



Software MassHunter di Agilent – Acquisizione dati per il sistema LC/MS serie 6400 triplo quadrupolo

Guida alla familiarizzazione

Prima di iniziare **3**

Preparazione del sistema **3**

Preparazione per l'acquisizione dati **3**

Esercizio 1 - Sviluppare un metodo di acquisizione per la serie 6400 **6**

Attività 1. Immettere i parametri di acquisizione e acquisire i dati **6**

Attività 2. Determinare le masse degli ioni precursore **10**

Attività 3. Trovare la tensione frammentatore ottimale per una risposta al massimo grado **13**

Attività 4. Determinare le masse degli ioni prodotto **23**

Attività 5. Trovare l'energia di collisione ottimale per l'acquisizione MRM **30**

Esercizio 2 – Parametri per l'ottimizzazione dell'acquisizione con il software Optimizer **34**

Attività 1. Usare il software Optimizer per ottimizzare i parametri di acquisizione **34**

Esercizio 3 – Sviluppare un metodo di acquisizione di MRM dinamico partendo da un file di dati di acquisizione MRM o da un metodo MRM **40**

Attività 1. Creare un file di batch a partire da un file di dati MRM già esistente **41**

Attività 2. Stampare un report nel programma Quantitative Analysis **44**

Attività 3. Creare un metodo di MRM dinamico usando la funzionalità Update dMRM **45**

Attività 4. Creare un metodo di MRM dinamico a partire da un metodo MRM **47**



Agilent Technologies

Utilizzare gli esercizi contenuti nella presente guida per imparare a usare il sistema LC/MS Agilent serie 6400 triplo quadrupolo. È possibile eseguire gli esercizi con SulfaDrugs, i file di dati dimostrativi forniti insieme al sistema (nella cartella **Data** del disco di installazione Qualitative Analysis), oppure con dati acquisiti dall'utente.

L'Esercizio 1 insegna a determinare le impostazioni di acquisizione migliori per eseguire l'analisi dei composti di interesse. Queste istruzioni aiutano a comprendere non solo come configurare una lista di lavoro in modo da ottimizzare i parametri dello strumento e ottenere una migliore sensibilità durante l'acquisizione, ma anche a utilizzare il programma Qualitative Analysis attraverso il quale è possibile identificare i valori dei parametri che generano una risposta del segnale ottimale. È comunque possibile leggere ulteriori informazioni sul programma Qualitative Analysis usando la *Guida alla familiarizzazione per l'analisi qualitativa* oppure la Guida in linea del programma di analisi qualitativa.

L'Esercizio 2 esemplifica l'uso del programma Optimizer. Il software Optimizer permette di ottimizzare i parametri di acquisizione. Segnatamente, automatizza la selezione del migliore ione precursore e la tensione del frammentatore per lo ione precursore più abbondante, la selezione dei migliori ioni prodotto, nonché l'ottimizzazione dei valori dell'energia di collisione di ciascuna transizione per un elenco di composti selezionati.

L'Esercizio 3 insegna a usare un file di dati acquisito oppure i risultati del report Quantitative Analysis per aggiornare un metodo di MRM dinamico. Questo metodo permette di configurare facilmente un metodo di MRM dinamico.

NOTA

Consultare la *Guida ai concetti* per apprendere il funzionamento dello spettrometro di massa a triplo quadrupolo e capire perché il frammentatore e le tensioni dell'energia di collisione svolgono un ruolo così importante. Per informazioni di riferimento, consultare il Capitolo 3 "Sensibilità del sistema MS Agilent triplo quadrupolo" contenuto nella *Guida ai concetti*. Consultare la Guida in linea per informazioni dettagliate sul funzionamento del programma.

Ogni attività è presentata in una tabella con tre colonne:

- Fasi – Usare queste informazioni generali per procedere autonomamente all'esplorazione del programma.
- Istruzioni dettagliate – Usare queste informazioni se si necessita di aiuto o si predilige un processo di apprendimento per fasi.
- Commenti – Leggere questa sezione per suggerimenti e informazioni aggiuntive su ciascuna fase dell'esercizio.

Prima di iniziare

Prima di iniziare è opportuno verificare che il sistema sia pronto. Se si intende acquisire dati, è necessario anche configurare lo strumento.

Preparazione del sistema

1 Verificare che:

- Il programma Data Acquisition sia installato.
- I moduli LC e il sistema LC/MS serie 6400 triplo quadrupolo siano stati configurati.
- Le prestazioni del sistema state verificate.
- Il sistema sia acceso.

Se queste operazioni non sono state ancora eseguite, consultare la *Guida all'installazione* dello strumento.

2 Copiare i file di dati sul PC.

Copiare la cartella denominata **SulfaDrugs** all'interno della cartella **Data** (presente sul disco di installazione Qualitative Analysis) su una posizione del disco rigido locale. Questa cartella contiene tutti i file di dati necessari per l'esercizio.

NOTA

Non riutilizzare i file di dati SulfaDrug già presenti nel sistema a meno che non si è certi di averli copiati dagli originali sul disco e di essere gli unici utilizzatori di questi file.

Preparazione per l'acquisizione dati

Se non si intende acquisire dati ma si desidera, piuttosto, imparare a usare il programma Qualitative Analysis per sviluppare un metodo, è possibile saltare questa fase che descrive come preparare il campione dimostrativo. Eseguire quindi quelle attività che spiegano come usare il programma Qualitative Analysis con i file di dati SulfaDrug forniti con il sistema.

Elenco dei componenti

L'esercizio in questa guida utilizza i materiali e le attrezzature di seguito descritti:

- Moduli LC Agilent 1200, 1260 Infinity o 1290 Infinity: campionatore con piastra a pozzetti, pompa binaria, comparto colonna termostato, DAD
- Colonna Zorbax (vedere [Tabella 1](#) a pagina 4)
- Una miscela campione di sulfamidici da 10- μ L (preparata in questa fase)

Tabella 1 Colonne Zorbax

Tripla quadrupolo	Descrizione colonna	Spessore pellicola	Grandezza pori	Codice
6410B, 6420, 6430, 6460 e 6490	SB-C18 2,1 mm x 50 mm	1,8 µm	80Å	822700-902

1 Preparare il solvente LC.

In serbatoi da 1 litro contenenti acqua e acetonitrile (ACN) di qualità per HPLC, aggiungere 1 mL di 5M NH_4HCO_2 (formiato di ammonio) ciascuno per produrre 5 mM di NH_4HCO_2 in acqua e acetonitrile, da utilizzare per i canali A e B rispettivamente.

2 Preparare il campione.

- a** Aggiungere 10 µL della miscela di sulfamidici prelevata da una delle fiale (500 µL) a 990 µL di solvente A in una fiala di Eppendorf, in modo che la concentrazione finale sia di 1 ng/µL.
- b** Collocare una fiala campione contenente una quantità iniettabile del campione preparato all'interno dell'autocampionatore.

3 Configurare la colonna LC.

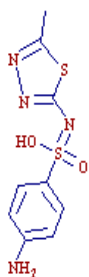
Usare l'appropriata colonna Agilent dalla [Tabella 1](#).

4 Impostare la temperatura della colonna.

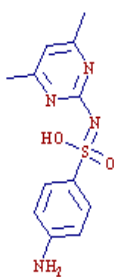
Per i modelli Agilent 6460 e 6490 con tecnologia Agilent Jet Stream, impostare la temperatura della colonna a 60 °C.

Per i modelli Agilent 6420 e 6430 e per i modelli Agilent 6460 e 6490 senza tecnologia Agilent Jet Stream, impostare la temperatura della colonna a 40 °C. Questo esercizio può essere eseguito anche a temperatura ambiente.

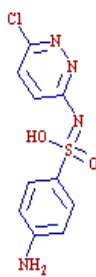
Il campione dimostrativo per LC elettrospray (cod. art. 59987-20033) contiene cinque fiale contenenti 100 ng/µL ciascuna di sulfametizolo $(\text{M}+\text{H})^+ = 271$, sulfametazina $(\text{M}+\text{H})^+ = 279$, sulfacloropiridazina $(\text{M}+\text{H})^+ = 285$, e sulfadimetossina $(\text{M}+\text{H})^+ = 311$.



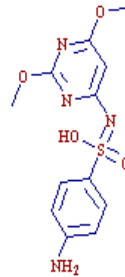
Sulfamethizole



Sulfamethazine



Sulfachloropyridazine



Sulfadimethoxine

NOTA

La determinazione dei valori dei parametri ottimali necessaria per l'acquisizione dei dati dei composti campione richiede che lo strumento Agilent a triplo quadrupolo sia già calibrato sugli ioni calibranti con miscela di calibrazione. Prima di continuare l'esercizio, assicurarsi di aver usato le funzioni Checktune o Autotune per verificare che l'attribuzione di massa, l'ampiezza di picco e l'intensità del segnale siano quelle corrette per gli ioni calibranti..

Consultare la *Guida introduttiva*, la *Guida all'installazione* o la Guida in linea per istruzioni su come calibrare lo strumento.

Esercizio 1 - Sviluppare un metodo di acquisizione per la serie 6400

Attività 1. Immettere i parametri di acquisizione e acquisire i dati

Esercizio 1 - Sviluppare un metodo di acquisizione per la serie 6400

In questo esercizio viene analizzata una miscela di quattro composti di sulfonamidi.

Attività 1. Immettere i parametri di acquisizione e acquisire i dati

In questo esercizio si immettono le condizioni per l'analisi della miscela di sulfamidici.

Fasi	Istruzioni dettagliate	Commenti
1 Inserire i parametri LC appropriati per la miscela di sulfamidici. Vedere Tabella 2 .	a Fare doppio clic sull'icona Data Acquisition . b Verificare che Acquisition sia visualizzata come selezione all'interno della casella di testo Context . Se la selezione è Tune, fare clic su Acquisition dal menu a discesa Context nella barra combinata. c Immettere i parametri LC elencati nella Tabella 2 .	Viene visualizzata la finestra Data Acquisition. Vedere Figura 1.

Tabella 2 Parametri LC per la miscela di sulfamidici

Parametro	Parametro LC
POMPA	
• Flowrate	800 µL/min
• Solvent A	5 mM NH ₄ HCO ₂ in H ₂ O
• Solvent B	5 mM NH ₄ HCO ₂ nel rapporto 90:10 acetonitrile:acqua
• Gradient (min - %B)	0 min - 13% 1,80 min - 60% 2 min - 60%
• Stop Time	2,0 min
• Post Time	2,0 min
INIETTORE	
• Inj. Vol.	2,0 µL
• Injection	Standard

Esercizio 1 - Sviluppare un metodo di acquisizione per la serie 6400

Attività 1. Immettere i parametri di acquisizione e acquisire i dati

Tabella 2 Parametri LC per la miscela di sulfamidici (segue)

Parametro	Parametro LC
• Draw Position	0,0 mm
RIVELATORE UV	
• Ch A	254 nm (4 nm BW su rivelatore DAD)
• REF A (solo DAD)	400 nm (80 nm BW)
TERMOSTATO COLONNA	
• Temp	60 °C per i modelli 6460 e 6490 con tecnologia Agilent Jet Stream 40 °C per altri strumenti

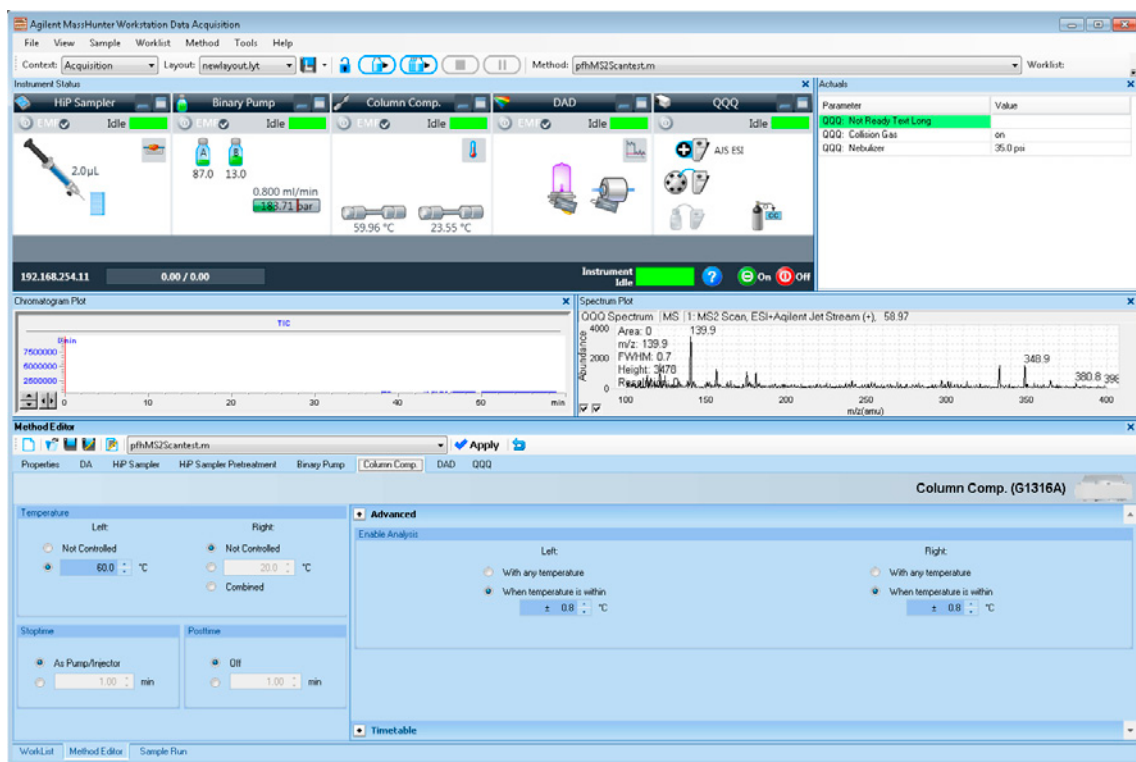


Figura 1 Software Agilent MassHunter Workstation – Finestra Data Acquisition

Esercizio 1 - Sviluppare un metodo di acquisizione per la serie 6400

Attività 1. Immettere i parametri di acquisizione e acquisire i dati

Fasi	Istruzioni dettagliate	Commenti
2 Inserire i parametri MS appropriati per la miscela di sulfamidici e salvare il metodo come <i>iii</i> MS2Scantest.m , dove <i>iii</i> sono le iniziali dell'utente. Vedere Tabella 3 .	a Fare clic sulla scheda QQQ nella finestra Method Editor. b Selezionare MS2Scan dall'elenco Scan Type contenuto nella tabella Time Segments. c Immettere gli altri parametri MS come elencato nella Tabella 3. Questi parametri si trovano nella scheda Acquisition o nella scheda Source. d Salvare il metodo come <i>iii</i>MS2Scantest.m, dove <i>iii</i> sono le iniziali dell'utente.	

Tabella 3 Parametri MS per la miscela di sulfamidici

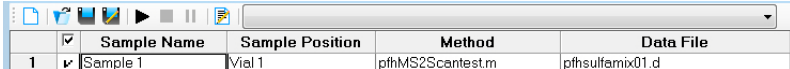
Parametro	Valore	
• Inlet	ESI (polarità positiva)	ESI (polarità positiva) con tecnologia Agilent Jet Stream
• Scan Type	MS2Scan	MS2Scan
• Delta EMV pos	400 V	200 V
• Mass Range	da 100 a 400	da 100 a 400
• Cell Acceleration Voltage	7 V	7 V
• Gas Temp	350 °C 250 °C per iFunnel su Agilent 6490	350 °C 250 °C per iFunnel su Agilent 6490
• Gas Flow	12 L/min	10 L/min
• Nebulizer	50 psi	35 psi (azoto)
• Sheath Gas Temperature	non applicabile	400 °C
• Sheath Gas Flow	non applicabile	12 L/min
• Nozzle Voltage	non applicabile	0 V
• Capillary Voltage positive	4000 V	4000 V

Esercizio 1 - Sviluppare un metodo di acquisizione per la serie 6400

Attività 1. Immettere i parametri di acquisizione e acquisire i dati

The screenshot shows the Agilent QQQ method editor. On the left, the 'Scan Type' dropdown is set to 'MS2 Scan'. Below it, the 'Scan segments' table is visible, showing a single segment from 100 to 400 m/z. On the right, the 'Scan parameters' section shows 'Step size' as 0.1 amu and 'Data storage' as 'Profile'.

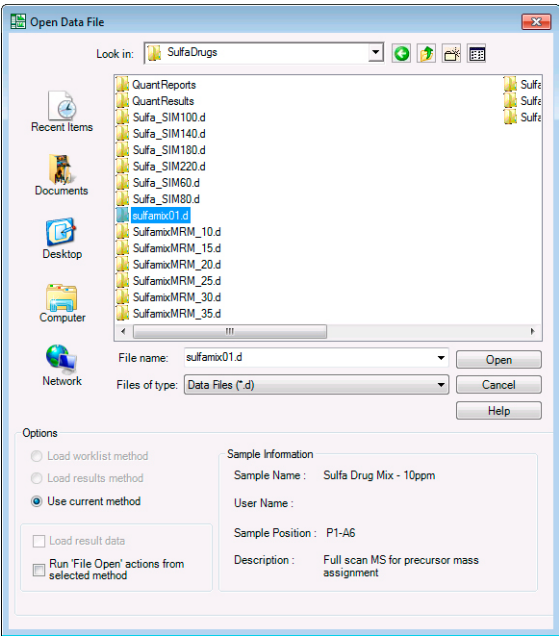
Figura 2 Selezionare **Scan Type** di MS2 Scan nella scheda QQQ

Fasi	Istruzioni dettagliate	Commenti
3	Acquisire i dati (facoltativo).	
	• Configurare una lista di lavoro a una riga con il metodo appena creato. • Denominare il file di dati iiiisulfamix01.d, dove iii sono le iniziali dell'utente. • Scegliere un percorso directory per archiviare i file di dati e il metodo.	• Per impostazione predefinita, la finestra Worklist viene visualizzata come scheda all'interno della finestra Method Editor. Fare clic sulla scheda Worklist per visualizzare la finestra Worklist. • Number of samples è impostato su 1. • L'acquisizione del file di dati MS con scansione completa è terminata ed è possibile vedere quali ioni si stanno formando a partire dal campione. • Questa fase è facoltativa poiché è possibile eseguire la fase successiva con un file di dati esemplificativo fornito con il programma. In alternativa, è possibile creare un file di dati proprio come descritto in questa fase.
	- a Se necessario, fare clic su View > Worklist per visualizzare la finestra Worklist. - b Fare clic su Worklist > Worklist Run Parameters. Verificare che i parametri siano impostati correttamente. Fare clic su OK. - c Fare clic su Worklist > Add Multiple Samples. - d Digitare iiiisulfamix01.d come nome del file di dati. - e Selezionare iiiMS2Scantest.m come nome del metodo. - f Fare clic sulla scheda Sample Position. - g Selezionare Autosampler, Well-plate oppure Vial Tray. - h All'interno del grafico selezionare una posizione singola. Fare clic su OK. - i Nella finestra Worklist, selezionare la casella di controllo a sinistra del campione come illustrato in basso.	
		
	j Fare clic sull'icona Start Worklist Run nella barra degli strumenti principale, sull'icona Run Worklist nella barra degli strumenti Worklist, oppure fare clic sul comando Worklist > Run.	

Attività 2. Determinare le masse degli ioni precursore

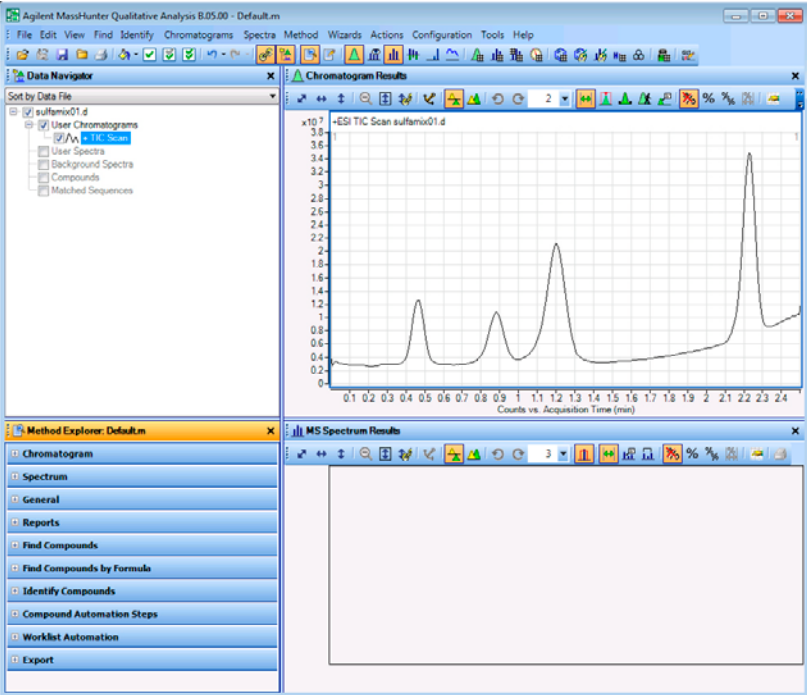
In questo esercizio è possibile determinare gli ioni precursore per ciascuno dei sulfamidici nel file di dati che è stato appena acquisito.

Fasi	Istruzioni dettagliate	Commenti
1 Aprire il file di dati acquisito. Nel programma Qualitative Analysis, aprire il file esemplificativo, sulfamix01.d, oppure il file di dati creato in “Attività 1. Immettere i parametri di acquisizione e acquisire i dati” a pagina 6.	a Fare doppio clic sull'icona Qualitative Analysis.  Il programma visualizza la finestra di dialogo "Open Data File".	- Quando si apre la directory SulfaDrugs dopo l'installazione, la casella di controllo Load result data (in basso a sinistra) appare in grigio. - Se la casella è selezionata, significa che il file di dati contiene già i risultati. Deselezionare la casella di controllo prima di aprire il file.



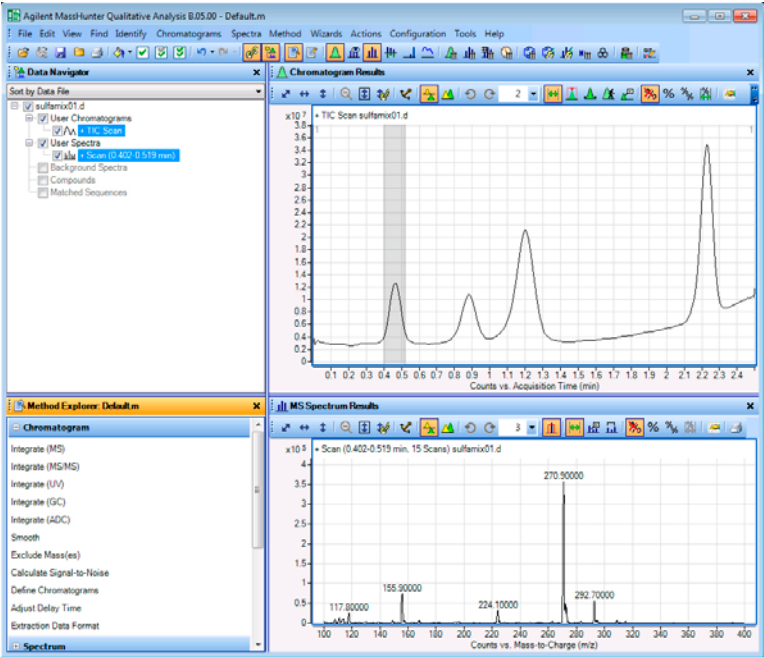
Esercizio 1 - Sviluppare un metodo di acquisizione per la serie 6400

Attività 2. Determinare le masse degli ioni precursore

Fasi	Istruzioni dettagliate	Commenti
	b Eseguire una delle seguenti operazioni: - Selezionare il file di dati esemplificativo sulfamix01.d, quindi fare clic su Open. - Selezionare il file di dati creato in "Attività 1. Immettere i parametri di acquisizione e acquisire i dati" a pagina 6 e fare clic su Open. Per impostazione predefinita, il sistema visualizza il cromatogramma di corrente ionica totale (Total Ion Chromatogram, TIC).	- La figura in basso mostra il layout predefinito. - Il programma Qualitative Analysis visualizza un file di dati appena aperto con lo stesso layout e le impostazioni di visualizzazione utilizzati per il precedente file di dati. Pertanto, è INDISPENSABILE assicurarsi di ripristinare le impostazioni predefinite per questo esercizio.
Prima di iniziare, verificare che tutte le precedenti impostazioni siano state ripristinate ai valori predefiniti: - Ripristinare i layout predefiniti - Fare clic su Configuration > Window Layouts > Restore Default Layout. - Assicurarsi che il metodo sia default.m. (vedere barra del titolo) - Fare clic su Method > Open. - Selezionare default.m, quindi fare clic su Open. - Ripristinare le opzioni di visualizzazione alle impostazioni predefinite. - Nel menu Configuration, fare clic su ciascuno dei comandi Display Options. - Fare clic su Default, quindi su OK. In alternativa... - Ripristinare il layout generale. - Fare clic su Configuration > Configure for Workflow > General. - Fare clic su OK. (facoltativo) Potrebbe essere necessario salvare le modifiche apportate al metodo. - Ripristinare le opzioni di visualizzazione alle impostazioni predefinite. - Nel menu Configuration, fare clic su ciascuno dei comandi Display Options. - Fare clic su Default, quindi su OK.		

Esercizio 1 - Sviluppare un metodo di acquisizione per la serie 6400

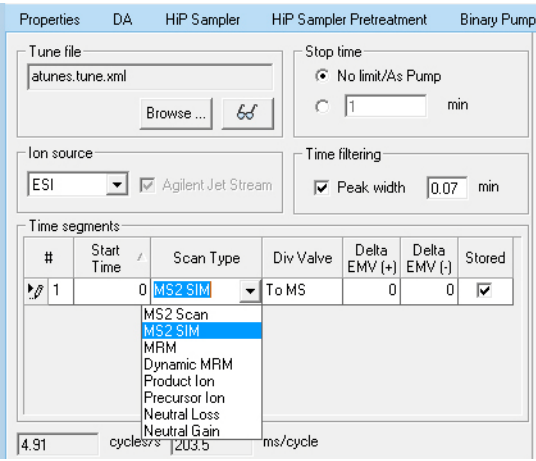
Attività 2. Determinare le masse degli ioni precursore

Fasi	Istruzioni dettagliate	Commenti															
2 Determinare le masse degli ioni precursore per tutti i quattro picchi. Le masse sono state determinate correttamente se i valori ottenuti sono simili a quelli illustrati in tabella:	a Nella finestra Chromatogram Results, verificare che l'icona Range Select nella barra degli strumenti  sia attiva. b Fare clic con il pulsante sinistro e trascinare il cursore attraverso il primo picco per produrre una regione ombreggiata, come illustrato nella figura in basso. c Fare clic con il tasto destro sull'area ombreggiata, quindi selezionare Extract MS Spectrum dal menu di scelta rapida.	- Il sistema visualizza la media di uno spettro attraverso il picco nella finestra MS Spectrum Results. - La massa del precursore del primo composto, il sulfametizolo, viene determinata con un valore m/z di 270,9. - Per ottenere una scansione singola, fare doppio clic sul punto più alto del picco.															
<table><tr><th>Compound</th><th>RT</th><th>m/z</th></tr><tr><td>Sulfamethizole</td><td>0.47</td><td>270.9</td></tr><tr><td>Sulfachloropyridazine</td><td>0.88</td><td>284.9</td></tr><tr><td>Sulfamethazine</td><td>1.20</td><td>279.0</td></tr><tr><td>Sulfadimethoxine</td><td>2.23</td><td>311.0</td></tr></table>	Compound	RT	m/z	Sulfamethizole	0.47	270.9	Sulfachloropyridazine	0.88	284.9	Sulfamethazine	1.20	279.0	Sulfadimethoxine	2.23	311.0		
Compound	RT	m/z															
Sulfamethizole	0.47	270.9															
Sulfachloropyridazine	0.88	284.9															
Sulfamethazine	1.20	279.0															
Sulfadimethoxine	2.23	311.0															
- Se il file di dati è stato acquisito utilizzando la tecnologia Agilent Jet Stream, i tempi di ritenzione potrebbero essere differenti. - Il file di dati sulfamix01.d è stato acquisito con una colonna diversa, di conseguenza i tempi di ritenzione sono differenti. - Chiudere il file di dati dopo aver trovato le masse degli ioni precursore.		d Ripetere da fase a a fase c per gli altri composti. Le masse degli ioni precursore dovrebbero corrispondere a quelle della tabella nella fase 2. e Fare clic su File > Close Data File. f Quando viene richiesto di salvare i risultati, fare clic su No. Alcuni composti formano anche addotti di sodio (Na) e/o di potassio (K), corrispondenti alle masse $M + 23$ e $M + 39$ rispettivamente. Visualizzare queste masse insieme a $M + H$ può offrire una rapida conferma di quale sia lo ione pseudomolecolare ($M + H$).															

Attività 3. Trovare la tensione frammentatore ottimale per una risposta al massimo grado

L'attività 3 spiega come eseguire l'ottimizzazione della tensione del frammentatore creando esperimenti per il monitoraggio di ioni selezionati per ciascun composto in funzione di un metodo, e configurando più metodi con tensioni frammentatore differenti.

La tensione del frammentatore per il modello 6490 viene impostata automaticamente durante l'Autotune e non può essere impostata nel programma di acquisizione dati. Se lo strumento è 6490, passare a “Attività 4. Determinare le masse degli ioni prodotto”. È possibile eseguire la parte di analisi qualitativa di questa attività usando i file di dati forniti con il software.

Fasi	Istruzioni dettagliate	Commenti
1 Configurare sei metodi per sei differenti tensioni del frammentatore. • Passare a un esperimento SIM. • Usare 60, 80, 100, 140, 180 e 220 volt come tensioni frammentatore per i sei metodi. • Salvare i metodi come iiiMS2SIMxxx.m, dove iii sono le iniziali dell'utente e xxx è la tensione.	a Nell'elenco a discesa Scan Type, fare clic su MS2 SIM. 	

Esercizio 1 - Sviluppare un metodo di acquisizione per la serie 6400

Attività 3. Trovare la tensione frammentatore ottimale per una risposta al massimo grado

Fasi

Istruzioni dettagliate

Commenti

b

Nella scheda **Acquisition**, popolare i campi **Compound Name** e **Mass** (massa degli ioni precursore) per la sulfadimetossina.

c

Fare clic con il tasto destro in un punto qualsiasi della sezione Scan segments, quindi fare clic su **Add Row**.

d

Popolare i campi **Compound Name** e **Mass** per la sulfachloripiridazina.

e

Ripetere le fasi c e d per la sulfametazina e il sulfametizolo.

f

Salvare il metodo come *iii*MS2SIM140.m, dove *iii* sono le iniziali dell'utente.

g

Modificare la tensione del frammentatore a 60 e salvare il metodo come ***iii*MS2SIM060**, dove *iii* sono le iniziali dell'utente.

h

Ripetere **fase g** per le tensioni 80, 100, 180 e 220, salvando i metodi come ***iii*MS2SIM080**, ***iii*MS2SIM100**, ***iii*MS2SIM180** e ***iii*MS2SIM220**, dove *iii* sono le iniziali dell'utente.

• Quando MS2SIM Scan Type è impostato, nella finestra Acquisition viene visualizzato un insieme di colonne differente.

• Il programma Instrument Control e Data Acquisition crea un esperimento SIM per ciascuna massa dei composti, partendo con una tensione frammentatore predefinita di 140. Vedere l'esempio in basso.

• La colonna Fragmentor appare in grigio se il tipo di strumento è il modello Agilent 6490.

Acquisition | Source | Chromatogram | Instrument | Diagnostics

Scan segments

Compound Name	ISTD?	Mass	MS2 Res	Dwell	Fragmentor	Cell Accelerator Voltage	Polarity
sulfadimethoxine	☐	311 Unit		200	140	7	Positive
sulfachloropyridazine	☐	285 Unit		200	140	7	Positive
sulfamethazine	☐	279 Unit		200	140	7	Positive
sulfamethizole	☐	271 Unit		200	140	7	Positive

Esercizio 1 - Sviluppare un metodo di acquisizione per la serie 6400

Attività 3. Trovare la tensione frammentatore ottimale per una risposta al massimo grado

Fasi	Istruzioni dettagliate	Commenti
2 Configurare ed eseguire la lista di lavoro (facoltativo). - Configurare sei campioni con il nome campione SulfaDrugMix per iniettare 1 ul dalle fiale 1-6 o da fiale a piacere. - Specificare i file di dati come iiiSulfaSIMxxx.d, dove iii sono le iniziali dell'utente e xxx è la tensione.	a Se necessario, fare clic sull'icona Worklist per assicurarsi che la lista di lavoro sia visibile. b Fare clic su Worklist > New per avviare una nuova lista di lavoro. Non è necessario salvare l'ultima lista di lavoro. c Per configurare l'esecuzione, fare clic con il tasto destro nell'angolo in alto a sinistra della lista di lavoro, quindi fare clic su Worklist Run Parameters. d Immettere i percorsi per il metodo e i file di dati. e Immettere le informazioni per l'esecuzione della tensione 60. f Fare clic su Worklist > Add Sample. Un altro campione è stato aggiunto alla lista di lavoro. Aggiungere cinque campioni alla lista di lavoro per le tensioni 80-220. g Selezionare la casella di controllo a sinistra del nome campione per ognuno dei sei campioni.	Questa fase è facoltativa poiché è possibile utilizzare i file di dati forniti con il sistema per eseguire molte delle attività descritte in questo esercizio.

	Sample Name	Sample Position	Method	Data File	Sample Type	Lev
1	Sample 1	Vial 1	pthMS2SIM60.m	SulfaSim60.d	Sample	
2	Sample 1	No Injection	pthMS2SIM80.m	SulfaSim80.d	Sample	
3	Sample 1	No Injection	pthMS2SIM100.m	SulfaSim100.d	Sample	
4	Sample 1	No Injection	pthMS2SIM140.m	SulfaSim140.d	Sample	
5	Sample 1	No Injection	pthMS2SIM180.m	SulfaSim180.d	Sample	
6	Sample 1	No Injection	pthMS2SIM220.m	SulfaSim220.d	Sample	

- h** Avviare la lista di lavoro.
- Fare clic su **Worklist > Run**.
 - Fare clic sull'icona  nella barra degli strumenti principale.
 - Fare clic sull'icona  nella barra degli strumenti della lista di lavoro.
- Si noti che il programma esegue soltanto quei campioni contrassegnati con un segno di spunta.
 - È possibile eseguire la lista di lavoro anche in modalità bloccata facendo clic sul pulsante

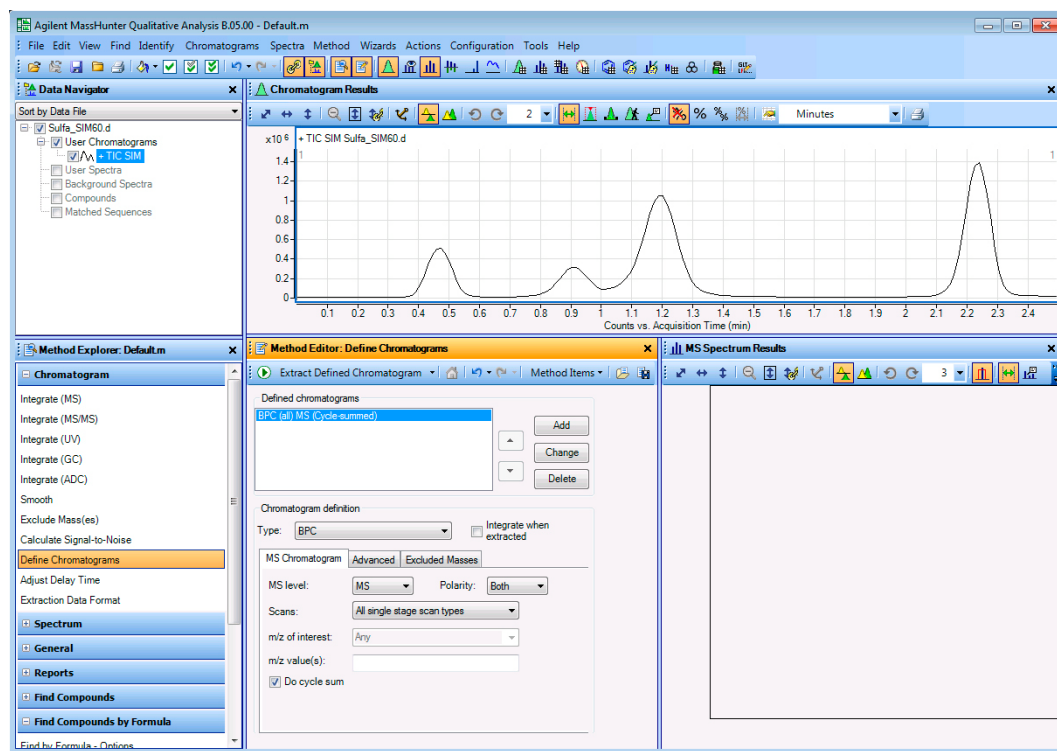


nella barra degli strumenti principale.

Esercizio 1 - Sviluppare un metodo di acquisizione per la serie 6400

Attività 3. Trovare la tensione frammentatore ottimale per una risposta al massimo grado

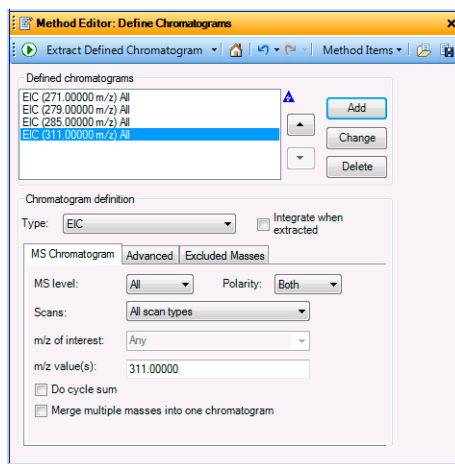
Fasi	Istruzioni dettagliate	Commenti
3	Configurare un metodo qualitativo per visualizzare i dati degli EIC in maniera automatica. - Aprire il file di dati Sulfa_SIM60.d o il file iiiSulfa_SIM60.d creato, dove iii sono le iniziali dell'utente. - In Method Editor, aggiungere gli EIC corrispondenti alle masse degli ioni precursore di 271, 279, 285 e 311. - Salvare il metodo come iiiExercise1, dove iii sono le iniziali dell'utente.	Si dovrebbe aprire il programma Qualitative Analysis. In caso contrario, vedere "Fare doppio clic sull'icona Qualitative Analysis." a pagina 10.



Esercizio 1 - Sviluppare un metodo di acquisizione per la serie 6400

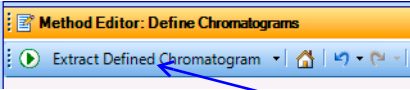
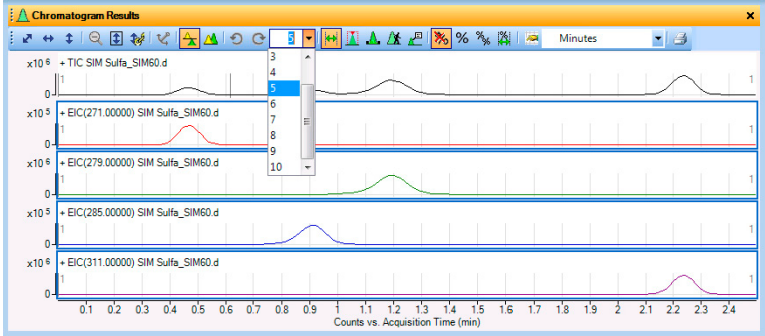
Attività 3. Trovare la tensione frammentatore ottimale per una risposta al massimo grado

Fasi	Istruzioni dettagliate	Commenti
d	Se necessario, fare clic su Define Chromatograms nella sezione Chromatogram di Method Explorer.	- Dopo l'installazione, la selezione elenco predefinita in Method Editor sarà Integrate (MS). - È inoltre possibile selezionare Define Chromatograms dall'elenco Method Items nella finestra Method Editor.
e	Per eliminare il cromatogramma BPC, fare clic su Delete .	
f	Selezionare EIC per Chromatogram Definition Type .	
g	Nella scheda MS Chromatogram, assicurarsi che MS Level sia impostato su All e che Scans sia impostato su All scan types .	
h	Deselezionare la casella di controllo Do cycle sum .	
i	Immettere 271 per il campo m/z value .	
j	Fare clic su Add .	
k	Ripetere le fasi i-j per gli altri ioni precursore, 279, 285 e 311.	
l	Fare clic su Method > Save As . Il sistema apre la finestra di dialogo Save As.	
m	Salvare il metodo come Exercise 1.m .	
n	Fare clic su Save .	



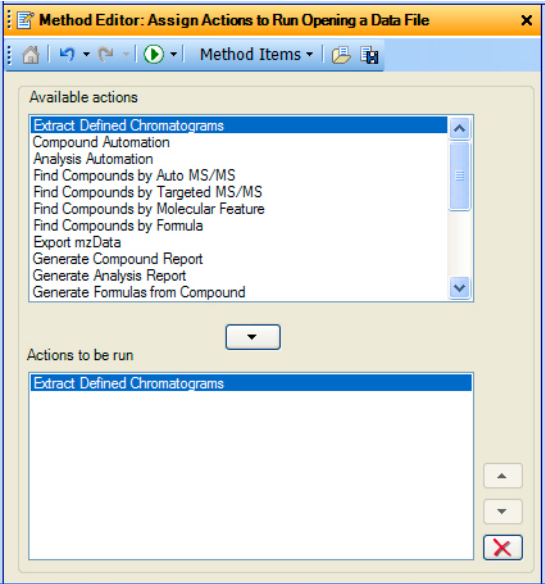
Esercizio 1 - Sviluppare un metodo di acquisizione per la serie 6400

Attività 3. Trovare la tensione frammentatore ottimale per una risposta al massimo grado

Fasi	Istruzioni dettagliate	Commenti
4 Estrarre il cromatogramma per il file di dati e visualizzare i risultati. Assicurarsi di visualizzare tutti i cinque cromatogrammi, il TIC e gli EIC.	a Fare clic sul pulsante Run nella barra degli strumenti Method Editor.  b Per visualizzare il TIC e gli EIC, fare clic sulla freccia accanto all'icona Maximum Number of List Panes nella barra degli strumenti Chromatogram Results, come illustrato nell'esempio riportato. c Selezionare 5 per visualizzare cinque cromatogrammi contemporaneamente. Il sistema visualizza i risultati dei cromatogrammi come illustrato in basso. 	È inoltre possibile fare clic sul comando Chromatograms > Extract Defined Chromatograms per estrarre i cromatogrammi definiti.

Esercizio 1 - Sviluppare un metodo di acquisizione per la serie 6400

Attività 3. Trovare la tensione frammentatore ottimale per una risposta al massimo grado

Fasi	Istruzioni dettagliate	Commenti
5 Estrarre i cromatogrammi degli ioni rimanenti in maniera automatica. - Extract Defined Chromatograms dovrebbe essere l'azione predefinita per le azioni da eseguire all'apertura di un file. - Aprire i file di dati rimanenti, da Sulfa_SIM80.d a Sulfa_SIM220.d. - Chiudere Method Explorer.	a Selezionare File Open Actions dalla sezione General in Method Explorer. b Assicurarsi che l'elenco Actions to be run contenga solo Extract Defined Chromatograms.	La finestra Method Editor del programma Qualitative Analysis permette di definire le azioni da eseguire automaticamente all'apertura di uno o più file.
	 The screenshot shows the 'Method Editor' window. The title bar reads 'Method Editor: Assign Actions to Run Opening a Data File'. Inside, there are two main sections: 'Available actions' and 'Actions to be run'. The 'Available actions' list includes: 'Extract Defined Chromatograms', 'Compound Automation', 'Analysis Automation', 'Find Compounds by Auto MS/MS', 'Find Compounds by Targeted MS/MS', 'Find Compounds by Molecular Feature', 'Find Compounds by Formula', 'Export mzData', 'Generate Compound Report', 'Generate Analysis Report', and 'Generate Formulas from Compound'. 'Extract Defined Chromatograms' is highlighted. Below this list is a dropdown arrow. The 'Actions to be run' section has a list box containing 'Extract Defined Chromatograms'. To the right of this list box are up and down arrow buttons and a red 'X' button.	
	c Fare clic su File > Open Data File. Il sistema visualizza la finestra di dialogo Open Data File. d Selezionare i file di dati da aprire, da Sulfa_SIM80.d a Sulfa_SIM220.d. e Selezionare la casella di controllo Run 'File Open' actions from selected method (in basso a sinistra).	

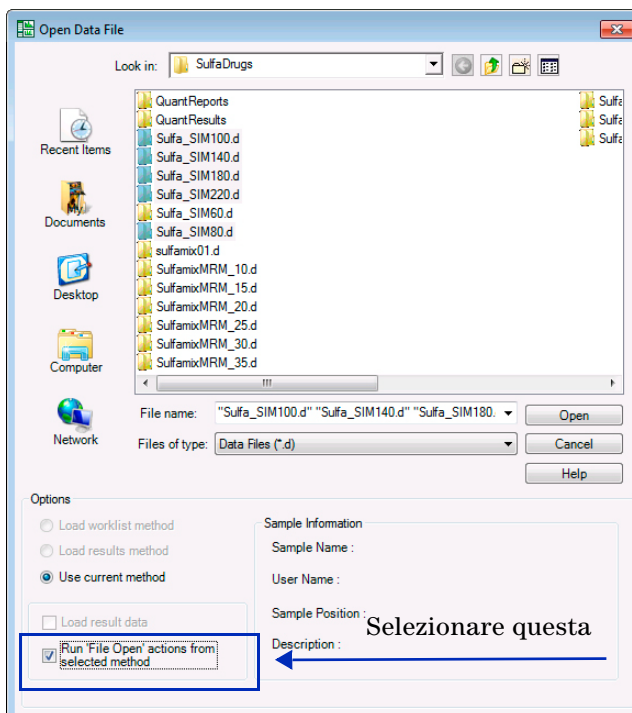
Esercizio 1 - Sviluppare un metodo di acquisizione per la serie 6400

Attività 3. Trovare la tensione frammentatore ottimale per una risposta al massimo grado

Fasi

Istruzioni dettagliate

Commenti



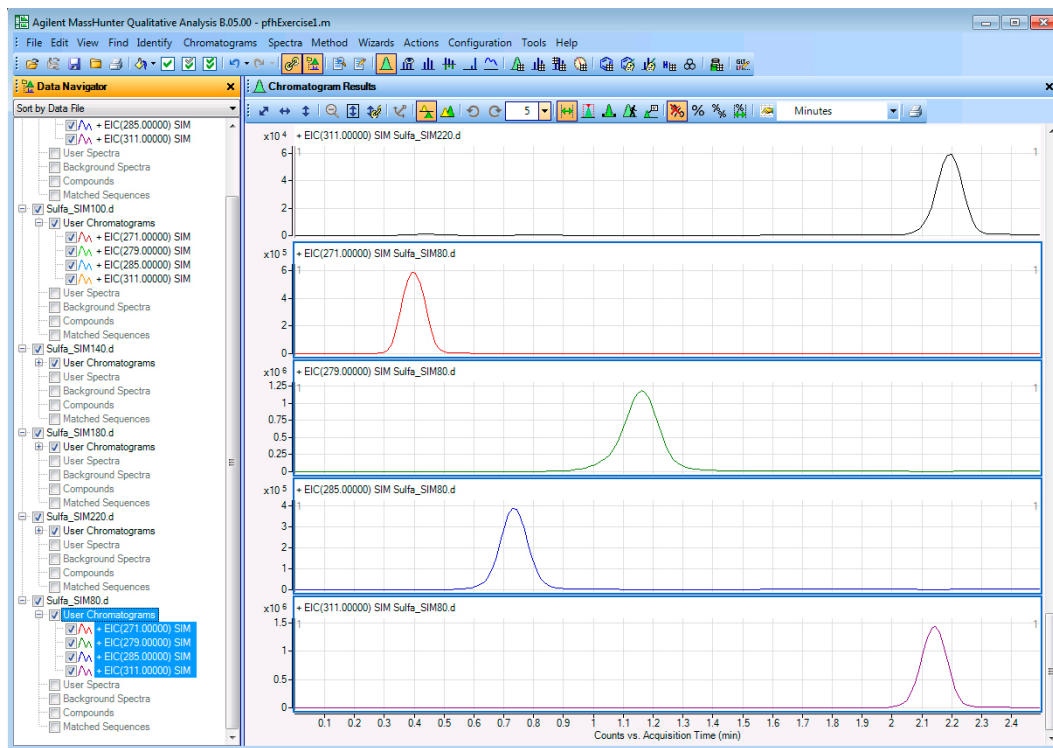
- f** Fare clic su **Open**.
Il programma Qualitative Analysis visualizza tutti gli EIC per tutti i file di dati selezionati.
- g** Per chiudere Method Explorer e Method Editor, fare clic sulla **X** in alto a destra di ciascuna finestra.
- È possibile chiudere le finestre Method Explorer e Method Editor anche facendo clic sul comando **View > Method Explorer** e sul comando **View > Method Editor**.

Esercizio 1 - Sviluppare un metodo di acquisizione per la serie 6400
Attività 3. Trovare la tensione frammentatore ottimale per una risposta al massimo grado

Fasi

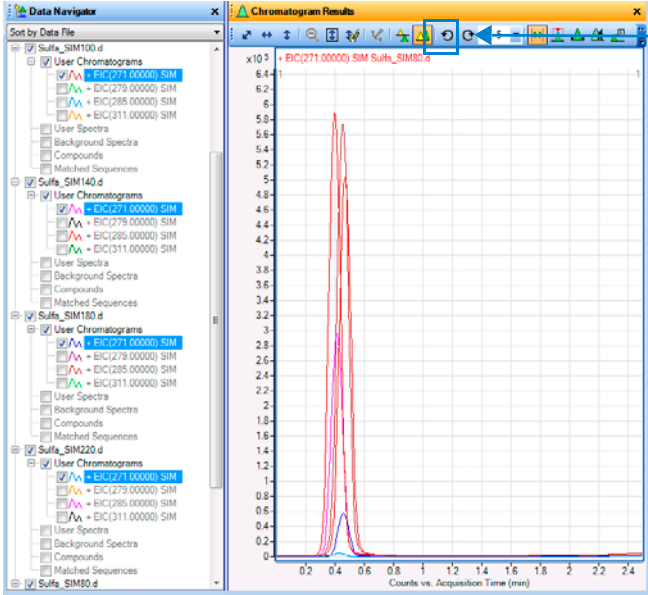
Istruzioni dettagliate

Commenti



Esercizio 1 - Sviluppare un metodo di acquisizione per la serie 6400

Attività 3. Trovare la tensione frammentatore ottimale per una risposta al massimo grado

Fasi	Istruzioni dettagliate	Commenti
6	Selezionare la tensione frammentatore che produce la massima risposta per ciascuno degli ioni precursore. Chiudere i file di dati dopo aver determinato la tensione ottimale.	- Premendo il tasto Ctrl è possibile selezionare più oggetti dalla finestra Data Navigator. - Premendo il tasto Maiusc è possibile selezionare un gruppo di oggetti. - Una tensione frammentatore di 100 dovrebbe essere adeguata per ciascuno degli ioni precursore. - È possibile determinare gli ioni prodotto disponibili per gli esperimenti MRM in modo da aumentare al massimo la sensibilità durante l'analisi.
	a Nella finestra Data Navigator, evidenziare gli EIC per un valore m/z di 271,0. b Fare clic sull'icona Show only the highlighted items.  Ora sono selezionate solo le caselle di controllo con m/z di 271. c Esaminare le intensità relative di ciascun picco per determinare quale sarà la migliore impostazione della tensione frammentatore da utilizzare per il precursore 271.	
		È possibile sovrapporre i cromatogrammi facendo clic sull'icona Overlaid Mode nella barra degli strumenti Chromatogram Results.
	d Ripetere da fase a a fase c per gli altri tre picchi di base o per gli ioni precursore. e Fare clic su File > Close Data File. f Fare clic su Close quando viene visualizzata la finestra di dialogo Close Data File.	Fare clic sui diversi EIC nella finestra Data Navigator per modificare il cromatogramma etichettato nella finestra Chromatogram Results. Quando il colore dell'etichetta del cromatogramma corrisponde al colore del cromatogramma di intensità più elevata, sarà utilizzata la tensione frammentatore che è stata utilizzata per quel file.

Attività 4. Determinare le masse degli ioni prodotto

In questa parte di sviluppo del metodo, saranno utilizzate tre energie di collisione per determinare i frammenti ionici migliori da utilizzare per l'acquisizione MRM finale.

Fasi	Istruzioni dettagliate	Commenti
1 Configurare tre metodi di acquisizione degli ioni prodotto e acquisire i dati. - Usare i parametri MS riportati nell'esempio in basso, ma modificare la tensione frammentatore alla tensione ottimale determinata nell'attività precedente. - Salvare i metodi come iiiSulfamix PI_xx.m, dove iii sono le iniziali dell'utente e xx è l'energia di collisione.	a Fare clic sulla scheda MS QQQ nel riquadro Method Editor. b Selezionare Product Ion nella casella combinata Scan Type per eseguire la scansione di tutti gli ioni precursore per i relativi ioni prodotto. c Immettere tutti i parametri MS come elencato nell'esempio riportato in basso, verificando che Collision Energy abbia un valore di 15 e che la tensione frammentatore sia impostata alla tensione ottimale determinata nell'Attività 3. d Salvare il metodo come iiiSulfamix PI_15.m . e Ripetere da fase c a fase d per le energie di collisione di 30 e 45.	- Quando si modifica Scan Type nella tabella Time Segments, la tabella Scan segments viene reimpostata. Per copiare i segmenti di scansione nella nuova tabella Scan segments, evidenziare tutte le righe della tabella Scan segments, fare clic con il tasto destro sulla tabella e poi su Copy. Dopo aver selezionato un nuovo valore per Scan Type, fare clic con il tasto destro sulla tabella Scan segments e selezionare Paste from Clipboard. - Non è possibile copiare e incollare la tabella Scan segments tra tutti i tipi di scansione.

The screenshot displays the 'MS QQQ' method configuration window. On the left, the 'Tune file' is set to 'atunes.tune.xml' and the 'Ion source' is 'ESI'. The 'Time segments' table shows a single scan with a 'Product Ion' scan type. The 'Scan segments' table on the right lists three scans with precursor ions 311, 285, and 279, all with a collision energy of 15. The 'Scan parameters' section shows a step size of 0.1 amu and data storage set to Profile.

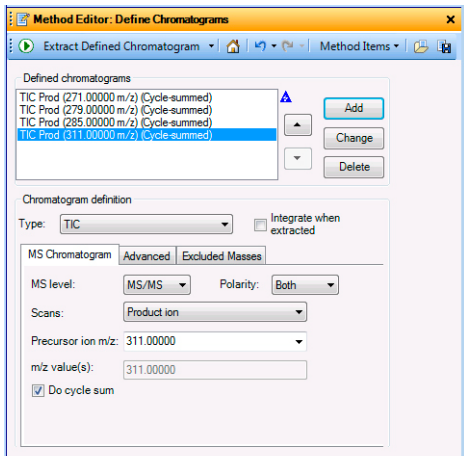
Segment Name	Precursor Ion	MS2 From	MS2 To	Scan Time	Fragmentor	Collision Energy	Cell Accelerator Voltage	Polarity
sulfamethoxine	311	50	320	250	140	15		
sulfachloropyridaz	285	50	320	250	140	15		7 Positive
sulfamethazine	279	50	320	250	140	15		7 Positive
sulfamethizole	270	50	320	250	140	15		7 Positive

2 Configurare ed eseguire la lista di lavoro (facoltativo). Specificare i file di dati come iiiSulfamix PI_xx.d, dove iii sono le iniziali dell'utente e xx è l'energia di collisione.	a Fare clic sulla scheda Worklist . b Aggiungere tre campioni alla lista di lavoro per le energie di collisione 15, 30 e 45. c Selezionare la casella di controllo a sinistra di Sample Name per ciascuno dei campioni che si sta aggiungendo. d Fare clic su Worklist > Run .	- Questa è facoltativa poiché è possibile determinare le masse degli ioni prodotto mediante i file di dati forniti con il sistema. - Usare le istruzioni indicate alla Fase 2 dell'Attività 3 per configurare la lista di lavoro.
--	--	--

Esercizio 1 - Sviluppare un metodo di acquisizione per la serie 6400

Attività 4. Determinare le masse degli ioni prodotto

Fasi	Istruzioni dettagliate	Commenti
3	Configurare un metodo qualitativo per integrare ed estrarre gli spettri degli ioni prodotto. - Usare i file di dati SulfamixPI_xx.d, dove xx è l'energia di collisione, oppure i file di dati creati dall'utente, iiiSulfamixPI_xx.d. - Aprire Method Explorer e Method Editor. - Usare i TIC configurati per l'analisi MS/MS, lo ione prodotto e ciascuno degli ioni precursore 271, 279, 285 e 311. - Verificare che l'integratore MS/MS sia stato selezionato e che il numero massimo di picchi sia limitato ai picchi più ampi con valore 100. - Aggiungere la possibilità di integrare ed estrarre gli spettri dei picchi alle azioni dei file da eseguire all'apertura dei dati. - Salvare le modifiche al metodo corrente.	Il programma Qualitative Analysis dovrebbe essere già aperto e contenere <i>iiiexercise 1.m</i> come metodo.
	a Fare clic sull'icona Open Data File nella barra degli strumenti. b Selezionare SulfamixPI_15.d. c Verificare che la casella di controllo Run File Open Actions from Specified Method sia selezionata, quindi fare clic su Open. d Verificare che le finestre Method Explorer e Method Editor siano visualizzate; in caso contrario, fare clic sulle icone Method Explorer e Method Editor. e Nella sezione Chromatogram della finestra Method Explorer, selezionare Define Chromatograms. f Eliminare tutti i cromatogrammi esistenti contenuti nell'elenco Defined Chromatograms. g Selezionare TIC dall'elenco Type nella sezione Define chromatograms. h Per il campo MS level, selezionare MS/MS. i Selezionare la casella di controllo Do cycle sum. j Per il campo Scans, selezionare Product ion. k Per il campo Precursor ion m/z, digitare 271. l Fare clic sul pulsante Add. m Ripetere le fasi j-k per tutti gli ioni.	



Esercizio 1 - Sviluppare un metodo di acquisizione per la serie 6400

Attività 4. Determinare le masse degli ioni prodotto

Fasi	Istruzioni dettagliate	Commenti
	- n Dalla finestra Method Explorer nella sezione Chromatogram, fare clic su Integrate (MS/MS). - o Se necessario, selezionare MS/MS come Integrator selection.	• Questi file di dati contengono dati MS/MS, per cui è necessario modificare i parametri nella sezione Integrate (MS/MS). Se il file di dati conteneva esclusivamente dati MS, sarà necessario modificare i parametri nella sezione Integrate (MS).

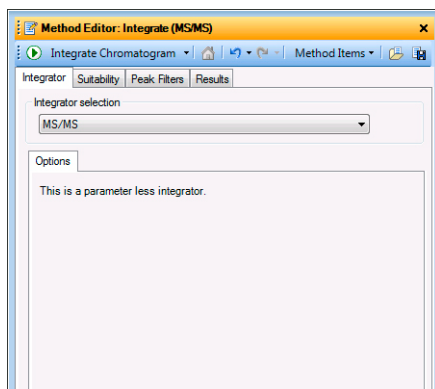


Figura 3 Scheda Integrate (MS/MS) > Integrator

- p Fare clic sulla scheda **Peak Filters**.
Verificare che la casella di controllo **Limit (by height) to the largest** sia selezionata e impostata al valore 100 come illustrato in basso.

Esercizio 1 - Sviluppare un metodo di acquisizione per la serie 6400

Attività 4. Determinare le masse degli ioni prodotto

Fasi	Istruzioni dettagliate	Commenti
------	------------------------	----------

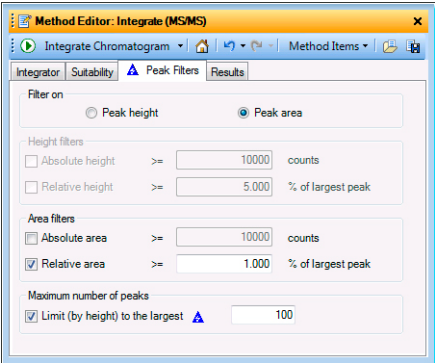


Figura 4 Scheda Integrate (MS/MS) > Peak Filters

- q Fare clic su **General** in Method Explorer, quindi su **File Open Actions**.
- r Selezionare **Integrate and extract peak spectra** dall'elenco delle azioni disponibili e fare clic su  per aggiungere l'azione a **Actions to be run**.

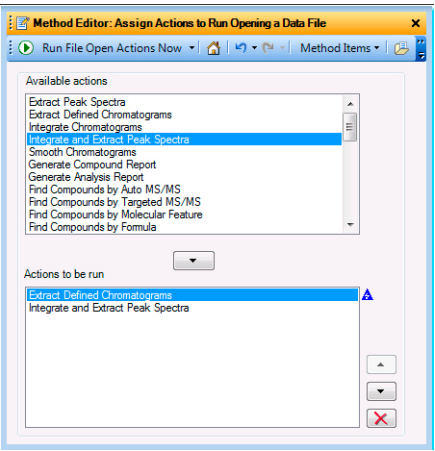


Figura 5 Scheda General > File Open Actions

Esercizio 1 - Sviluppare un metodo di acquisizione per la serie 6400

Attività 4. Determinare le masse degli ioni prodotto

Fasi	Istruzioni dettagliate	Commenti
	s Per applicare le modifiche al metodo corrente, ossia <code>///exercise1.m</code>, fare clic sull'icona Save Method.  È inoltre possibile fare clic su Method > Save.	
4 Eseguire il metodo qualitativo sul file di dati corrente.	Nella barra degli strumenti Method Editor, fare clic sul pulsante Run, . Quando viene visualizzata la sezione Assign Actions to Run Opening A Data File, viene eseguito l'elenco Actions to be run.	• Per prima cosa, il programma estrae i cromatogrammi degli ioni prodotto per ciascuno degli ioni precursore nel file di dati. • In seguito, va alla ricerca del picco più ampio in tutti i cromatogrammi di corrente ionica totale, quindi integra ed estrae gli spettri dei picchi per tutti i picchi integrati. • Vedere Figura 6 a pagina 28.

Esercizio 1 - Sviluppare un metodo di acquisizione per la serie 6400

Attività 4. Determinare le masse degli ioni prodotto

Fasi

Istruzioni dettagliate

Commenti

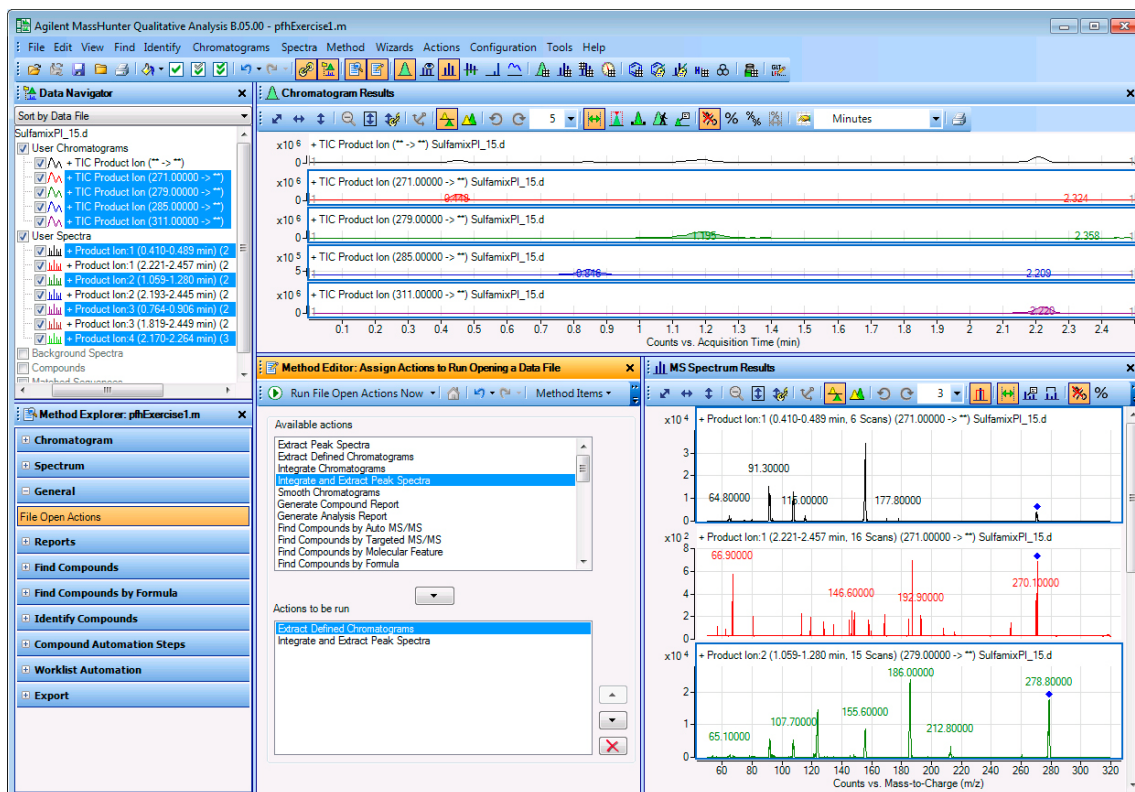


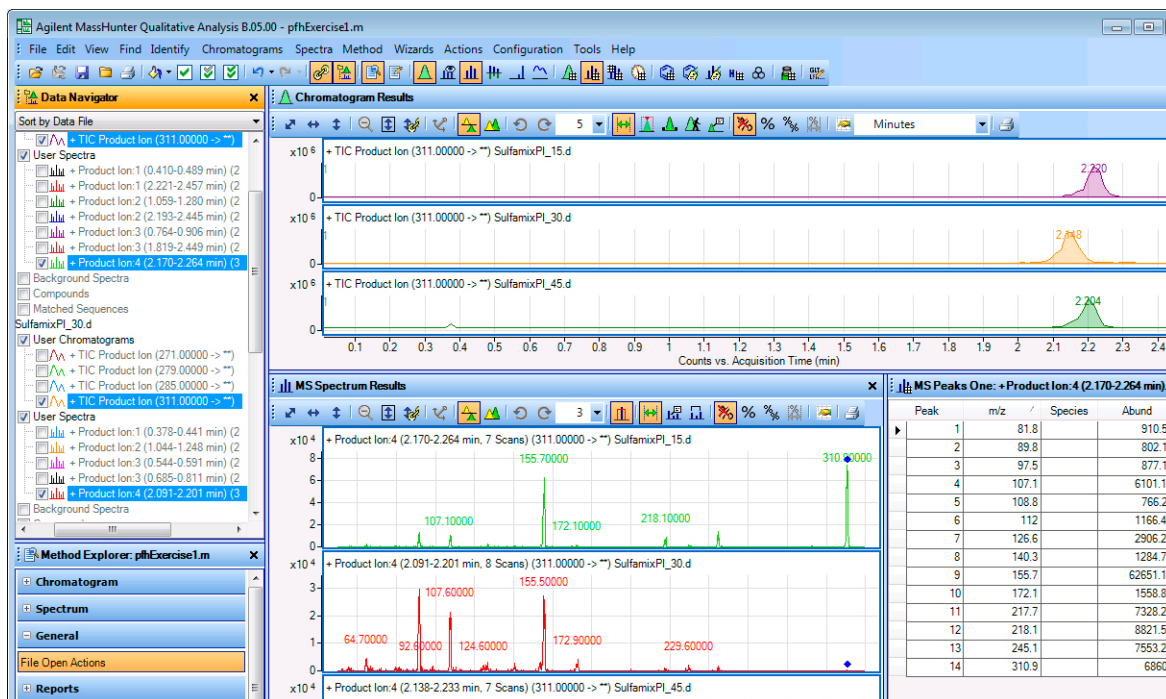
Figura 6 Risultati dell'integrazione e dell'estrazione spettrale dei picchi.

- 5 Eseguire le azioni 'File Open' sui file di dati dei restanti ioni prodotto.
- Usare i file di esempio, **Sulfamix PI_xx.d**, oppure i file di dati acquisiti in [fase 2](#).
- a Fare clic su **File > Open Data File**. Il sistema visualizza la finestra di dialogo Open Data File.
- b Tenere premuto il tasto **Ctrl** ed eseguire una delle seguenti azioni:
- Selezionare i due file di dati **Sulfamix PI_30.d**, e **Sulfamix PI_45.d**.
 - Selezionare i file di dati acquisiti in [fase 2](#).
- c Selezionare la casella di controllo **Run 'File Open' actions from selected method** nella finestra di dialogo Open Data File, quindi fare clic su **Open**.
- All'apertura dei file, il metodo Qual estrae innanzi tutto i cromatogrammi degli ioni prodotto per ogni ione precursore.
 - In seguito, va alla ricerca del picco più ampio in tutti i cromatogrammi di corrente ionica totale, quindi integra ed estrae gli spettri dei picchi per tutti i picchi integrati.

Esercizio 1 - Sviluppare un metodo di acquisizione per la serie 6400

Attività 4. Determinare le masse degli ioni prodotto

Fasi	Istruzioni dettagliate	Commenti
6	Identificare gli ioni prodotto.	
•	Visualizzare ciascun insieme di TIC e gli spettri singolarmente (ad es., m/z di 271 per primo).	
•	Chiudere i file di dati.	
a	In Data Navigator, selezionare i TIC e gli spettri per lo ione precursore con m/z di 271.	Lo ione prodotto con m/z di 155,7 è il più abbondante tra gli ioni prodotto e il segnale più alto è registrato a 15 V.
b	Fare clic sull'icona Show only the highlighted items .	Questo implica che una scelta valida per l'MRM per il sulfametizolo sarebbe 271,0 > 155,7 se l'energia di collisione è intorno ai 15 V.
c	Fare clic su View > MS Spectrum Peak List 1 .	Il picco potrebbe non essere etichettato se è troppo ampio.
d	Esaminare gli spettri per vedere quali frammenti ionici sono prodotti a quali energie di collisione.	
e	Ripetere le fasi a-d fino a identificare tutti gli ioni prodotto.	



f Fare clic sull'icona **Close Data File** nella barra degli strumenti principale, quindi su **Close** quando viene visualizzata la finestra di dialogo contenente l'elenco dei file di dati.

Sulfametizolo-271,0 > 155,7
 Sulfametazina-279,0 > 185,8
 Sulfaclopiridazina-285,0 > 155,7
 Sulfadimetossina-311,0 > 155,7

Attività 5. Trovare l'energia di collisione ottimale per l'acquisizione MRM

In questa attività vengono configurati i metodi di acquisizione MRM per i sulfamidici in base a energie di collisione differenti. Dall'esame degli spettri e dal confronto tra le intensità dei picchi, è possibile determinare le impostazioni dell'energia di collisione ottimale per i composti.

Fasi	Istruzioni dettagliate	Commenti
1 Configurare i tre metodi di acquisizione MRM. - Usare tutti i parametri MS riportati nell'esempio in basso, ad eccezione del valore dell'energia di collisione. - Usare le energie di collisione di 10, 15 e 20. - Salvare i metodi come iiiSulfamix MRM_xx.m, dove iii sono le iniziali dell'utente e xx è l'energia di collisione.	a Fare clic sulla scheda MS QQQ. b Impostare Scan Type su MRM. c Immettere tutti i parametri MS riportati nell'esempio in basso, ad eccezione del valore dell'energia di collisione. d Nella colonna dell'energia di collisione, digitare 10 per ogni composto. e Salvare il metodo come iiiSulfamix MRM_10.m. f Ripetere fase d e fase e per le energie di collisione di 15, 20, 25, 30 e 35 salvando i metodi come iiiSulfamix MRM_xx.m, dove iii sono le iniziali dell'utente e xx è l'energia di collisione.	Dal momento che, nell'esercizio precedente, i picchi più ampi sono stati prodotti con un'energia di collisione di 15, saranno prese in considerazione solo quelle energie di collisione a un lato di 15.

Tune file
atunes:tune.xml
Browse... 60'

Ion source
ESI

Time segments

#	Start Time	Scan Type	Div Valve	Delta EMV (+)	Delta EMV (-)	Stored
1	0	MRM	To MS	18	0	☒

4.67 cycles/s 214.0 ms/cycle

Stop time
☒ No limit/As Pump
☐ 1 min

Time filtering
☒ Peak width 0.07 min

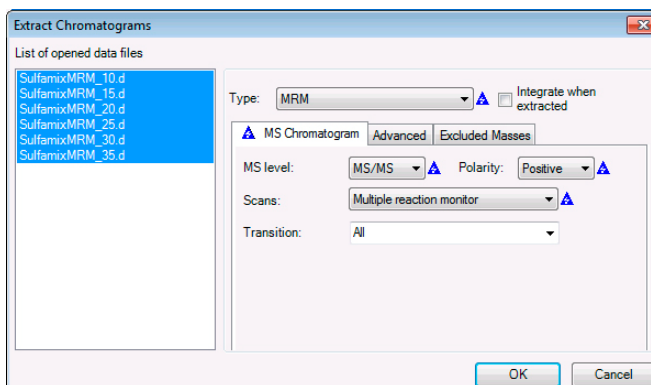
Acquisition | Source | Chromatogram | Instrument | Diagnostics |

Scan segments

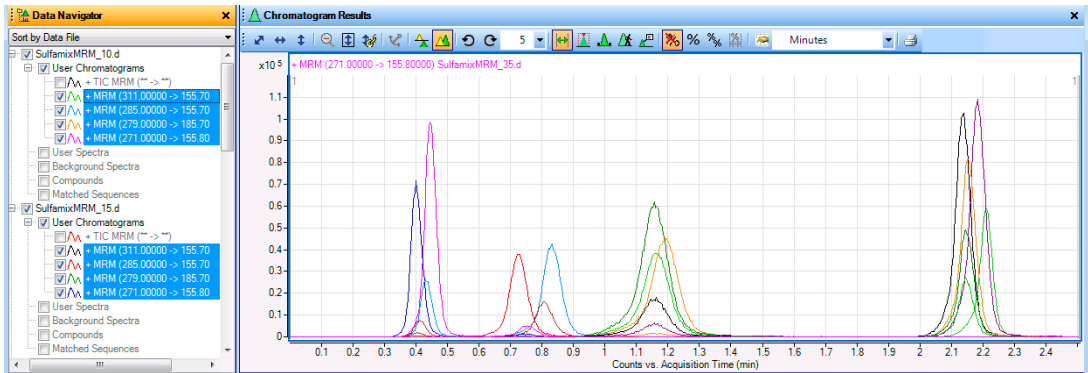
Compound Name	ISTD?	Precursor Ion	MS1 Res	Product Ion	MS2 Res	Dwell	Fragmentor	Collision Energy	Cell Accelerator Voltage	Polarity
Shladimethoxine	☐	311	Unit	155.7	Unit	50	100	10	7	Positive
Sulfachloropyradizine	☐	285	Unit	155.7	Unit	50	100	10	7	Positive
Sulfamethazine	☐	279	Unit	185.7	Unit	50	100	10	7	Positive
Sulfamethizole	☐	271	Unit	155.8	Unit	50	100	10	7	Positive

Esercizio 1 - Sviluppare un metodo di acquisizione per la serie 6400
Attività 5. Trovare l'energia di collisione ottimale per l'acquisizione MRM

Fasi	Istruzioni dettagliate	Commenti
2 Configurare ed eseguire la lista di lavoro (facoltativo). Specificare i file di dati come iiiSulfamix MRM_xx.d, dove iii sono le iniziali dell'utente e xx è l'energia di collisione.	a Fare clic sulla scheda Worklist per visualizzare la lista di lavoro. b Aggiungere sei campioni alla lista di lavoro per le energie di collisione 10, 15, 20, 25, 30, 35. c Selezionare la casella di controllo a sinistra del nome campione per ciascuno dei tre campioni. d Fare clic su Worklist > Run.	Questa fase è facoltativa poiché è possibile utilizzare i sei file di dati esemplificativi nella fase successiva.
3 Confrontare le intensità di transizione dei composti alle varie energie di collisione. - Aprire il file di dati MRM: SulfamixMRM_10.d SulfamixMRM_15.d SulfamixMRM_20.d SulfamixMRM_25.d SulfamixMRM_30.d SulfamixMRM_35.d - Impostare i parametri di estrazione dei cromatogrammi MRM come illustrato a destra per tutte le transizioni. - Disabilitare i TIC per maggiore chiarezza ed esaminare le intensità dei picchi. - Confrontare le intensità di transizione di ciascun composto ottenute a una data energia di collisione, con la transizione dello stesso composto ottenuta a un'energia di collisione differente (eseguire questa operazione in modalità Overlaid con tutti i cromatogrammi MRM). - Chiudere i file di dati ma non salvare i risultati. - Vedere la Tabella 4 a pagina 33 per le impostazioni del metodo ottimali per ciascun composto.	a Aprire il programma Qualitative Analysis. b Deselezionare la casella di controllo Run 'File Open' actions.... c Aprire i file di dati MRM nel programma Qualitative Analysis. d Fare clic con il tasto destro sulla finestra Chromatogram Results, quindi su Extract Chromatograms dal menu di scelta rapida. e Per selezionare tutti i file di dati, fare clic sull'ultimo file tenendo premuto il tasto Maiusc. f Immettere i parametri come elencato nell'esempio in basso e fare clic su OK. g Deselezionare le caselle di controllo dei TIC per facilitare la visualizzazione dei cromatogrammi MRM.	A cosa serve uno spettro per l'MRM? È una funzionalità del programma che consente di visualizzare gli spettri anche per gli esperimenti MRM, e può essere molto utile per confrontare le intensità relative di ioni prodotto generati dallo stesso precursore.



Esercizio 1 - Sviluppare un metodo di acquisizione per la serie 6400
Attività 5. Trovare l'energia di collisione ottimale per l'acquisizione MRM

Fasi	Istruzioni dettagliate	Commenti
	h Fare clic sull'icona Overlaid Mode, . i Nella finestra Chromatogram Results, confrontare le intensità di picco per la transizione di ciascun composto in tutti i file di dati.	• Confrontare i colori della finestra Chromatogram Results con il colore accanto al nome della transizione MRM in Data Navigator. • È inoltre possibile fare clic con il tasto destro sulla testata della finestra Chromatogram Results e confrontare i colori dei cromatogrammi con i colori dei titoli nel menu di scelta rapida.
		
	A meno che non si decida di acquisire gli MRM a energie di collisione inferiori, le impostazioni del metodo ottimali dovrebbero essere come quelle illustrate in Tabella 4. j Fare clic sull'icona Close Data File nella barra degli strumenti principale, quindi su Close quando viene visualizzata la finestra di dialogo Close Data File.	• A questo punto si dispone di tutte le informazioni necessarie per eseguire un esperimento di acquisizione MRM per la miscela di sulfamidici. Considerare di eseguire almeno un'altra esecuzione con queste impostazioni.

Esercizio 1 - Sviluppare un metodo di acquisizione per la serie 6400
Attività 5. Trovare l'energia di collisione ottimale per l'acquisizione MRM

Tabella 4 Composti ed energia di collisione

Composti	Transizione MRM	Frammentatore	Collisione
Sulfametizolo	271,0 > 155,8	100 V	10
Sulfametazina	279,0 > 185,7	100	15
Sulfacloropiridazina	285,0 > 155,7	100	10
Sulfadimetossina	311,0 > 155,7	100	20

Esercizio 2 – Parametri per l'ottimizzazione dell'acquisizione con il software Optimizer

In questo esercizio viene ottimizzata una miscela di quattro composti di sulfonamidi.

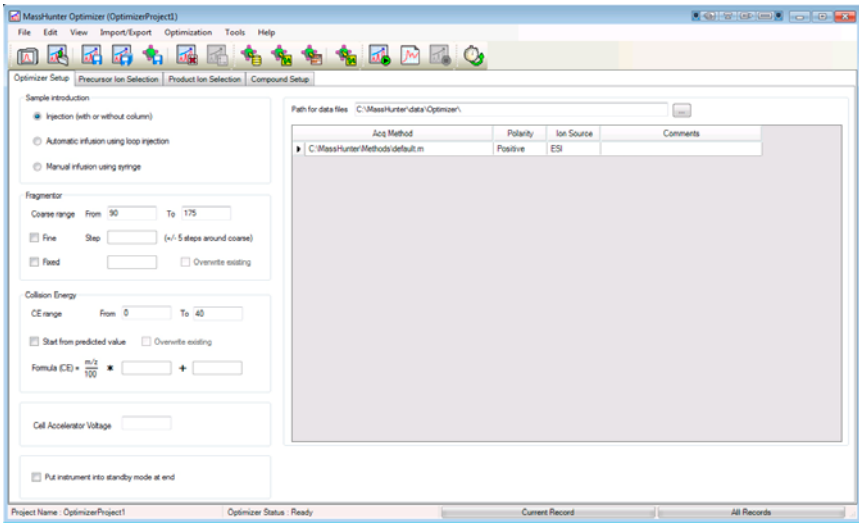
Attività 1. Usare il software Optimizer per ottimizzare i parametri di acquisizione

Il software Optimizer permette di ottimizzare i parametri di acquisizione. Segnatamente, automatizza la selezione degli ioni precursore migliori, l'ottimizzazione della tensione del frammentatore per ciascuno ione precursore, la selezione degli ioni prodotto migliori, nonché l'ottimizzazione dei valori dell'energia di collisione per ciascuna transizione in relazione a un elenco di composti specificati dall'utente.

Per completare questa attività, in primo luogo è necessario creare il metodo **iiiSulfamix MRM_10.m** in **"Attività 5. Trovare l'energia di collisione ottimale per l'acquisizione MRM"** a pagina 30. Non è necessario acquisire il file di dati.

La tensione del frammentatore per lo strumento 6490 viene impostata automaticamente durante l'Autotune. La tensione del frammentatore per uno strumento 6490 non è ottimizzata. I parametri del frammentatore e i risultati non saranno visualizzati per uno strumento 6490.

Fasi	Istruzioni dettagliate	Commenti
1 Avviare il software MassHunter Optimizer.	Fare doppio clic sull'icona Optimizer. 	Se si stanno ottimizzando peptidi, usare il programma Optimizer for Peptides.



Esercizio 2 – Parametri per l'ottimizzazione dell'acquisizione con il software Optimizer

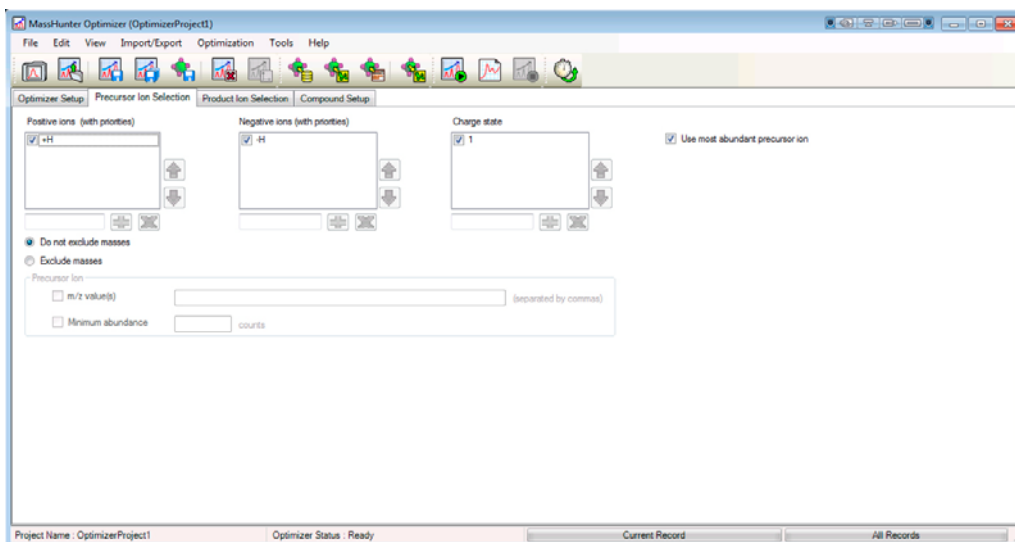
Attività 1. Usare il software Optimizer per ottimizzare i parametri di acquisizione

Fasi	Istruzioni dettagliate	Commenti
2 Impostare i parametri di ottimizzazione.	a Fare clic sulla scheda Optimizer Setup. b Impostare il metodo Sample introduction su Injection. c Impostare i parametri della rampa del frammentatore come segue: • Impostare l'intervallo dei valori di rampa del frammentatore da 90 a 135. • Deselezionare la casella di controllo Fragmentor Fine. d Impostare l'intervallo per la rampa dell'energia di collisione da 0 a 40 V. e Selezionare un percorso per i file di dati in modo da memorizzare i dati di esecuzione dell'ottimizzazione. f Fare clic con il tasto destro sulla tabella a destra e selezionare Add Method dal menu di scelta rapida. g Fare clic sul pulsante a destra della cella Acq Method per aprire la finestra di dialogo Open Method. h Selezionare il metodo creato nell'esercizio precedente iiiSulfamix MRM_10.m e fare clic su OK. I campi Polarity e Ion Source saranno popolati con i valori impostati nel metodo selezionato. i Verificare che la sorgente ionica del metodo corrisponda alla configurazione fisica dello strumento. j Ripetere da fase f a fase i per selezionare altri metodi.	• L'ottimizzazione fine affina i valori di rampa grossolani e fornisce un'ottimizzazione migliore, ma impiega più tempo per l'esecuzione. • I dati possono essere visualizzati successivamente con il software MassHunter Qualitative Analysis di Agilent. • La tensione del frammentatore non è ottimizzata per uno strumento Agilent 6490 triplo quadrupolo. Viene impostata automaticamente durante l'Autotune. I parametri del frammentatore e i risultati per uno strumento 6490 non sono visualizzati nel programma Optimizer.

Esercizio 2 – Parametri per l'ottimizzazione dell'acquisizione con il software Optimizer

Attività 1. Usare il software Optimizer per ottimizzare i parametri di acquisizione

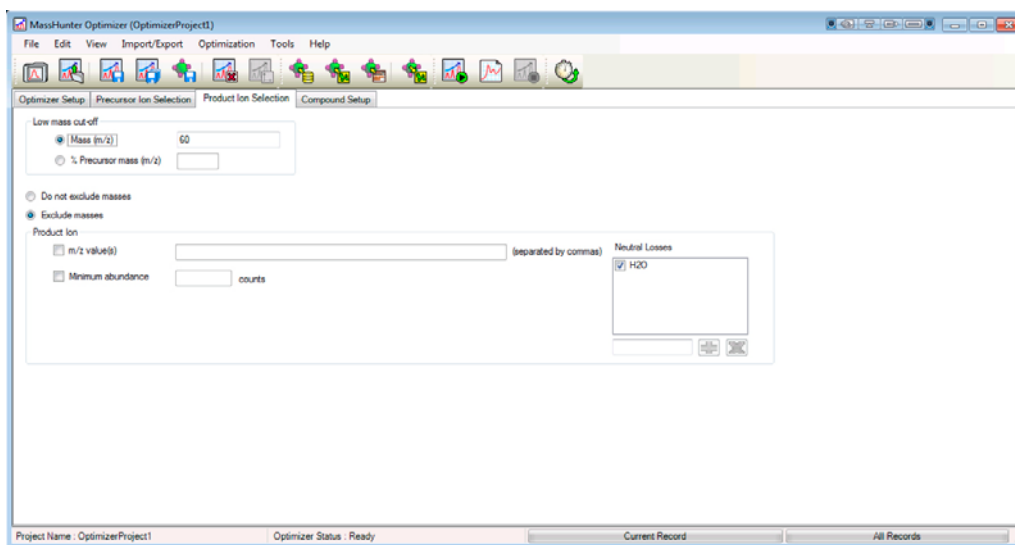
Fasi	Istruzioni dettagliate	Commenti
3 Selezionare gli ioni precursore	a Fare clic sulla scheda Precursor Ion Selection. b Selezionare l'addotto Positive ions +H. c Selezionare Charge state di 1. d Impostare le priorità di ricerca degli ioni precursore. e (facoltativo) Per escludere determinate masse dall'analisi, fare clic su Exclude masses nella parte inferiore della schermata. Immettere i valori m/z da escludere separati da virgole e/o immettere un valore di abbondanza minima nei conteggi.	- Selezionare la casella di controllo Use most abundant precursor ion per usare lo ione precursore più abbondante. - Deselezionare la casella di controllo Use most abundant precursor ion e usare i pulsanti freccia Up e Down per impostare l'ordine di ricerca (gli ioni in cima alla lista hanno la priorità). - È anche possibile immettere un valore Neutral Losses da escludere (ad esempio H₂O).



Esercizio 2 – Parametri per l'ottimizzazione dell'acquisizione con il software Optimizer

Attività 1. Usare il software Optimizer per ottimizzare i parametri di acquisizione

Fasi	Istruzioni dettagliate	Commenti
4 Selezionare gli ioni prodotto	a Fare clic sulla scheda Product Ion Selection. b Immettere un valore per Low mass cut-off. Selezionare Mass (m/z) con m/z di 60. c Per escludere determinate masse dall'analisi, fare clic sull'opzione Exclude masses nella parte inferiore della schermata. Immettere i valori m/z da escludere separati da virgole e/o immettere un valore di abbondanza minima nei conteggi. d Eventualmente, è possibile immettere un valore Neutral Losses da escludere, ad esempio H_2O. Immettere una formula nella casella e fare clic sul pulsante per aggiungerla all'elenco.	



Esercizio 2 – Parametri per l'ottimizzazione dell'acquisizione con il software Optimizer

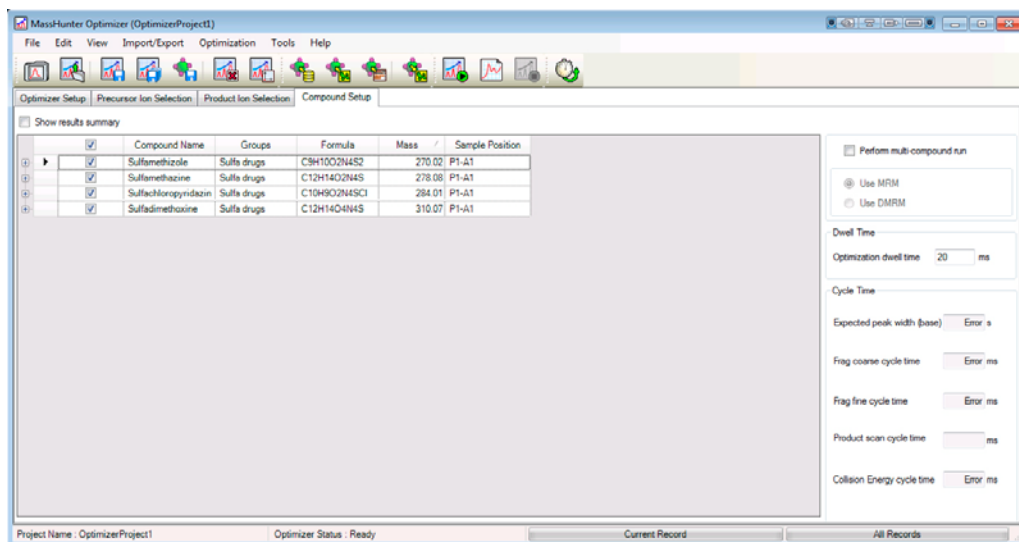
Attività 1. Usare il software Optimizer per ottimizzare i parametri di acquisizione

Fasi	Istruzioni dettagliate	Commenti
5 Configurare una lista di composti. Le formule per i quattro sulfamidici sono le seguenti: • Sulfametizolo (SMT) $C_9H_{10}O_2N_4S_2$ • Sulfametazina (SMZ) $C_{12}H_{14}O_2N_4S$ • Sulfacoloropiridazina (SCP) $C_{10}H_9O_2N_4SCl$ • Sulfadimetossina (SDM) $C_{12}H_{14}O_4N_4S$	a Fare clic sulla scheda Compound Setup. b Deselezionare la casella di controllo Show results summary sopra la tabella mentre si configura l'elenco dei composti. c Fare clic con il tasto destro sulla tabella e selezionare Add Compound dal menu di scelta rapida per aggiungere una riga alla fine della tabella. d Immettere Sulfamethizole come Compound Name. e Immettere Sulfa drugs come nome gruppo nella colonna Groups. f Immettere $C_9H_{10}O_2N_4S_2$ come Formula del composto. Verrà calcolata la massa. g Immettere la Sample Position per il nuovo composto. h (facoltativo) Immettere un valore Optimization dwell time per impostare tempi di ciclo più lunghi o più brevi. i Ripetere le fasi appena descritte per aggiungere gli altri tre sulfamidici alla tabella. j Selezionare le colonne Select per i composti (righe) da utilizzare per l'ottimizzazione. k Salvare l'elenco dei composti nel database o nel progetto corrente.	• I composti sono globali per tutti i progetti. Le informazioni sui composti, come il nome, il gruppo, la formula e la massa in un progetto saranno riflesse in tutto il database. • Se in questa fase non vengono specificati metodi o ioni, per generare gli ioni l'ottimizzazione dei composti utilizzerà i metodi indicati nella scheda Optimizer Setup e le informazioni contenute nelle schede Precursor Ion Selection e Product Ion Selection. • È inoltre possibile immettere la massa monoisotopica nella colonna Mass in luogo della Formula.

Esercizio 2 – Parametri per l'ottimizzazione dell'acquisizione con il software Optimizer

Attività 1. Usare il software Optimizer per ottimizzare i parametri di acquisizione

Fasi	Istruzioni dettagliate	Commenti
------	------------------------	----------



I parametri del frammentatore e i risultati non sono visualizzati per uno strumento Agilent 6490 triplo quadrupolo. La tensione del frammentatore per uno strumento 6490 viene impostata automaticamente durante l'Autotune.

- 6 Avviare il processo di ottimizzazione.
 - Fare clic sul pulsante **Start Optimization** () sulla barra degli strumenti oppure
 - Fare clic sul pulsante **Ion Breakdown Profile** () sulla barra degli strumenti.
 - 7 Rivedere i risultati.
 - a Fare clic sulla scheda **Compound Setup**.
 - b Selezionare la casella di controllo **Show results summary** sopra la tabella.
 - c Rivedere i seguenti valori per ogni ione di transizione nella tabella Compound:
 - Frammentatore
 - Energia di collisione
 - d Rivedere la stampa del report di ottimizzazione.
- (facoltativo) Usare il programma Agilent MassHunter Workstation Qualitative Analysis per esaminare i dati.
- Consultare la Guida in linea per il programma Optimizer o la Guida introduttiva a Optimizer per apprendere come importare i risultati di ottimizzazione per l'acquisizione dei segmenti temporali MRM.

Esercizio 3 – Sviluppare un metodo di acquisizione di MRM dinamico partendo da un file di dati di acquisizione MRM o da un metodo MRM

Attività 1. Usare il software Optimizer per ottimizzare i parametri di acquisizione

Esercizio 3 – Sviluppare un metodo di acquisizione di MRM dinamico partendo da un file di dati di acquisizione MRM o da un metodo MRM

Lo scopo dell'esercizio è creare un metodo di MRM dinamico partendo da un file di dati MRM acquisiti per i file di dati sulfamix_MRM con i tempi di ritenzione corretti per l'MRM dinamico usando il programma Quantitative Analysis. Tutte le transizioni nel metodo MRM devono avere la stessa polarità.

Questo esercizio prevede tre attività principali:

- “Attività 1. Creare un file di batch a partire da un file di dati MRM già esistente” a pagina 41
- “Attività 2. Stampare un report nel programma Quantitative Analysis” a pagina 44
- “Attività 3. Creare un metodo di MRM dinamico usando la funzionalità Update dMRM” a pagina 45

È possibile creare un metodo di MRM dinamico a partire da un metodo MRM già esistente.

- “Attività 4. Creare un metodo di MRM dinamico a partire da un metodo MRM” a pagina 47

Esercizio 3 – Sviluppare un metodo di acquisizione di MRM dinamico partendo da un file di dati di acquisizione MRM o da un metodo MRM

Attività 1. Creare un file di batch a partire da un file di dati MRM già esistente

Attività 1. Creare un file di batch a partire da un file di dati MRM già esistente

In questo esercizio è possibile creare un batch e un metodo a partire da un file di dati MRM già esistente.

Fasi	Istruzioni dettagliate	Commenti
1 Aprire il programma Quantitative Analysis e creare un file di batch con un file campione, SulfamixMRM_35.d. Copiare il file di dati SulfamixMRM_35.d dal disco di installazione alla cartella \MassHunter\Data\MRM_to_DMRM.	a Fare doppio clic sull'icona QQQ Quantitative Analysis. b Fare clic su File > New Batch. c Navigare fino alla cartella \MassHunter\Data\MRM_to_DMRM. d Digitare MRM_to_DMRM nella casella di testo File Name. e Fare clic su Open. f Fare clic su File > Add Samples. g Selezionare il file SulfamixMRM_35.d. h Fare clic su OK.	Il file SulfamixMRM_35.d si trova sul disco di installazione nella cartella \Support\Data. Copiare l'intera cartella nella cartella \MassHunter\Data\MRM_to_DMRM.
2 Creare un metodo per il batch usando i dati MRM.	a Fare clic su Method > New > New Method from Acquired MRM data. b Selezionare il file di dati SulfamixMRM_35.d. c Fare clic su Open.	

Esercizio 3 – Sviluppare un metodo di acquisizione di MRM dinamico partendo da un file di dati di acquisizione MRM o da un metodo MRM

Attività 1. Creare un file di batch a partire da un file di dati MRM già esistente

Fasi	Istruzioni dettagliate	Commenti
3 Impostare i valori per Concentration Setup, Qualifier Setup e Calibration Curve Setup. • Aggiungere il livello di calibrazione 1 con una concentrazione di 10000. • Impostare Uncertainty su Relative per tutti i qualificatori. • Impostare Curve Fit su Linear. • Impostare Curve Fit Origin su Include. • Impostare Curve Fit Weight su None.	a Selezionare Concentration Setup nella sezione Manual Setup Tasks all'interno del riquadro Method Tasks. b Selezionare il primo composto nella tabella. c Fare clic con il tasto destro sulla riga del composto, quindi selezionare New Calibration Level dal menu di scelta rapida. d Immettere 1 nella colonna Level e 10 nella colonna Conc.. e Fare clic con il tasto destro sulla casella Level e selezionare Copy Calibration Levels To. f Fare clic su Select All. Fare clic su OK. g Selezionare Qualifier Setup nella sezione Manual Setup Tasks all'interno del riquadro Method Tasks. h Verificare che il valore impostato per Uncertainty sia Relative. i Selezionare Calibration Curve Setup nella sezione Manual Setup Tasks all'interno del riquadro Method Tasks. j Impostare Curve Fit su Linear per tutti i composti. k Impostare CF Origin su Include per tutti i composti. l Impostare CF Weight su None per tutti i composti.	• Consultare la Guida in linea del programma Quantitative Analysis per ulteriori informazioni su queste attività.

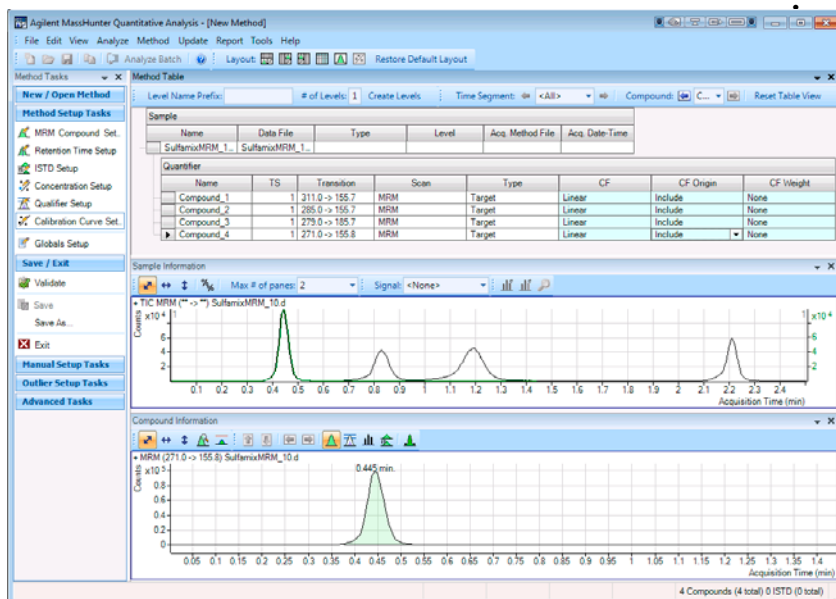
Esercizio 3 – Sviluppare un metodo di acquisizione di MRM dinamico partendo da un file di dati di acquisizione MRM o da un metodo MRM

Attività 1. Creare un file di batch a partire da un file di dati MRM già esistente

Fasi

Istruzioni dettagliate

Commenti



4 Verificare il metodo, salvarlo e applicarlo al batch.

- Fare clic su **Method > Validate**.
- Fare clic su OK nella finestra di messaggio. Se necessario, correggere gli errori.
- Fare clic su **Method > Save As**.
- Immettere MRM_to_DMRM.
- Fare clic sul pulsante **Save**.
- Fare clic su **Method > Exit**.
- Fare clic su **Yes** per applicare il metodo al batch.

5 Analizzare e salvare il batch.

- Fare clic su **Analyze > Analyze Batch**.
- Fare clic su **File > Save Batch**.

Attività 2. Stampare un report nel programma Quantitative Analysis

In questa attività è possibile stampare un report usando un modello.

È possibile aggiornare un metodo di MRM dinamico usando un file di dati oppure la cartella con i report di quantificazione. Questa attività, infatti, prevede la creazione di una cartella contenente i report di quantificazione.

Fasi	Istruzioni dettagliate	Commenti
1 Stampare un report usando il modello MRM_to_DMRM.xltx.	a Fare clic su File > Save. b Fare clic su Report > Generate. Il sistema visualizza la finestra di dialogo Report. c Selezionare il file Template. d Selezionare la cartella Report. Questo nome cartella sarà utilizzato nell'attività successiva. e Fare clic su OK.	• Copiare il modello MRM_to_DMRM.xltx dalla cartella \Support\Data del disco di installazione. • Per questo report non è necessario stampare il report. Fare clic su Advanced per selezionare una stampante diversa. Se non si desidera stampare il report, fare clic su Advanced.
2 Controllare lo stato del report usando il programma Queue Viewer.	a Fare clic su Report > Queue Viewer. b Attendere che la stampa del report sia terminata. c Chiudere il programma Task Queue Viewer.	

Esercizio 3 – Sviluppare un metodo di acquisizione di MRM dinamico partendo da un file di dati di acquisizione MRM o da un metodo MRM

Attività 3. Creare un metodo di MRM dinamico usando la funzionalità Update dMRM

Attività 3. Creare un metodo di MRM dinamico usando la funzionalità Update dMRM

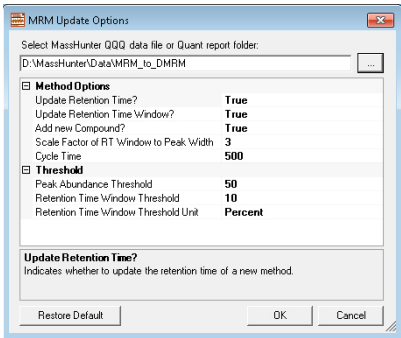
È possibile creare un metodo di MRM dinamico a partire da un file di dati MRM o da un metodo di analisi quantitativa. Innanzi tutto, impostare **Scan Type** su Dynamic MRM, quindi usare la finestra di dialogo Update MRM Method.

Fasi	Istruzioni dettagliate	Commenti
1 Aprire il metodo <i>iii</i> Sulfamix MRM_10.m e salvarlo con un nuovo nome nel formato <i>iii</i> Sulfamix dMRM.m, dove <i>iii</i> sono le iniziali dell'utente.	a Fare clic su File > Open > Method. b Selezionare il metodo <i>iii</i>Sulfamix MRM_10.m. c Fare clic su OK. d Fare clic su Method > Save As. e Digitare il nome del nuovo metodo con il formato <i>iii</i>Sulfamix_dMRM.m.	• In questo esempio, il batch si trova nella cartella \MassHunter\Data\MRM_to_DMRM.
2 Cambiare il metodo in un metodo di MRM dinamico con gli stessi composti. È possibile usare un file di dati o il report generato nell'ultima attività.	a Fare clic sulla scheda Acquisition nella scheda QQQ della finestra Method Editor. b Fare clic con il tasto destro sulla tabella Scan segments e selezionare Update MRM Method. Si apre la finestra di dialogo Update MRM Editor. c Selezionare la cartella contenente il file <i>report.results.xml</i> o il file di dati <i>iiiSulfamix MRM_10.d</i>. d Selezionare True per Update Retention Time?. e Selezionare True per Add new Compound. f Fare clic su OK.	• Lo strumento Update MRM Method imposta automaticamente il tipo di scansione su Dynamic MRM. • Come input per questa finestra di dialogo, è possibile selezionare un file di dati acquisito con Scan Type impostato su MRM oppure una cartella Quant Report. I segmenti di scansione sono creati a partire da una di queste due sorgenti di input.

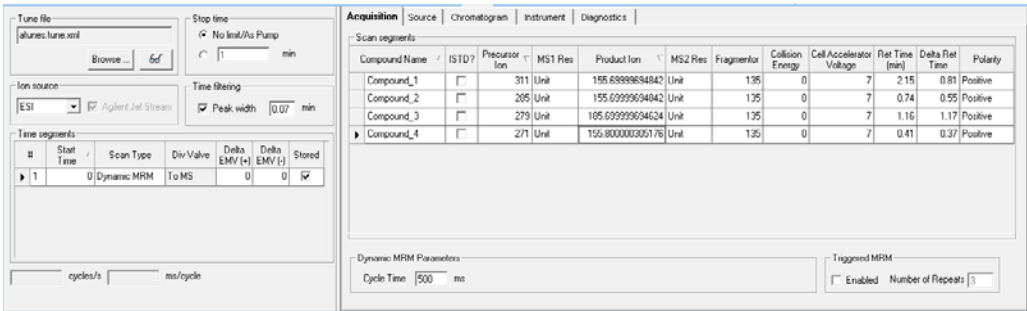
Esercizio 3 – Sviluppare un metodo di acquisizione di MRM dinamico partendo da un file di dati di acquisizione MRM o da un metodo MRM

Attività 3. Creare un metodo di MRM dinamico usando la funzionalità Update dMRM

Fasi	Istruzioni dettagliate	Commenti
------	------------------------	----------



È possibile aggiornare i composti nella tabella Scan segments usando un file di dati QQQ o una cartella del report Quantitative analysis.



I composti risultanti dal file di dati o dal report di quantificazione vengono automaticamente aggiunti alla tabella Scan segments. Se si utilizza un file di dati e non è stato immesso un nome composto nella tabella Scan Segments prima di aver acquisito il file di dati, il nome composto non sarà aggiunto automaticamente.

- g Selezionare il composto originale nella tabella Scan segments.
- h Fare clic con il tasto destro sulla riga e selezionare **Delete Row**.
- i Fare clic su **Method > Save**.

Attività 4. Creare un metodo di MRM dinamico a partire da un metodo MRM

È possibile creare un metodo di MRM dinamico direttamente da un metodo MRM usando il comando Paste from Clipboard del menu di scelta rapida.

Fasi	Istruzioni dettagliate	Commenti
1 Aprire il metodo <i>iiiSulfamix</i> MRM_10.m e salvarlo con un nuovo nome nel formato <i>iiiSulfamix dMRM_Easy.m</i> , dove <i>iii</i> sono le iniziali dell'utente.	a Fare clic su File > Open > Method. b Selezionare il metodo <i>iiiSulfamix</i> MRM_10.m. c Fare clic su OK. d Fare clic su Method > Save As. e Digitare il nome del nuovo metodo con il formato <i>iiiSulfamix_dMRM2.m</i>. f Fare clic sul pulsante Save.	
2 Copiare tutti i composti dalla tabella Scan segments nel metodo MRM.	a Fare clic sulla scheda Acquisition nella scheda QQQ della finestra Method Editor. b Selezionare tutte le righe della tabella Scan segments. c Fare clic con il tasto destro sulla tabella Scan segments e selezionare Copy.	• Per selezionare tutte le righe della tabella Scan segments, è necessario selezionare la prima riga della tabella e scorrere fino a raggiungere l'ultima riga. Premere il tasto Maiusc e selezionare l'ultima riga della tabella.
3 Impostare il tipo di scansione su Dynamic MRM e incollare le righe nella nuova tabella Scan segments.	a Selezionare Dynamic MRM come tipo di scansione. b Fare clic con il tasto destro sulla tabella Scan segments, quindi selezionare Paste from Clipboard. c Selezionare il composto originale nella tabella Scan segments. d Fare clic con il tasto destro e selezionare Delete Row. e Fare clic su Method > Save.	• Per unire più Time Segments in uno stesso Dynamic MRM Time Segment, incollare i segmenti di scansione in un foglio Excel e creare un elenco con molti elementi. Quando tutti i segmenti di scansione saranno stati incollati in Excel, è possibile copiarli usando il programma di calcolo.

Esercizio 3 – Sviluppare un metodo di acquisizione di MRM dinamico partendo da un file di dati di acquisizione MRM o da un metodo MRM

Attività 4. Creare un metodo di MRM dinamico a partire da un metodo MRM

Tune file
atunes.tune.xml
Browse ...

Stop time

No limit/As Pump

1 min

Ion source
ESI
Agilent Jet Stream

Time filtering

Peak width

0.07 min

Time segments

#	Start Time	Scan Type	Div Valve	Delta EMV (+)	Delta EMV (-)	Stored
1	0	Dynamic MRM	To MS	0	0	☒

cycles/s

ms/cycle

Acquisition

Source

Chromatogram

Instrument

Diagnostics

Scan segments

Compound Name	ISTD?	Precursor Ion	MS1 Res	Product Ion	MS2 Res	Fragmentor	Collision Energy	Cell Accelerator Voltage	Ret Time (min)	Delta Ret Time	Polarity
Compound1	☒	350 Unit		200 Unit					0	0	Positive
sulfamethoxine	☐	311 Unit		155.7 Unit					5	0.81	Positive
sulfachloropyridazin	☐	285 Unit		155.7 Unit					4	0.55	Positive
sulfamethazine	☐	279 Unit		185.7 Unit					6	1.17	Positive
sulfamethizole	☐	271 Unit		155.8 Unit					1	0.37	Positive

Dynamic MRM Parameters

Cycle Time

500 ms

Insert Row

Append Row

Delete Row

Sort

Import from optimizer...

Update MRM Method ...

Edit MRM Method ...

Calibrate MRM Method ...

Cut

Copy

Paste

Date from Clipboard

per of Repeats

3

48

Guida alla familiarizzazione del sistema LC/MS Agilent serie 6400 triplo quadrupolo

Esercizio 3 – Sviluppare un metodo di acquisizione di MRM dinamico partendo da un file di dati di acquisizione MRM o da un metodo MRM

Attività 4. Creare un metodo di MRM dinamico a partire da un metodo MRM

In questo volume

Questo esercizio aiuta a utilizzare il sistema LC/MS Agilent serie 6400 triplo quadrupolo. In questa guida è possibile acquisire dati e poi analizzare i risultati usando il programma Qualitative Analysis, imparando così a sviluppare un metodo di acquisizione.

© Agilent Technologies, Inc. 2012

Revisione A, febbraio 2012



G3335-94128



Agilent Technologies