

Agilent serie 6400 Sistema LC/MS triplo quadrupolo

Guida introduttiva

Dove reperire le informazioni 9

Operazioni preliminari 11

Fase 1. Avvio del software Data Acquisition 12

Fase 2. Preparazione dei moduli LC 18

Fase 3. Preparazione dello strumento a triplo quadrupolo. 22

Fase 4. Configurazione ed esecuzione di un metodo di acquisizione 25

Fase 5. Revisione dei risultati con il programma Qualitative
Analysis 33

Fase 6. Configurazione ed esecuzione della quantificazione 33

La presente guida deve essere utilizzata per eseguire le prime operazioni sul sistema LC/MS Agilent serie 6400 triplo quadrupolo, nonché come linee guida per informazioni utili all'utente.

Cos'è il sistema LC/MS Agilent serie 6400 triplo quadrupolo?

Il sistema LC/MS a triplo quadrupolo di Agilent è un cromatografo liquido con spettrometro di massa a triplo quadrupolo in grado di eseguire analisi di MS/MS mediante tre insiemi di barre parallele (in questo caso, quadrupolo, esapolo, quadrupolo). Il primo quadrupolo separa gli ioni in ioni precursore, che sono frammentati nell'esapolo in ioni prodotto, che a loro volta vengono separati dal secondo quadrupolo. Spesso, due o più ioni precursore e i relativi ioni prodotto sono monitorati in sequenza in modalità MRM (monitoraggio di reazione multipla). È possibile monitorare fino a 4000 transizioni MRM usando l'MRM dinamico.



Agilent Technologies

Novità dell'acquisizione dati

Lo strumento Agilent 6490 a triplo quadrupolo è dotato della tecnologia iFunnel che fornisce un campionamento più efficiente degli ioni all'interno dello spettrometro di massa. La tecnologia iFunnel include la tecnologia Agilent Jet Stream, un gruppo di desolvatazione più piccolo con capillare a più canali e il Dual Offset Ion Funnel.

I sistemi LC/MS 6490 e 6460 a triplo quadrupolo di Agilent sono spediti dalla fabbrica con la tecnologia Agilent Jet Stream che utilizza un gas di profilamento super riscaldato per collimare il nebulizzatore spray, con un notevole aumento del numero degli ioni in ingresso nello spettrometro di massa.

È possibile configurare un sistema LC/MS Agilent a triplo quadrupolo con i moduli LC Agilent 1100, 1200, 1260 o 1290 Infinity.

Inoltre, il sistema LC/MS Agilent a triplo quadrupolo ha in dotazione il software Agilent MassHunter Workstation che include tre principali programmi:

- Data Acquisition (Acquisizione dati) - da una schermata è possibile calibrare lo spettrometro di massa, controllare e monitorare i parametri dello strumento, configurare i metodi di acquisizione e le liste di lavoro contenenti più campioni e monitorare i tracciati di esecuzione in tempo reale.
- Quantitative Analysis (Analisi quantitativa) - da una schermata è possibile configurare un batch di file di dati e quantificare, valutare e riquantificare i risultati. Da questa schermata è possibile accedere al Method Editor per la configurazione e la modifica dei metodi di quantificazione.
- Qualitative Analysis (Analisi qualitativa) - da una schermata è possibile estrarre e integrare i cromatogrammi, sottrarre il rumore di fondo, estrarre gli spettri dei picchi e confrontare i dati appartenenti a tipi di file di dati differenti.

Novità dell'acquisizione dati

Il programma Data Acquisition per la serie 6400 a triplo quadrupolo include numerose nuove funzionalità nella revisione attuale.

Versione B.05.00

- I modelli supportati sono 6410B, 6420A, 6430A, 6460A e 6490A.
- Se il tipo di scansione è Dynamic MRM, è possibile modificare la tabella Time Segments per spostare LC su Waste prima e dopo il segmento dell'MRM dinamico.
- Per Triggered MRM, è possibile utilizzare una qualsiasi transizione primaria come ione trigger selezionando la colonna Trigger.

- È possibile specificare i metodi di analisi dei dati da eseguire in Method Editor. È possibile specificare il metodo di analisi qualitativa da eseguire, il metodo di analisi quantitativa e il modello di report per l'analisi quantitativa da eseguire.
- Il software di acquisizione dati Agilent MassHunter Workstation è stato ulteriormente integrato con il software Skyline del laboratorio MacCoss dell'Università di Washington.
- Per l'interfaccia HPLC-Chip, il precedente parametro Injection Flush Volume è stato suddiviso in 2 parametri distinti. Injection Path Volume (impostazione di configurazione) è il volume morto tra la sede dell'ago e il chip. Sample Flush Volume (parametro del metodo) si basa sul campione.
- Per l'interfaccia HPLC-Chip, il valore Sample Flush Volume specificato nel metodo può essere sovrascritto nella lista di lavoro.
- Per HPLC-Chip, il tipo di chip è ora visualizzato come parametro del metodo. Se si utilizza un diverso tipo di chip, il software cerca di risolvere le differenze nella posizione della valvola, ecc., e avvisa l'utente in caso di eventuali modifiche del metodo o di conflitti.
- È supportato il rivelatore a lunghezza d'onda multipla Agilent G4211A (MWD 1290).
- Sono supportati i rivelatori a lunghezza d'onda multipla Agilent G1365C e G1365D.
- È supportato il rivelatore di fluorescenza Agilent G1321A.
- È supportata la scatola valvole esterna Agilent G1170A per valvole intercambiabili.
- L'interfaccia utente ora ha finestre separate per il tracciato del cromatogramma, il tracciato dello spettro, i valori effettivi del dispositivo e il campione elaborato.
- È possibile personalizzare l'interfaccia utente modificando la posizione e la dimensione delle finestre.
- È possibile ridurre a icona un dispositivo nella finestra Instrument Status.
- La durata del registro può essere modificata in un numero diverso di giorni.
- Il registro Study Manager registra l'inizio, la fine, il ripristino o il riavvio di uno studio.
- Windows 7 (a 64 bit) è supportato.
- Excel 2010 a 32 bit è supportato.
- Windows XP non è supportato.
- Excel 2007 non è supportato.

Novità dell'acquisizione dati

- È possibile specificare un metodo di errore per i dispositivi LC nella finestra Instrument Status. Questo metodo viene salvato e utilizzato se il dispositivo va in errore.
- La configurazione del dispositivo per i dispositivi LC viene eseguita mediante il programma Instrument Configuration. I dispositivi possono essere anche ridenominati e riordinati.
- Gli studi per l'importazione delle liste di lavoro sono supportati nel programma Study Manager.

Service Pack B.04.01

- Service Pack 4, o SP4, gestisce la perdita di comunicazione quando si esegue una lunga lista di lavoro su Windows 7 a 64 bit.
- SP4 è cumulativo e contiene altri tre precedenti service pack.
- Service Pack 3 migliora le prestazioni di inversione positiva-negativa per tutti i modelli e insieme al firmware della versione completa A.00.6.36 con caricatore di ion-funnel, corregge gli errori RF e DC dello ion-funnel per il modello 6490A (questo aggiornamento è obbligatorio).
- Service Pack 2 supporta il modello 6420A.
- Service Pack 1 contiene miglioramenti per la calibrazione automatica di tutti i modelli.

Versione B.04.01

- I modelli supportati sono 6410B, 6430A, 6460A e 6490A.
- Windows 7 è supportato.
- Excel 2010 è supportato per i report Optimizer in Windows 7.
- I report per le funzioni Acquisition Method, Worklist e Tune sono stampati mediante i report RDL.
- L'inversione di polarità positiva/negativa è disponibile per Dynamic MRM.

Versione B.04.00

- I modelli supportati sono 6410B, 6430A, 6460A e 6490A.
- La tecnologia iFunnel è supportata sul modello Agilent 6490A triplo quadrupolo.
- Optimizer B.04.00 è installato come parte del software QQQ Data Acquisition.
- La risoluzione migliorata di 0,4 m/z FWHM è supportata sul modello Agilent 6490A triplo quadrupolo.

- La modalità "Fast scan" con velocità di scansione di 10000 m/z al secondo è supportata sul modello Agilent 6490A triplo quadrupolo.
- La funzione Triggered MRM è supportata su tutti i tripli quadrupoli supportati.
- Il supporto per sorgente ionica generica è incluso.
- La tensione dell'acceleratore della cella di collisione può essere specificata come parametro del metodo per ciascuna transizione ai fini dell'ottimizzazione del segnale.
- I metodi dell'MRM dinamico possono essere automaticamente suddivisi in 2 o più metodi.
- I metodi dell'MRM dinamico possono essere combinati in uno stesso metodo.
- Il programma Study Manager può creare studi Drug Discovery Screening e studi Optimization Automation.
- Lo studio Bioanalysis, ridenominato a partire dallo studio PK LIMS, è supportato.
- Il programma Map File Generator supporta Worklists, Drug Discovery Screening e Optimization Automation.
- Ora è disponibile la funzione Method Comparator.
- È disponibile la funzione Method Audit Trail in modalità Compliance e il confronto tra versioni del metodo quando è attiva la conformità.
- La lista di lavoro contiene le colonne Sample Group e Sample Info. visualizzate in Quant.
- È possibile specificare i codici a barre per le piastre in una lista di lavoro.
- Le esecuzioni in modalità bloccata sono supportate in Study Manager.
- È possibile specificare uno script di standby in Study Manager.
- È supportato un checksum per gli studi.

Versione B.03.01 con Service Pack 2

- È supportato il backflush della sede dell'ago mediante Flexible Cube G4227A.
- È supportata la funzionalità di riduzione del carry over per Chip Cube 1260.
- È supportata la pompa isocratica Agilent 1260 (G1310B).
- È supportata la pompa quaternaria Agilent 1260 (G1311B).
- È supportata la pompa quaternaria Agilent 1260 VL (G1311C).
- È supportata la pompa capillare Agilent 1260 (G1376A).
- È supportata la nanopompa Agilent 1260 (G2226A)
- È supportata la pompa binaria Agilent 1260 (G1312B).
- È supportata la pompa binaria Agilent 1260 VL (G1312C).

Novità dell'acquisizione dati

- È supportata la pompa binaria Agilent 1290 VL (G4220B).
- È supportato l'autocampionatore standard Agilent 1260 (G1329B).
- È supportato l'autocampionatore ad alte prestazioni Agilent 1260 (G1367E).
- È supportato l'autocampionatore ad alte prestazioni con micropiastra Agilent 1260 (G1377A).
- È supportato l'iniettore LC Agilent 1290 HTC/HTS (G4277A).
- È supportato l'iniettore LC Agilent 1290 HTC/HTS (G4278A).
- È supportato il rivelatore a lunghezza d'onda variabile (VWD) Agilent 1260 VL (G1314B).
- È supportato il rivelatore a lunghezza d'onda variabile (VWD) Agilent 1260 SL (G1314C).
- È supportato il rivelatore a lunghezza d'onda variabile (VWD) Agilent 1260 (G1314F).
- È supportato il rivelatore a lunghezza d'onda variabile (VWD) Agilent 1290 (G1314E).
- È supportato il rivelatore con diode array (DAD) Agilent 1260 SL (G1315C).
- È supportato il rivelatore con diode array (DAD) Agilent 1260 VL (G1315D).
- È supportato il rivelatore con diode array (DAD) Agilent 1260 (G4212B).
- È supportato il comparto colonna termostato (TCC) Agilent 1260 (G1316A).

Versione B.03.01

- È supportato il programma Study Manager. È possibile creare uno studio da una lista di lavoro o da un file di input PK LIMS.
- È possibile aggiornare un metodo di MRM dinamico usando un file di dati o i risultati del report dell'analisi quantitativa.
- È possibile visualizzare un metodo di MRM nella finestra del visualizzatore Dynamic MRM.
- È supportato il programma Map File Generator. Questo programma consente di modificare un file di mapping usato per mappare le colonne di un file di importazione per i nomi delle colonne all'interno di una lista di lavoro.
- È supportato l'autocampionatore a elevate prestazioni Agilent 1290 Infinity (G4226A).
- È supportata la pompa binaria Agilent 1290 Infinity (G4220A).
- È supportato il rivelatore con diode array (DAD) Agilent 1290 Infinity (G4212A).
- È supportato il comparto colonna termostato (TCC) Agilent 1290 Infinity (G1316C).
- La tensione del capillare può essere modificata durante un'esecuzione per sistemi HPLC-Chip Cube.

Versione B0.02.01 con Service Pack 1

- È supportato l'autocampionatore a elevate prestazioni Agilent 1290 Infinity (G4226A).
- È supportata la pompa binaria Agilent 1290 Infinity (G4220A).
- È supportato il rivelatore con diode array (DAD) Agilent 1290 Infinity (G4212A).
- È supportato il comparto colonna termostato (TCC) Agilent 1290 Infinity (G1316C).
- Le informazioni sull'ampiezza di picco sono visualizzate nell'interfaccia utente dell'MRM dinamico.
- È supportato il database della fase II dell'MRM dinamico.

Versione B.02.01

- È supportato il sistema LC/MS Agilent 6410A triplo quadrupolo.
- È supportato il sistema LC/MS Agilent 6410A 2K triplo quadrupolo.
- È supportato il sistema LC/MS Agilent 6410B triplo quadrupolo.
- È supportato il sistema LC/MS Agilent 6430A triplo quadrupolo.
- È supportato il sistema LC/MS Agilent 6460A triplo quadrupolo.
- L'intervallo di massa è compreso tra 5 e 2250 amu per il sistema LC/MS Agilent 6430 triplo quadrupolo.
- È ancora supportato il sistema LC/MS Agilent 6460A triplo quadrupolo (vedere più avanti).
- È supportato l'MRM dinamico. L'MRM dinamico permette di aggiungere fino a 4000 transizioni in un unico segmento temporale con una sovrapposizione fino a 200 transizioni contemporaneamente.
- È supportato il software Agilent MassHunter Workstation versione B.02.00 con Patch 3 - programma Qualitative Analysis.
- È supportato il software Agilent MassHunter Workstation versione B.03.01 - programma Quantitative Analysis.
- È supportata la rapida inversione di polarità con tempo di inversione di 30 ms per i modelli 6430A e 6460A.
- È supportata la rapida inversione di polarità con tempo di inversione di 500 ms per il modello 6410B.
- Durante l'acquisizione dei dati sui modelli 6410B, 6430A o 6460A, non vengono eseguite correzioni della linea di base per il rumore elettronico o della corrente di oscurità. Questo rumore è infatti incluso nel file di dati.

Versione B.02.00

- Solo il modello 6460A triplo quadrupolo è supportato nella presente revisione.
- La tecnologia Agilent Jet Stream è supportata sul sistema LC/MS Agilent 6460 triplo quadrupolo.
- L'intervallo di massa è esteso da 5 a 3000 amu per il sistema LC/MS Agilent 6460 triplo quadrupolo. Non esistono masse di regolazione superiori a 2600 amu.
- L'intervallo di massa è compreso tra 5 e 1650 per il sistema Agilent 6410A triplo quadrupolo. L'intervallo di massa è compreso tra 5 e 2000 per il sistema Agilent 6410B triplo quadrupolo.
- È possibile acquisire fino a 500 MRM per segmento temporale.
- È possibile acquisire più di 150 MRM al secondo.
- È supportata l'inversione rapida di polarità positiva/negativa (ritardo di inversione di 100 ms).
- Sono supportati i modelli D ed E dei rivelatori a lunghezza d'onda variabile di Agilent.
- La riduzione del ritardo gradiente è supportata su HPLC-Chip.
- È supportato l'autocampionatore a elevate prestazioni Agilent 1367D SL Plus.
- È possibile utilizzare qualsiasi lingua per creare gli script.
- È possibile inserire una lista di lavoro nella lista di lavoro corrente.
- Un'icona personalizzata è usata per indicare un file di dati MassHunter. Il programma ".d Icon Changer" è disponibile per modificare l'icona dei file di dati già acquisiti.
- Le notifiche del registro possono essere visualizzate nella barra delle applicazioni sotto forma di messaggi a fumetto.
- La quantità di spazio libero su disco è visualizzata nella barra di stato della finestra Data Acquisition.
- Il programma DA Reprocessing è disponibile per consentire la rielaborazione dei file di dati con il programma Qualitative Analysis.

Per informazioni sulle novità dei programmi Qualitative Analysis e Quantitative Analysis, consultare la *Guida alla familiarizzazione* per ciascuno di questi programmi.

Dove reperire le informazioni

Help

Premere F1 Per ottenere ulteriori informazioni su un riquadro, una finestra o una finestra di dialogo, posizionare il cursore sulla parte del riquadro, della finestra o della finestra di dialogo di interesse e premere **F1**.

Menu Help Dal menu Help, accedere alla guida rapida e alla guida di riferimento.

Documenti

È possibile trovare i manuali a corredo dell'hardware o del software per il triplo quadrupolo. Inoltre, è possibile reperire una versione PDF dei manuali dal disco di installazione all'interno della cartella **Manuals**. Molti di questi manuali sono anche disponibili sul sito web www.chem.agilent.com.

Guida all'installazione Questa guida può essere utilizzata per installare l'hardware e il software, configurare lo strumento e verificarne le prestazioni.

Guida agli aggiornamenti Questa guida viene utilizzata per aggiornare il software MassHunter Workstation a partire da una precedente versione.

Guida ai concetti - Quadro d'insieme Contiene le informazioni di riferimento per aiutare a comprendere il funzionamento dell'hardware e del software.

Guida alla manutenzione Utilizzare questa guida per mantenere e risolvere i problemi del sistema LC/MS Agilent triplo quadrupolo.

Guida alla familiarizzazione per l'acquisizione dati con la serie 6400 triplo quadrupolo. Contiene gli esercizi per imparare a usare l'hardware del sistema LC/MS triplo quadrupolo e il programma Data Acquisition per la serie 6400 triplo quadrupolo.

Guida introduttiva a Study Manager Utilizzare questa guida per imparare a usare il software MassHunter Study Manager.

Dove reperire le informazioni

Formazione

Guida introduttiva al software MassHunter Optimizer Utilizzare questa guida per conoscere il programma MassHunter Optimizer. Il programma MassHunter Optimizer fornisce un metodo per ottimizzare automaticamente i parametri di acquisizione dati relativi a ciascun componente analizzato, per la modalità MRM (monitoraggio di reazione multipla) su uno strumento a triplo quadrupolo.

Guida introduttiva al programma MassHunter QQQ Compliance Utilizzare questa guida per conoscere il programma MassHunter QQQ Compliance.

Guida introduttiva al programma MassHunter Quant Compliance Utilizzare questa guida per conoscere il programma MassHunter Quant Compliance (*questa guida è contenuta nel disco Quantitative Analysis*).

Guida alla familiarizzazione del programma Qualitative Analysis Eseguire gli esercizi per imparare a usare il programma Qualitative Analysis (*questa guida è contenuta nel disco Qualitative Analysis*).

Guida alla familiarizzazione del programma Quantitative Analysis Eseguire gli esercizi per imparare a usare il programma Quantitative Analysis (*questa guida è contenuta nel disco Quantitative Analysis*).

Formazione

Guida alla familiarizzazione Usare le tre guide per imparare a conoscere meglio il software.

Guida introduttiva Usare le guide introduttive a Study Manager, Optimizer e Compliance per imparare a conoscere questi programmi.

DVD di formazione sui report Usare i video e gli esercizi di familiarizzazione per imparare a stampare i report e a personalizzarli utilizzando il componente aggiuntivo Report Designer e il programma Excel.

Corsi di formazione Visitare il sito www.chem.agilent.com per visualizzare un elenco di corsi istruttivi sul sistema LC/MS Agilent triplo quadrupolo.

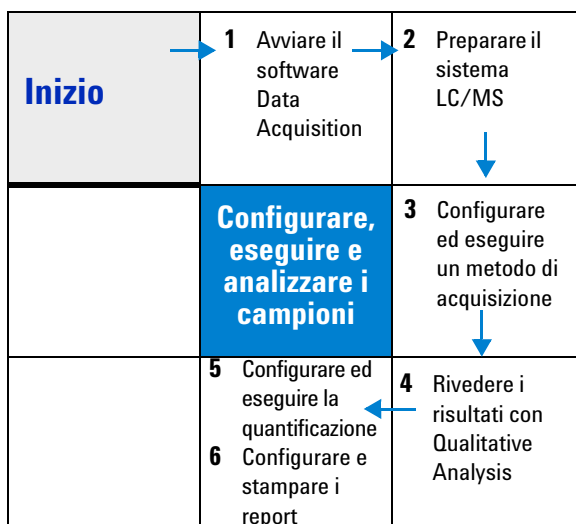
Operazioni preliminari

Installazione dell'hardware e del software del sistema LC/MS triplo quadrupolo

Utilizzare la *Guida all'installazione* per installare l'hardware e il software e verificare le prestazioni dello strumento.

Configurazione, esecuzione e analisi dei campioni

Il percorso illustrato in basso descrive le fasi necessarie per configurare ed eseguire un batch di campioni dall'inizio alla fine. Seguire le istruzioni riportate nelle pagine che seguono per iniziare a usare lo strumento e imparare dove reperire le informazioni che torneranno utili in ogni fase del percorso.



Fase 1. Avvio del software Data Acquisition

Le istruzioni fornite prevedono che:

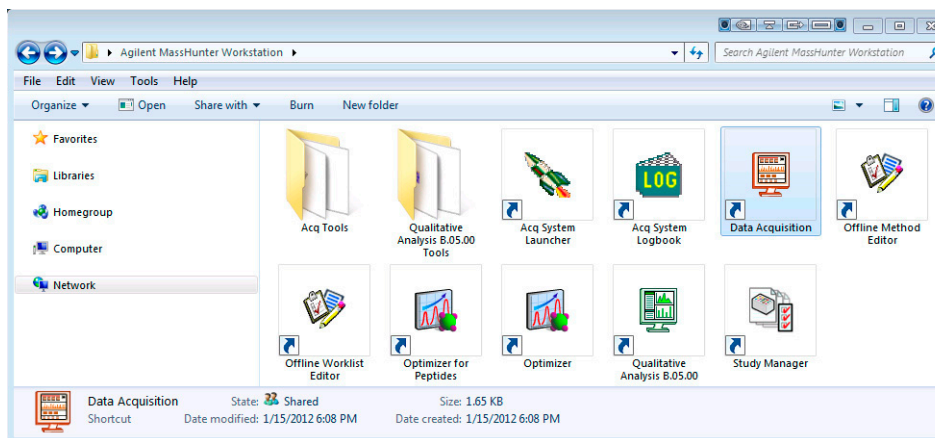
- L'hardware e il software siano installati.
- Lo strumento sia configurato.

Usare le istruzioni contenute nella *Guida all'installazione* per configurare lo strumento per la prima volta e tutte le volte che si modifica la configurazione LC.

I moduli LC e il dispositivo MS a triplo quadrupolo sono accesi, ma la pompa LC non funziona.

Dopo l'installazione tutte le icone del software Agilent MassHunter Workstation sono visualizzate sul desktop. Per avviare il programma di acquisizione dati, fare doppio clic sull'icona **Data Acquisition**.

Viene visualizzata la finestra Data Acquisition.



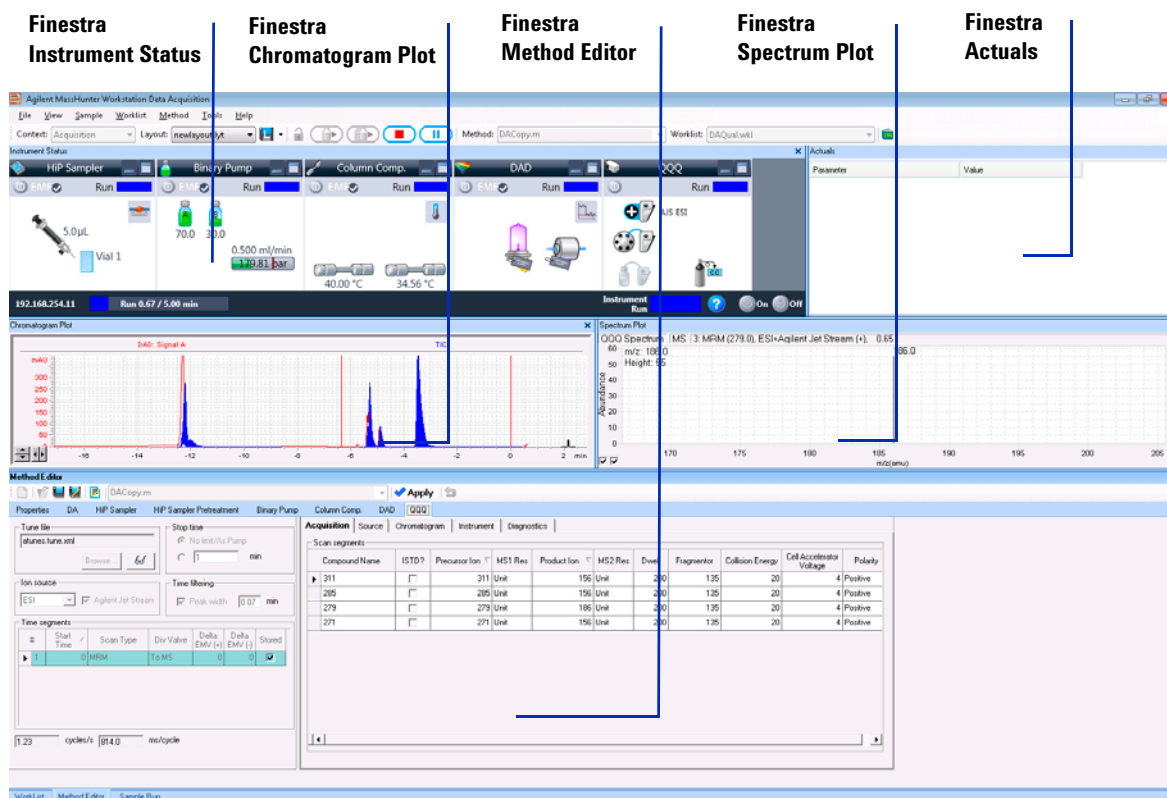
NOTA

Quando si apre la finestra, i motori del software si avviano automaticamente. Se è necessario riavviarli, fare clic con il tasto destro sull'icona **Acq System Launcher** nella barra di sistema, quindi fare clic su **Start Engines**.

Se i moduli LC sono stati modificati di recente, è opportuno ricordarsi di configurare di nuovo lo strumento. Vedere la *Guida all'installazione* per istruzioni.

Finestre - per svolgere la maggior parte del lavoro

Quando si avvia il programma Data Acquisition per la prima volta, viene visualizzata la finestra principale. La maggior parte del lavoro viene svolta all'interno delle otto finestre contenute in questa finestra principale. Le otto finestre forniscono gli strumenti per configurare i metodi di acquisizione, eseguire i campioni in maniera automatica o interattiva, monitorare lo stato dello strumento, monitorare le esecuzioni e calibrare lo strumento.



Le finestre Sample Run e Worklist sono visualizzate come schede. Queste tre finestre "condividono" questo spazio. Fare clic sulla scheda per passare a un'altra finestra.

Figura 1 Finestra principale del programma Data Acquisition

Mostra/nascondi finestre È possibile mostrare una finestra alla volta nella schermata o fino a sette finestre contemporaneamente. È impossibile nascondere tutte le finestre. Per mostrare o nascondere una finestra, fare clic sui comandi nel menu **View**. È possibile inoltre nascondere una finestra facendo clic sull'icona X in alto a destra della finestra.

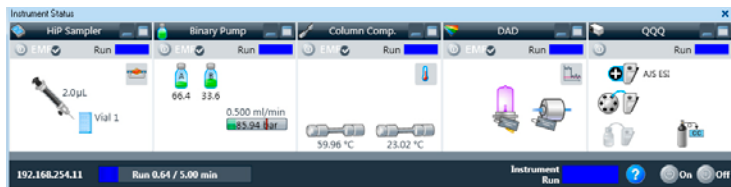
Facendo clic su una finestra, il titolo della finestra attiva assume un colore diverso. Premere **F1** per visualizzare una guida sulla finestra attiva. È inoltre possibile trascinare il bordo di una finestra per ridimensionarla. Facendo doppio clic sul titolo della finestra, la finestra "diventa mobile" e può essere trasportata fuori della finestra principale. Fare nuovamente doppio clic sulla barra del titolo per "ancorare" la finestra. È possibile spostare e ancorare la finestra facendo clic con il tasto destro sul titolo della finestra e selezionando **Floating**.

Finestra Instrument Status Da questa finestra è possibile visualizzare lo stato di ciascun dispositivo configurato con lo strumento: **Error, Not ready, Pre-run, Post-run, Running, Injecting, Idle, Offline** e **Standby**. È inoltre possibile impostare il controllo di esclusione del metodo e i parametri di configurazione per i dispositivi LC e lo strumento MS.

Questa finestra visualizza lo stato corrente di ciascun dispositivo sotto forma di testo e attraverso la codifica del colore:

Codifica del colore nella finestra Instrument Status

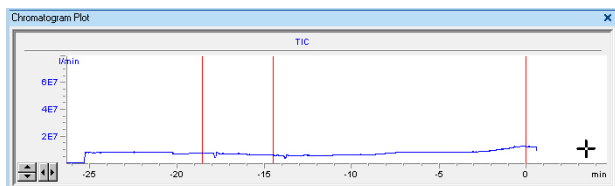
Colore	Stato
Rosso	Error (Errore)
Giallo	Not ready (Non pronto)
Viola	Pre-run, post-run, Waiting (Pre-esecuzione, post-esecuzione, in attesa)
Blu	Running, injecting (In esecuzione, iniezione in corso)
Verde	Idle (Inattivo)
Grigio scuro	Offline (Non in linea)
Grigio chiaro	Standby (ad esempio, lampade spente)



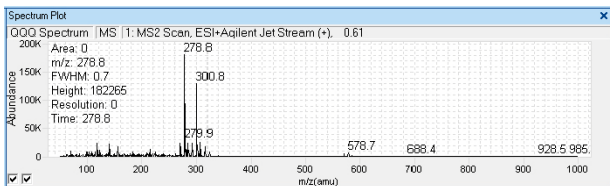
Finestra Actuals Da questa finestra è possibile visualizzare il valore corrente dei parametri dello strumento selezionati.

Parameter	Value
000: No Ready Test Long	Ion source in the method does n...
000: Run State	standby
000: High Vac	6.01E-5 Torr
000: Gas Temp	200 °C
000: Rough Vac	3.55E+0 Torr
000: Turbo 1 Speed	100.0 %
000: Turbo 2 Speed	100.0 %
000: Forevac Vacuum	4.00E-03
000: Sheath Gas Flow	3.0 l/min
000: Sheath Gas Temp	125 °C
Binary Pump: Ripple	0 %

Finestra Chromatogram Plot Da questa finestra è possibile monitorare i tracciati del cromatogramma in tempo reale. Questi tracciati possono essere segnali definiti dall'utente e/o parametri dello strumento.



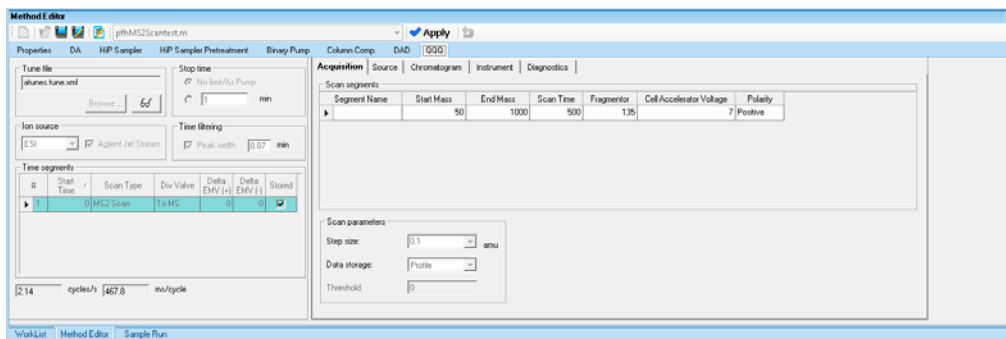
Finestra Spectrum Plot Da questa finestra è possibile monitorare il tracciato spettrale in tempo reale.



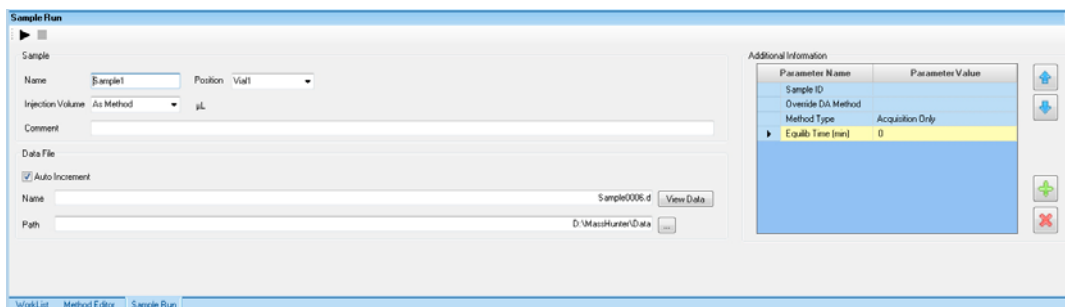
Operazioni preliminari

Fase 1. Avvio del software Data Acquisition

Finestra Method Editor Da questa finestra è possibile immettere i parametri di acquisizione per il metodo.



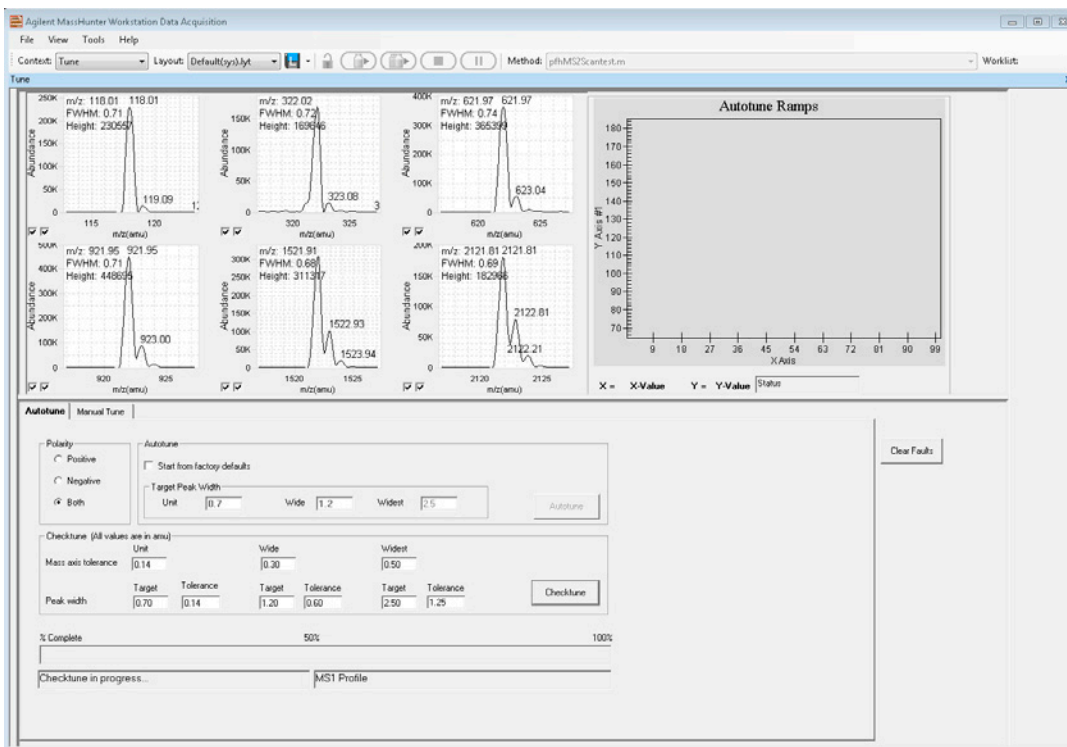
Finestra Sample Run Da questa finestra è possibile inserire le informazioni sul campione per eseguire singoli campioni in maniera interattiva, oppure avviare l'esecuzione di un singolo campione. Inoltre, è possibile specificare il campo Override DA Method e selezionare **Both Acquisition and DA** oppure **DA Only** per il campo **Method Type**, per eseguire l'analisi dei dati come parte del metodo.



Finestra Worklist Da questa finestra è possibile immettere le informazioni sul campione per più campioni. Quando si esegue la lista di lavoro, i campioni vengono eseguiti automaticamente nell'ordine elencato. È possibile scegliere tra le varie opzioni di esecuzione: Acquisition Only, Both Acquisition and DA, oppure DA only selezionando una di queste opzioni come parte del metodo da eseguire nella finestra di dialogo Worklist Run Parameters.

	Sample Name	Sample Position	Method	Data File	Sample Type	Level Name	Comment	Sample Group	Info.
1	Sample1	P1-A1	default.m	WorklistData1.d	Sample				
2	Sample2	P1-A2	default.m	WorklistData2.d	Sample				
3	Sample3	P1-B1	default.m	WorklistData3.d	Sample				
4	Sample4	P1-B2	default.m	WorklistData4.d	Sample				

Finestra Tune Da questa finestra è possibile calibrare lo spettrometro di massa. È possibile utilizzare gli algoritmi di calibrazione automatica forniti, oppure decidere di calibrare lo strumento manualmente.



Fase 2. Preparazione dei moduli LC

Leggere e seguire le istruzioni contenute nella Guida in linea per ciascuna delle attività della lista di lavoro descritte nelle pagine più avanti.

1 Impostare il flusso LC su **Waste**.

Mentre si esegue il condizionamento e l'equilibratura della colonna, è possibile calibrare lo strumento MS a triplo quadrupolo. In questa fase si vuole impedire il pompaggio del flusso di effluenti all'interno del sistema, per cui si inverte la direzione del flusso LC allontanandolo dalla sorgente ionica MS e canalizzandolo verso lo scarico.

Se il cromatografo liquido è collegato a un rivelatore VWD o a un rivelatore DAD, è comunque possibile monitorare le oscillazioni del cromatogramma in tempo reale di uno dei rivelatori prima di un'esecuzione.

- a Fare clic con il tasto destro sul dispositivo **QQQ** nella finestra Instrument Status.

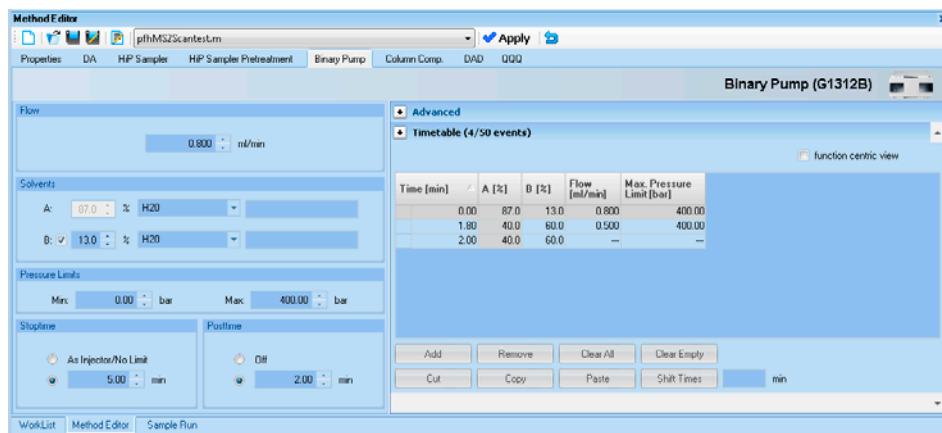


- b Fare clic su **LC > Waste**.

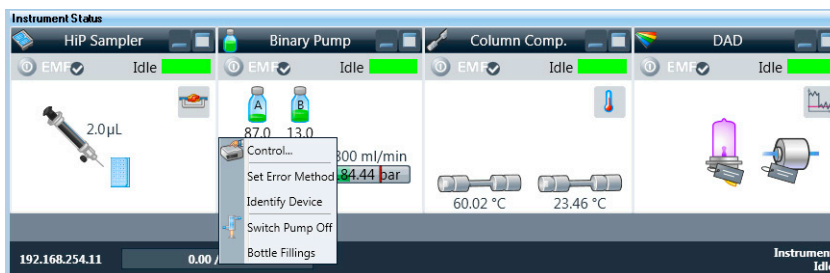
2 Spurgare la pompa LC.

Per spurgare la pompa, seguire le istruzioni fornite nel *Manuale dell'utente* per la pompa.

- 3 Configurare lo strumento per condizionare o equilibrare la colonna.
 - a Immettere i parametri LC, quindi fare clic su **Apply** per scaricarli nello strumento LC.



- b Fare clic con il tasto destro su un modulo LC nella finestra Instrument Status per modificare i parametri di controllo di esclusione del metodo, se necessario.



- c Monitorare la linea di base e adattare il tracciato per assicurarsi che la colonna sia equilibrata e che la linea di base sia stabile (vedere [fase 4](#) e [fase 5](#) a pagina 20).

Operazioni preliminari

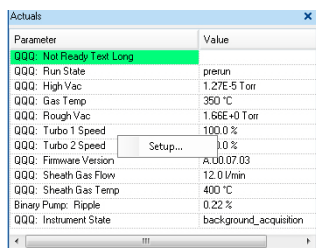
Fase 2. Preparazione dei moduli LC

- 4 Configurare lo strumento per visualizzare i valori dei parametri in tempo reale (valori effettivi).

Mentre si prepara un'esecuzione e durante un'esecuzione, potrebbe essere necessario visualizzare i valori effettivi dei parametri dello strumento.

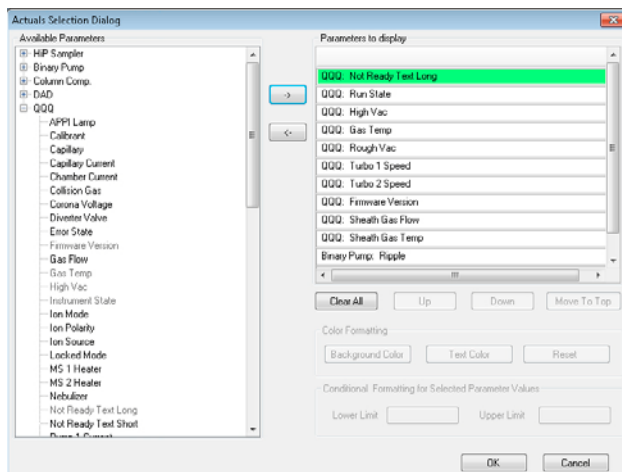
È possibile farlo all'interno della finestra Instrument Status.

- a Fare clic con il tasto destro sull'elenco **Actuals** per visualizzare il comando Setup.



Parameter	Value
QQQ: Not Ready Text Long	
QQQ: Run State	pre-run
QQQ: High Vac	1.27E-5 Torr
QQQ: Gas Temp	350 °C
QQQ: Rough Vac	1.68E+0 Torr
QQQ: Turbo 1 Speed	100.0 %
QQQ: Turbo 2 Speed	10.0 %
QQQ: Firmware Version	AJ00.07.03
QQQ: Sheath Gas Flow	12.0 l/min
QQQ: Sheath Gas Temp	400 °C
Binary Pump: Ripple	0.22 %
QQQ: Instrument State	background_acquisition

- b Fare clic su **Setup** per far comparire l'elenco dei valori disponibili per il monitoraggio.

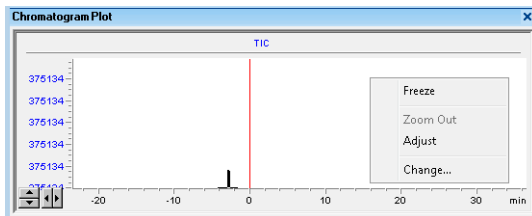


- c Aggiungere tutti i valori dei parametri che si desidera monitorare, quindi fare clic su **OK**.

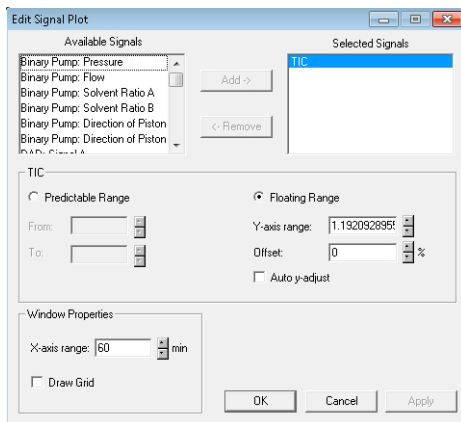
5 Impostare lo strumento per visualizzare il tracciato in tempo reale.

Mentre si esegue il condizionamento della colonna, è possibile impostare le visualizzazioni per monitorare l'effluente.

- Fare clic con il tasto destro sul tracciato del cromatogramma, quindi su **Change**.



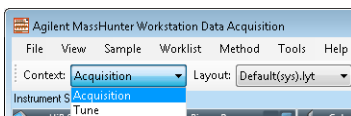
Nella finestra di dialogo Edit Signal Plot, è possibile selezionare il tipo di segnale di visualizzazione.



Fase 3. Preparazione dello strumento a triplo quadrupolo.

Eeguire una funzione di Checktune, Autotune o Manual Tune

- 1 Dall'elenco **Context**, fare clic su **Tune**.



È possibile visualizzare la finestra Instrument Status, la finestra Actuals e la finestra Tune quando si passa al contesto Tune. Fare clic su **Tune** nel menu **View** se la finestra Tune non è visibile.



- 2 Fare clic su **Checktune** per valutare se i parametri MS rientrano nei limiti adatti per produrre l'accuratezza e la risoluzione di massa specificati. La funzione Checktune impiega un tempo massimo di 15 minuti.

Se il file di calibrazione corrente è stato calibrato l'ultima volta con Fast Scan Autotune, l'algoritmo Checktune controllerà solo MS2. Se il file di calibrazione corrente è stato calibrato l'ultima volta con Autotune, l'algoritmo Checktune controllerà MS1 e MS2.

Se il file di calibrazione corrente è stato calibrato l'ultima volta con Fast Scan Autotune, la casella di controllo **Fast Scan** è selezionata nella scheda Manual Tune.

Eeguire un controllo **Checktune** con cadenza regolare.

Se il controllo **Checktune** è positivo, passare a [fase 4](#).

Se il controllo **Checktune** è negativo, è necessario eseguire un Autotune (descritto di seguito).

- 3** Fare clic su **Autotune** per calibrare lo spettrometro di massa automaticamente (15-20 minuti per tutti i modelli ad eccezione del 6490. Il modello 6490 impiega circa 45 minuti per ciascuna modalità di ionizzazione). Il sistema modifica automaticamente i vari parametri di calibrazione per calibrare lo spettrometro. Eseguire l'Autotune solo quando necessario.

Selezionare la casella di controllo **Start from Factory Defaults** solo dopo aver spento e riavviato lo strumento. In seguito, facendo clic su **Autotune**, lo strumento viene calibrato in base ai valori di fabbrica predefiniti (20-25 minuti per tutti i modelli ad eccezione del 6490. Il modello 6490 impiega circa 45 minuti per ciascuna modalità di ionizzazione).

I report Checktune e Autotune vengono generati automaticamente dopo che l'Autotune si conclude positivamente. Se i risultati dell'Autotune sono negativi, non viene stampato nessun report.

Se l'Autotune è negativo o se viene stabilito che lo spettrometro di massa a triplo quadrupolo necessita di valori personalizzati inseriti per i parametri di calibrazione, è possibile calibrare lo strumento manualmente.

- 4** (facoltativo) Fare clic sul pulsante **Fast Scan Autotune Only** per eseguire la calibrazione con scansione rapida. Eseguire questa operazione solo se i risultati dell'Autotune sono accettabili.

L'acquisizione con scansione rapida è supportata solo sul modello 6490 con due tipi di scansione: **MS2 Scan** e **Product Ion**. L'Autotune con scansione rapida esegue la calibrazione solo con la risoluzione **Wide** (1,2), con **Samples** impostato a 1 (nella scheda Manual Tune > Acquisition) con una dimensione passo di 0,2. Il tempo di scansione nella scheda Acquisition viene generato automaticamente in base alla dimensione del passo e all'intervallo di massa.

- 5** Dall'elenco **Context**, fare clic su **Acquisition**.

Impostare il flusso LC su MS

- Dopo aver eseguito il condizionamento della colonna e la calibrazione dello spettrometro di massa a triplo quadrupolo, è necessario invertire il flusso LC da Waste in MS. A tal fine, consultare la sezione “[Impostare il flusso LC su Waste.](#)” a pagina 18.

Monitorare la linea di base MS e le visualizzazioni spettrali



Se non è stata monitorata la linea di base LC con un rivelatore VWD o DAD, assicurarsi che la linea di base del triplo quadrupolo sia stabile e che nessuno spettro di intensità interferente appaia nella visualizzazione.

Se la linea di base LC è stata monitorata con un rivelatore VWD o DAD, ripristinare le visualizzazioni predefinite del triplo quadrupolo.

- 1 Fare clic con il tasto destro sul tracciato del cromatogramma, quindi su **Change**.
- 2 Selezionare il segnale MS, quindi fare clic su **OK**.

Visualizzare eventi ed errori nel registro di sistema

Durante la preparazione dello strumento, potrebbe essere visualizzato un errore che deve essere risolto. Questa operazione viene eseguita attraverso il System Logbook Viewer.

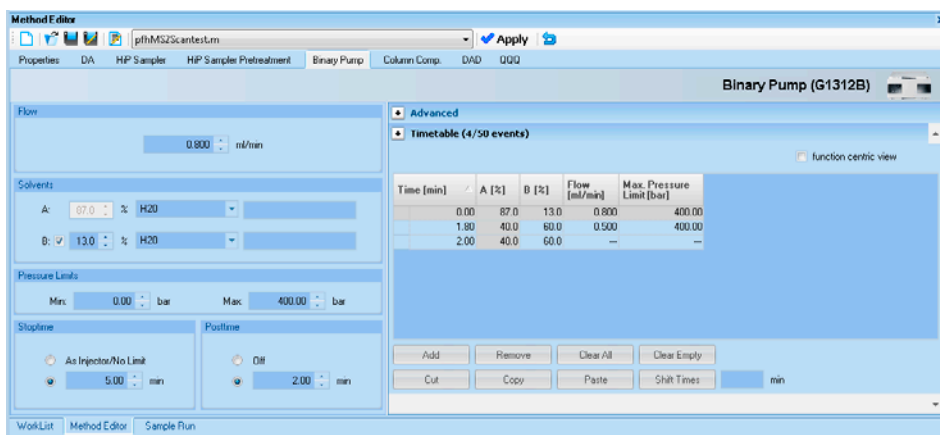
- Fare clic sull'icona **Log** () nella barra degli strumenti della finestra Data Acquisition, quindi visualizzare gli eventi registrati.
- In alternativa, fare clic su **Tools > System Logbook Viewer**.
- O ancora, fare clic con il tasto destro sull'icona  nella barra delle applicazioni di sistema. Per prima cosa, fare clic su **Enable Notification**. Quindi, fare clic con il tasto destro sull'icona LOG e poi su **Configure**. Il sistema invierà una notifica dei nuovi errori e avvertimenti mostrando i messaggi nella barra delle applicazioni.

Fase 4. Configurazione ed esecuzione di un metodo di acquisizione

Leggere e seguire le istruzioni riportate nella Guida in linea per ciascuna delle attività descritte nelle pagine successive.

Inoltre, completare l'Esercizio contenuto nella *Guida alla familiarizzazione* del programma Data Acquisition per imparare a configurare ed eseguire il metodo di acquisizione.

- 1 Configurare il metodo:
 - a Immettere i valori e le impostazioni per ciascuna delle tabelle in basso.
 - b (facoltativo) Se si desidera scaricare le impostazioni nello strumento, fare clic su **Apply**.
 - c Per salvare il metodo, fare clic su **Method > Save As**.
 - d Denominare il metodo e fare clic su **OK**.
- 2 Immettere i valori per tutti i moduli LC configurati per lo strumento.



NOTA

Durante l'immissione dei parametri MS alla pagina successiva, assicurarsi che il file di calibrazione sia quello da utilizzare insieme all'acquisizione.

- 3 Immettere i valori dei parametri per il triplo quadrupolo.
 - a Selezionare il tipo di scansione da **Scan Type** dall'elenco contenuto nella tabella **Time segments**. La tabella Scan segments viene cancellata quando si modifica il tipo di scansione. I parametri disponibili sulla destra variano in base al valore Scan Type.

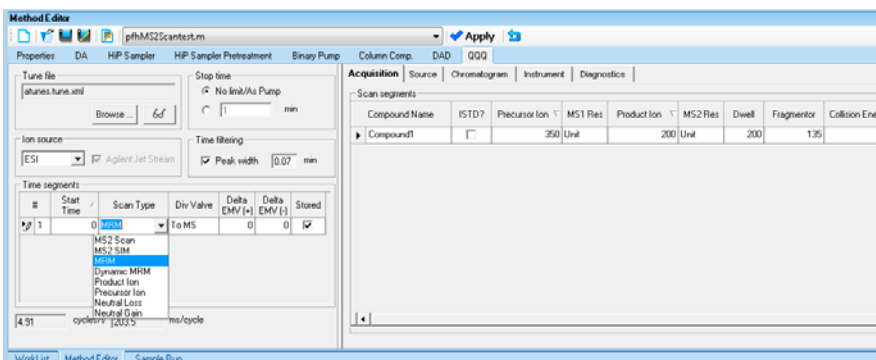
Operazioni preliminari

Fase 4. Configurazione ed esecuzione di un metodo di acquisizione

Se si modifica **Scan Type** da **MRM** in **Dynamic MRM** oppure in **Triggered MRM**, è possibile copiare e incollare le transizioni dagli Appunti nella nuova tabella **Scan segments**. Consultare la Guida in linea per ulteriori informazioni.

- b** Immettere un valore nel campo **Acquisition** che si desidera modificare. È possibile inserire più segmenti di scansione.

Non è possibile impostare la tensione del frammentatore in Acquisition se il tipo di strumento è il modello Agilent 6490. Questo strumento utilizza sempre il valore nel file di calibrazione.



- 4** Configurare le impostazioni per modificare i parametri del sistema MS a triplo quadrupolo con segmenti e scansioni:
 - a** Per aggiungere un segmento, fare clic con il tasto destro in un punto qualsiasi della sezione **Scan segments** per far comparire il menu Scan Segments, quindi fare clic su **Add Row**.
 - b** Immettere i parametri per ciascun segmento da sottoporre a scansione.

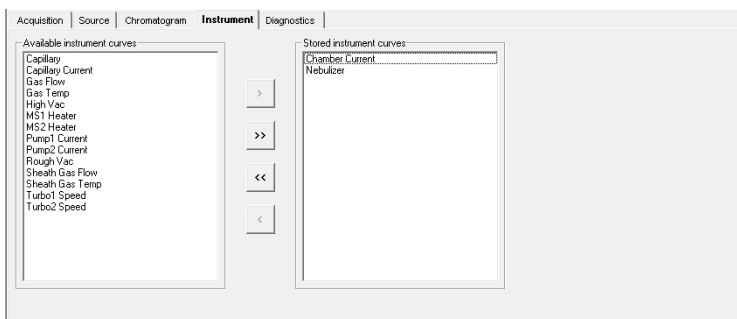
The screenshot shows a close-up of the 'Scan segments' table. The table has columns for Compound Name, ISTD?, Precursor Ion, MS1 Res, Product Ion, MS2 Res, Dwell, Fragmentor, Collision Energy, Cell Accelerator Voltage, and Pub. A context menu is open over the table, showing options like 'Add Row', 'Delete Row', 'Sort', 'Import from optimizer...', 'Update MRM Method...', 'Cut', 'Copy', 'Paste', 'Paste from Clipboard', 'Fill Down', and 'Fill Column'. The table contains four rows of data:

Compound Name	ISTD?	Precursor Ion	MS1 Res	Product Ion	MS2 Res	Dwell	Fragmentor	Collision Energy	Cell Accelerator Voltage	Pub
Sulfamethoxine	<input type="checkbox"/>	311 Unl		50	380	20			5	Positive
Sulfachloropyridazine	<input type="checkbox"/>	285 Unl		30	380	20			5	Positive
Sulfamethazine	<input type="checkbox"/>	279 Unl		30	380	15			5	Positive
Sulfamethizole	<input type="checkbox"/>	271 Unl		30	380	10			5	Positive

- 5 Impostare i segnali per il tracciato del cromatogramma:
- Fare clic sulla scheda **Chromatogram**.
 - Selezionare **Chromatogram Type**, quindi immettere gli altri valori del tracciato.

Chromatogram Type	Label	Extracted Masses	Precursor Ion	Product Ion	Excluded Masses	Offset	Y Range
TIC	TIC					0	1E+07
MRM	MRM		350	200		0	1000
EIC	EIC	200				0	1000
MS1EIC	MS1EIC		350	200		0	1000
MS2EIC	MS2EIC		350	200		0	1000
BPC	BPC			200		0	1000
MS1BPC	MS1BPC			200		0	1000
MS2BPC	MS2BPC		350			0	1000

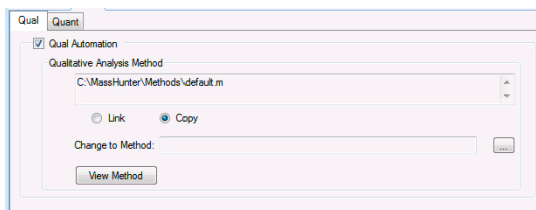
- 6 Configurare **Stored instrument curves** nella scheda Instrument. All'interno del programma Qualitative Analysis, è possibile visualizzare questi valori nella finestra MS Actuals per lo spettro corrente. Con il triplo quadrupolo, i valori nella finestra MS Actuals del programma Qualitative Analysis sono i valori salvati nella scheda Instrument.
- Fare clic sulla scheda **Instrument**.
 - Selezionare **Stored instrument curves**. Questi valori saranno visualizzati nella finestra MS Actuals del programma Qualitative Analysis per ciascuno spettro.



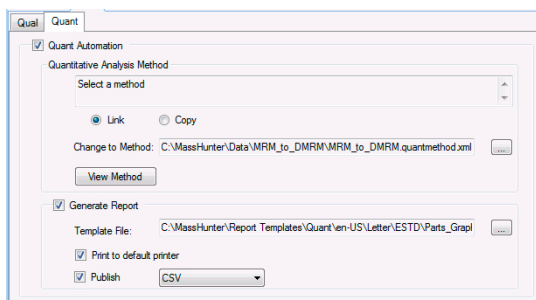
7 Configurare i parametri per l'analisi dei dati (DA).

Un metodo può contenere parametri per l'analisi qualitativa, per l'analisi quantitativa, o per entrambe. Un metodo di analisi dei dati è un metodo che contiene i parametri di acquisizione dati con la casella di controllo **Qual Automation** selezionata nella scheda Qual, oppure con la casella di controllo **Quant Automation** selezionata nella scheda Quant.

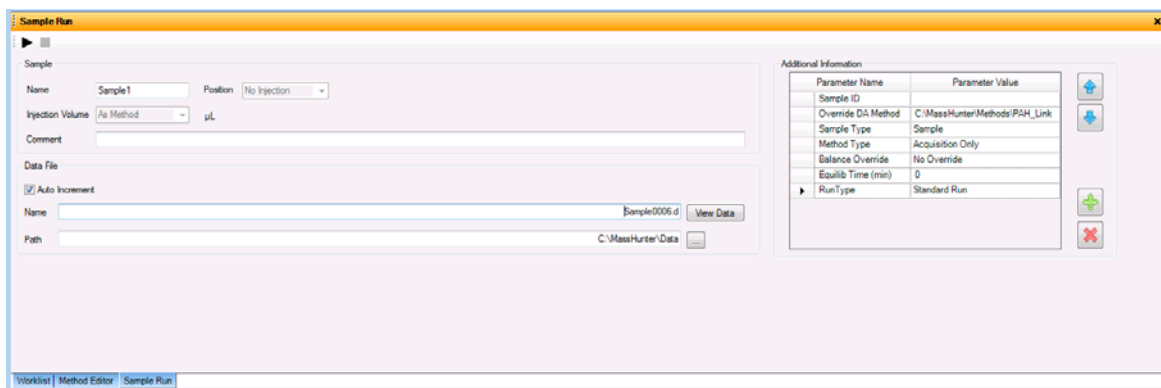
- a Fare clic sulla scheda **DA**.
- b (facoltativo) Selezionare la casella di controllo **Qual Automation**. Il nome dell'attuale metodo di analisi qualitativa è visualizzato nell'elenco. Se si desidera modificare il metodo di analisi qualitativa collegato, fare clic sul pulsante "..." per selezionare un metodo diverso. Quando il metodo DA viene salvato, il metodo di analisi qualitativa selezionato viene copiato o collegato al metodo di acquisizione dati.



- c (facoltativo) Fare clic sulla scheda **Quant**. Selezionare la casella di controllo **Quant Automation**. Il nome dell'attuale metodo di analisi qualitativa è visualizzato nell'elenco. Se si desidera modificare il metodo di analisi quantitativa collegato, fare clic sul pulsante "..." per selezionare un metodo diverso. Quando il metodo DA viene salvato, il metodo di analisi quantitativa selezionato viene copiato o collegato al metodo di acquisizione dati.
- d (facoltativo) Selezionare la casella di controllo **Generate Report** nella scheda Quant. Selezionare quindi il file modello (Template File) da utilizzare. Per stampare il report, selezionare la casella di controllo Print to default printer. È inoltre possibile selezionare la casella di controllo Publish per creare un file in formato CSV, TXT o PDF.




- 8 Salvare il metodo.
 - a Fare clic su **Method > Save As** oppure su **Method > Save**.
 - b Se necessario, denominare il metodo e fare clic su **OK**.
- 9 Configurare ed eseguire i campioni interattivi:
 - a Fare clic sulla finestra **Sample Run**. Per impostazione predefinita, questa finestra è visualizzata come scheda all'interno delle finestre **Worklist** e **Method Editor**.
 - b Immettere le informazioni tipo Sample Name, Data File Name e Path.
 - c Immettere i valori desiderati in **Additional Information**. È possibile modificare il valore dei parametri nell'elenco **Additional Information**.



È quindi possibile eseguire un metodo di analisi dei dati da questa finestra selezionando **Both Acquisition and DA** oppure **DA Only** per il campo **Method Type**. Inoltre, è necessario impostare **Override DA method** per indicare quale metodo di acquisizione dati contiene il metodo DA da eseguire.

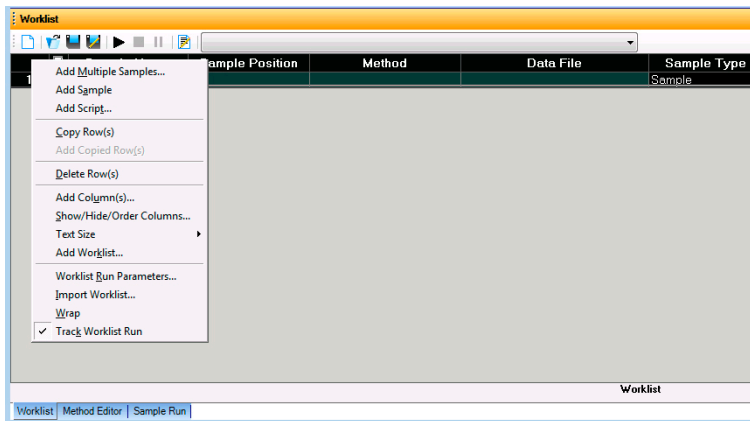
- d Per avviare l'esecuzione di un campione singolo, fare clic sul pulsante Run, , nella finestra Sample Run, oppure sul pulsante Run, , nella barra degli strumenti principale.

È possibile eseguire il campione singolo in modalità bloccata o sbloccata. Se la modalità è bloccata, nessuno può modificare i parametri del metodo o del campione durante un'esecuzione. Non è nemmeno possibile sovrascrivere questo file di dati nel programma Data Acquisition. Il pulsante  nella barra degli strumenti principale indica che la modalità bloccata è attiva.

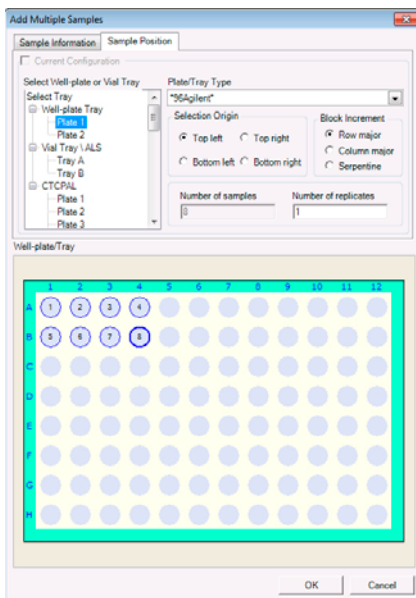
Inoltre, è possibile specificare il campo Override DA Method e selezionare **Both Acquisition and DA** oppure **DA Only** per **Method Type**, in modo da eseguire l'analisi dei dati come parte del metodo.



10 Configurare ed eseguire le liste di lavoro

- a Fare clic con il tasto destro in alto a sinistra della lista di lavoro.



- b Fare clic su **Add Multiple Samples**. Si apre la finestra di dialogo Add Multiple Samples.
- c Immettere tutte le informazioni nella scheda Sample Information.
- d Fare clic sulla scheda **Sample Position** per specificare le posizioni della fiala del campione (verificare che il tipo di vassoio campioni specifico sia configurato facendo clic con il tasto destro sull'immagine del dispositivo autocampionatore).



- e Specificare le posizioni, quindi fare clic su **OK**.
- f Per configurare l'esecuzione di una lista di lavoro, fare clic con il tasto destro in alto a sinistra, quindi su **Worklist Run Parameters**.
- g Fare clic sulla scheda **Page 1**.
- h Immettere i percorsi per il metodo e i file di dati.
- i Fare clic sulla scheda **Page 2**.
- j Rivedere le informazioni e fare clic su **OK**.
- k Per avviare l'esecuzione, fare clic sul pulsante **Run Worklist**, , nella barra degli strumenti principale, oppure sul pulsante Run, , nella finestra Worklist.

È possibile eseguire la lista di lavoro in modalità bloccata o sbloccata. Se la modalità è bloccata, nessuno può modificare il metodo o la lista di lavoro quando la lista è in esecuzione.

Operazioni preliminari

Fase 4. Configurazione ed esecuzione di un metodo di acquisizione

NOTA

Per utilizzare un metodo di acquisizione che abbia un metodo DA differente dal metodo inserito nella lista di lavoro, visualizzare la colonna denominata **Override DA Method** nella lista di lavoro mediante la finestra di dialogo **Show/Hide/Order Columns**. All'interno di questa colonna, immettere il nome dell'altro metodo contenente i parametri DA da utilizzare per il campione. La parte di acquisizione dati di questo metodo è utilizzata in luogo della parte di acquisizione dati del metodo corrente.

È inoltre possibile immettere il nome di questo metodo nella finestra di dialogo Add Multiple Samples.

Fase 5. Revisione dei risultati con il programma Qualitative Analysis

Usare il programma Qualitative Analysis per eseguire le attività descritte di seguito e altre attività ancora:

- Rivedere i risultati per lo sviluppo del metodo di acquisizione
- Selezionare gli ioni precursore e gli ioni prodotto più appropriati per le analisi MRM
- Trovare i composti
- Identificare i composti
- Eseguire l'estrazione delle caratteristiche molecolari

Eseguire gli esercizi contenuti nella **Guida alla familiarizzazione per l'analisi qualitativa** per imparare a usare il programma Qualitative Analysis.

Eseguire l'Esercizio 1 contenuto nella **Guida alla familiarizzazione** per l'acquisizione dati del triplo quadrupolo per imparare a usare il programma Qualitative Analysis e sviluppare i metodi di acquisizione.

Inoltre, consultare la Guida in linea per imparare a eseguire altre operazioni per analizzare i dati.

Fase 6. Configurazione ed esecuzione della quantificazione

Un altro fondamentale strumento per l'analisi e il reporting dei risultati del sistema LC/MS triplo quadrupolo è il programma Quantitative Analysis.

- Eseguire gli esercizi contenuti nella **Guida alla familiarizzazione per l'analisi quantitativa** per imparare a eseguire queste operazioni e quantificare i file dei dati acquisiti:
 - Configurazione di un batch e di un metodo per quantificare automaticamente un insieme di campioni
 - Revisione dei risultati imparando a visualizzare e a usare la schermata dei risultati Batch-at-a-Glance
 - Identificazione e utilizzo degli outlier per modificare il metodo e riquantificare i dati usando una curva di calibrazione più adatta o altre impostazioni più appropriate

Inoltre, consultare la Guida in linea per imparare a eseguire altre operazioni per analizzare i dati.

In questo volume

Il presente volume contiene brevi istruzioni che consentono di eseguire operazioni preliminari con il sistema LC/MS Agilent triplo quadrupolo. Nello stesso viene anche rapidamente descritto il programma Data Acquisition, che permette di:

- Preparare lo strumento per un'esecuzione.
- Configurare i metodi di acquisizione.
- Configurare ed eseguire le liste di lavoro.

Microsoft®, Windows®, Windows 7® e Excel® sono marchi registrati di Microsoft Corporation negli Stati Uniti e/o in altri paesi.

© Agilent Technologies, Inc. 2012

Revisione A, febbraio 2012



G3335-94129

