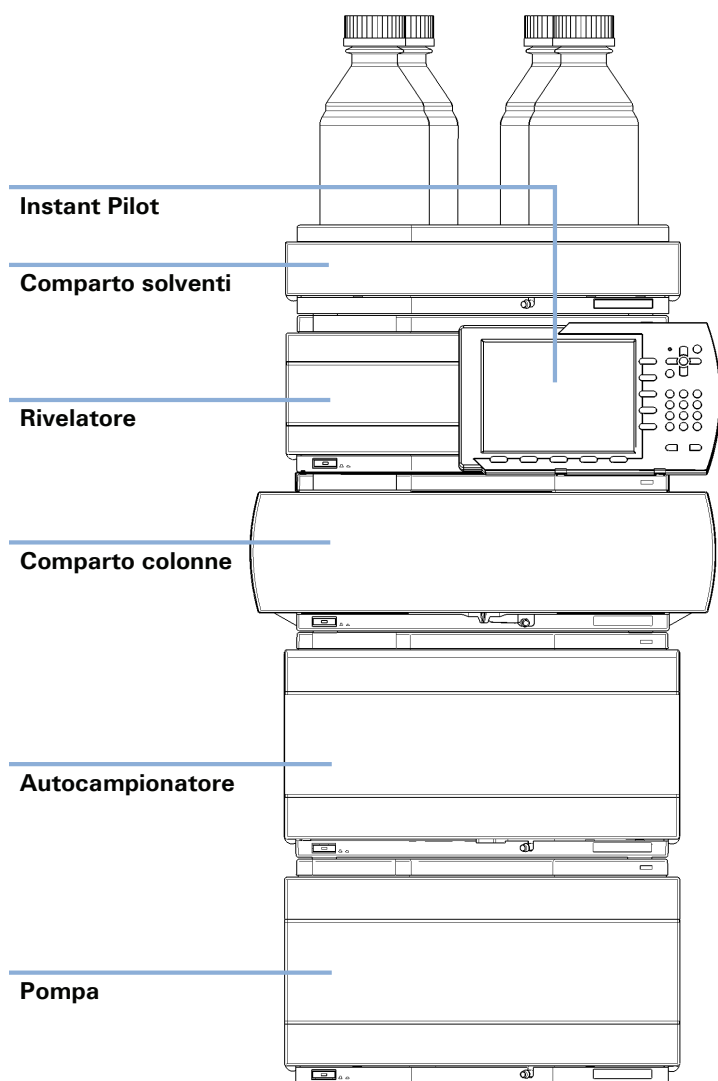


Figura 29 Configurazione dello stack consigliata per 1290 Infinity con pompa quaternaria (vista anteriore)

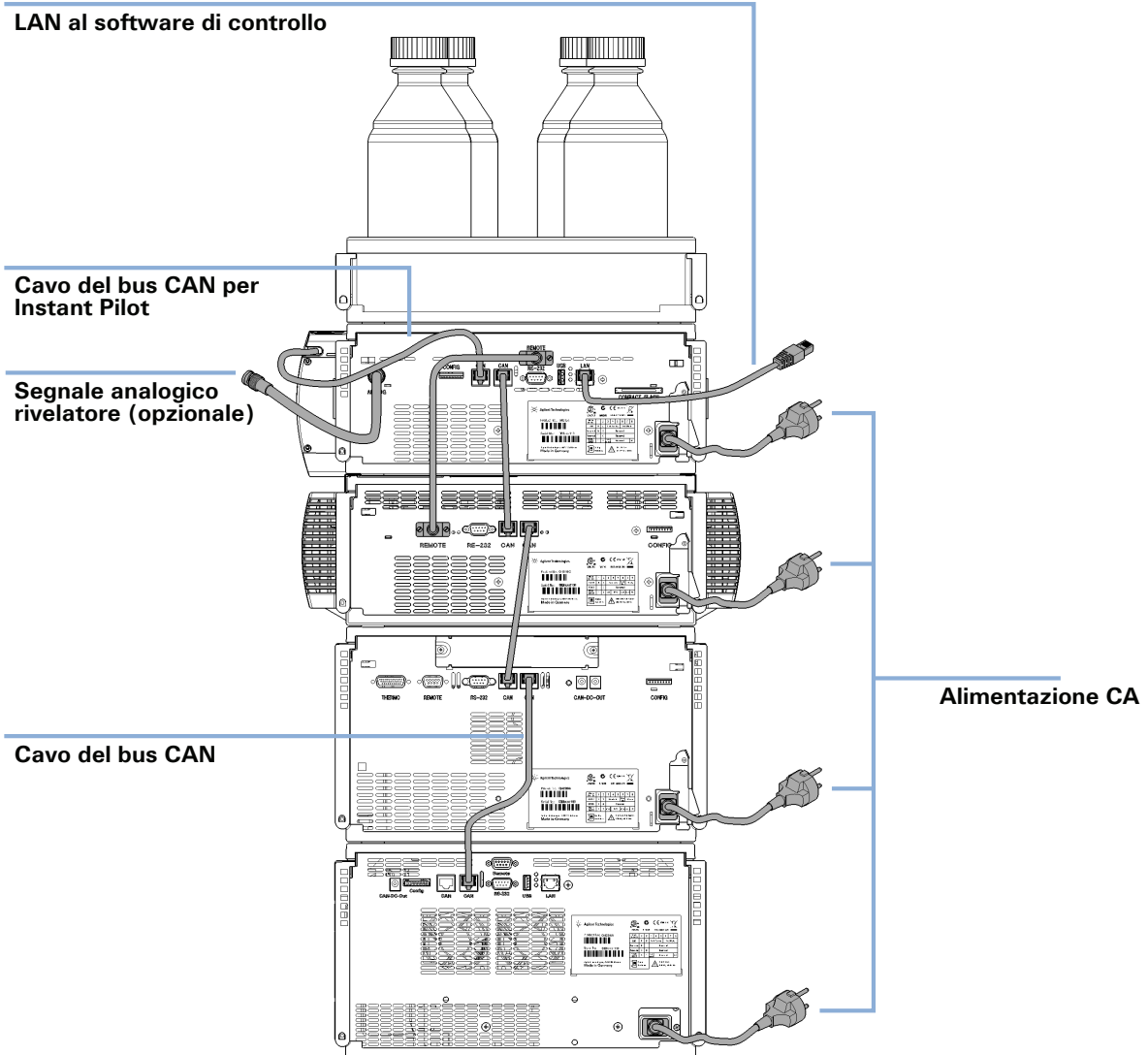


Figura 30 Configurazione dello stack consigliata per 1290 Infinity con pompa quaternaria (vista posteriore)

Configurazione due stack

Se si aggiunge al sistema il termostato dell'autocampionatore, si consiglia di impiegare una configurazione in due stack; in questa configurazione entrambi i moduli pesanti (la pompa 1290 Infinity e il termostato) vengono collocati in fondo al rispettivo stack e si evita di utilizzare un solo stack di altezza elevata. Alcuni utenti preferiscono questa disposizione con altezza inferiore anche in assenza del termostato dell'autocampionatore. Tra la pompa e l'autocampionatore è necessario un capillare di lunghezza leggermente superiore. Vedere [Figura 31](#), pagina 86 e [Figura 32](#), pagina 87.

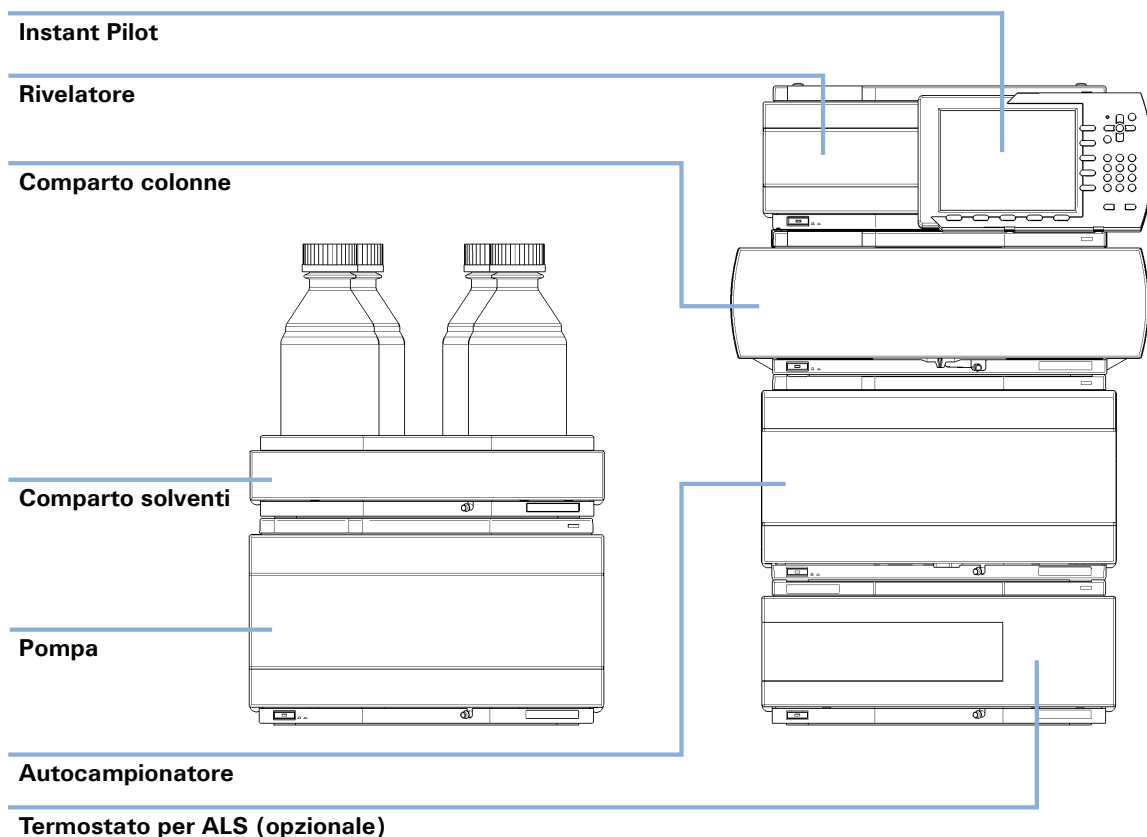


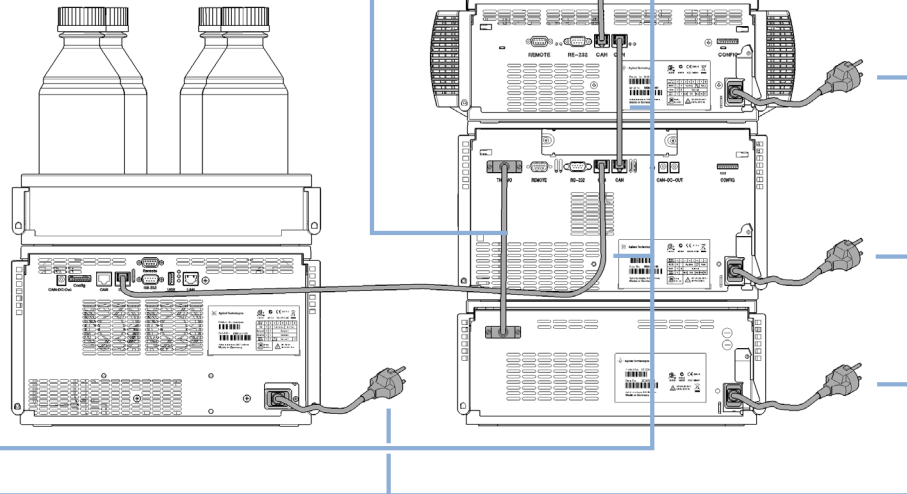
Figura 31 Configurazione in due stack consigliata per 1290 Infinity con pompa quaternaria (vista anteriore)

LAN al software di controllo

Cavo del bus CAN per Instant Pilot

Segnale analogico rivelatore (opzionale)

Cavo termostato
(opzionale)



Cavo del bus CAN

Alimentazione CA

Figura 32 Configurazione in due stack consigliata per 1290 Infinity con pompa quaternaria (vista posteriore)

Adescamento della pompa

La procedura è richiesta quando...

- la pompa viene utilizzata per la prima volta
- uno o più tubi di ingresso contengono vuoti d'aria o sono a secco per altri motivi

Lo scopo dell'adescamento è di rimuovere le bolle d'aria dalla pompa e dai suoi tubi di ingresso.

Propan-2-olo (nomi alternativi: isopropanolo, isopropil alcool, IPA) è il miglior solvente per l'adescamento della pompa quando questa è a secco; presenta il vantaggio di essere miscibile con la maggioranza dei solventi di fase normale o inversa (se necessario, controllare una tavola di miscibilità dei solventi).

ATTENZIONE

Solventi, campioni e reagenti tossici, infiammabili e pericolosi

La manipolazione di solventi, campioni e reagenti può condurre a rischi per la salute e la sicurezza.

- Durante l'uso di queste sostanze attenersi alle procedure di sicurezza adeguate (ad esempio, indossare occhiali, guanti e indumenti protettivi) come descritto nella scheda sull'uso e sulla sicurezza dei materiali fornita dal produttore e attenersi sempre alla buona pratica di laboratorio.
- Il volume delle sostanze deve essere ridotto al minimo necessario per condurre l'analisi.
- Non usare lo strumento in ambienti in cui siano presenti gas esplosivi.

NOTA

Evita di portare a esaurimento i serbatoi dei solventi grazie alla funzione di controllo del Riempimento bottiglie. Utilizzare una siringa per riempire i tubi del solvente, la pompa non pomperà aria.

NOTA

Prima di iniziare la procedura, verificare che tutte le linee dei solventi siano collegate alla pompa secondo le indicazioni del manuale di installazione della pompa e che i tubi di scarico siano correttamente posizionati su un contenitore per i solventi esausti adatto. Accertarsi che la pompa sia controllata dal software del computer o dal sistema di controllo Instant Pilot e che la velocità di flusso sia impostata su zero.

- 1 Preparare il canale A e la testa della pompa A per l'adescamento.
 - a Riempire parte del serbatoio di ciascun solvente con ca. 150 ml di propan-2-olo di grado HPLC per l'adescamento della pompa e posizionare nei serbatoi le estremità dei tubi dei solventi dotate di filtro di vetro sterilizzato.
 - b Scollegare il tubo che entra nella valvola di controllo di ingresso della testa della pompa A. Questo è il tubo di uscita proveniente dal canale A del degassatore sotto vuoto.
 - c Inserire nel tubo la siringa di adescamento con adattatore filettato.
 - d Aspirare lentamente il solvente nel tubo fino alla rimozione di tutte le bolle.
 - e Rimuovere rapidamente la siringa e l'adattatore dal tubo e attaccare quest'ultimo alla valvola di controllo in ingresso sulla testa della pompa A.
- 2 Ripetere i passaggi precedenti per il canale del solvente B e la testa della pompa B.
- 3 Se nella pompa è installata una valvola di selezione del solvente (SSV), eseguire ciascuno dei passaggi seguenti per ogni tubo vuoto di solvente rimasto.
 - a Scollegare il tubo vuoto a livello della valvola di selezione del solvente. Inserire nel tubo la siringa di adescamento con adattatore filettato.
 - b Aspirare lentamente il solvente nel tubo fino alla rimozione di tutte le bolle.
 - c Rimuovere rapidamente la siringa e l'adattatore dal tubo e riattaccare quest'ultimo alla valvola di selezione del solvente.
- 4 Nel software ChemStation, fare clic con il pulsante destro del mouse sulla sezione della pompa nel diagramma del sistema e quindi selezionare **Prime On** dal menu contestuale (attenzione a non fare confusione con il comando **Purge On**). Altri sistemi di controllo hanno una funzione simile.

La valvola di spurgo ora commuta i percorsi idraulici A e B sulla posizione di scarico e in contemporanea adescherà entrambi i canali. Il modulo aspira il solvente, ad alta velocità e simultaneamente con tutti i sistemi di azionamento della pompa, e lo eroga alla posizione di scarico della valvola di spurgo automatica. L'operazione viene ripetuta 20 volte prima di concludere il processo di adescamento. La valvola di spurgo ricommuta il percorso idraulico sul sistema.

A questo punto, si raccomanda di spurgare ogni canale con 30 ml di propan-2-olo. Seguire la procedura “[Spurgo della pompa](#)”, pagina 90.

Spurgo della pompa

Si descrive la procedura di spurgo per la pompa binaria 1290 Infinity. La stessa procedura può essere eseguita per la pompa quaternaria 1290 Infinity.

- Dopo aver eseguito per la prima volta l'adescamento della pompa.
- Quando la pompa deve essere spurgata con solvente fresco prima di usare il sistema o quando si deve cambiare tipo di solvente.
- Se la pompa è rimasta inattiva per poche ore o più (può essersi diffusa aria nelle linee dei solventi e si raccomanda lo spurgo).
- Se i serbatoi dei solventi sono stati riempiti e la pompa deve essere spurgata per riempire il sistema con solvente fresco. Se si devono usare solventi diversi, accertarsi che il nuovo solvente sia miscibile con il solvente precedente; se necessario inserire un passaggio intermedio con un solvente co-miscibile (l'isopropanolo è spesso una buona scelta, controllare su una tavola di miscibilità dei solventi).

I tubi di ingresso alla pompa devono essere già riempiti di solvente. Se i tubi di ingresso sono parzialmente o completamente a secco, seguire la procedura di adescamento completa (vedere [“Adescamento della pompa”](#), pagina 88).

La valvola di spurgo consente di collegare contemporaneamente entrambe le teste delle pompe allo scarico e di spurgare alla loro velocità massima di flusso di 5 ml/min, raggiungendo un flusso di spurgo totale di 10 ml/min con composizione 50/50.

ATTENZIONE

Solventi, campioni e reagenti tossici, infiammabili e pericolosi

La manipolazione di solventi, campioni e reagenti può condurre a rischi per la salute e la sicurezza.

- Durante l'uso di queste sostanze attenersi alle procedure di sicurezza adeguate (ad esempio, indossare occhiali, guanti e indumenti protettivi) come descritto nella scheda sull'uso e sulla sicurezza dei materiali fornita dal produttore e attenersi sempre alla buona pratica di laboratorio.
- Il volume delle sostanze deve essere ridotto al minimo necessario per condurre l'analisi.
- Non usare lo strumento in ambienti in cui siano presenti gas esplosivi.

- 1 Per accedere alla pagina delle impostazioni di controllo della valvola di spurgo, fare clic con il pulsante destro del mouse sulla sezione della pompa e selezionare **Control** dal menu contestuale.

In alternativa, è possibile selezionare **Strumento > Altro-PompaBin-1290 Infinity > Controllo**.

- 2 Nella sezione **Purge**, impostare i seguenti parametri:

- **Duration:** 6 min
- **Flow:** 10 ml/min
- **Composition B:** 50 %

Si assume automaticamente che la **Composition A** sarà pari al 50 %. Lasciare il pulsante Acceso/Spento in posizione **Off**. Fare clic su **OK** per uscire.

4 Configurazione e installazione del sistema

Installazione del modulo

- 3 Fare clic con il pulsante destro del mouse sulla sezione della pompa e selezionare **Purge On** dal menu contestuale.

NOTA

Non confondere **Purge On** con la voce successiva **Prime On**.

La valvola di spurgo ora commuta il percorso idraulico sulla posizione di spurgo e in contemporanea spurgherà entrambi i canali nello scarico a 5 ml/min ognuno per una durata di 6 minuti. Al termine del periodo previsto, il flusso di spurgo viene spento, la valvola ricommuta il percorso idraulico sul sistema e quindi vengono ripristinate la velocità di flusso e la composizione attualmente impostati nel metodo. In questo esempio, il flusso del metodo è ancora impostato su zero. Le impostazioni per lo spurgo nella pagina di **Control** dai passaggi 1 e 2 rimangono configurate, quindi quando è nuovamente necessario il processo di spurgo, si può riprendere dal passaggio 3.

Quando la pompa è stata inizialmente adescata e spurgata con propan-2-olo, si possono cambiare i solventi con quelli della fase mobile come acqua e metanolo. La procedura di spurgo va ripetuta ogni qualvolta si cambi il solvente. Subito dopo lo spurgo, il solvente nella pompa non è stato degassato e quindi si deve far funzionare il sistema per almeno 10 min in modo da degassare il solvente.

Collegamenti di flusso tra i moduli

Quando si collegano i moduli, lavare sempre con solvente tutti i capillari e la colonna prima di eseguire il collegamento con il componente successivo del percorso idraulico.

- 1** Collegare l'uscita di miscelatore Jet Weaver all'autocampionatore usando un capillare flessibile di acciaio inossidabile d.i. 0,12 mm (il codice colore dell'etichetta è rosso). Questo va collegato alla porta 1 sulla valvola di iniezione dell'autocampionatore.
- 2** Collegare un capillare flessibile di acciaio inossidabile d.i. 0,12 mm dalla porta 6 sulla valvola di iniezione dell'autocampionatore al comparto colonna termostato. Collegare il capillare direttamente allo scambiatore di calore a bassa dispersione per il volume di ritardo minimo e alla valvola di commutazione se installata.
- 3** Collegare l'uscita della colonna all'ingresso (indicato con la dicitura CELL-IN, collegamento sul lato sinistro) della cella a cartuccia Max-Light nel rivelatore 1290 Infinity.
- 4** Collegare il tubo di scarico all'uscita (indicata con la dicitura CELL-OUT, collegamento sul lato destro) della cella a cartuccia Max-Light nel rivelatore 1290 Infinity e posizionare l'uscita in un contenitore adatto alla raccolta degli scarichi.

Integrazione in rete

Per l'integrazione in rete del proprio sistema fare riferimento ai manuali per l'utente dei rispettivi moduli (capitolo *Configurazione LAN*).

4 Configurazione e installazione del sistema

Installazione del modulo



5 Guida introduttiva

Informazioni sulla guida introduttiva	96
Preparazione del sistema	97
Accensione del sistema (ON)	97
Caricamento del metodo predefinito	98
Configurazione del diagramma in linea	100
Spurgo della pompa	102
Acquisizione dei dati nella schermata Metodo e controllo analisi	103
Parametri del metodo per la miscela campione e la colonna ZORBAX RRHD	103
Impostazione del metodo	105
Esecuzione del metodo per una singola iniezione	107
Esecuzione più rapida del metodo	108
Analisi dei dati	110
Schermata dell'Analisi dati	111
Integrazione di un segnale	112
Specificare il rapporto	114

Nel presente capitolo vengono fornite informazioni sull'acquisizione e sull'analisi dei dati con il sistema LC Agilent 1290 Infinity.



Informazioni sulla guida introduttiva

Nel presente capitolo sono fornite informazioni sul funzionamento del sistema LC Agilent 1290 Infinity. La guida può essere utilizzata per eseguire rapidamente una prima analisi dopo l'installazione, funzionando sia da esempio per un'esercitazione sia da controllo del funzionamento globale del sistema. Include anche informazioni più dettagliate sui parametri del metodo.

Questo esempio illustra la configurazione e l'esecuzione di un'analisi utilizzando la colonna e la miscela campione da analizzare forniti insieme al sistema LC Agilent 1290 Infinity. L'esempio fa riferimento ai menu e ai comandi di OpenLAB CDS edizione ChemStation, ma funzioni identiche sono disponibili anche su opzioni di controllo alternative, inclusi OpenLAB CDS edizione EZChrom, sistema di controllo Instant Pilot e software MassHunter.

NOTA

Il punto di partenza assume che il sistema sia stato installato, acceso e sia stato eseguito il primo adescamento (vedere [“Adescamento della pompa”](#), pagina 88). La lampada UV deve essere accesa almeno 30 minuti prima di eseguire qualsiasi lavoro quantitativo.

Preparazione del sistema

Accensione del sistema (ON)

Se il sistema non è completamente acceso con il software indicante lo stato Pronto, eseguire i seguenti passaggi.

- 1 Accendere il computer del sistema e attendere la comparsa del desktop di Windows.
- 2 Attivare l'alimentazione elettrica dei moduli LC premendo il pulsante sul lato inferiore sinistro di tutti i moduli.

Al centro del pulsante sarà visibile la luce verde di accensione.

- 3 Aprire il software di controllo sul computer facendo clic sull'icona (se configurato). In alternativa, è possibile selezionare **Start > Tutti i programmi > Agilent Technologies > OpenLAB > Pannello di controllo OpenLAB**. Selezionare lo strumento di interesse nel pannello di navigazione alla voce **Instrumentse** fare clic su **Launch online**.

Il software ChemStation si apre con la schermata **Method and Run Control**. Inizialmente i moduli sono in modalità di pausa (In attesa) e nello stato Non pronto, ad eccezione dell'autocampionatore che viene inizializzato immediatamente e commutato nello stato Pronto.

- 4 Per accendere ogni modulo singolarmente, fare clic con il pulsante destro del mouse sulla rispettiva icona e selezionare **Switch [module name] on** dal menu contestuale.

In alternativa, si possono accendere tutti i moduli del sistema simultaneamente facendo clic sul pulsante **System On/Off** situato in basso a destra del diagramma del sistema. Lo stato del sistema cambia da *Non pronto* (indicazione gialla) a *Pronto* (indicazione verde) dopo un breve ritardo in attesa di ottenere i valori di regolazione.

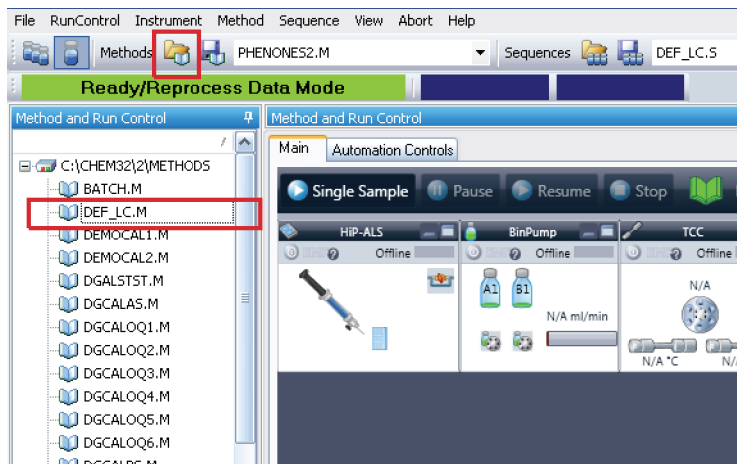
Caricamento del metodo predefinito

Il software ChemStation comprende un metodo predefinito chiamato **DEF_LC.M**, che viene caricato alla prima esecuzione oppure ogni volta che è richiesto un nuovo modello vuoto per definire il metodo. Contiene impostazioni predefinite per tutti i moduli.

Con questa procedura, viene caricato il metodo **DEF_LC.M**. Può essere usato per configurare tutti i parametri in base a impostazioni predefinite, o per ottenere un modello vuoto prima di configurare un nuovo metodo.

- 1 Portarsi sulla schermata di ChemStation **Method and Run Control**.
- 2 Sulla barra del menu, selezionare **Metodo > Nuovo metodo...** quindi selezionare **DEF_LC.M** dal menu contestuale.

In alternativa è possibile usare l'icona **Load Method**  nella barra del menu o fare doppio clic sul nome del metodo **DEF_LC.M** nella scheda **Metodi** del pannello di navigazione.



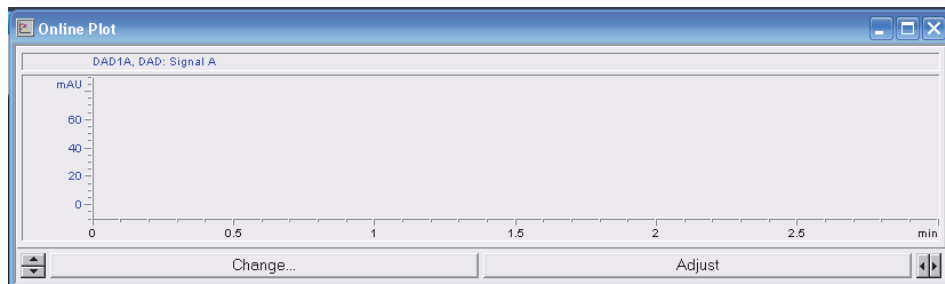
Il metodo predefinito (**DEF_LC.M**) è caratterizzato da una serie di parametri predefiniti che possono essere modificati successivamente per creare un nuovo metodo. Ad esempio, la velocità di flusso è impostata su zero e **Method Information** e **Method History** sono vuoti.

NOTA

Si noti che questo metodo non può mai essere sovrascritto con nuovi parametri. Quindi, facendo clic su **Save** si verrà reindirizzati alla funzione **Save As...**, dove è necessario inserire un nome diverso per il metodo.

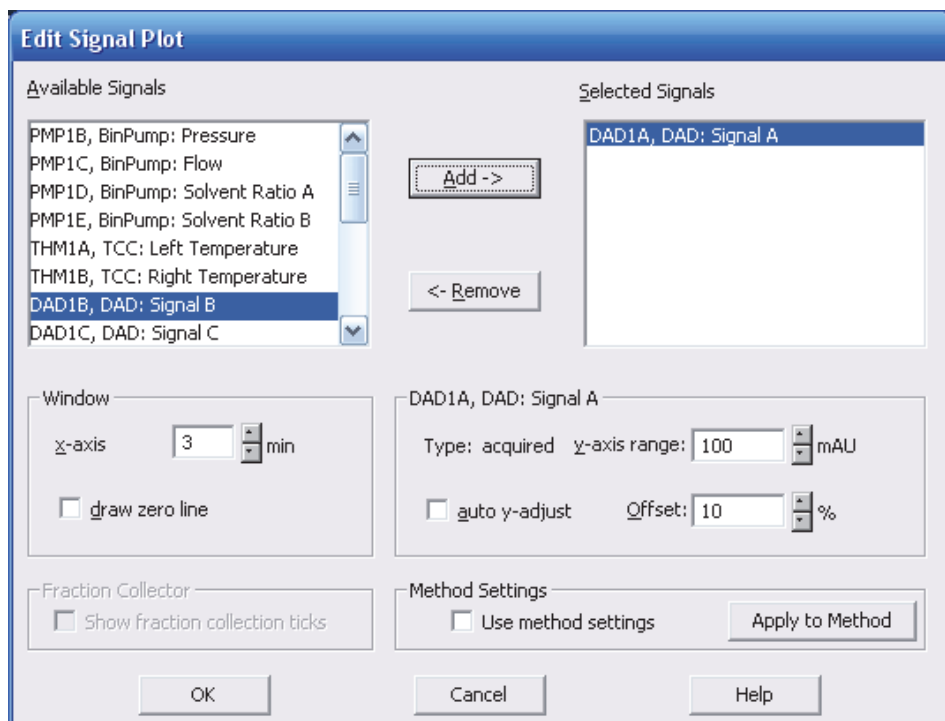
Configurazione del diagramma in linea

- 1 Se la finestra **Online Plot** non è visibile: fase clic su **Visualizza > Segnali in linea > Finestra del segnale 1** per visualizzarla.



- 2 Per configurare uno o più dei segnali desiderati nella finestra **Online Plot**, fare clic su **Change....**

Si apre la pagina di impostazione **Edit Signal Plot**.



- 3 Nella finestra di dialogo **Available Signals**, evidenziare i segnali richiesti e fare clic su **Add** per spostarli nella finestra di dialogo **Selected Signals**.
- 4 Per configurare le singole impostazioni di ciascun segnale, evidenziare il segnale nella finestra di dialogo **Selected Signal** e impostare i valori richiesti nella metà inferiore della pagina.

NOTA

Oltre ai segnali del rivelatore, nel diagramma si possono ottenere anche le tracce di altri parametri, come temperatura e pressione. Selezionando **Apply to Method**, le impostazioni di questa pagina possono essere archiviate nel metodo.

La finestra **Online Plot** si comporta come la carta di registrazione dei tracciati, in quanto registra in modo continuo i dati in uscita dal/i rivelatore/i e altri parametri in uscita. I segnali iniziano a essere disegnati alla destra della finestra e si spostano verso sinistra. Sono accessibili dati risalenti fino ai 90 min precedenti. Ciò risulta utile per controllare la linea di base e per consultare le iniezioni precedenti. Le scale degli assi X e Y possono essere regolate con i pulsanti su/giù situati su ogni asse.

Il pulsante **Adjust** nella finestra **Online Plot** sposta il punto attualmente presente sul segnale selezionato facendolo coincidere con lo zero. Il segnale selezionato è indicato dal colore dei contrassegni dell'asse Y. Un particolare segnale può essere selezionato facendo clic sul segnale o sulla relativa descrizione nella parte alta del diagramma.

Il pulsante **Balance** quando premuto azzerà tutti i rivelatori.

NOTA

I cambiamenti introdotti nella pagina **Online Plot** non hanno alcun effetto sui dati archiviati nei singoli file dei dati.

Spurgo della pompa

Effettuare un ciclo di spurgo della pompa se:

- è stato eseguito per la prima volta l'adescamento della pompa;
- la pompa deve essere spurgata con solvente fresco prima di usare il sistema o quando si deve cambiare tipo di solvente;
- la pompa è rimasta inattiva per poche ore o più (può essersi diffusa aria nelle linee dei solventi e si raccomanda lo spurgo);
- i serbatoi dei solventi sono stati riempiti e la pompa deve essere spurgata per riempire il sistema con solvente fresco; si devono usare solventi diversi, accertandosi che il nuovo solvente sia miscibile con il solvente precedente; se necessario inserire un passaggio intermedio con un solvente co-miscibile (l'isopropanolo è spesso una buona scelta, controllare su una tavola di miscibilità dei solventi);

Per informazioni sulla procedura di spurgo, fare riferimento a “[Spurgo della pompa](#)”, pagina 90.

Acquisizione dei dati nella schermata Metodo e controllo analisi

Tutte le procedure e le impostazioni del metodo descritte qui di seguito si riferiscono alla pompa binaria 1290 Infinity. Le stesse sono applicabili alla pompa quaternaria 1290 Infinity.

Parametri del metodo per la miscela campione e la colonna ZORBAX RRHD

Il sistema LC 1290 Infinity viene fornito con una colonna ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18 1,8 μm , 2,1 mm x 50 mm e una miscela campione contenente fenoni che verranno utilizzate per eseguire la presente procedura esemplificativa.

La miscela campione con fenoni (codice 5188-6529) contiene nove componenti, da 100 ng/ μl ciascuno, dissolti in acqua / acetonitrile (65/35). I nove componenti sono:

- Acetanilide
- Acetofenone
- Propiofenone
- Butirrofenone
- Benzofenone
- Valerofenone
- Esanofenone
- Eptanofenone
- Ottanofenone

I parametri del metodo per la separazione di questa miscela campione sono riassunti nella [Tabella 9](#), pagina 104.

Tabella 9 Parametri del metodo per la prima analisi di separazione

Modulo	Parametro	Impostazioni
Pompa	Solvente A	Acqua
	Solvente B	Acetonitrile
	Velocità di flusso	0,4 ml/min
	Composizione iniziale	60 % A, 40 % B
	Tabella di programmazione del gradiente	A 4 minuti 20 % A, 80 % B
	Tempo finale	5 minuti
Autocampionatore	Iniezione	1 µl
	Lavaggio dell'ago	Lavaggio della porta, 6 s
TCC	Colonna	ZORBAX Eclipse Plus C18 d.i. 1,8 µm, 2,1 mm x 50 mm
	Temperatura	40 °C
Rivelatore	Segnale A	250 nm, larghezza banda 100 nm, rif. 360 nm, larghezza banda 100 nm
	Ampiezza del picco	0,025 min (10 Hz)
	Memorizzazione spettri	Tutti

Impostazione del metodo

Questa sezione indica come impostare rapidamente le condizioni del metodo per eseguire l'analisi usando le condizioni della miscela campione. Per una spiegazione più dettagliata di tutti i parametri disponibili consultare l'Appendice, “[Impostazione di un metodo con la funzione Edit Entire Method](#)”, pagina 123.

Il metodo predefinito **DEF_LC.M** è stato caricato in modo che sia pronto a preparare il nuovo metodo. Ora si possono modificare i parametri principali per creare il nuovo metodo. Per l'esempio di separazione discusso qui, vedere le condizioni elencate nella [Tabella 9](#), pagina 104.

- 1 Per accedere rapidamente alla pagina **Method** di ogni modulo, fare clic con il pulsante destro del mouse sul diagramma del sistema per il modulo e selezionare **Method...** dal menu contestuale.

Tutti i moduli vanno impostati in questo modo.

- 2 Fare clic con il pulsante destro del mouse sull'area della pompa e selezionare **Method...** dal menu contestuale.
 - a Nella pagina **Method** della **1290 Infinity Binary Pump**, inserire i parametri sotto elencati.
 - Velocità di flusso: 0,4 ml/min
 - Solvente A: Selezionare **Water** dall'elenco a discesa relativo alla compressibilità.
 - Solvente B: Selezionare la casella di spunta per attivare il Solvente B.
 - %B: Valore iniziale 40 %
 - Tempo finale: 5 min
 - Limite massimo di pressione: 1200 bar
 - b Fare clic sul segno **+** per aprire la **Timetable**.
 - c Aggiungere una riga, selezionare **Change Solvent Composition** e impostare %B su 80 %
 - d Per gli altri parametri si possono lasciare i valori delle impostazioni predefinite. Fare clic su **OK** per uscire dalla finestra.

Queste modifiche vengono inviate al modulo della pompa.

- 3 Fare clic con il pulsante destro del mouse sull'area dell'autocampionatore e selezionare **Method...** dal menu contestuale.
 - a Nella pagina **Method** dell'**1290 Infinity Autosampler**, inserire i parametri sotto elencati.

- Volume di iniezione: 1,0 µl
 - Iniezione con lavaggio dell'ago
 - Modalità Lavaggio porta, Tempo: 6 s
- b** Per gli altri parametri si possono lasciare i valori delle impostazioni predefinite. Fare clic su **OK** per uscire dalla finestra.

Queste modifiche vengono inviate al modulo dell'autocampionatore.

- 4** Fare clic con il pulsante destro del mouse sull'area del comparto colonna termostata (TCC) e selezionare **Method...** dal menu contestuale.
- a** Nella pagina **Method** del **1290 Infinity TCC**, inserire i parametri sotto elencati.
- Temperatura dello scambiatore di calore sinistro 40 °C
 - Temperatura combinata dello scambiatore di calore destro
- b** Per gli altri parametri si possono lasciare i valori delle impostazioni predefinite. Fare clic su **OK** per uscire dalla finestra.
- Queste modifiche vengono inviate al modulo del TCC.
- 5** Fare clic con il pulsante destro del mouse sull'area del rivelatore a serie di diodi (DAD) e selezionare **Method...** dal menu contestuale.
- a** Nella pagina **Method** del **1290 Infinity DAD**, inserire i parametri sotto elencati.
- **Use Signal:** spegne tutti i segnali eccetto il **Signal A** deselezionando le caselle di spunta.
 - Segnale A: 250 nm, larghezza banda 100 nm, rif. 360 nm, larghezza banda 100 nm
 - Ampiezza del picco: 0,012 min (Risposta 0,25 s, 20 Hz)
- b** Nella sezione **Advanced**, impostare **Spectrum Store** su **All**.
- c** Per gli altri parametri si possono lasciare i valori delle impostazioni predefinite. Fare clic su **OK** per uscire dalla finestra.
- Queste modifiche vengono inviate al modulo del DAD.
- 6** Sono stati così inseriti tutti i necessari parametri dei moduli. Selezionare **Metodo > Salva Metodo con nome...** per salvare il metodo con un nuovo nome. ChemStation consentirà ora di salvare il metodo come **DEF_LC.M**, cosicché il modello del metodo predefinito non viene modificato.
- 7** Lasciar equilibrare il sistema per almeno 10 min e prima di far partire l'analisi verificare che la linea di base nel **Online Plot** sia stabile.

Esecuzione del metodo per una singola iniezione

Questa sezione illustra come eseguire una singola iniezione della miscela campione utilizzando le condizioni impostate nella sezione precedente.

Su ChemStation le analisi possono essere eseguite in due modalità.

- **Run Method:** singole iniezioni, ad esempio, nello sviluppo interattivo del metodo, usando le impostazioni dei parametri attivi in quel momento;
- **Run Sequence:** serie di iniezioni automatizzate da fiale multiple, possibilmente con più metodi. Per ulteriori dettagli fare riferimento ai manuali ChemStation.

- 1 Fare clic sull'icona **Select Run Method Task** .
- 2 Se al momento non sono caricate le condizioni del metodo desiderate, per caricarle selezionare **Metodo > Carica Metodo** o l'icona  che si trova sulla barra del menu.

NOTA

Se in un metodo caricato sono stati introdotti cambiamenti che non sono ancora stati salvati, un asterisco giallo sull'icona dello stato del metodo lo segnala. L'iniezione può essere eseguita senza prima salvare i cambiamenti di quei parametri. ChemStation archivia sempre una copia dei parametri di acquisizione in file di dati come ACQ.TXT per garantire la protezione dei parametri del metodo originari.

- 3 Posizionare la fiala del campione in posizione 1, ossia la posizione frontale delle 10 posizioni delle fiale da 2 ml sul lato destro del vassoio portacampioni.
- 4 Selezionare **Esegui controllo > Informazioni sul campione** e inserire un nome (opzionale) per la **Subdirectory**, il **Filename**, la **Location** del campione (**fiala 1**), il **Sample Name** e l'eventuale **Comment**.
- 5 Se il sistema si è già equilibrato e la linea di base è stabile, per attivare l'iniezione fare clic su **Run Method** nella pagina **Sample Info**. In alternativa, fare clic su **OK** e, quando si è pronti, fare clic sul pulsante **Start Single Sample** al di sopra del diagramma del sistema.
- 6 L'iniezione viene eseguita e il cromatogramma appare nel **Online Plot**. L'acquisizione dei dati si fermerà quando viene raggiunto il **Stop Time**.
Il cromatogramma dovrebbe risultare simile a quello della [Figura 33](#), pagina 108, tuttavia l'asse del tempo sarà più lungo in quel caso perché quella analisi è stata eseguita in condizioni di velocità quattro volte maggiore rispetto a queste.

Esecuzione più rapida del metodo

Il primo esercizio è stato eseguito a una pressione raggiungibile in un sistema standard. Ora la velocità di flusso viene aumentata e il gradiente regolato per ottenere una separazione più rapida.

1 Modificare le condizioni del metodo analogamente a quanto effettuato nella sezione precedente per introdurre i cambiamenti sotto elencati.

- Velocità di flusso: 1,6 ml/min
- Gradiente: cambiare il gradiente in modo che la sua pendenza sia invariata in termini di volume rispetto alla prima analisi. Il flusso è stato aumentato di 4 volte, quindi ridurre il tempo del gradiente di 4 volte; impostare il tempo del gradiente su 1 min.
- Tempo finale: 1,25 min

2 Salvare il metodo con un nuovo nome.

3 Accertarsi di usare un nuovo nome del file in **Sample Info**.

4 Quando la linea di base è stabile ed equilibrata, iniziare l'analisi usando il pulsante **Start Single Sample**.

Il cromatogramma dovrebbe risultare simile a quello mostrato sotto con un tempo di analisi di circa 1 min.

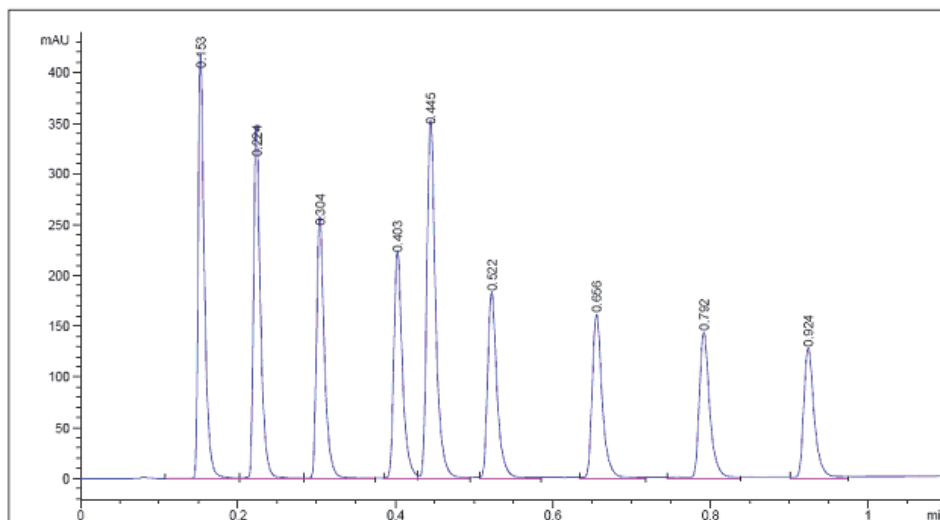


Figura 33 Esempio di cromatogramma della miscela campione contenente fenoli utilizzando le condizioni di Avvio rapido

Questa separazione in realtà non è ottimizzata con queste condizioni, quindi l'utente potrebbe acquisire più esperienza sul funzionamento del sistema cercando di ottimizzare ulteriormente il metodo. Alcune variazioni che potrebbero essere d'aiuto sono:

- ridurre la concentrazione del campione diluendo 1:10;
- aumentare l'intervallo del gradiente;
- incrementare la temperatura;
- esaminare gli spettri dei picchi e selezionare l'appropriata rivelazione di banda stretta.

Per maggiori informazioni sull'ottimizzazione, fare riferimento a “[Ottimizzazione del sistema LC Agilent 1290 Infinity](#)”, pagina 41.

Analisi dei dati

In ChemStation un metodo contiene tutti i parametri per l'acquisizione dei dati (per il controllo del sistema) e per l'analisi dei dati (per l'elaborazione dei dati per fornire risultati quantitativi e qualitativi). Questa sezione è dedicata brevemente all'integrazione e ai rapporti nell'analisi dei dati per consentire di integrare e stampare le separazioni generate seguendo la procedura descritta precedentemente in questo capitolo. Per maggiori informazioni sull'analisi dei dati, compreso l'uso della calibrazione per la quantificazione, fare riferimento al manuale ChemStation.

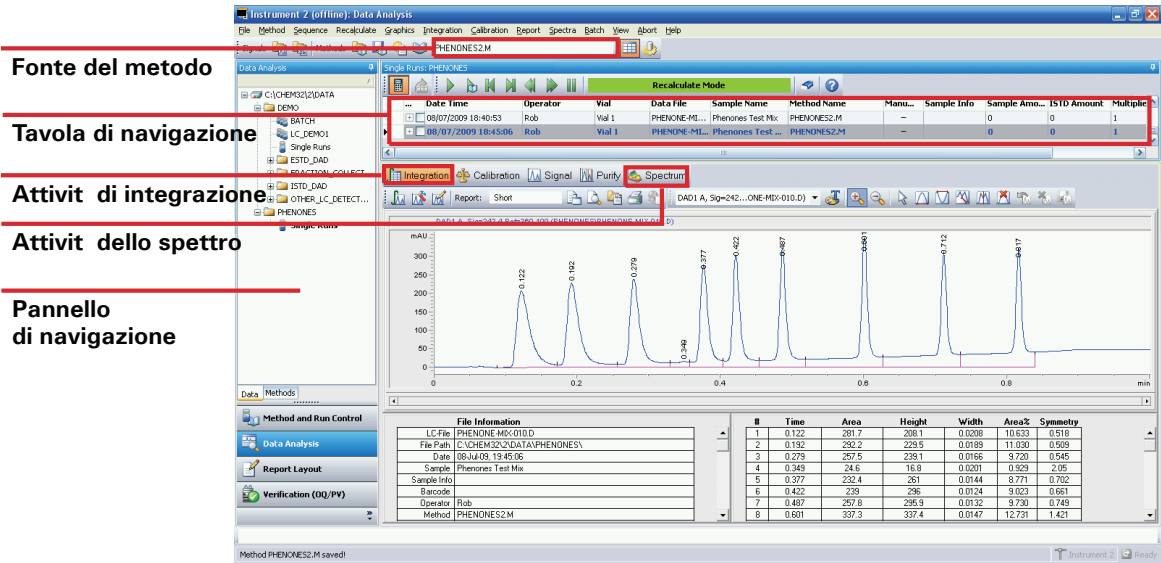


Figura 34 Schermata dell'analisi dei dati

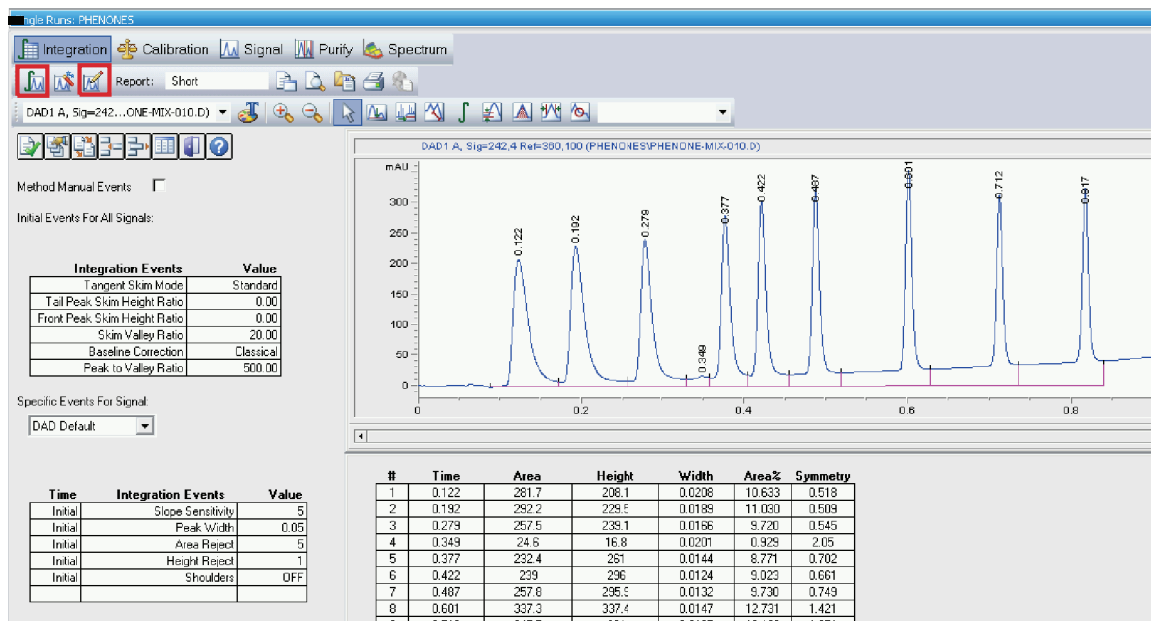
Schermata dell'Analisi dati

Per aprire un cromatogramma nella schermata Data Analysis:

- 1 lanciare una sessione di ChemStation in modalità off-line;
- 2 fare clic sul pulsante Analisi dei dati sulla parte in basso a sinistra dello schermo (vedere [Figura 34](#), pagina 110).
- 3 Nel Pannello di navigazione, trovare la directory dei dati contenente i file dei dati. Tutti i dati relativi alle singole iniezioni sono raggruppati sotto **Single Runs**. Fare doppio clic su **Single Runs** per caricare questi file dei dati nella Tavola di navigazione.
- 4 Selezionare un file nella Tavola di navigazione e fare doppio clic su essa per caricare il cromatogramma nel visualizzatore.

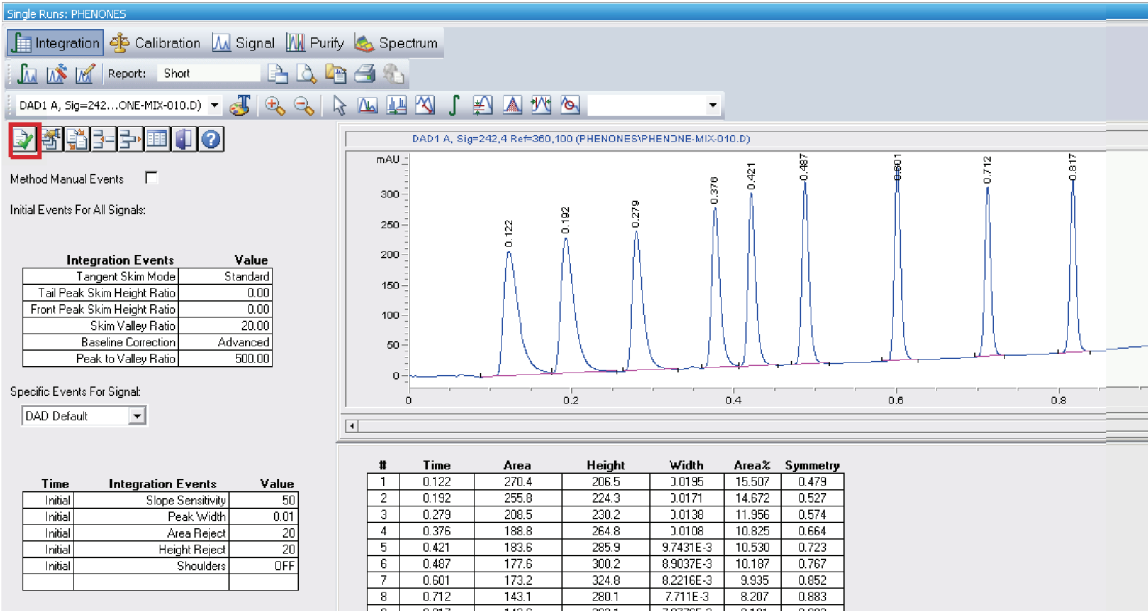
Integrazione di un segnale

- 1 Selezionare lo strumento Attività di integrazione (vedere figura sotto).
Nella figura sotto sono evidenziate le icone **Integrate** e **Set Integration Events Table**.



- 2 Fare clic sull'icona **Set Integration Events Table** per aprire la tabella come mostrato.
- 3 Per le analisi del gradiente impostare **Baseline Correction** in **Advanced**.
- 4 Impostare **Slope Sensitivity** su 50. Valori superiori integreranno i picchi più ripidi e ignoreranno i picchi meno ripidi.
- 5 Impostare il valore **Peak Width** sul picco di interesse più stretto, in questo caso circa 0,01.
- 6 Per scartare i picchi più bassi si possono impostare **Area Reject** e **Height Reject**.
- 7 Fare clic sull'icona **Integrate** per aggiornare i risultati in base a queste nuove impostazioni.

- 8 Uscire dalla tabella degli eventi usando l'icona con il segno di spunta verde (vedere figura sotto).



Specificare il rapporto

- 1 Sulla barra del menu, fare clic su **Rapporto > Specifica rapporto** per visualizzare la finestra mostrata in figura.

Specify Report: Instrument 1

Reporting settings | Quantitation settings

Report mode

☐ Use Intelligent Reporting ☒ Use Classic Reporting

Style

Report style: Short

Quantitative result sorted by: Signal

☐ Sample info on each page ☒ Add fraction table and ticks

☒ Add chromatogram output ☐ Add summed peaks table

☐ Add sample custom fields to sample info ☐ Add compound custom fields

Report layout for uncalibrated peaks

☐ Separately ☒ With calibrated peaks ☐ Do not report

Chromatogram output

☒ Portrait ☐ Landscape ☐ Multi-page (Landscape)

Size % of pages

Time: 100

Response: 40

Pages

Signal options...

Destination

☐ Printer ☒ Screen ☒ File

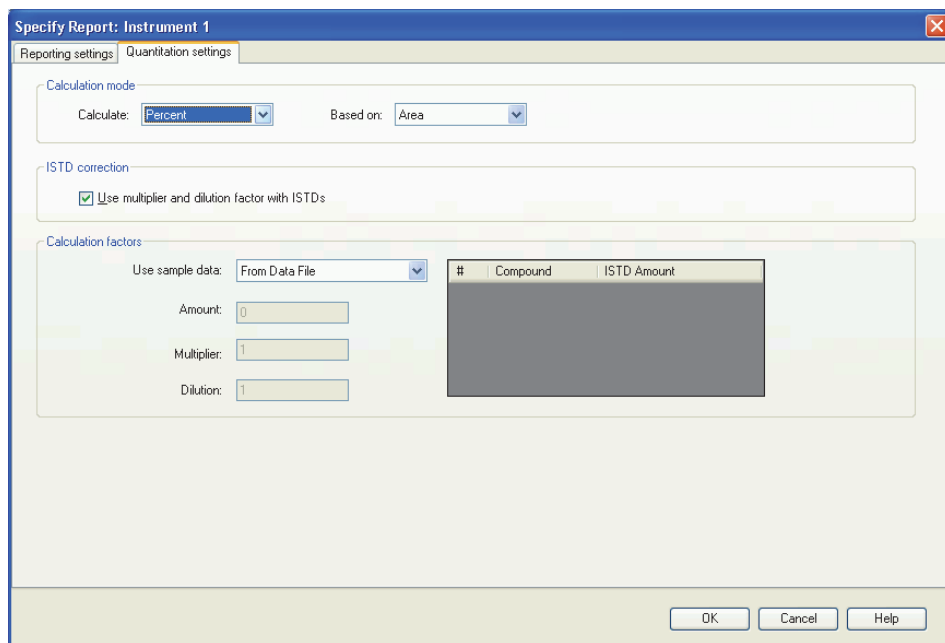
File setting

File prefix: Report

☒ PDF ☐ CSV ☐ HTM ☐ DIF

☒ Unique PDF file name ☒ TXT ☐ XLS ☐ EMF

OK Cancel Help



- 2 Con le impostazioni mostrate come esempio nelle figure sopra è possibile riprodurre sullo schermo un Rapporto di area percentuale.
- 3 Nella sezione **Destination**, selezionare **Printer** se si desidera una copia cartacea oppure **File e PDF** per ottenere un utile file PDF del rapporto memorizzato nel file dei dati (il file dei dati con suffisso .D è in realtà una directory. Il file del rapporto può essere visualizzato direttamente in ChemStation oppure si può cercare nella directory usando la normale funzione File Explorer di Windows).
- 4 Salvare ancora una volta il metodo per assicurarsi che le impostazioni del rapporto vengano memorizzate dal metodo per usi futuri.
Quando si userà ancora il metodo, per produrre il rapporto verranno usate queste impostazioni degli eventi di integrazione e dei rapporti.

Questa sezione riporta brevi indicazioni su come usare l'Analisi dei dati del software ChemStation. Consultare i manuali ChemStation e il sistema di aiuto on-line per maggiori dettagli sulle potenti caratteristiche di ChemStation.



6 Appendice

Informazioni per la sicurezza	118
Informazioni sui solventi	121
Agilent Technologies su Internet	122
Impostazione di un metodo con la funzione Edit Entire Method	123
Informazioni sul metodo	125
Strumento/Acquisizione	126
Analisi dei dati	141
Lista di controllo del tempo di analisi	148

Nel presente capitolo vengono fornite ulteriori informazioni di natura legale, sulla sicurezza e sull'impostazione di un metodo.



Informazioni per la sicurezza

Informazioni generali sulla sicurezza

Le seguenti precauzioni generali di sicurezza devono essere rispettate durante tutte le fasi di utilizzo, manutenzione e riparazione dello strumento. Il mancato rispetto di tali precauzioni o di avvertenze specifiche riportate in altri punti del presente manuale implica la violazione degli standard di sicurezza della progettazione, della produzione e dell'uso previsto dello strumento. Agilent Technologies non riconosce alcuna responsabilità per eventuali danni risultanti dal mancato rispetto delle istruzioni fornite.

ATTENZIONE

Verificare che lo strumento venga utilizzato correttamente.

La protezione fornita dallo strumento potrebbe risultare insufficiente.

→ L'operatore di questo strumento è tenuto a utilizzarlo come specificato nel presente manuale.

Standard di sicurezza:

Questo strumento è classificato come facente parte della Classe di Sicurezza I (provvisto di terminale di messa a terra) ed è stato prodotto e collaudato secondo gli standard di sicurezza internazionali.

Funzionamento

Prima di attivare l'alimentazione, seguire le istruzioni della sezione relativa all'installazione. Inoltre, osservare quanto segue.

Non rimuovere i coperchi dello strumento mentre è in funzione. Prima dell'accensione, tutti i terminali a terra, le prolunghe, gli autotrasformatori e i dispositivi connessi devono essere collegati a massa mediante una presa a terra. Qualsiasi interruzione della messa a terra protettiva causerà un rischio potenziale di scosse elettriche con possibilità di lesioni gravi. Laddove questa

protezione risulti danneggiata, è necessario mettere lo strumento fuori funzione e impedirne l'uso.

Assicurarsi che siano utilizzati esclusivamente fusibili con la corrente nominale richiesta e del tipo specificato (apertura circuito normale, ritardo, ecc.). Non utilizzare fusibili riparati ed evitare il cortocircuito dei supporti fusibile.

Alcune modifiche descritte nel manuale devono essere effettuate con la corrente collegata e lo strumento privo di coperchi. La corrente presente in molti punti può, in caso di contatto, provocare lesioni alle persone.

Qualsiasi operazione di modifica, manutenzione e riparazione dello strumento aperto sotto tensione deve essere, per quanto possibile, evitata. Queste operazioni, quando inevitabili, devono essere eseguite da persone competenti e consapevoli del rischio a cui sono sottoposte. Non tentare riparazioni o modifiche interne se non è presente un'altra persona in grado di prestare soccorso e rianimazione. Non sostituire parti con il cavo di alimentazione collegato.

Non usare lo strumento in presenza di gas infiammabili o fumi. L'uso dello strumento, al pari di altre apparecchiature elettriche, in queste condizioni può compromettere la sicurezza.

Non installare parti di ricambio e non effettuare modifiche non autorizzate.

I condensatori all'interno dello strumento possono essere ancora carichi, anche se lo strumento non è collegato alla presa di corrente. Questo strumento utilizza tensioni pericolose, in grado di provocare gravi lesioni alle persone. Usare, collaudare e riparare lo strumento con la massima cautela.

Quando si utilizzano solventi si devono osservare le procedure di sicurezza appropriate (ad esempio, occhiali protettivi, guanti di sicurezza e indumenti di protezione), come descritto nella scheda sull'uso e sulla sicurezza dei materiali del produttore dei solventi, in particolare quando si utilizzano solventi tossici o pericolosi.

Simboli di sicurezza

Tabella 10 Simboli di sicurezza

Simbolo	Descrizione
	Se l'apparecchiatura è contrassegnata da questo simbolo, l'utente è tenuto a consultare il manuale d'uso al fine di evitare il pericolo di lesioni all'operatore e danni all'apparecchiatura.
	Indica la presenza di tensioni pericolose.
	Indica un terminale di messa a terra protetto.
	Indica il rischio di lesioni oculari in caso di visione diretta della luce prodotta dalla lampada al deuterio utilizzata nel prodotto.
	Se l'apparecchiatura è contrassegnata da questo simbolo, sono presenti superfici molto calde che non devono essere toccate dall'utente.

ATTENZIONE

L'indicazione ATTENZIONE

segnala situazioni che potrebbero potenzialmente causare lesioni gravi o mortali.

- Prima di continuare a usare lo strumento, verificare di aver compreso e attuato quanto indicato nell'indicazione di attenzione.

AVVERTENZA

L'indicazione AVVERTENZA

indica situazioni che possono causare una perdita di dati o danni allo strumento.

- Non procedere oltre finché non è stato compreso ed eseguito quanto indicato.

Informazioni sui solventi

Cella di flusso

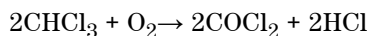
Per proteggere la funzionalità ottimale della cella di flusso:

- Evitare l'uso di soluzioni alcaline (pH > 9,5) in grado di intaccare il quarzo e di alterare le proprietà ottiche della cella di flusso.

Uso dei solventi

Osservare le seguenti raccomandazioni sull'uso dei solventi.

- I recipienti di vetro scuro possono prevenire la proliferazione delle alghe.
- Evitare l'utilizzo dei seguenti solventi che corrodono l'acciaio:
 - Soluzioni di alogenuri di alcali e relativi acidi (ad esempio, ioduro di litio, cloruro di potassio, ecc.).
 - Concentrazioni elevate di acidi inorganici, come l'acido solforico e nitrico, specialmente ad alte temperature (se il metodo cromatografico lo consente, sostituirli con soluzioni tampone di acido fosforico o fosfati, meno corrosivi per l'acciaio inossidabile).
 - Solventi alogenati o miscele che formano radicali e/o acidi, ad esempio:



Questa reazione, nella quale l'acciaio inossidabile agisce da catalizzatore, avviene rapidamente in presenza di cloroformio anidro, se il processo di disidratazione elimina l'alcool stabilizzatore.

- Gli eteri di grado cromatografico contenenti perossidi (ad esempio, THF, diossano, diisopropiletero) devono essere filtrati con ossido di alluminio, che assorbe i perossidi.
- Solventi contenenti agenti complessanti forti (come EDTA).
- Miscele di tetracloruro di carbonio con 2-propanolo o THF.

Agilent Technologies su Internet

Per informazioni aggiornate su prodotti e servizi, visitare il sito Web di Agilent al seguente indirizzo:

<http://www.agilent.com>

Selezionare Products/Chemical Analysis

Da qui è possibile scaricare direttamente l'ultima versione del firmware dei moduli.

Impostazione di un metodo con la funzione Edit Entire Method

Tutte le procedure e le impostazioni del metodo descritte qui di seguito si riferiscono alla pompa binaria 1290 Infinity. Le stesse sono applicabili alla pompa quaternaria 1290 Infinity.

In ChemStation un metodo contiene tutti i parametri per l'Acquisizione dei dati (per il controllo del sistema) e per l'Analisi dei dati (per l'elaborazione dei dati per fornire risultati quantitativi e qualitativi). Ai parametri si accede attraverso una serie di schermate, ognuna dedicata a un modulo o funzione. A queste schermate si accede facendo clic su un'icona dell'interfaccia utente grafica (GUI) o attraverso gli elenchi a discesa della barra del menu. Un nuovo metodo può essere creato caricando e modificando un metodo esistente oppure caricando e modificando il modello in bianco del metodo **DEF_LC.M**.

Per cambiare solo alcuni parametri, è possibile andare direttamente alle pagine di impostazione relative ai parametri da cambiare. Gli utenti meno esperti possono trovare più facile utilizzare la funzione **Modifica tutto il metodo**, poiché passa in rassegna automaticamente tutte le pagine. Ad essa si accede dal menu **Metodo > Modifica tutto il metodo**, che apre la finestra di dialogo **Check Method Sections to Edit**.

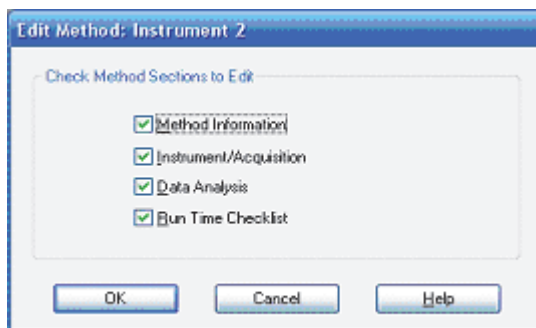


Figura 35 Controlla le sezioni del metodo da modificare

Questa finestra di dialogo riepiloga le sezioni che verranno visualizzate e offre la possibilità di saltare le parti che vengono deselezionate.

A seconda di quali parti sono state selezionate, la funzione mostra in sequenza diverse schermate.

- **Method Information:** comprende una descrizione del metodo in forma di testo.
- **Instrument/Acquisition** comprende:
 - parametri dell'iniettore;
 - parametri della pompa;
 - parametri del forno;
 - parametri del rivelatore e
 - curve dello strumento.
- **Data Analysis** comprende:
 - dettagli del segnale
 - parametri di integrazione e
 - parametri del rapporto.
- **Run Time Checklist:** comprende le parti del metodo che verranno eseguite.

NOTA

Durante **Edit Entire Method**, facendo clic su **OK** si chiude la schermata corrente per l'immissione dei valori e si passa alla schermata successiva. È un processo a senso unico.

Se si preme inavvertitamente **OK** prima di aver immesso tutti i valori, è necessario utilizzare il tasto **Cancel** e ricominciare la procedura da **Edit Entire Method**. In alternativa, proseguire e tornare alla schermata non completata una volta terminato. Facendo clic su **Cancel** si possono saltare (**Skip**) le schermate rimanenti.

Informazioni sul metodo

La schermata **Method Information** può anche essere raggiunta direttamente dal menu **Metodo > Informazioni sul metodo** o facendo clic con il pulsante destro del mouse sull'interfaccia utente grafica.

Questa scheda permette di inserire informazioni sul metodo. Queste informazioni compariranno sopra il diagramma del sistema nella schermata **Method and Run Control** ogni volta che il metodo viene caricato e risiede nella memoria.

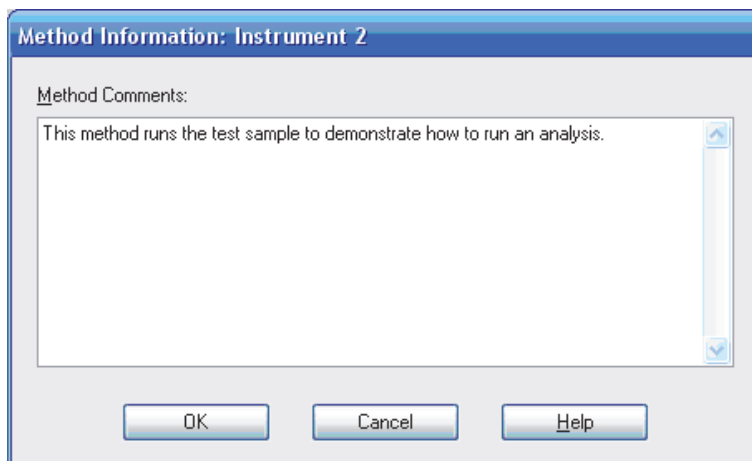


Figura 36 Informazioni sul metodo

Strumento/Acquisizione

Impostazione del metodo dello strumento

La schermata **Setup Method** può essere raggiunta direttamente dal menu **Strumento > Imposta metodo dello strumento...** o facendo clic con il pulsante destro del mouse sull'interfaccia utente grafica di qualsiasi icona dei moduli e quindi selezionando **Method...** nel menu contestuale. Questo passaggio di **Edit Entire Method** costituisce la schermata del **Setup Method** suddivisa in sei schede per moduli o funzioni diverse.

Le schede sono:

- autocampionatore ad alte prestazioni (**HiP-ALS**)
- **HiP-ALS Injector Program**
- pompa binaria (**BinPump**)
- Comparto colonna termostato (**TCC**)
- Rivelatore a serie di diodi (**DAD**)
- **Instrument Curves**

Per spostarsi tra le schede, fare clic sul nome della scheda sulla parte alta della schermata. Quando i parametri sono stati cambiati, possono essere inviati immediatamente allo strumento facendo clic su **Apply** oppure quando tutte le schede sono state completate facendo clic su **OK** si inviano ai moduli tutti i parametri, la schermata si chiude e si passa alla schermata successiva.

Le schede per inserire i parametri hanno lo stesso aspetto in tutti i programmi di controllo (ChemStation, EZChrom, MassHunter, ecc.) per la scelta di Agilent di utilizzare driver RC.Net comuni a tutti i moduli dello strumento.

Per analizzare la separazione della miscela campione, come nel caso della maggioranza dei metodi, non è necessario cambiare ogni parametro disponibile; tuttavia essi verranno descritti nelle prossime sezioni per ragioni di completezza.

Scheda autocampionatore (HiP-ALS)

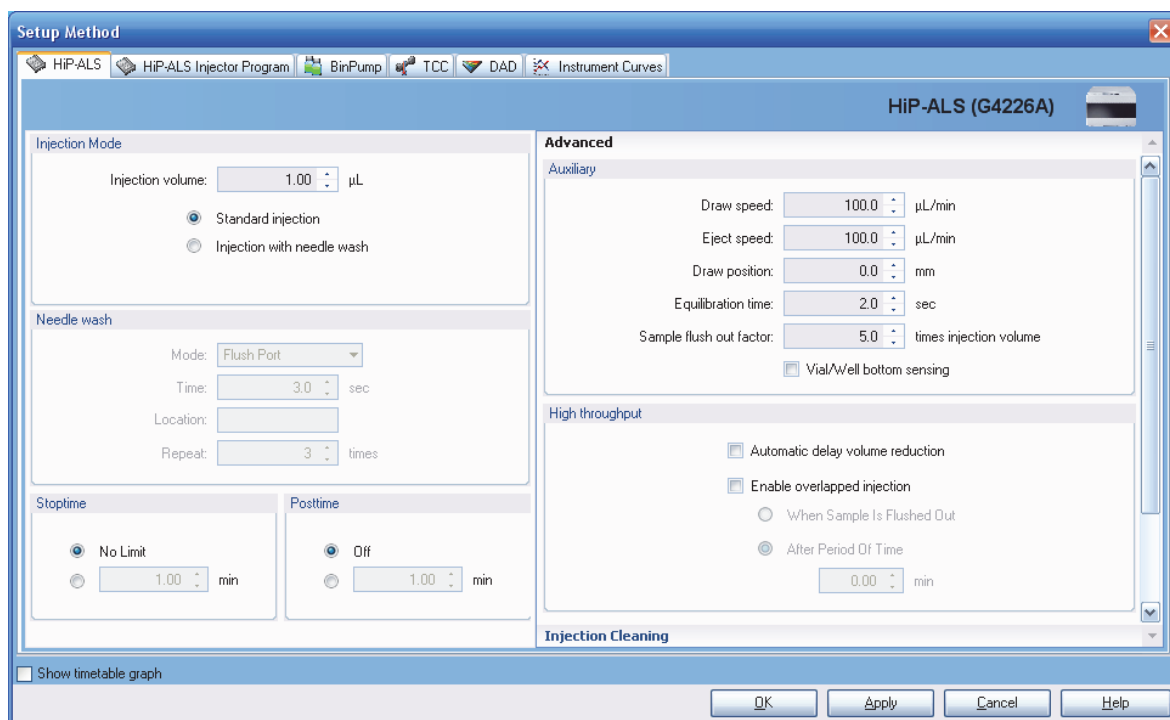


Figura 37 Schermata Imposta metodo – Scheda dell'autocampionatore ad alte prestazioni

- **Injection Mode**
 - **Injection volume:** imposta il volume da iniettare (ad esempio 3 µL).
 - **Standard injection:** indica che non viene eseguito il lavaggio esterno dell'ago.
 - **Injection with needle wash:** si usa per ridurre il potenziale effetto memoria. Questa opzione è raccomandata e viene configurata nella scheda successiva.
- **Needle Wash:** se questa funzione è stata selezionata sopra.
 - **Mode:** stabilisce la modalità di lavaggio della parte esterna dell'ago: o attivamente in **Flush Port** o per immersione in una **Wash Vial** specificata.

- **Time**, in secondi, durante il quale la pompa peristaltica collegata alla porta di lavaggio pomperà il solvente di risciacquo. Esso verrà pompato per altri 15 s per pulire la porta di lavaggio.
- **Location**: determina quale fiala o piastra a pozzetti verrà usata, nel caso in cui sia stata selezionata **Wash Vial**.

NOTA

Le fiale devono essere prive di setto, ossia devono essere aperte per evitare il trasferimento di materiale sul setto con conseguente effetto memoria.

- **Repeat**, nel caso in cui sia stata selezionata la funzione Fiala di lavaggio, stabilisce quante volte l'ago viene immerso nella fiala (predefinito 3, massimo 5).
- **Stop Time / Post Time** vengono impostati su **No Limit / Off** e questi valori vengono riportati nella scheda della pompa.
- **Advanced - Auxiliary**
 - **Draw speed**: è la velocità con cui il campione viene spinto nell'ago. Il valore predefinito è 100 µl/min. La velocità deve essere rallentata in caso di campioni viscosi per ottenere maggiore precisione con volumi di campione piccoli (<2 µL).
 - **Eject speed**: è la velocità di emissione dall'ago.
 - **Draw position**: indica lo scarto verticale dalla posizione di iniezione nominale di 10 mm al di sopra del fondo di una fiala. Questo corrisponde a circa metà cammino al di sopra di una fiala da 2 ml, quindi è necessario impostare uno scarto negativo perché il campione venga prelevato vicino al fondo della fiala; ad esempio, un valore di -7 mm posizionerebbe la punta dell'ago a 3 mm dal fondo della fiala.
 - **Equilibration time**: indica il tempo di ritardo tra l'aspirazione del campione e il movimento dell'ago.
 - **Sample flush out factor**: stabilisce quanto tempo attende l'autocampionatore dopo l'iniezione prima di permettere alla valvola di commutare in posizione di bypass. Ciò assicura che la zona del campione sia libera dall'ago, dalla sede e dalla valvola di iniezione. Il valore predefinito è 5.
 - **Vial/Well bottom sensing**: è un'alternativa all'uso dello scarto per la posizione di aspirazione. L'ago si muove lentamente verso il basso finché non tocca il fondo della fiala o del pozzetto e quindi si alza di 1 mm. Questo è un modo versatile per assicurarsi che l'ago si trovi vicino al fondo della fiala, ma richiede un tempo leggermente maggiore per completare l'inie-

zione e non va usato se sul fondo della fiala sono presenti particolati che potrebbero bloccare l'ago.

- **Advanced - High Throughput**
 - **Automatic delay volume reduction (ADVR):** commuta la valvola di iniezione dalla posizione di mainpass a quella di bypass dopo l'esecuzione dell'iniezione e dopo che un volume definito dal fattore di eliminazione del campione è stato fatto passare attraverso l'iniettore. Questo riduce il volume di ritardo del sistema di circa 70 µl e consente ai cambiamenti di gradiente di raggiungere prima la colonna.
 - **Enable overlapped injection:** anche questa funzione commuta la valvola di iniezione dalla posizione di mainpass a quella di bypass dopo l'esecuzione dell'iniezione oppure dopo che il campione è uscito dall'iniettore o in uno specifico momento successivo dell'analisi. L'iniettore aspirerà quindi il campione successivo in preparazione dell'iniezione successiva, riducendo così la durata complessiva del ciclo e aumentando il rendimento sul campione.
- **Injection Valve Cleaning**
 - **Injector Cleaning:** consente il lavaggio del sistema di iniezione con il solvente.
 - **Injection Valve Cleaning:** consente di commutare la valvola in momenti predefiniti durante l'analisi per minimizzare l'effetto memoria quando vengono iniettati composti problematici.

Scheda dell'autocampionatore ad alte prestazioni (Hip_ALS Injector Program)

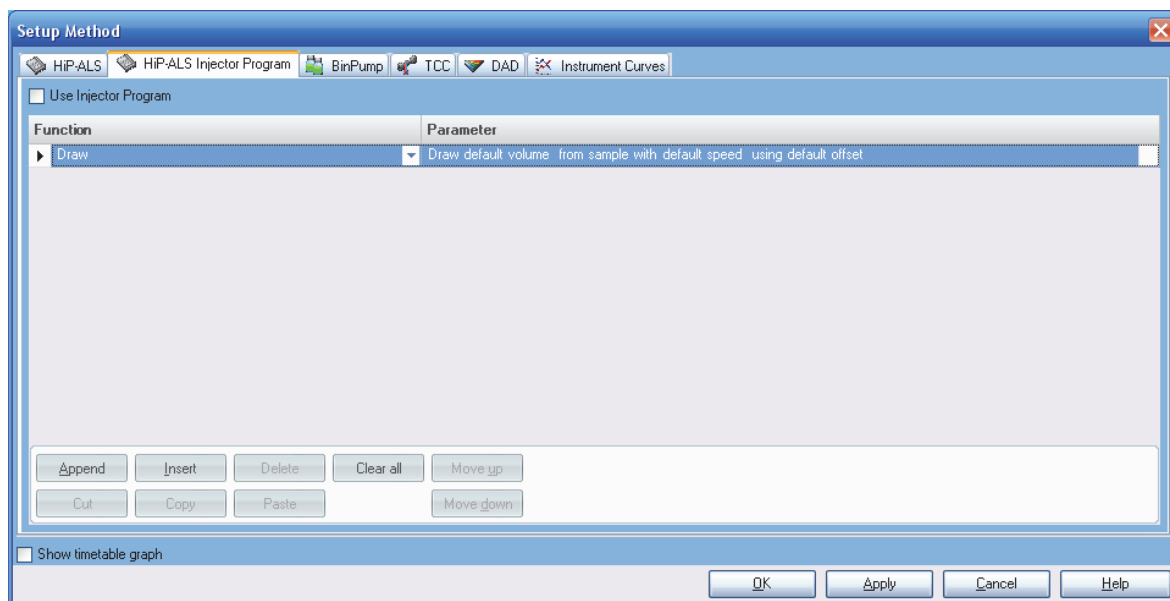


Figura 38 Schermata Imposta metodo – Scheda del programma dell'iniettore dell'autocampionatore HiP

Consente di costruire procedure di iniezione specializzate che prevedono la manipolazione di aliquote da più fiale come, ad esempio, nella derivatizzazione pre-colonna. I reagenti chimici vengono miscelati automaticamente con il campione per incrementare la rivelabilità o la sensibilità. Un esempio usato di frequente consiste nella derivatizzazione degli amminoacidi con i reagenti OPA e FMOC. Per maggiori dettagli, fare riferimento al *manuale dell'autocampionatore Agilent 1290 Infinity*.

Scheda della pompa binaria (BinPump)

The screenshot shows the 'BinPump (G4220A)' configuration window. It includes tabs for 'HIP-ALS', 'HIP-ALS Injector Program', 'BinPump', 'TCC', 'DAD', and 'Instrument Curves'. The 'Flow' section is set to 0.000 mL/min. The 'Solvents' section shows two channels, A and B, both set to 100.0% H2O. The 'Stoptime' section is set to 'No Limit' and 'Posttime' is set to 'Off'. The 'Pressure Limits' section shows a minimum of 0.00 bar and a maximum of 400.00 bar. The 'Timetable' section is empty. The bottom of the window has buttons for 'OK', 'Apply', 'Cancel', and 'Help'.

Figura 39 Schermata Imposta metodo – Scheda della pompa binaria

- **Flow:** imposta velocità di flusso sino a 5 ml/min. Ad esempio, per la separazione si usa la velocità di 0,4 ml/min. Se la contropressione raggiunge in breve la pressione massima impostata, il flusso verrà ridotto per alcuni secondi per abbassare la pressione, ma se la pressione continua a essere limitata in questo modo si instaurerà una condizione di errore e il flusso verrà interrotto.
- **Solvents:** definisce le fasi mobili disponibili e le proporzioni percentuali pompate ai due canali, A e B. Su ciascun canale, una casella a discesa permette di selezionare un solvente da un elenco in modo che il controllo della pompa utilizzi le impostazioni di compressibilità ottimali. In questo modo le caratteristiche del flusso saranno ottimizzate, come descritto in [“Configurazione del volume di ritardo ottimale”](#), pagina 44. Una seconda casella di testo consente di inserire una descrizione della fase mobile. Se nella pompa è installata la valvola di selezione del solvente, allora ogni canale ha due opzioni per il solvente e l'opzione corretta per il metodo va selezionata

mediante il pulsante radio alla sinistra della descrizione del solvente. La pompa formerà miscele binarie dei canali selezionati A e B, ad esempio A2 e B1; non è possibile miscelare A1 con A2 o B1 con B2. I valori immessi per le proporzioni di A e B definiscono la composizione di un metodo isocratico o definiscono le condizioni di partenza di un metodo in gradiente e le condizioni di equilibratura tra analisi in gradiente. Si deve immettere solo il valore di B, mentre A si aggiornerà al valore dato dal 100% meno B quando si muove il cursore. Nel caso della separazione, impostando A per l'acqua e B per il metanolo al 50 % A sarà 50 %.

- **Timetable:** indica in dettaglio le variazioni che devono verificarsi durante l'analisi per le composizioni percentuali di A e B nella fase mobile o, se necessario, per la velocità di flusso e la pressione massima consentite. La tabella di programmazione inserisce variazioni lineari dei parametri tra i valori di regolazione definiti. Le impostazioni inserite altrove in questa schermata funzionano come condizioni iniziali e cambieranno soltanto se si modifica uno dei valori della tabella di programmazione. Ad esempio, se durante l'analisi il flusso è costante non sussiste la necessità di immettere un valore relativo al flusso nella tabella di programmazione. Per immettere in valore nella tabella di programmazione, fare clic sul pulsante **Add** per aggiungere una riga alla tabella; inserire il tempo del valore di regolazione, selezionare la voce da modificare dall'elenco a discesa (composizione, flusso, pressione) e fare clic sulla casella **parameter** per aprire la casella dove immettere il valore. Se l'inserimento dei valori nella tabella di programmazione viene effettuato senza seguire una sequenza logica, i valori immessi vengono riordinati automaticamente in ordine temporale. Le righe della tabella di programmazione possono essere modificate direttamente e per aggiungerne o rimuoverne altre si possono utilizzare i pulsanti **Cut**, **Paste** e **Remove**. Per creare un profilo di gradiente, si possono aggiungere più righe per ottenere una serie di segmenti a gradiente lineare. Per impostare un gradiente semplice per la separazione qui esemplificata, se sono presenti valori nella tabella di programmazione questi vanno prima cancellati usando il pulsante **Clear all**, aggiungere una riga a 4,00 min per portare la composizione al 90 %. La visualizzazione grafica mostrerà ora un gradiente lineare dal 50 % di B al 90 % di B nell'arco di 4 min. Se è necessario un gradiente a gradino, questo può essere creato inserendo due valori per le impostazioni 'prima del gradino' e 'dopo il gradino' separati da 0,01 min. Questa procedura viene spesso usata per eluire rapidamente picchi ritenuti da una colonna in prossimità della fine di un'analisi aumentando il solvente più forte e/o la velocità di flusso in un gradiente a gradini, ad esempio aumentando la % di B dal 75 % al 95 %. Nella tabella di programmazione non è necessario inserire le impostazioni per il tempo 0,00 min, questi valori ven-

gono ricavati da altri valori di regolazione presenti in questa schermata. Tuttavia, alcuni utenti desiderano vedere un elenco ‘completo’ nella tabella di programmazione e quindi inseriscono un valore per 0,00 min. Questo non costituisce un problema, tuttavia ogni volta che le condizioni iniziali vengono modificate le nuove impostazioni vanno inserite sia nella tabella di programmazione sia nella sezione della schermata relativa ai valori di regolazione dei solventi.

- **Show timetable graph:** quando questa casella è spuntata, le variazioni apportate alla tabella di programmazione vengono rappresentate graficamente.
- **Stop Time:** definisce il tempo globale della separazione o dell'analisi e a volte è indicato come ‘Tempo di analisi’ da alcuni utenti. Indica il momento, in minuti a partire dall'esecuzione dell'iniezione, in cui l'analisi finisce, ossia il momento in cui termina l'acquisizione dei dati. Il flusso, la composizione e altre impostazioni del sistema ritorneranno ai valori iniziali per il metodo e il sistema diventa disponibile per eseguire l'iniezione successiva. Questo tempo deve sempre durare almeno quanto l'ultimo valore immesso nella tabella di programmazione, altrimenti l'analisi si fermerà e ritornerà alle condizioni di partenza prima che vengano completati gli eventi previsti dalla tabella. Il **Stop Time** può essere impostato su **No Limit**, in qual caso l'utente deve interrompere manualmente l'analisi. Anche se tutti i moduli del sistema hanno propri parametri di Tempo finale, quello della pompa viene considerato il principale e quindi gli altri moduli in genere verranno impostati in base a questo valore.
- **Post Time:** definisce un periodo di conto alla rovescia dopo il termine dell'analisi, durante il quale viene inibita l'esecuzione dell'iniezione successiva. Dà al sistema il tempo necessario per riequilibrarsi dopo un'analisi in gradiente. Per un metodo isocratico può essere impostato su **Off**. Per un metodo in gradiente il valore può essere determinato sperimentalmente osservando il comportamento della linea di base, ma tipicamente sarà dato dal tempo del volume di ritardo del sistema sommato ad almeno l'equivalente di tre-cinque volumi di colonna da far fluire attraverso il sistema.
- **Pressure Limits:** controlla il comportamento della pompa in termini di pressione. Con la pompa 1290 Infinity la pressione massima è 1200 bar, ma alcune colonne possono sopportare solo pressioni inferiori e impostando qui questo valore la colonna sarà protetta. La pompa genererà una condizione di errore se la pressione viene raggiunta e quindi tutte le analisi in corso verranno fermate e la pompa verrà commutata in modalità di attesa senza flusso. Le informazioni sulla pressione massima di una particolare colonna sono fornite insieme alla colonna. Le colonne Agilent ZORBAX RRHD sono adatte per operare a 1200 bar. Il limite Bassa pressione è ‘Disat-

6 Appendice

Impostazione di un metodo con la funzione Edit Entire Method

tivo' quando il valore è zero, ma a qualsiasi altro valore la pompa genererà un errore nel caso in cui durante il funzionamento la pressione scenda al di sotto di questo valore. Questa è una misura di salvaguardia alternativa quando la colonna non è all'interno di un modulo dotato di sensore per le perdite o nel caso in cui il sistema pompi a secco. Tipicamente, si imposta un valore da 10 a 20 bar.

Scheda del comparto colonna termostata (TCC)

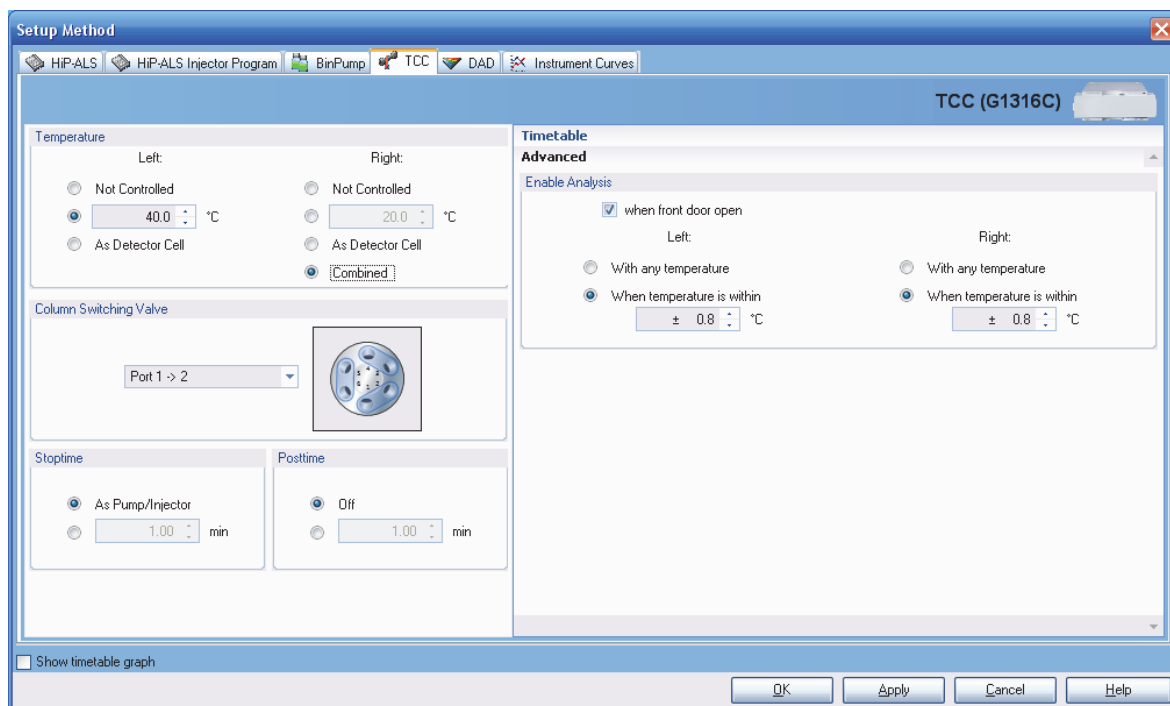


Figura 40 Schermata Imposta metodo – Scheda del comparto colonna termostata

- **Temperature:** stabilisce la temperatura dei supporti di colonna destro e sinistro, che possono essere controllati in modo indipendente o interconnesso facendo clic sul pulsante radio **Combined**. Quando combinate, le impostazioni per il lato sinistro controllano entrambe le sezioni e ciò si rende sicuramente necessario quando la lunghezza della colonna supera i 15 cm e necessita di essere supportata da entrambe le sezioni. I due lati possono operare separatamente quando è necessario avere due colonne che funzionano a temperature diverse. Questa funzione può essere attivata quando è instal-

lata anche una valvola di commutazione. Un altro uso di zone di temperatura separate è quando la colonna viene fatta funzionare a una temperatura elevata (ad esempio superiore a 60 °C) da un lato, mentre lo scambiatore di calore sull'altro lato viene usato per raffreddare l'eluente prima che entri nel rivelatore, riducendo così il rumore dovuto agli effetti termici nella cella di flusso. Selezionando l'opzione **As Detector Cell** verrà automaticamente letta la temperatura della cella nel rivelatore 1290 Infinity.

La temperatura di ogni zona può essere impostata da -5 °C a 100 °C ed è compito dell'utente verificare che quella colonna sia adatta per funzionare alla temperatura impostata. (La fasi StableBond per le colonne Agilent ZORBAX RRHD e RRHT possono essere usate all'estremo superiore dell'intervallo). La temperatura è controllata di $\pm 0,15$ °C fino a 10 °C al di sotto della temperatura ambientale, sebbene va sottolineato che esistono poche applicazioni che lavorano al di sotto dei 12-15 °C. Evitare di usare il TCC a temperature così basse, perché si formerà condensa di acqua per via dell'umidità dell'aria e verrà attivato il sensore per le perdite.

- **Column Switching Valve:** questa opzione è attiva solo quando è installata una valvola tra i sostegni per la colonna. Sono disponibili tre tipi di valvole:
 - a 2 posizioni e 6 porte, usate per commutare tra 2 colonne
 - a 2 posizioni e 10 porte, usate per la rigenerazione alternata delle colonne
 - a 8 posizioni e 9 porte, usate per la selezione di colonne multiple in MDS

Scheda del rivelatore a serie di diodi (DAD)

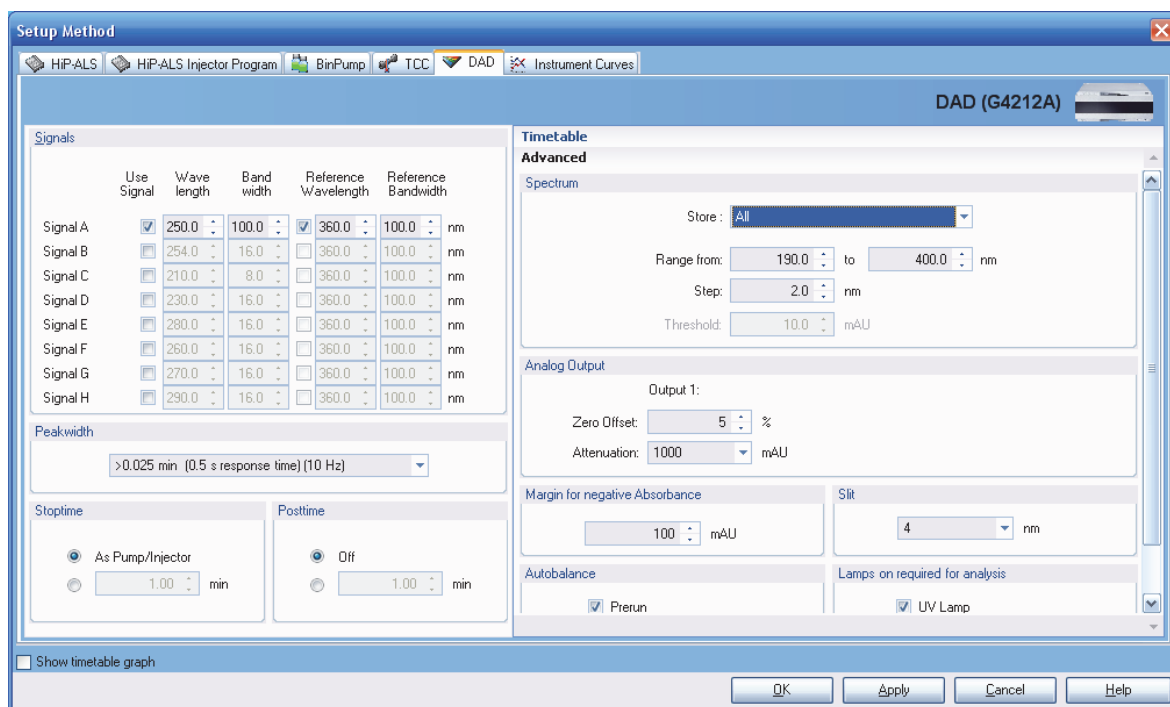


Figura 41 Schermata Imposta metodo – Scheda del rivelatore a serie di diodi

- **Signals:** si possono registrare fino a otto segnali (cromatogrammi) separati. Perché un segnale venga considerato per la raccolta, spuntare la casella **Use Signal** per il segnale di interesse; vanno definite la lunghezza d'onda e l'ampiezza di banda e se è necessario un segnale di riferimento, va spuntata quella casella per definirlo.
- **Wavelength:** imposta la lunghezza d'onda centrale (nm) del segnale;
- **Bandwidth:** imposta l'ampiezza (nm) del segnale;
- **Reference Wavelength:** imposta la lunghezza d'onda centrale (nm) della banda di riferimento che viene sottratta dal segnale analitico;
- **Reference Bandwidth:** imposta l'ampiezza (nm) della banda di riferimento;
- **Peakwidth:** imposta la velocità di raccolta dei dati e la filtrazione del segnale.
- **Stop Time / Post Time** vengono impostati su **No Limit / Off** e questi valori vengono riportati nella scheda della **Pump**. Tuttavia, il Tempo finale del modulo

del rivelatore a volte può differire dal Tempo finale della pompa, quando è necessario che l'analisi dei dati si interrompa prima del termine dell'analisi definito nella pompa. Ciò può verificarsi nel caso in cui al termine del gradiente è stata impostata una rampa di equilibrizzazione del gradiente. Ad esempio, la %B può aumentare fino al 95 % a 10 min e ci si aspetta che tutti i picchi siano eluiti dalla colonna, quindi l'analisi è essenzialmente terminata, ma si aggiunge un gradiente in più, che riporta %B al valore iniziale nell'arco di due minuti per iniziare gradualmente la riequilibrizzazione della colonna. Durante questa rampa verso il basso non ci si attendono valori utili quindi il Tempo finale del rivelatore è impostato su 10 min e la raccolta dei dati interrotta, mentre il Tempo finale della pompa è pari a 12 min per consentire il completamento della rampa verso il basso. Questa è una scelta dell'utente e in alcuni casi si accetta che i minuti finali del cromatogramma possano non contenere informazioni utili, ma vengono registrati comunque per evitare l'inconveniente di avere un Tempo finale diverso per il rivelatore. Il Tempo finale del rivelatore non si sovrappone a quello della pompa e determina l'interruzione dell'analisi tanto quanto lo farebbe un Tempo finale anticipato di qualsiasi altro modulo, da qui la praticità di impostare il Tempo finale su **As Pump**.

- **Timetable:** funziona nello stesso modo degli altri moduli, ossia si aggiunge una riga, si seleziona la funzione da cambiare e si inseriscono i nuovi valori per quella funzione. Le variazioni per il rivelatore avverranno immediatamente al momento specificato. Le seguenti funzioni possono essere modificate durante la corsa:
 - Bilanciamento
 - Modifica segnale
 - Modifica soglia
 - Modifica picco - rivelatore dell'ampiezza del picco
 - Modifica modalità di acquisizione degli spettri
 - Modifica contatti
- **Advanced - Spectrum**

Durante l'analisi gli spettri possono essere salvati su base continua o controllata dai picchi (ciò si applica al software ChemStation, alcuni pacchetti software, ad es. EZChrom, supportano solo la raccolta continua di tutti gli spettri e le opzioni per il controllo da parte dei picchi non compaiono). La raccolta degli spettri e dei segnali sono operazioni indipendenti eseguite dal firmware del rivelatore e non dipendono dal software del computer che estrae i dati dalla matrice 3D. La velocità con cui si rilevano i picchi è stabi-

lita dalle impostazioni per l'**Peakwidth**; durante l'intervallo specificato da **Peakwidth** vengono rilevati otto picchi. Il firmware rileva il picco sul segnale A solo per determinare quando devono essere salvati gli spettri controllati dai picchi. Per segnali multipli, può essere necessario avere impostato il segnale A come rivelatore a banda ampia a garanzia che siano disponibili spettri dei picchi per tutti di segnali a lunghezza d'onda diversa.

- **Store:** controlla la modalità di raccolta degli spettri con le opzioni elencate di seguito.

Nessuno: nessuno spettro memorizzato.

Apice+Linee di base: vengono rilevati 3 spettri, all'inizio, all'apice e alla fine del picco.

Apice+Pendenze+Linee di base: vengono rilevati 5 spettri, all'inizio, alla pendenza ascendente, all'apice, alla pendenza discendente e alla fine del picco.

Tutto nel picco: vengono memorizzati tutti gli spettri disponibili in un picco.

Tutti vengono memorizzati tutti gli spettri dell'analisi.

Ogni 2 spettri: vengono archiviati solo gli spettri alternati acquisiti durante l'analisi.

- **Range:** gli spettri possono essere salvati per tutta la gamma coperta dal rivelatore, da 190 nm a 640 nm, o qualsiasi gamma ridotta ritenuta appropriata dall'utente. Ciò riduce la quantità di dati da memorizzare.
- **Step:** controlla l'intervallo (nm) dei dati memorizzati in uno spettro e quindi influenza la risoluzione spettrale osservata. L'impostazione predefinita di 2 nm è una buona scelta per la maggioranza delle applicazioni.
- **Threshold:** stabilisce che non vengono memorizzati spettri per altezze di picco inferiori a questo valore (mAU).

- **Advanced - Analog Output**

Il rivelatore 1290 Infinity ha un connettore di uscita del segnale analogico da usare con i sistemi di dati che non accettano un segnale digitale in ingresso. Si possono inserire le impostazioni sotto elencate.

- **Zero Offset:** pone il livello zero a una percentuale stabilita del segnale in uscita, lasciando così una certa tolleranza di deriva negativa.
- **Attenuation:** aumenta l'assorbanza impostata fino all'uscita completa.
- **Advanced - Margin for Negative Absorbance**

L'impostazione predefinita è 100 mAU, che significa che il rivelatore ha un intervallo dinamico sufficiente, tenendo in considerazione il punto in cui era stato impostato il livello zero, per misurare questo valore verso il basso. Per misurare picchi negativi più ampi o per seguire una linea di base con una forte deriva negativa, il valore va aggiustato verso il basso per impedire al segnale di appiattirsi sul fondo dell'intervallo. Tuttavia, non va cambiato senza un buon motivo, perché rendendolo più negativo aumenterà il rumore della linea di base e si ridurrà l'intervallo disponibile per la misurazione dei picchi positivi.

- **Advanced - Slit**

La fenditura all'ingresso dello spettrografo controlla la risoluzione spettrale e influenza il rumore della linea basale e la sensibilità. L'impostazione predefinita di 4 nm è adatta alla maggioranza delle applicazioni. Vedere [“Ottimizzare una sensibilità maggiore”](#), pagina 61 per ulteriori informazioni su questo parametro.

- **Advanced - Autobalance:** imposta su zero il livello di assorbanza a tutte le lunghezze d'onda (ossia bilancia tutti i punti dello spettro su zero) e quindi azzerà anche il segnale della linea di base. **Prerun:** si seleziona per bilanciare subito prima dell'inizio dell'analisi, e questa è la situazione normale. A volte si seleziona in alternativa **Postrun** per bilanciare al termine dell'analisi, quando è scaduto il Tempo post-analisi. Ad esempio, se il segnale mostra sempre una deriva negativa e l'utente preferisce che l'analisi termini ad assorbanza zero, allora questo parametro imposterà il corretto livello zero per l'analisi seguente. Non cambierà retrospettivamente l'analisi al termine della quale ha eseguito il bilanciamento.
- **Advanced - Lamps on required for analysis:** il DAD o MWD 1290 Infinity è dotato di una lampada al deuterio che deve essere accesa per l'analisi, quindi la casella deve essere spuntata.

Scheda Instrument Curves

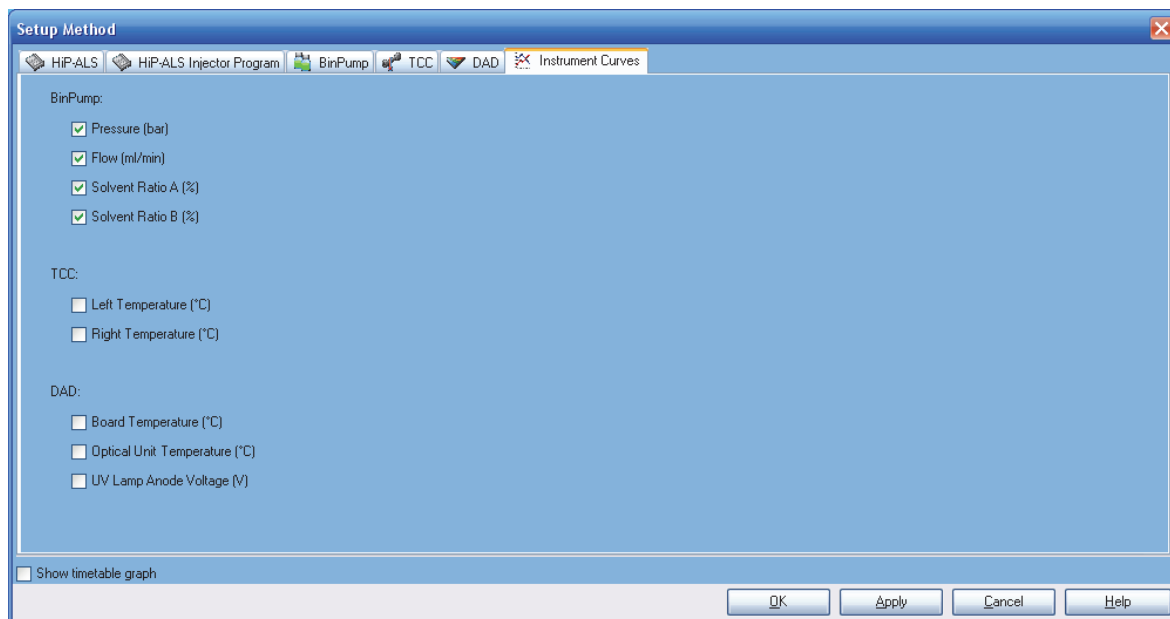


Figura 42 Schermata Imposta metodo – Scheda delle curve relative allo strumento

Spuntando l'apposita casella, la scheda delle curve relative allo strumento consente di memorizzare insieme ai dati flussi di dati monitorati diversi dai segnali del rivelatore. Questi vengono principalmente usati a scopi diagnostici e sono elencati qui di seguito.

- Pompa:
 - pressione
 - flusso
 - composizione A/B: può essere utile per sovrapporre il profilo del gradiente su un cromatogramma
- Comparto colonna termostato:
 - temperatura dello scambiatore di calore sinistro/destro
- Rivelatore:
 - temperatura della scheda
 - temperatura dell'unità ottica
 - tensione anodo della lampada UV

Analisi dei dati

Dettagli segnale

La schermata **Signal Details** può anche essere raggiunta direttamente dalla visualizzazione **Method and Run Control**: fare clic con il pulsante destro del mouse sull'interfaccia utente grafica sull'icona **Calibration** e quindi selezionare **Signal Details** dal menu contestuale. Nella visualizzazione Analisi dei dati, si può accedere attraverso il menu **Calibrazione > Dettagli segnale**.

La schermata **Signal Details** è il passaggio successivo di **Edit Entire Method** che indica all'Analisi dei dati quale tra i segnali acquisiti elaborare. La casella a discesa elenca i segnali disponibili, compresi i segnali analitici definiti nelle impostazioni del rivelatore, nonché i parametri registrati come temperatura, flusso, composizione, pressione e tracce diagnostiche. Selezionare un segnale e fare clic su **Add to Method** per trasferirlo alla tabella **Signal Details** mostrata nella parte bassa dello schermo. Si può scegliere se selezionare alcuni o tutti i segnali acquisiti del rivelatore perché vengano elaborati. Se non vengono rilevati segnali, la tabella è vuota. In questa situazione ChemStation per impostazione predefinita elaborerà tutti i segnali acquisiti del rivelatore.

A volte l'utente potrebbe modificare un metodo esistente per creare un nuovo metodo e incappa in un errore di **Parameter Mismatch** quando tenta di attivare il metodo. In pratica, nel vecchio metodo i **Signal Details** contenevano un segnale specificato, ad esempio 250 nm con ampiezza di banda di 8 nm, e questo valore nel nuovo metodo è stato cambiato ad esempio in 254 nm/12 nm. La tabella **Signal Details** contiene ancora i dettagli precedenti e il processo le sta indicando un segnale che non viene più acquisito. Evidenziare il segnale precedente all'interno della tabella e usando il pulsante **Delete Row** il problema verrà corretto.

Se un sistema utilizza rivelatori multipli, come il rivelatore a serie di diodi e uno spettrometro di massa, le righe **Signal Description** permettono di inserire i tempi di ritardo per il rivelatore a valle del flusso, così il software può allineare picchi da diversi rivelatori.

6 Appendice

Impostazione di un metodo con la funzione Edit Entire Method

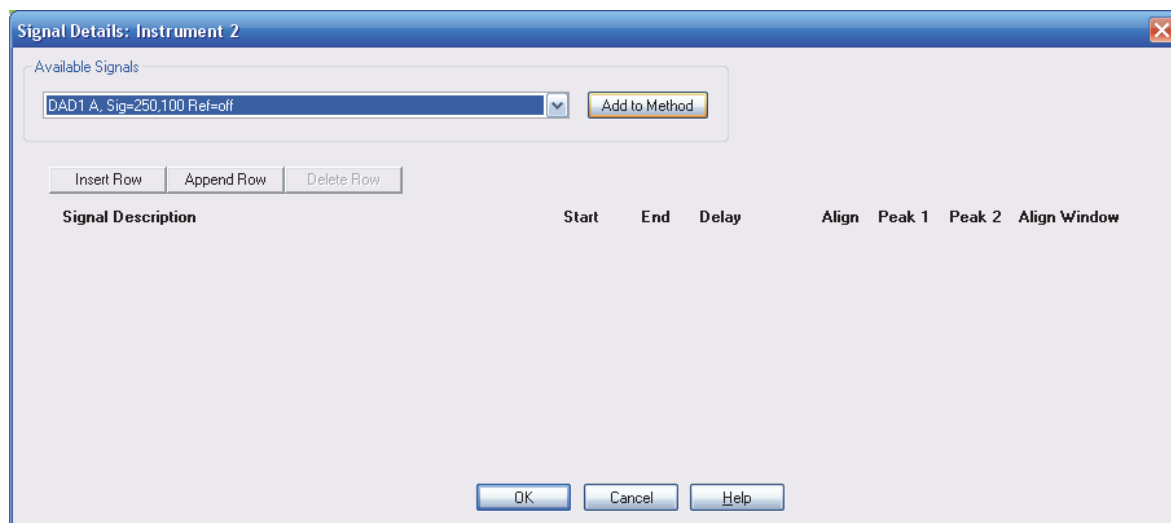


Figura 43 Dettagli segnale

Modifica eventi di integrazione

La schermata **Edit Integration Events** può essere anche raggiunta direttamente dalla finestra **Method and Run Control** facendo clic con il pulsante destro del mouse sull'interfaccia utente grafica dell'icona Eventi di integrazione e quindi facendo clic su **Edit Integration Events** nel menu contestuale. Nella visualizzazione **Data Analysis**, vi si può accedere attraverso il menu **Integrazione > Eventi di integrazione...** o sull'icona di attività **Edit Integration Events**.

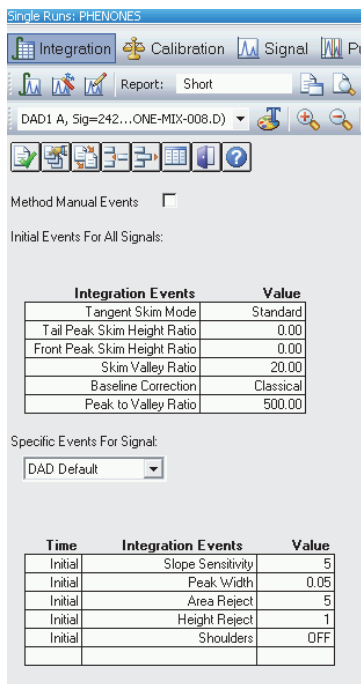


Figura 44 Schermata Modifica eventi di integrazione

L'integrazione, la calibrazione e la creazione del rapporto costituiscono la parte relativa all'analisi dei dati del metodo. I parametri di integrazione e la tabella di calibrazione sono di semplice impostazione una volta acquisiti i dati, i quali possono essere ricontrollati nella finestra Analisi dei dati. Gli eventi di integrazione possono essere ottimizzati in quel momento e spesso si usano le impostazioni predefinite per le analisi iniziali di acquisizione.

La schermata **Edit Integration Events** è caratterizzata da due tabelle.

- **Initial Events For All Signals:** contiene gli eventi (parametri di integrazione) che si applicano a tutti i segnali acquisiti con il metodo.
- **Specific Events For Signal:** contiene gli eventi che sono specifici per un tipo di rivelatore o specifici per diversi segnali dallo stesso rivelatore.

In questa tabella i parametri principali sono quelli sotto elencati.

- **Slope Sensitivity:** rappresenta la pendenza e la curvatura della linea di base necessarie per marcare l'inizio e la fine di un picco.
- **Peak Width:** vanno inseriti i valori dell'ampiezza a metà altezza del picco di interesse più stretto. Questo serve all'integratore per distinguere tra rumore e picchi molto piccoli.
- **Area Reject / Height Reject:** valori che controllano l'eliminazione dai risultati dei picchi la cui area o altezza ricade all'interno di questi valori.
- **Integration OFF/ON** sopprime l'integrazione tra limiti definiti. Funzione usata quasi sempre per inibire l'integrazione nella regione dall'iniezione al fronte del solvente o al marcatore di picchi non ritenuti.

Per aggiungere alla tabella le righe come **Integration OFF/ON** usare le icone in cima alla finestra.

Fare clic su **OK** per uscire e si aprirà la schermata successiva del processo di Modifica tutto il metodo.

Specifica rapporto

La schermata **Specify Report** può anche essere raggiunta direttamente dalla finestra **Method and Run Control** facendo clic con il pulsante destro del mouse sull'interfaccia utente grafica dell'icona Rapporto e quindi facendo clic su **Specify Report** nel menu contestuale. Nella visualizzazione **Data Analysis**, vi si può accedere attraverso il menu **Rapporto > Specifica rapporto** o sull'icona di attività Specifica rapporto.

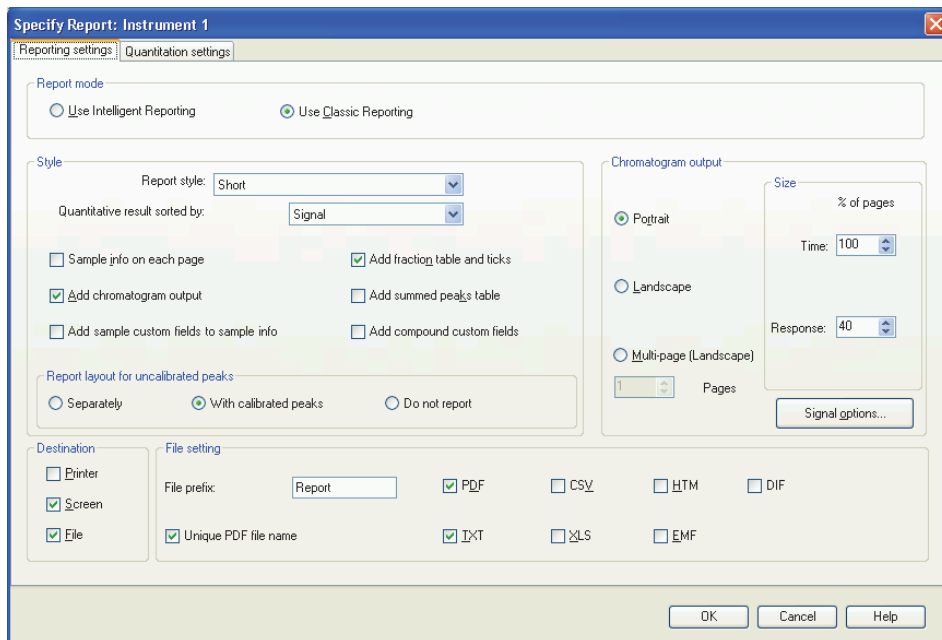


Figura 45 Schermata Specifica rapporto

Per impostare un semplice rapporto riportante l'area percentuale mediante la funzione di Stesura classica di rapporti, che stampa su stampante e su un file PDF, immettere le seguenti impostazioni nelle sezioni elencate di seguito della schermata Specifica rapporto.

Sulla scheda **Reporting settings**

- **Report mode:** utilizza la stesura classica dei rapporti
- **Style**
 - **Report Style:** breve
 - **Quantitative results sorted by:** segnale

- **Add Chromatogram Output:** verificato
- **Chromatogram Output:** verticale
- **Size:**
 - Asse del **Time:** 100 % della pagina
 - Asse della **Response:** 40 % della pagina
- **Destination**
 - **Printer:** verificata
 - **Screen:** non verificata
 - **File:** verificato
- **File Setting:**
 - **PDF:** verificato
 - **Unique PDF file name:** verificato

Sulla scheda **Quantitation settings**

- **Calculation mode**
 - **Calculate:** percentuale
 - **Based on:** area

Fare clic su **OK** per uscire e si aprirà la schermata successiva del processo di Modifica tutto il metodo.

Curve relative allo strumento

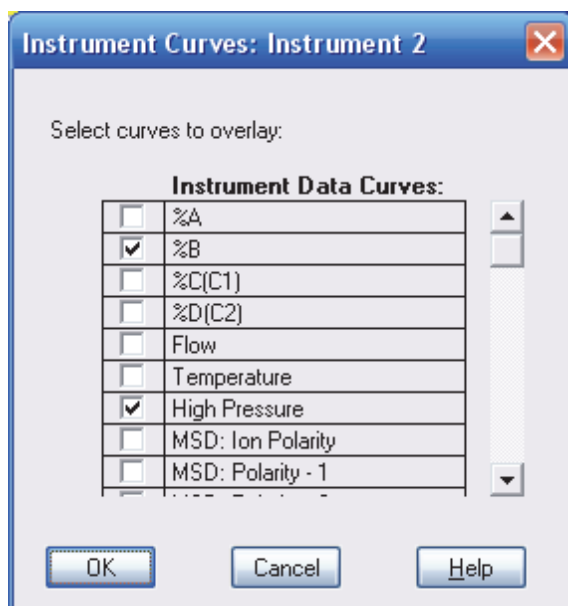


Figura 46 Schermata Curve relative allo strumento

Le caselle di spunta della scheda **Instrument Curves** consentono a questi parametri registrati di essere sovrapposti in forma grafica sul cromatogramma.

Lista di controllo del tempo di analisi

La schermata della **Run Time Checklist** può anche essere raggiunta direttamente dal menu **Metodo > Lista di controllo del tempo di analisi...** o facendo clic sull'icona **Run Time Checklist** sulla parte alta della schermata.

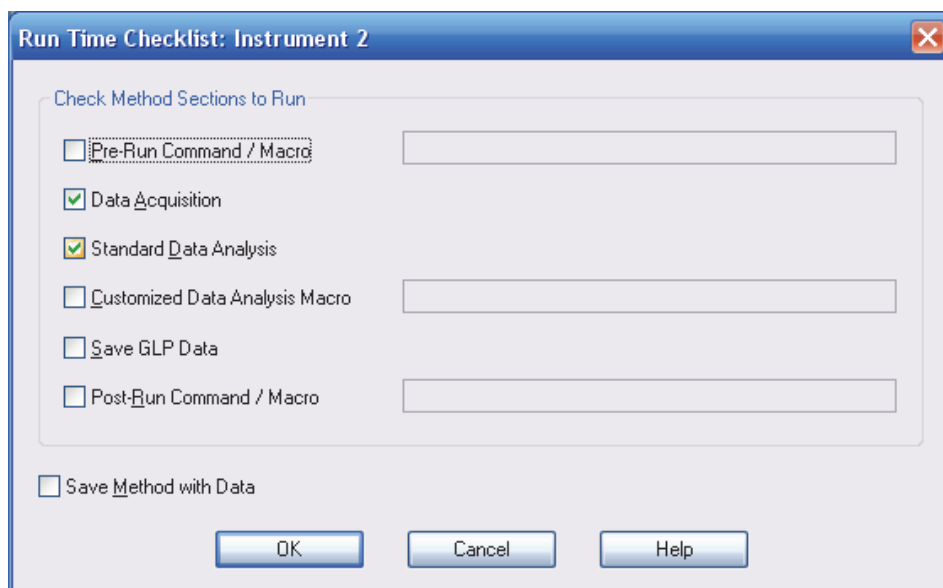


Figura 47 Schermata Lista di controllo del tempo di analisi

La **Run Time Checklist** permette di scegliere se il metodo deve prevedere sia l'acquisizione dei dati che la loro analisi e offre anche l'opportunità di collegare comandi o programmi macro in diversi punti del flusso di lavoro. Nella maggior parte dei casi, le caselle **Data Acquisition** e **Standard Data Analysis** sono spuntate. Se l'analisi dei dati non è necessaria, ad esempio, in una serie di analisi per lo sviluppo del metodo, si può togliere la spunta da **Standard Data Analysis** per non produrre il rapporto; i dati possono essere controllati visivamente in un momento successivo nella visualizzazione **Data Analysis**.

Per collegare un programma macro a uno dei punti di accesso, va spuntata la casella pertinente e il nome della macro va digitato nella casella di testo a destra. Il software cerca la macro nella directory C:\Chem32\Core; se è salvata altrove, inserire il percorso.

I punti di accesso nel flusso di lavoro del metodo sono i seguenti.

- **Pre-Run Command / Macro**
- **Customized Data Analysis Macro**
- **Post-Run Command / Macro**

Save Method with Data salva una copia del metodo nel file dei dati e le assegna il nome RUN.M. Questa operazione non è necessaria se ChemStation viene attivata nella configurazione consueta, perché il software salva sempre il metodo nel file dei dati (tutte le versioni a partire dalla B.02.01). Questa opzione risulta rilevante solo se ChemStation è stata configurata in modo che la funzione **Unique Sequence Folder Creation** sia disattivata e quindi i metodi non vengono copiati di routine nel file dei dati.

Poiché questa è la schermata finale del processo, facendo clic su **OK** si uscirà dal **Run Time Checklist** e dal processo **Edit Entire Method**. Il metodo ora deve essere salvato nella directory dei metodi principali, che per impostazione predefinita è C:\Chem32\1\Methods, usando **File > Salva con nome > Metodo** oppure **Menu del Metodo > Salva metodo con nome**.

Glossario-IU

1

1290 Infinity Autosampler
Autocampionatore 1290 Infinity
1290 Infinity Binary Pump
Pompa binaria 1290 Infinity
1290 Infinity DAD
DAD 1290 Infinity
1290 Infinity TCC
TCC 1290 Infinity

A

Add
Aggiungi
Add Chromatogram Output
Aggiungi uscita cromatogramma
Add to Method
Aggiungi al metodo
Adjust
Regola
Advanced
Avanzate
Advanced - Analog Output
Avanzate - Uscita analogica
Advanced - Autobalance
Avanzate - Bilanciamento automatico
Advanced - Auxiliary
Avanzate - Ausiliarie
Advanced - High Throughput
Avanzate - Alta produttività
Advanced - Lamps on required for analysis
Avanzate - Lampada accesa richiesta per l'analisi

Advanced - Margin for Negative Absorbance
Avanzate - Margine per l'assorbanza negativa
Advanced - Slit
Avanzate - Fenditura
Advanced - Spectrum
Avanzate - Spettro
All
Tutti
Apply
Applica
Apply to Method
Applica al metodo
Area Reject
Scarto area
Area Reject / Height Reject
Scarto area / Scarto altezza
As Detector Cell
Come cella nel rivelatore
As Pump
Come pompa
Attenuation
Attenuazione
Automatic delay volume reduction
Riduzione automatica del volume di ritardo
Available Signals
Segnali disponibili

B

Balance
Bilanciamento
Bandwidth
Ampiezza di banda

Based on
Basato su
Baseline Correction
Correzione della linea di base
BinPump
PompaBin

C

Calculate
Calcola
Calculation mode
Modalità calcolo
Calibration
Calibrazione
Cancel
Annulla
Change Solvent Composition
Modifica composizione del solvente
Change...
Cambia...
Check Method Sections to Edit
Controlla le sezioni del metodo da modificare
Chromatogram Output
Uscita cromatogramma
Clear all
Cancella tutto
Column Switching Valve
Valvola di commutazione della colonna
Combined
Combinata
Comment
Osservazione
Composition A
Composizione A

Composition B
Composizione B

Control
Controllo

Customized Data Analysis Macro
Macro personalizzata per l'analisi dei dati

Cut
Taglia

D

Data Acquisition
Acquisizione di dati

Data Analysis
Analisi dei dati

Delete Row
Elimina riga

Destination
Destinazione

Draw position
Posizione di aspirazione

Draw speed
Velocità di aspirazione

Duration
Durata

E

Edit Entire Method
Modifica tutto il metodo

Edit Integration Events
Modifica eventi di integrazione

Edit Signal Plot
Modifica diagramma del segnale

Eject speed
Velocità di emissione

Enable overlapped injection
Abilita iniezione sovrapposta

Equilibration time
Tempo di equilibratura

F

File Setting
Impostazione file

Filename
Nome del file

Flow
Flusso

Flush Port
Porta di lavaggio

H

Height Reject
Scarto altezza

Hip_ALS Injector Program
Iniettore Hip_ALS

HiP-ALS Injector Program
programma dell'iniettore di HiP-ALS

I

Initial Events For All Signals
Eventi iniziali per tutti i segnali

Injection Mode
Modalità di iniezione

Injection Valve Cleaning
Pulizia della valvola di iniezione

Injection volume
Volume di iniezione

Injection with needle wash
Iniezione con lavaggio dell'ago

Injector Cleaning
Pulizia dell'iniettore

Instrument Curves
Curve relative allo strumento

Instrument/Acquisition
Strumento/Acquisizione

Instruments
Strumenti

Integrate
Integra

Integration OFF/ON
Integrazione ATTIVA/DISATTIVA

L

Launch online
Lancia in linea

Load Method
Carica metodo

Location
Posizione

M

Method
Metodo

Method and Run Control
Metodo e controllo analisi

Method History
Cronologia del metodo

Method Information
Informazioni sul metodo

Method...
Metodo...

Mode
Modalità

N

Needle Wash
Lavaggio ago

No Limit
Nessun limite

No Limit / Off
Nessun limite / Spento

O

Off
Spento

Online Plot
Diagramma in linea

P

parameter
parametro

Parameter Mismatch
Accoppiamento errato dei parametri

Paste
Incolla

Peak Width
Ampiezza del picco

Peakwidth
Ampiezza picco

Post Time
Tempo post-analisi

Postrun
Post-analisi

Post-Run Command / Macro
Comando post-analisi / Macro

Prerun
Pre-analisi

Pre-Run Command / Macro
Comando pre-analisi / Macro

Pressure Limits
Limiti di pressione

Prime On
Attiva adescamento

Printer
Stampante

Pump
Pompa

Purge
Spurgo

Purge On
Attiva spurgo

Q

Quantitation settings
Impostazioni quantificazione

Quantitative results sorted by
Risultati quantitativi suddivisi per

R

Range
Intervallo

Reference Bandwidth
Ampiezza di banda di riferimento

Reference Wavelength
Lunghezza d'onda di riferimento

Remove
Rimuovi

Repeat
Ripeti

Report mode
Modalità del rapporto

Report Style
Stile del rapporto

Reporting settings
Impostazioni del rapporto

Response
Risposta

Run Method
Esegui metodo

Run Sequence
Esegui sequenza

Run Time Checklist
Lista di controllo del tempo di analisi

S

Sample flush out factor
Fattore di eliminazione del campione

Sample Info
Informazioni sul campione

Sample Name
Nome del campione

Save
Salva

Save As...
Salva con nome

Save Method with Data
Salva metodo con dati

Screen
Schermata

Select Run Method Task
Seleziona attività di esecuzione del metodo

Selected Signal
Segnale selezionato

Selected Signals
Segnali selezionati

Set Integration Events Table
Imposta tabella degli eventi di integrazione

Setup Method
Imposta metodo

Show timetable graph
Mostra grafico della tabella di programmazione

Signal A
Segnale A

Signal Description
Descrizione segnale

Signal Details
Dettagli segnale

Signals
Segnali

Single Runs
Analisi singole

Size
Dimensioni

Skip
Salta

Slope Sensitivity
Sensibilità pendenza

Solvents
Solventi

Specific Events For Signal
Eventi specifici per segnale

Specify Report
Specifica rapporto

Spectrum Store
 Memorizza spettro

Standard Data Analysis
 Analisi standard dei dati

Standard injection
 Iniezione standard

Start Single Sample
 Avvio singolo campione

Step
 Passo

Stop Time
 Tempo finale

Stop Time / Post Time
 Tempo finale / Tempo post-analisi

Store
 Memorizza

Style
 Stile

Subdirectory
 Sottodirectory

Switch [module name] on
 Accendi [nome del modulo]

System On/Off
 Accensione/Spegnimento del sistema

T

TCC)
 TCC

Temperature
 Temperatura

Threshold
 Soglia

Time
 Tempo

Timetable
 Tabella di programmazione

U

Unique PDF file name
 Nome unico del file PDF

Unique Sequence Folder Creation
 Creazione della cartella di sequenza unica

Use Signal
 Usa segnale

V

Vial/Well bottom sensing
 Rilevazione del fondo della fiala/poz-zetto

W

Wash Vial
 Fiala di lavaggio

Water
 Acqua

Wavelength
 Lunghezza d'onda

Z

Zero Offset
 Scarto zero

Indice

A

- Agilent
 - su Internet 122
- alghe 121
- alta produttività
 - ottimizzazione 55
- ampiezza del picco 67
- analisi dei dati 124
- analisi
 - dati 110
- Autocampionatore Infinity
 - descrizione 34

C

- calcolatore
 - costi 15
- caricamento
 - predefinito 98
- cella di flusso 121
 - informazioni sui solventi 121
 - Max-Light, cella di flusso a cartuccia 63
 - Max-Light, cella di flusso ad alta sensibilità 63
- classe di sicurezza I 118
- colonna
 - stabilizzazione termica 19
 - temperatura 19
- colonne
 - particelle inferiori a 2 micron 15
- Comparto colonna termostato
 - descrizione 36
- componenti del sistema
 - autocampionatore 34

- comparto colonna termostato 36
- pompa binaria 28
- rivelatore a serie di diodi 38

- configurazione e installazione del sistema
 - integrazione in rete 93
- configurazione
 - diagramma in linea 100
 - due stack - anteriore 81, 86
 - due stack - posteriore 82, 87
 - due stack 81, 86
 - stack unico 78, 83

- cromatografia liquida
 - utilizzo di particelle più piccole 8

D

- dati
 - analisi 110
- DEF_LC.M 123
- diagramma in linea
 - configurazione 100

E

- effetto memoria 70
- Equazione di van Deemter 10

F

- fattore di ritenzione 12

G

- guida introduttiva
 - introduzione 96

I

- impostazione del metodo dello strumento 126
- informazioni sui solventi 121
- informazioni sul metodo 124, 125
- integrazione in rete 93
- integrazione
 - segnale 112
- Internet 122

J

- Jet Weaver
 - rimuovere i collegamenti dei capillari 50

L

- larghezza della fenditura 66
- larghezza di banda 65
- Lista di controllo del tempo di analisi 124
- lunghezza d'onda del segnale 65
- lunghezza d'onda e larghezza di banda
 - ottimizzazione 63

M

- metodo
 - esecuzione più rapida 108
 - impostazione 105
 - modifica tutto il metodo 123
 - predefinito 123
 - singola iniezione 107

O

- ostruzione della colonna 72

linee guida per l'uso 72

ottimizzazione

- come ottenere una maggiore produttività 55
- condizioni di HPLC 12
- larghezza della fenditura 66
- lunghezza d'onda e larghezza di banda 63
- prevenzione delle ostruzioni della colonna 72
- raggiungimento effetto memoria ridotto 70
- raggiungimento risoluzione maggiore 58
- raggiungimento sensibilità maggiore 61
- sensibilità del rivelatore 63
- separazione cromatografica 12
- utilizzo della colonna 61
- volume del miscelatore della pompa 61
- volumi di iniezione 53

P

parametri del metodo 103

particelle inferiori a 2 micron 15

piatti teorici 12

Pompa binaria

- descrizione 28

R

rapporto

- specifiche 114

riduzione del volume di ritardo automatica 70

riscaldamento per attrito 19

risoluzione 12, 18

- Ottimizzazione 58

Rivelatore a serie di diodi

- descrizione 38

rivelatore

- ottenimento di una maggiore sensibilità 63

S

segnale

- integrazione 112

sensibilità

- ottimizzazione 61

sicurezza

- informazioni generali 118
- simboli 120

Sistema LC Agilent 1290 Infinity

- componenti del sistema 28
- intervallo di potenza 24
- nuove caratteristiche 24

sistema

- accensione 97

solventi 121

spurgo della pompa 90

Strumento/Acquisizione 124

T

tabella degli eventi di integrazione 112

tempo di risposta 67

V

velocità di campionamento dati 67

volume del miscelatore della pompa 61

volume di iniezione

- raggiungimento volumi maggiori 53

volume di ritardo

- descrizione 42
- esempio 42

volume extra-colonna

- descrizione 43

In questo volume

Il presente manuale contiene informazioni tecniche sul sistema LC Agilent 1290 Infinity.

Vengono trattati i seguenti argomenti:

- introduzione
- descrizione del prodotto
- ottimizzazione del sistema
- configurazione e installazione
- guida introduttiva.

© Agilent Technologies 2009-2011, 2012

Printed in Germany
05/2012



G4220-94301



Agilent Technologies