

# Sistema LC binario Agilent 1260 Infinity

Manuale per l'utente  
del sistema



**Agilent Technologies**

# Informazioni legali

© Agilent Technologies, Inc. 2006, 2008-2011, 2013

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

## Codice del manuale

G1312-94303

## Edizione

02/2013

Stampato in Germania

Agilent Technologies  
Hewlett-Packard-Strasse 8  
76337 Waldbronn

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

### Versione software

Il presente manuale è valido per la versione A.01.04 di Agilent OpenLAB CDS.

Windows® è un marchio di Microsoft Corporation registrato negli Stati Uniti.

## Garanzia

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

## Licenze tecnologia

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

## Indicazioni di sicurezza

### AVVERTENZA

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

### ATTENZIONE

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

## In questa guida...

Il presente manuale contiene informazioni sul sistema LC binario Agilent 1260 Infinity.

### **1 Sistema LC binario Agilent 1260 Infinity - Descrizione del prodotto**

Nel presente capitolo sono presentate le caratteristiche del sistema LC binario 1260 Infinity.

### **2 Introduzione**

Nel presente capitolo è riportata un'introduzione al sistema LC binario Agilent 1260 Infinity e ai principi su cui esso si basa.

### **3 Ottimizzazione del sistema LC binario Agilent 1260 Infinity**

Nel presente capitolo sono discusse l'applicazione della teoria e l'utilizzo delle caratteristiche del sistema LC per sviluppare separazioni ottimizzate.

### **4 Configurazione e installazione del sistema**

Nel presente capitolo vengono fornite informazioni su installazione del software, installazione dei moduli e preparazione del sistema per l'utilizzo.

### **5 Guida introduttiva**

Nel presente capitolo vengono fornite informazioni sull'acquisizione e sull'analisi dei dati con il sistema LC binario 1260 Infinity.

### **6 Appendice**

Nel presente capitolo vengono fornite ulteriori informazioni di natura legale, sulla sicurezza e sulle risorse disponibili sul Web oltre che sull'impostazione di un metodo.

# Sommario

<b>1</b>	<b>Sistema LC binario Agilent 1260 Infinity - Descrizione del prodotto</b>	<b>7</b>
	Caratteristiche del sistema LC binario Agilent 1260 Infinity	8
	Componenti del sistema	10
	Specifiche	22
<b>2</b>	<b>Introduzione</b>	<b>27</b>
	Teoria dell'impiego di particelle più piccole nella cromatografia liquida	28
	Vantaggi delle colonne con particelle di dimensioni ridotte	34
	Riscaldamento per attrito	37
<b>3</b>	<b>Ottimizzazione del sistema LC binario Agilent 1260 Infinity</b>	<b>39</b>
	Configurazione del volume di ritardo ottimale	40
	Come ottenere volumi di iniezione maggiori	47
	Come ridurre i tempi di ciclo	49
	Come ridurre al minimo l'effetto memoria	53
	Come ottenere una maggiore risoluzione	55
	Come ottenere una maggiore sensibilità	63
	Come prevenire ostruzioni della colonna	68
<b>4</b>	<b>Configurazione e installazione del sistema</b>	<b>71</b>
	Installazione del software	72
	Installazione dei moduli	74
<b>5</b>	<b>Guida introduttiva</b>	<b>85</b>
	Informazioni sulla guida introduttiva	86
	Preparazione del sistema	87
	Acquisizione dei dati nella schermata del metodo e controllo analisi	92
	Analisi dei dati	100

**6 Appendice 105**

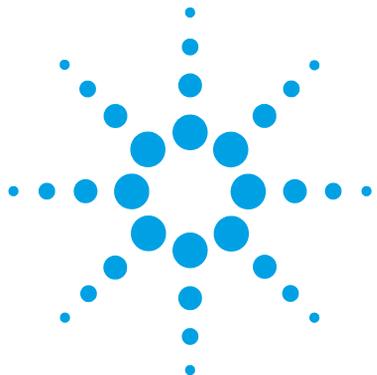
Informazioni per la sicurezza 106

Informazioni sui solventi 109

Agilent Technologies su Internet 114

Impostazione di un metodo con la funzione di modifica di tutto il metodo 115

## Sommario



# 1

## Sistema LC binario Agilent 1260 Infinity - Descrizione del prodotto

Caratteristiche del sistema LC binario Agilent 1260 Infinity	8
Componenti del sistema	10
Pompa binaria 1260 Infinity (G1312B)	11
Degassatore ad alte prestazioni 1260 Infinity (G4225A)	14
Autocampionatore ad alte prestazioni 1260 Infinity (G1367E)	15
Comparto colonne termostato 1290 Infinity (G1316C)	17
Rivelatore a serie di diodi 1260 Infinity (G4212B)	19
Valvole Quick Change serie 1200 Infinity	21
Specifiche	22

Nel presente capitolo sono presentate le caratteristiche del sistema LC binario 1260 Infinity.



## Caratteristiche del sistema LC binario Agilent 1260 Infinity

Il principio che ispira il design del sistema LC binario 1260 Infinity è la possibilità di eseguire applicazioni di cromatografia liquida con separazioni ultra-rapide e ad alta risoluzione pur preservando l'intero spettro di funzionalità per le applicazioni HPLC standard. Pertanto, il sistema assicura la completa retrocompatibilità con i metodi HPLC e UHPLC consolidati già sviluppati dall'utente. L'utilizzo di particelle di dimensioni inferiori a due micron (STM) significa che per ottenere velocità di flusso più alte o in presenza di colonne lunghe è necessaria una pressione superiore per far fluire la fase mobile attraverso la colonna. Il circuito idraulico del sistema LC binario 1260 Infinity è ottimizzato per ridurre al minimo la contropressione, mentre la distribuzione delle dimensioni delle particelle delle colonne ZORBAX RRHT è realizzata in modo da generare una riduzione significativa della contropressione rispetto ad altre colonne STM.

Di seguito sono elencati caratteristiche e vantaggi del design del sistema LC binario Agilent 1260 Infinity:

- Il volume di ritardo configurabile fino a 120  $\mu\text{L}$  della pompa binaria 1260 Infinity abbinato a un intervallo di velocità di flusso compreso tra 0,05 e un massimo di 5 mL/min per valori di pressione fino a 600 bar permette di eseguire applicazioni con colonne da narrow bore (diametro interno di 2,1 mm) a standard bore (diametro interno di 4,6 mm), consentendo di soddisfare i requisiti sia delle applicazioni LC sia di quelle LC/MS.
- La configurazione per volume di ritardo standard della pompa binaria 1260 Infinity consente di eseguire non soltanto applicazioni UHPLC ma anche metodi HPLC tradizionali senza riduzione delle prestazioni o variazione dei pattern cromatografici.
- Il design a flusso passante di nuova generazione dell'autocampionatore ad alte prestazioni 1260 Infinity consente di ottenere la più elevata precisione per un ampio intervallo di volumi di iniezione (da 0,1 fino a 100  $\mu\text{L}$ ) senza sostituire il loop del campione. È progettato per offrire un'alta efficienza di elaborazione dei campioni, un basso effetto memoria e cicli di iniezione rapidi.
- L'alta temperatura, fino a 100 °C su particolari colonne, migliora la flessibilità della selettività e riduce la viscosità dei solventi per una separazione ancora più rapida.

- Nel comparto colonne termostato 1290 Infinity è possibile installare diversi elementi riscaldanti (1,6  $\mu$ L) e raffreddanti (1,5  $\mu$ L) per ottenere un basso volume extra-colonna. La temperatura è regolabile da 10 °C al di sotto della temperatura ambiente fino a 100 °C.
- Il nuovo design pull-out del sistema di azionamento delle valvole e le valvole Quick Change sostituibili dall'utente del comparto colonne termostato 1290 Infinity incrementano l'utilizzabilità e spianano il cammino a soluzioni multi-metodo e di sviluppo automatico dei metodi a produttività ultra-elevata.
- Il kit di tubi a bassa dispersione e le celle di flusso a basso volume riducono al minimo la dispersione dei picchi per le colonne narrow bore.
- Uniformità della linea di base e acquisizione spettrale rapida a velocità di campionamento fino a 80 Hz grazie al nuovo design ottico del rivelatore a serie di diodi 1260 Infinity .
- Sono disponibili diverse celle di flusso per rivelatori UV per l'uso con colonne di diametro interno di 2,1 , 3,0 e 4,6 mm, inclusa la rivoluzionaria cella di flusso a cartuccia Max-Light Agilent con cammino ottico di 60 mm (rumore tipico:  $<\pm 0,6 \mu$ AU/cm) per un'eccezionale sensibilità di rivelazione.

È possibile eseguire l'aggiornamento graduale dalla serie 1100 o 1200 al sistema LC binario Agilent 1260 Infinity; per esempio un rivelatore serie 1100 o un comparto colonne serie 1200 può essere abbinato a una pompa binaria 1260 Infinity.

## Componenti del sistema

Sono possibili svariate configurazioni del sistema LC binario 1260 Infinity, ciascuna adatta agli specifici requisiti delle singole applicazioni. Alcune configurazioni sono descritte in maggiore dettaglio nel presente manuale (vedere [“Configurazione e installazione del sistema”](#), pagina 71). I moduli descritti nelle sezioni che seguono sono i componenti tipici di un sistema LC binario 1260 Infinity. Oltre a questi componenti principali, soluzioni individuali sono disponibili per applicazioni specifiche (alcune sono descritte nel capitolo "Ottimizzazione").

## Pompa binaria 1260 Infinity (G1312B)

La pompa binaria include due pompe identiche integrate in un unico alloggiamento. I gradienti binari vengono creati tramite miscelazione ad alta pressione. È possibile by-passare lo smorzatore di impulsi e il miscelatore nel caso di applicazioni a bassa velocità di flusso oppure quando si desidera un volume transiente minimo. Le applicazioni tipiche riguardano i metodi ad alta produttività con gradienti rapidi su colonne ad alta risoluzione da 2,1 mm. La pompa è in grado di erogare il flusso nell'intervallo 0,1 – 5 mL/min fino a un massimo di 600 bar. Una valvola (opzionale) di selezione del solvente consente di formare miscele binarie (isocratiche o gradienti) da uno dei due solventi per canale. Il lavaggio attivo delle guarnizioni (opzionale) è disponibile per l'uso con soluzioni tampone concentrate.

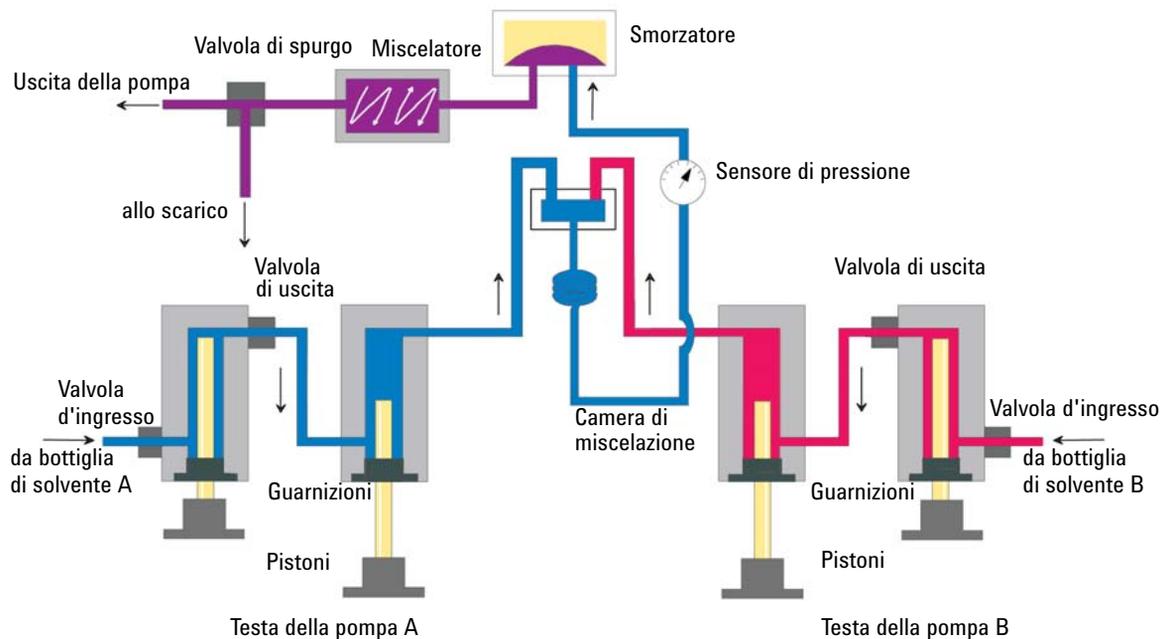
### Principio di funzionamento

La pompa binaria è basata su un design a due canali e due pistoni in serie, che integra tutte le funzioni essenziali tipiche di un sistema di erogazione del solvente. Il dosaggio del solvente e l'erogazione al lato ad alta pressione vengono effettuate da due gruppi pompa in grado di generare un pressione massima pari a 600 bar.

Ogni canale comprende un gruppo pompa che include sistema di azionamento della pompa, testa della pompa, valvola d'ingresso attiva con cartuccia sostituibile e valvola di uscita. Entrambi i canali sono collegati a una camera di miscelazione a basso volume, a sua volta collegata mediante un fascio di capillari di restrizione a un'unità di smorzamento e a un miscelatore. Un sensore della pressione controlla la pressione della pompa. Sull'uscita della pompa è montata una valvola di spurgo dotata di setto poroso in PTFE, che semplifica l'adescamento del sistema di pompaggio.

# 1 Sistema LC binario Agilent 1260 Infinity - Descrizione del prodotto

## Componenti del sistema



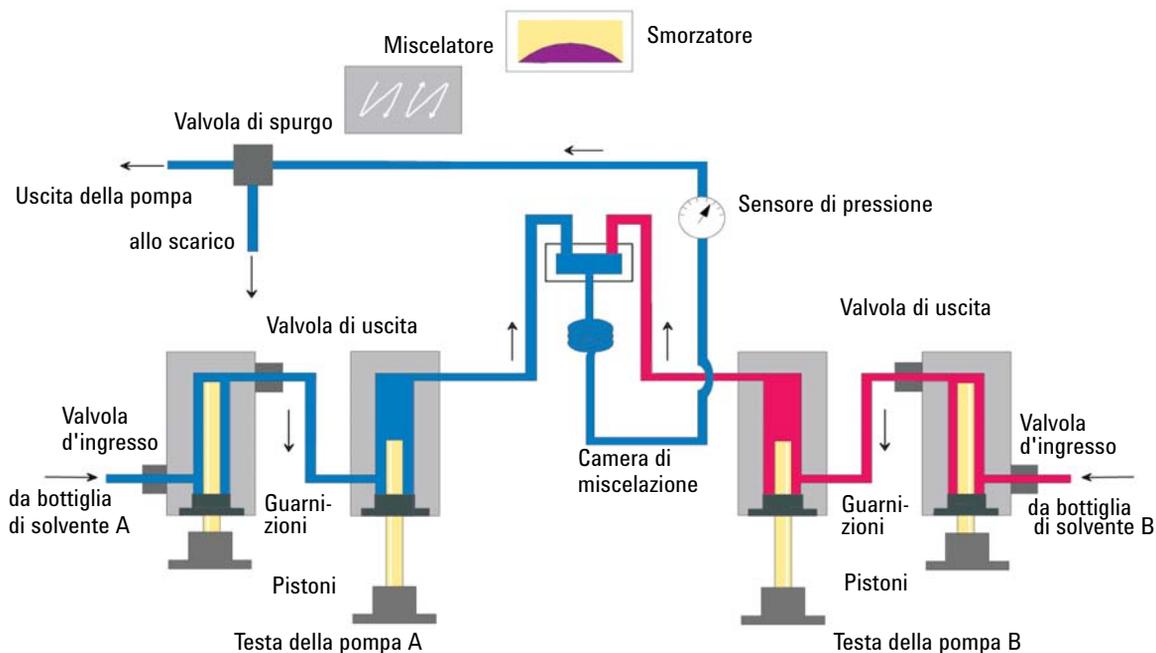
**Figura 1** Percorso idraulico della pompa binaria con regolatore e miscelatore

Lo smorzatore e il miscelatore possono essere by-passati per ottenere il minimo volume di ritardo della pompa binaria. Tale configurazione è consigliata per applicazioni a bassa velocità di flusso con gradienti ripidi.

In [Figura 2](#), pagina 13 è illustrato il circuito idraulico in modalità a volume di ritardo basso. Per istruzioni su come passare da una configurazione all'altra, vedere il manuale dell'utente della pompa binaria G1312B .

**NOTA**

Non è possibile by-passare il miscelatore lasciando in linea lo smorzatore, poiché tale configurazione potrebbe provocare un funzionamento imprevisto della pompa binaria.

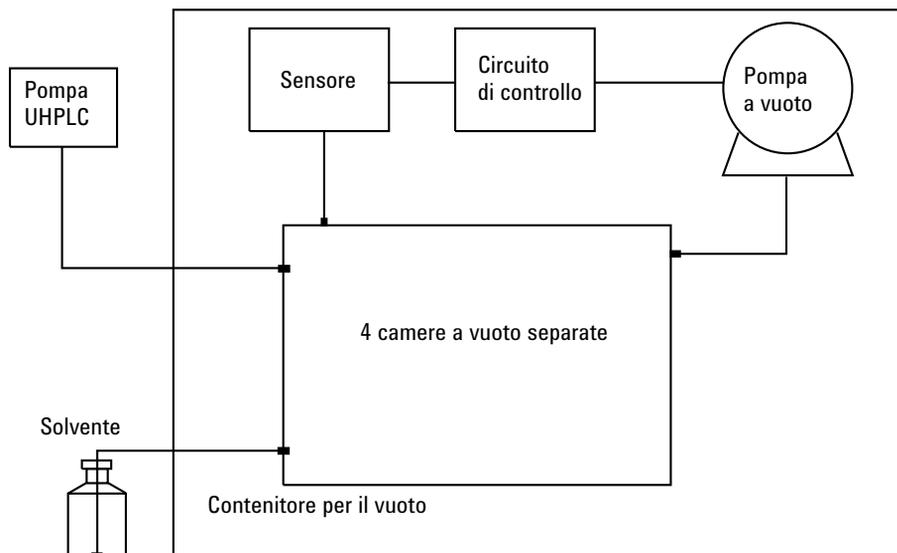


**Figura 2** Percorso idraulico della pompa binaria con regolatore e miscelatore by-passati

## Degassatore ad alte prestazioni 1260 Infinity (G4225A)

I componenti del degassatore ad alte prestazioni Agilent 1260 Infinity , modello G4225A, sono quattro camere a vuoto separate con tubi semipermeabili, una pompa a vuoto e un gruppo di controllo. All'accensione del degassatore sottovuoto, il gruppo di controllo mette in funzione la pompa a vuoto, che crea la bassa pressione nelle camere a vuoto. La pressione viene misurata da un sensore di pressione. Il degassatore sottovuoto mantiene la bassa pressione tramite perdita controllata nel filtro d'ingresso dell'aria e regolazione della pompa a vuoto mediante il sensore di pressione.

La pompa LC aspira i solventi dalle bottiglie attraverso i tubi semipermeabili delle camere a vuoto. Quando i solventi attraversano le camere a vuoto, gli eventuali gas dissolti nei solventi si diffondono attraverso i tubi e raggiungono le camere a vuoto. Pertanto, quando escono dalle uscite del degassatore sottovuoto i solventi sono degassificati.



**Figura 3** Panoramica (è riportato uno solo dei quattro canali del solvente)

## Autocampionatore ad alte prestazioni 1260 Infinity (G1367E)

### Caratteristiche

L'autocampionatore ad alte prestazioni 1260 Infinity è compatibile con un intervallo di pressione più ampio (fino a 600 bar) e consente pertanto l'utilizzo della moderna tecnologia per colonne (colonne narrow bore con particelle di dimensioni inferiori a due micron) con il sistema LC binario Agilent 1260 Infinity. Le nuove parti ottimizzate aumentano la robustezza, il design a flusso passante si traduce in alta velocità ed effetto memoria minimo, l'incremento della velocità di iniezione dei campioni assicura un'alta efficienza di elaborazione dei campioni, la modalità di sovrapposizione delle iniezioni aumenta la produttività mentre l'ampia gamma di recipienti per campioni, quali vial e piastre a pozzetti, rende flessibile e pratica la manipolazione dei campioni. L'utilizzo di piastre a 384 pozzetti consente di analizzare fino a 768 campioni senza l'intervento dell'operatore.

### Principio di funzionamento dell'autocampionatore

Durante la sequenza di campionamento i movimenti dei componenti dell'autocampionatore vengono continuamente controllati dal processore dell'autocampionatore. Il processore definisce intervalli temporali e intervalli meccanici specifici per ciascun movimento. Se una determinata fase della sequenza di campionamento non viene completata correttamente, viene visualizzato un messaggio di errore. Tramite la valvola di iniezione il solvente by-passa l'autocampionatore durante la sequenza di campionamento. L'ago si sposta sulla posizione desiderata del campione e viene fatto scendere nel liquido contenente il campione per consentire al dispositivo di dosaggio di aspirare il volume desiderato ritraendo lo stantuffo di un tratto specifico. L'ago viene quindi risollevato e spostato nella sede per chiudere il loop del campione. Il campione viene introdotto nella colonna quando la valvola di iniezione ritorna nella posizione di mainpass al termine della sequenza di campionamento.

La sequenza di campionamento standard viene eseguita nel seguente ordine:

- 1 La valvola di iniezione si sposta nella posizione di bypass.
- 2 Lo stantuffo del dispositivo di dosaggio si sposta nella posizione di inizializzazione.
- 3 Il blocco dell'ago si sposta verso l'alto.
- 4 L'ago si sposta sulla posizione desiderata del vial (o della piastra a pozzetti) del campione.

- 5 L'ago scende nel vial del campione (o nella piastra a pozzetti).
- 6 Il dispositivo di dosaggio aspira il volume di campione preimpostato.
- 7 L'ago esce dal vial del campione (o dalla piastra a pozzetti).
- 8 L'ago viene quindi spostato nella sede per chiudere il loop del campione.
- 9 Il blocco dell'ago si sposta verso il basso.
- 10 Il ciclo di iniezione si conclude quando la valvola di iniezione ritorna nella posizione di mainpass.

Il lavaggio dell'ago, se necessario, viene eseguito tra la fase 7 e la fase 8.

### Sequenza di iniezione

Prima dell'inizio della sequenza di iniezione e durante l'analisi, la valvola di iniezione si trova nella posizione di mainpass. In questa posizione la fase mobile fluisce attraverso il dispositivo di dosaggio, il loop del campione e l'ago dell'autocampionatore, in modo che tutte le parti a contatto con il campione vengano lavate durante l'analisi, per ridurre al minimo l'effetto memoria.

All'inizio della sequenza di campionamento, la valvola passa alla posizione di bypass. Il solvente proveniente dalla pompa entra nella valvola dalla porta 1 e fluisce direttamente nella colonna attraverso la porta 6.

L'ultimo passaggio della sequenza di campionamento è rappresentato dalla fase di iniezione e analisi. La valvola a sei porte viene commutata sulla posizione di mainpass e convoglia nuovamente il flusso attraverso il loop del campione, che a questo punto contiene una certa quantità di campione. Il flusso di solvente trasferisce il campione nella colonna e la separazione comincia. È questo l'inizio della fase di analisi. In questa fase, grazie al flusso di solvente i principali componenti hardware che incidono sulle prestazioni sono sottoposti a lavaggio. Nel caso delle applicazioni standard non è necessaria alcuna ulteriore procedura di lavaggio.

### Lavaggio dell'ago

Prima dell'iniezione, al fine di ridurre l'effetto memoria nel caso di analisi estremamente sensibili, è possibile lavare l'esterno dell'ago in una porta di lavaggio che è situata dietro la porta dell'iniettore sull'unità di campionamento. Non appena l'ago si trova sulla porta di lavaggio, una pompa peristaltica eroga solvente per uno specifico intervallo per pulire l'esterno dell'ago. Al termine di questo processo, l'ago ritorna nella posizione della porta di iniezione.

## Comparto colonne termostato 1290 Infinity (G1316C)

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

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

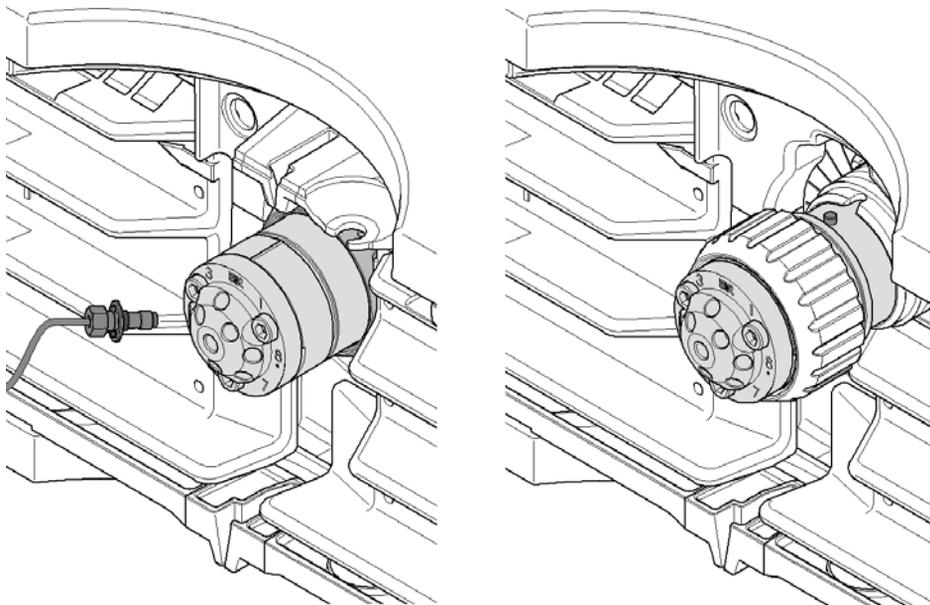
Ogni modulo TCC può alloggiare un sistema di azionamento interno delle valvole per facilitare le applicazioni basate sulla commutazione delle valvole, dalla semplice commutazione tra due colonne, alla rigenerazione alternata delle colonne, alla preparazione del campione o al lavaggio in controcorrente della colonna. Ogni testa della valvola è dotata di un kit completo contenente tutti i capillari necessari, scambiatori di calore a bassa dispersione aggiuntivi e altre parti.

Le valvole di commutazione sono caratterizzate da un'eccezionale semplicità d'uso e flessibilità per effettuare i collegamenti alla valvola. Una volta premuta, l'unità di azionamento della valvola Quick Change scorre in avanti per semplificare l'accesso (vedere [Figura 4](#), pagina 18, a sinistra). A seconda dell'applicazione, l'utente può installare teste delle valvole alternative sul meccanismo di azionamento (vedere [Figura 4](#), pagina 18, a destra). Si noti il tag RFID sulla parte superiore della testa della valvola.

<sup>1</sup> Tutte le specifiche sono valide per l'acqua distillata alla temperatura ambiente di 25 °C, valore di regolazione pari a 40 °C e velocità di flusso compresa tra 0,2 e 5 mL/min.

## 1 Sistema LC binario Agilent 1260 Infinity - Descrizione del prodotto

### Componenti del sistema



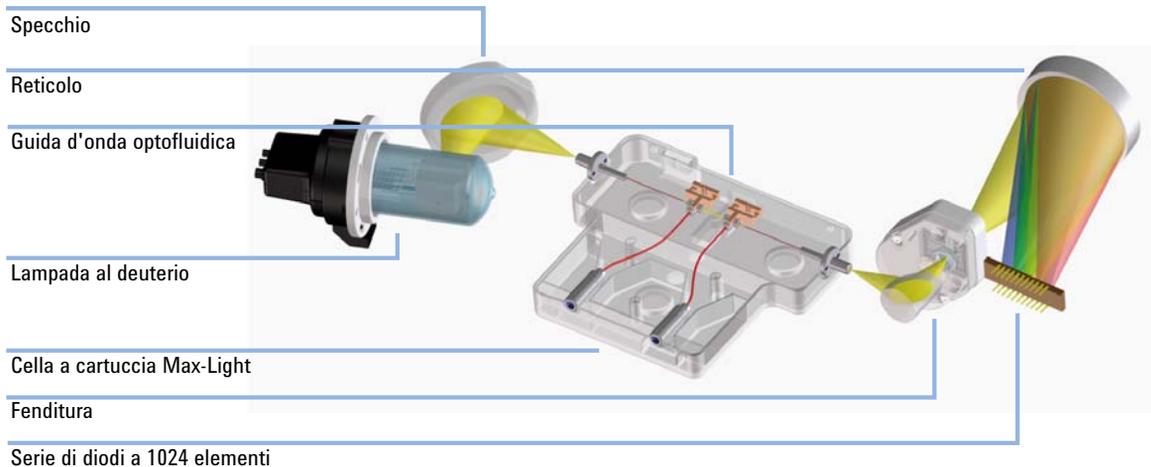
**Figura 4** Valvola a sostituzione rapida nel TCC

È possibile disporre “in cluster” fino a tre moduli TCC per eseguire applicazioni avanzate quali la commutazione tra otto colonne per lo sviluppo automatico di metodi o per rendere disponibili colonne aggiuntive per varie applicazioni. Pertanto, la colonna da utilizzare diviene un semplice parametro del metodo. Ciò richiede due teste di valvola a 8 posizioni/9 porte, una per ciascuno dei due moduli TCC. I moduli TCC “in cluster” sono rappresentati dal software come un'unica unità con un'unica interfaccia per la semplicità di utilizzo.

Altri miglioramenti rispetto ai modelli precedenti sono il migliore isolamento termico, migliori guide dei capillari e un sensore di “sportello aperto” che permette ai metodi di stabilire che lo sportello deve essere chiuso, una funzione particolarmente utile nel caso dei metodi a bassa o alta temperatura.

## Rivelatore a serie di diodi 1260 Infinity (G4212B)

Il rivelatore a serie di diodi (DAD) 1260 Infinity vanta un nuovo design ottico che utilizza una cella a cartuccia con tecnologia a guida d'onda optofluidica e offre un'elevata sensibilità, bassa dispersione, ampio intervallo lineare e linea di base molto stabile per le applicazioni LC standard e ultra-rapide. La cella a cartuccia Max-Light Agilent aumenta drasticamente la trasmissione della luce grazie al principio della riflessione interna totale lungo un capillare di silice fusa non rivestito, consentendo di raggiungere un nuovo livello di sensibilità senza compromettere la risoluzione a causa degli effetti di dispersione del volume della cella. Questo design riduce al minimo le perturbazioni della linea di base causate dall'indice di rifrazione o dagli effetti termici e consente di ottenere un'integrazione più affidabile delle aree dei picchi.



**Figura 5** Cammino ottico attraverso il rivelatore DAD

Il modulo integra anche il controllo elettronico della temperatura per incrementare ulteriormente la resistenza agli effetti della temperatura ambiente. Sebbene il volume idraulico della cella a cartuccia Max-Light sia molto ridotto, il cammino ottico ha il valore standard pari a 10 mm. Tuttavia, per sensibilità ancora superiori è disponibile in alternativa la cella ad alta sensibilità Max-Light Agilent che presenta un cammino ottico di 60 mm. Le celle si sostituiscono facilmente inserendole o estraendole dal relativo alloggiamento e vengono allineate automaticamente nel banco ottico. La sorgente luminosa del rivelatore DAD è una lampada al deuterio che opera su un intervallo di lunghezze d'onda da 190 a 640 nm. La rivelazione avviene tramite una serie di

## 1 Sistema LC binario Agilent 1260 Infinity - Descrizione del prodotto

### Componenti del sistema

1024 diodi. L'ingresso allo spettrografo è costituito da una fenditura ottica fissa di 4 nm.

I segnali cromatografici vengono estratti dai dati generati dalla serie di diodi tramite il firmware del modulo. È possibile definire fino a otto singoli segnali. Ciascuno di essi comprende una lunghezza d'onda del segnale, una larghezza di banda dei diodi raggruppati e, se necessario, una lunghezza d'onda e una larghezza di banda di riferimento. L'uscita dei segnali può avvenire a 80 Hz (80 punti dati/secondo) per la registrazione accurata dei picchi cromatografici più rapidi (i più stretti). Contemporaneamente, il modulo può anche inviare in uscita al sistema di dati gli spettri dell'intervallo completo alla stessa frequenza di 80 Hz.

Per i laboratori regolamentati è importante che vengano registrati tutti i parametri dei metodi. Il rivelatore DAD 1260 Infinity non solo registra i valori di regolazione dello strumento, ma è dotato anche di tag RFID (tag di identificazione a radiofrequenza) integrati nella lampada e nella cartuccia della cella di flusso, cosicché il sistema registra l'identità e le variabili di questi importanti componenti.

## Valvole Quick Change serie 1200 Infinity

Le valvole Quick Change Agilent 1200 Infinity supportano un ampio spettro di complesse applicazioni basate sull'uso di valvole. Ogni testa della valvola è dotata di un kit completo contenente tutti i capillari necessari, scambiatori di calore a bassa dispersione aggiuntivi e altre parti.

Tra le applicazioni tipiche delle valvole Quick Change si annoverano:

- Selezione di due colonne
- Arricchimento del campione
- Pulizia del campione
- Rigenerazione alternata delle colonne
- Applicazioni speciali, quali lo sviluppo di metodi o applicazioni 2D-LC

Per descrizioni dettagliate di queste applicazioni fare riferimento al manuale per l'utente delle soluzioni basate su valvole.

## Specifiche

Il design modulare del sistema LC binario 1260 Infinity consente di configurare un sistema che risponde perfettamente alle specifiche esigenze delle singole applicazioni. La specifica configurazione può differire dalla configurazione standard descritta nel manuale per l'utente del sistema.

Di seguito sono riportate le specifiche fisiche e delle prestazioni della pompa binaria 1260 Infinity . Informazioni sulle specifiche degli altri moduli inclusi nel sistema sono disponibili nei rispettivi manuali per l'utente dei moduli.

## Specifiche fisiche della pompa binaria 1260 Infinity (G1312B)

**Tabella 1** Specifiche fisiche

Tipo	Specifica	Commenti
Peso	15,5 kg	
Dimensioni (altezza × larghezza × profondità)	180 x 345 x 435 mm	
Tensione di rete	100 – 240 VAC, ± 10 %	Sono accettati valori di tensione ampiamente diversi
Frequenza di rete	50 o 60 Hz, ± 5 %	
Consumo elettrico	220 VA, 74 W / 253 BTU	Massimo
Temperatura ambiente operativa	4–55 °C	
Temperatura ambiente non operativa	-40 – 70 °C	
Umidità	< 95 % di umidità relativa a 40 °C	Senza condensa
Altitudine operativa	Fino a 2000 m	
Altitudine non operativa	Fino a 4600 m	Per l'immagazzinaggio del modulo
Standard di sicurezza: IEC, CSA, UL	Categoria di installazione II, grado di inquinamento 2	Solo per uso all'interno.

## Specifiche delle prestazioni

**Tabella 2** Specifiche delle prestazioni della pompa binaria Agilent 1260 Infinity (G1312B)

Tipo	Specifica	Commenti
Sistema idraulico	Due pompe con due pistoni in serie, sistema di trasmissione a corsa variabile controllato da servomotore, trasmissione con ingranaggi e viti a sfere, pistoni flottanti	
Intervallo di flusso impostabile	Valori preimpostati nell'intervallo 0,001 – 5 mL/min con incrementi pari a 0,001 mL/min	
Intervallo di flusso	0,05 – 5,0 mL/min	
Precisione del flusso	RSD $\leq 0,07\%$ o SD $\leq 0,02$ min, a seconda del maggiore dei due valori	in base al tempo di ritenzione a temperatura ambiente costante
Accuratezza del flusso	$\pm 1\%$ o 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ , a seconda del maggiore dei due valori	pompaggio di H <sub>2</sub> O degassificata a 10 MPa (100 bar)
Intervallo della pressione operativa	Intervallo operativo 0 – 60 MPa (0 – 600 bar, 0 – 8700 psi) fino a 5 mL/min	
Pulsazione della pressione	< 2 % di ampiezza (in genere < 1,3 %) o < 0,3 MPa (3 bar), a seconda del maggiore dei due valori, con isopropanolo a 1 mL/min, a tutte le pressioni > 1 MPa (10 bar, 147 psi) <i>Configurazione per volume di ritardo basso:</i> < 5 % di ampiezza (in genere < 2 %)	
Compensazione della compressibilità	Predefinita in base alla compressibilità della fase mobile	
Intervallo di pH consigliato	1,0 – 12,5, i solventi con pH < 2,3 non devono contenere acidi in grado di corrodere l'acciaio inossidabile	
Formazione del gradiente	Miscelazione binaria ad alta pressione	

**Tabella 2** Specifiche delle prestazioni della pompa binaria Agilent 1260 Infinity (G1312B)

<b>Tipo</b>	<b>Specifica</b>	<b>Commenti</b>
Volume di ritardo	<i>Configurazione per volume di ritardo standard:</i> 600 – 800 µL (include miscelatore da 400 µL), a seconda della contropressione <i>Configurazione per volume di ritardo basso:</i> 120 µL	misura effettuata con acqua a 1 mL/min (rivelatore caffeina/acqua)
Intervallo di composizione	intervallo impostabile: 0 – 100 % intervallo consigliato: 1 – 99 % o 5 µL/min per canale, a seconda del maggiore dei due valori	
Precisione della composizione	< 0,15 % (RSD) o < 0,04 min (SD), a seconda del maggiore dei due valori	a 0,2 e 1 mL/min; in base al tempo di ritenzione a temperatura ambiente costante
Accuratezza della composizione	± 0,35 % assoluta, a 2 mL/min, a 10 MPa (100 bar)	(rivelatore caffeina/acqua)
Controllo	Software di controllo Agilent (ad esempio ChemStation, EZChrom, OL, MassHunter)	
Controllo locale	Agilent Instant Pilot	Versione B.02.00 o successiva
Uscita analogica	Per il monitoraggio della pressione, 1,33 mV/bar, una uscita	
Comunicazioni	CAN (rete area controllore), RS-232C, APG remoto: segnali di pronto, avvio, interruzione e arresto, LAN opzionale	
Sicurezza e manutenzione	Ampio supporto per la risoluzione dei problemi e la manutenzione tramite Instant Pilot, Agilent Lab Advisor e Chromatography Data System. Le funzioni correlate alla sicurezza includono rivelazione delle perdite, gestione delle perdite in sicurezza, segnale di perdita in uscita per lo spegnimento del sistema di pompaggio e bassa tensione nelle principali aree soggette a manutenzione.	

## 1 Sistema LC binario Agilent 1260 Infinity - Descrizione del prodotto

### Specifiche

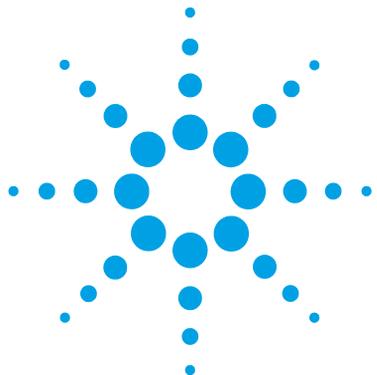
**Tabella 2** Specifiche delle prestazioni della pompa binaria Agilent 1260 Infinity (G1312B)

Tipo	Specifica	Commenti
Funzioni GLP	Avviso di manutenzione preventiva (EMF) per il controllo continuo dell'uso dello strumento in termini di usura delle guarnizioni e volume di fase mobile pompata, con limiti predefiniti e impostabili dall'utente e messaggi di avviso. Registri elettronici delle attività di manutenzione e degli errori.	
Involucri	Tutti i materiali sono riciclabili	

#### NOTA

Per velocità di flusso al di sotto dei 500 µl/min, o per l'uso in assenza di regolatore e miscelatore, è necessario un degassatore sottovuoto.

Tutte le misurazioni delle specifiche sono state effettuate con solventi degassati.



## 2 Introduzione

Teoria dell'impiego di particelle più piccole nella cromatografia  
liquida 28

Vantaggi delle colonne con particelle di dimensioni ridotte 34

Riscaldamento per attrito 37

Nel presente capitolo è riportata un'introduzione al sistema LC binario Agilent 1260 Infinity e ai principi su cui esso si basa.



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

## Introduzione

Nel 2003 Agilent ha introdotto per la prima volta sul mercato le colonne di silice completamente porosa con particelle da 1,8  $\mu\text{m}$ .

In combinazione con il sistema LC binario Agilent 1260 Infinity, queste colonne con particelle di dimensioni inferiori a due micron (1,8  $\mu\text{m}$ ) possono essere impiegate per perseguire i due seguenti obiettivi principali:

### 1 Cromatografia più rapida

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

### 2 Risoluzione superiore

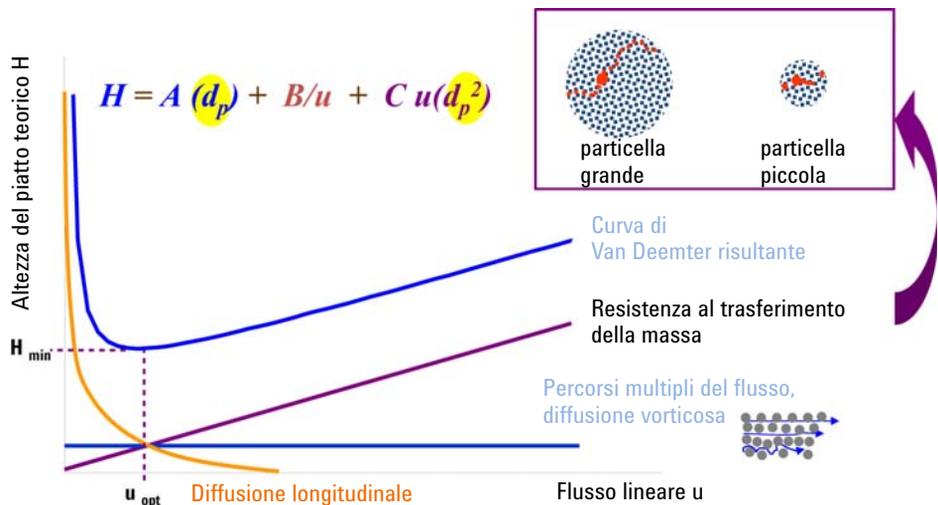
Le colonne lunghe con particelle inferiori a due micron offrono un'efficienza superiore e, quindi, la maggiore risoluzione necessaria per la separazione di campioni complessi.

La pressione necessaria per far fluire il solvente attraverso una colonna contenente particelle STM (inferiori a due micron) aumenta rapidamente al crescere della velocità di flusso quando si desiderano separazioni più rapide e aumenta molto rapidamente al crescere della lunghezza della colonna quando si desidera una risoluzione più elevata. La diffusione delle colonne STM, quindi, è stata contestuale allo sviluppo dei sistemi UHPLC, ovvero sistemi HPLC che offrono pressioni superiori rispetto ai consueti 400 bar, in uso sin dagli albori della tecnica HPLC.

Attualmente, Agilent mette a disposizione il sistema LC 1290 Infinity per rispondere ai massimi requisiti UHPLC con pressioni fino a 1200 bar.

## Teoria

Nell'HPLC l'efficienza di separazione può essere descritta grazie all'equazione di van Deemter (Figura 6, pagina 29). Tale equazione deriva dal modello dell'altezza dei piatti teorici adottato per misurare la dispersione degli analiti mentre si spostano lungo la colonna.  $H$  indica l'altezza equivalente a un piatto teorico (talvolta nota come HETP),  $d_p$  indica le dimensioni delle particelle del materiale di impaccamento della colonna,  $u_0$  è la velocità lineare della fase mobile e  $A$ ,  $B$  e  $C$  sono costanti correlate alle varie forze dispersive. La costante  $A$  indica la diffusione vorticoso o i percorsi di flusso multipli attraverso la colonna;  $B$  indica la diffusione molecolare lungo l'asse (longitudinale) della colonna;  $C$  indica il trasferimento di massa dell'analita tra le fasi mobile e stazionaria. La separazione è tanto più efficiente quanto più è basso il valore di  $H$ . Gli effetti di ogni singolo termine e l'equazione combinata sono mostrati in Figura 6, pagina 29, il cui grafico riporta l'altezza dei piatti in funzione della velocità di flusso lineare attraverso la colonna. Questo tipo di grafico è noto come curva di van Deemter e viene utilizzato per determinare la velocità di flusso ottimale (il punto di minimo della curva) per ottenere la migliore efficienza di separazione da una colonna.

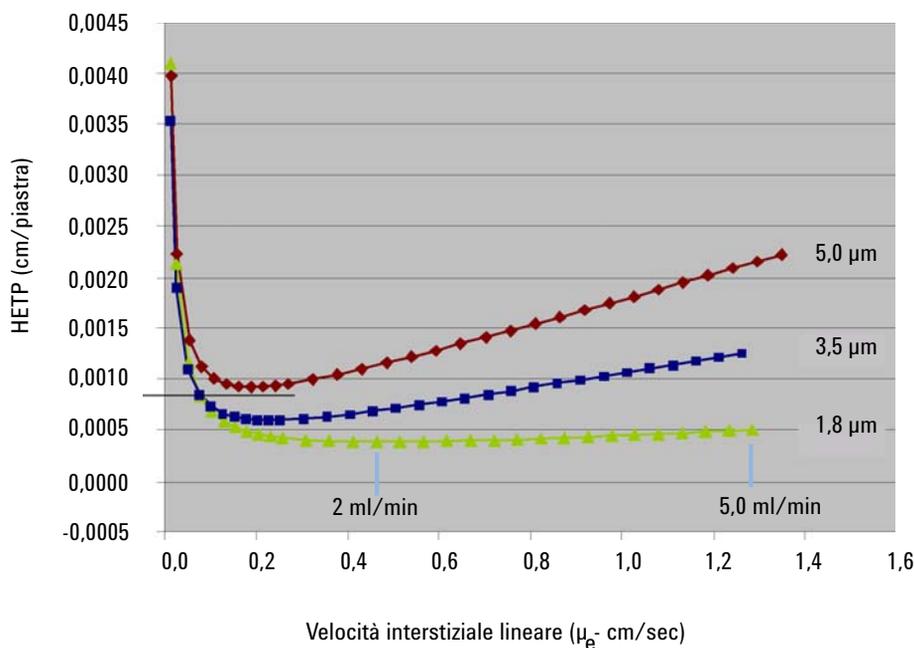


**Figura 6** Curva ipotetica di Van Deemter

## 2 Introduzione

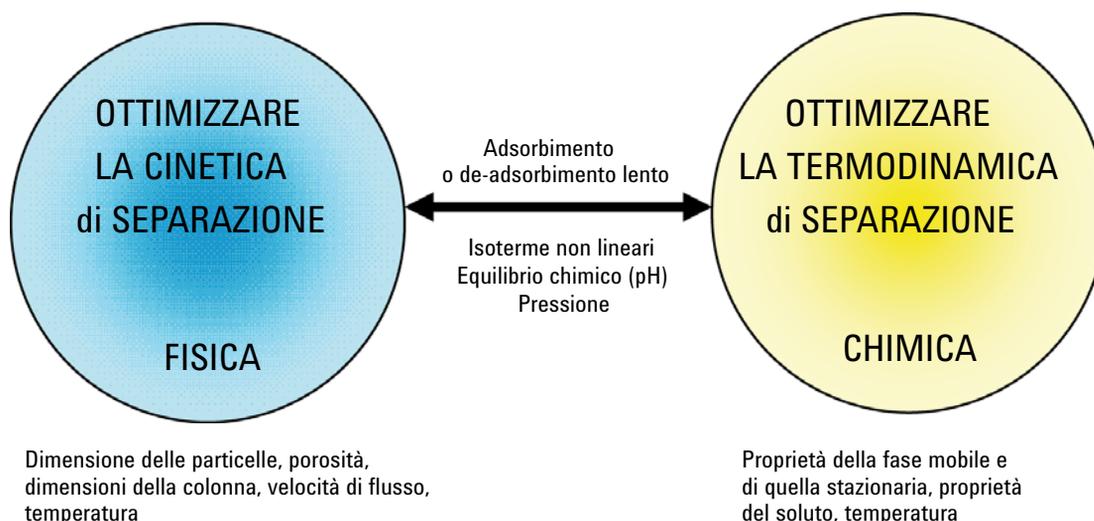
### Teoria dell'impiego di particelle più piccole nella cromatografia liquida

I grafici di van Deemter in [Figura 7](#), pagina 30 indicano che la riduzione delle dimensioni delle particelle aumenta l'efficienza. Il passaggio da particelle di dimensioni pari a  $3,5\ \mu\text{m}$  e  $5,0\ \mu\text{m}$ , comunemente utilizzate, a particelle da  $1,8\ \mu\text{m}$  migliora in misura significativa le prestazioni. Alle particelle da  $1,8\ \mu\text{m}$  sono associati valori di altezza dei piatti da due a tre volte inferiori ed efficienze proporzionalmente superiori. Ciò permette di utilizzare una colonna più corta senza compromettere la risoluzione e, di conseguenza, anche il tempo di analisi si riduce di un fattore pari a due o tre. L'aumento di efficienza deriva in larga misura dalla riduzione dei percorsi di flusso multipli grazie alle minori dimensioni delle particelle, fattore che comporta un valore minore della costante A (diffusione vorticoso). Inoltre, particelle più piccole implicano tempi di trasferimento di massa più brevi, riducendo il termine C, e si può rilevare come l'effetto complessivo sia una perdita di efficienza molto ridotta all'aumentare della velocità di flusso (la pendenza della curva diminuisce). Ciò significa che la separazione su particelle di dimensioni inferiori può essere ulteriormente accelerata aumentando le velocità di flusso senza ridurre significativamente l'efficienza.



**Figura 7** Curva di Van Deemter per particelle di diverse dimensioni

Una separazione cromatografica può essere ottimizzata in base ai parametri fisici della colonna HPLC quali dimensione delle particelle, dimensione dei pori, morfologia delle particelle, lunghezza e diametro della colonna, velocità del solvente e temperatura. Inoltre, è possibile prendere in considerazione la termodinamica di una separazione e regolare le proprietà del soluto e delle fasi mobile e stazionaria (percentuale di solvente organico, forza ionica e pH) in modo da ottenere i tempi di ritenzione più brevi e la massima selettività possibili.



**Figura 8** Selezione delle condizioni ottimali per l'HPLC

## 2 Introduzione

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

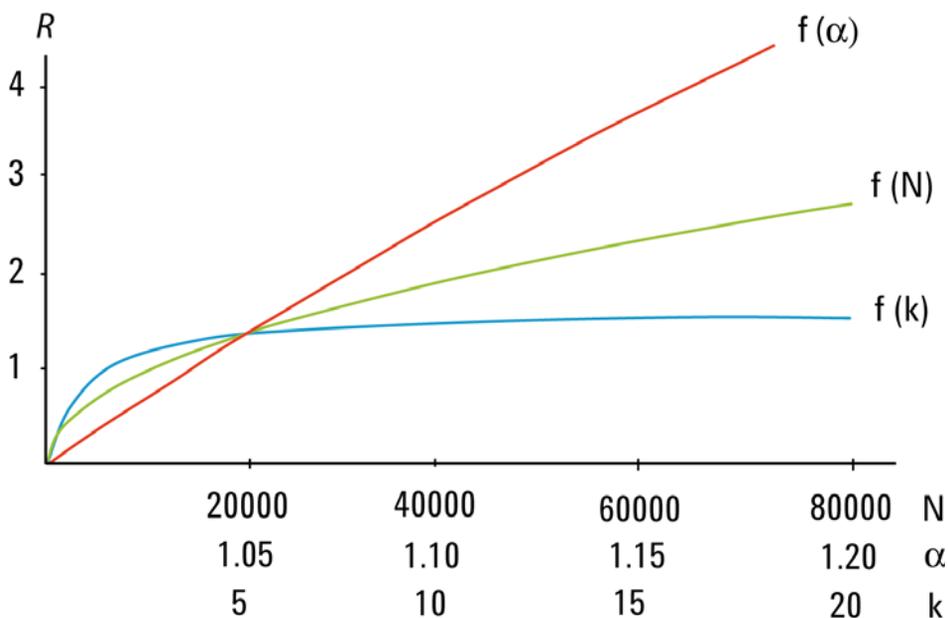
La risoluzione può essere descritta in funzione di tre parametri:

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

In base all'equazione della risoluzione (Figura 9, pagina 32), la selettività ha l'impatto più preponderante sulla risoluzione (Figura 10, pagina 32). Ciò significa che la scelta di proprietà adatte delle fasi stazionaria e mobile e della temperatura è un fattore critico per ottenere una buona separazione.

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

**Figura 9** Equazione della risoluzione



**Figura 10** Effetto del numero dei piatti, del fattore di separazione e del fattore di ritenzione su R

Tanto per i metodi di separazione UHPLC di nuova concezione quanto per il semplice trasferimento da un metodo tradizionale esistente, è vantaggioso avere a disposizione una vasta gamma di chimiche per la fase stazionaria in un'ampia tipologia di formati di colonna.

Agilent offre oltre 140 colonne ZORBAX Rapid Resolution High Throughput (RRHT) con particelle da 1,8  $\mu\text{m}$  (14 opzioni di selettività; lunghezza da 15 a 150 mm; diametri interni di 2,1 , 3,0 e 4,6 mm).

Oltre alle colonne ZORBAX, sono disponibili le colonne PoroShell con nove opzioni di selettività per l'uso con il sistema LC binario Agilent 1260 Infinity.

Ciò permette di scegliere la fase stazionaria ottimale in modo da ottenere la massima selettività. La risoluzione, la velocità di flusso e il tempo di analisi possono essere ottimizzati selezionando la colonna di diametro e lunghezza appropriati; la possibilità di operare con colonne STM più lunghe non è mai stata così accessibile.

Le colonne PoroShell sono note come colonne con particelle porose in superficie (SPP). Al contrario delle colonne in silice completamente porosa, queste colonne SPP possiedono un nucleo solido (diametro di 1,7  $\mu\text{m}$ ) e uno strato di silice porosa (spessore di 0,5  $\mu\text{m}$ ) intorno al nucleo. Velocità e risoluzione delle colonne PoroShell sono confrontabili con quelle delle colonne con particelle inferiori a due micron, con una riduzione massima della contropressione fino al 50 %. Ultimamente nel caso delle colonne PoroShell si assiste a una particolare diffusione delle particelle di dimensioni più ridotte rispetto alle meno recenti colonne con particelle "pellicolari". L'attuale interesse in questa tecnologia è stimolato dalla reintroduzione di particelle di dimensioni inferiori, quali le dimensioni inferiori ai 3 micron, per l'uso nelle separazioni in fase inversa di piccole molecole.

Molti laboratori conducono un esaustivo processo di screening per selezionare la migliore combinazione di fase stazionaria, fase mobile e temperatura per le rispettive separazioni. La soluzione per lo sviluppo di metodi multipli Agilent serie 1200 Infinity agevola l'automazione completa di questi processi di selezione dispendiosi in termini di tempo, rendendo lo sviluppo e lo trasferimento dei metodi un'operazione semplice e affidabile.

Le colonne ZORBAX RRHT da 1,8  $\mu\text{m}$  utilizzano la stessa fase chimica delle colonne ZORBAX con particelle da 3,5 e 5  $\mu\text{m}$ . Di conseguenza, per qualsiasi particolare fase delle colonne ZORBAX, le particelle da 5,0 , 3,5 e 1,8  $\mu\text{m}$  forniscono identica selettività, consentendo un semplice, rapido e sicuro trasferimento bidirezionale del metodo tra LC convenzionale e UHPLC.

## Vantaggi delle colonne con particelle di dimensioni ridotte

### Cromatografia più rapida

La riduzione dei tempi di analisi comporta numerosi vantaggi. I laboratori ad alta produttività ora possiedono una capacità superiore e possono analizzare un maggior numero di campioni in tempi più stretti. L'analisi di un maggior numero di campioni in tempi più stretti si traduce in costi più contenuti. Per esempio, riducendo il tempo di analisi da 20 min per campione a 5 min, il costo per 700 campioni si riduce del 79 % (Tabella 3, pagina 34).

**Tabella 3** Risparmio di tempo e di costi su 700 analisi

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

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

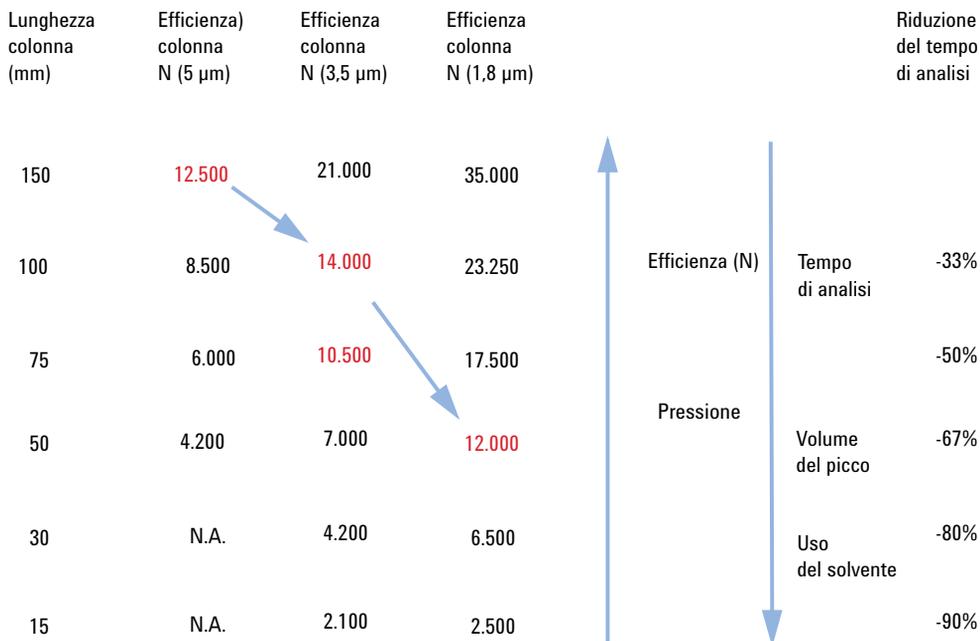
<sup>2</sup> 24 ore al giorno

Il calcolatore del risparmio Agilent fornisce un metodo semplice per calcolare il risparmio in termini di costi associato al passaggio dall'HPLC convenzionale all'UHPLC basata su colonne con particelle di dimensioni pari a 1,8 µm. Il calcolatore è disponibile sul sito Web di Agilent Technologies insieme a un calcolatore di trasferimento del metodo: [www.chem.agilent.com](http://www.chem.agilent.com). I risultati sono presentati sia in formato grafico sia tabellare.

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

Vantaggi delle colonne con particelle di dimensioni ridotte

anche per gli operatori nella chimica di sintesi che utilizzano sistemi LC/MS ad accesso aperto per la conferma dei composti e il controllo delle reazioni. Analisi di durata più breve possono inoltre accelerare significativamente il processo di sviluppo dei metodi.

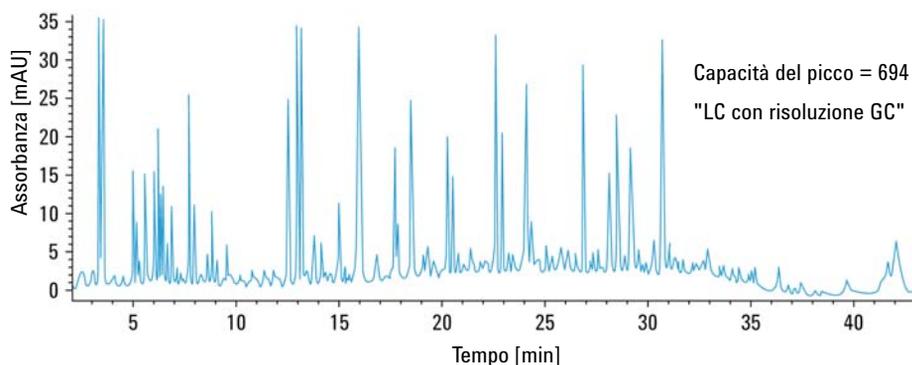


**Figura 11** Relazione tra dimensioni delle particelle, efficienza e tempo di analisi

È possibile ridurre il tempo di analisi senza compromettere l'efficienza della colonna mediante l'ottimizzazione delle dimensioni delle particelle e della pressione.

#### Risoluzione superiore

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



**Figura 12** Nell'analisi di un digerito triptico di BSA si possono raggiungere capacità di picco superiori a 700 usando una colonna ZORBAX RRHT SB-C18 (2,1 x 150 mm, 1,8  $\mu$ m)

## Riscaldamento per attrito

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

$$Power = F * p$$

in cui F è la velocità di flusso e p è la pressione.

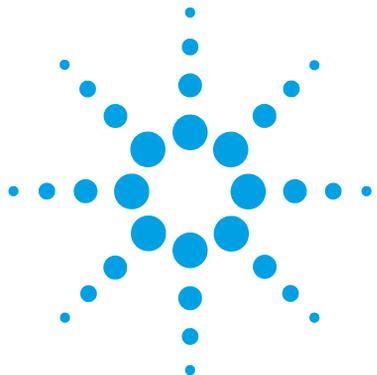
Un'elevata termostatazione della colonna (per esempio mediante l'uso di un bagno termostato) genera un forte gradiente radiale di temperatura, che comporta una perdita significativa di efficienza della colonna. La stabilizzazione termica della colonna sfruttando l'aria statica riduce il gradiente radiale di temperatura e quindi riduce le perdite di efficienza, anche se in questo caso è necessario accettare una temperatura più elevata in uscita dalla colonna. L'aumento della temperatura può influenzare la selettività. A valori più bassi di contropressione, le perdite di prestazione dovute al riscaldamento per attrito sono ridotte al minimo, cosicché le colonne di diametro interno pari a 4,6 o 3 mm con particelle inferiori a 2 micron presentano ancora efficienze superiori rispetto alle colonne corrispondenti di diametro interno pari a 2,1 mm.

Riepilogando, l'utilizzo di materiale di impaccamento con particelle di dimensioni inferiori a due micron offre i seguenti vantaggi: aumento dell'efficienza, risoluzione superiore e separazioni più rapide.

Le caratteristiche del sistema LC binario Agilent 1260 Infinity sono discusse nel capitolo *Descrizione del prodotto*. Nel capitolo *Ottimizzazione* sono discusse l'applicazione della teoria e l'utilizzo di queste caratteristiche per sviluppare separazioni ottimizzate.

## **2** **Introduzione**

### **Riscaldamento per attrito**



### 3

## Ottimizzazione del sistema LC binario Agilent 1260 Infinity

Configurazione del volume di ritardo ottimale	40
Volume di ritardo e volume extra-colonna	40
Volumi di ritardo nel sistema LC binario Agilent 1260 Infinity	42
Configurazione ottimale dello strumento per colonne di diametro interno di 2,1 mm	43
Configurazione ottimale dello strumento per colonne di diametro interno di 3 e 4,6 mm	45
Come ottenere volumi di iniezione maggiori	47
Come ridurre i tempi di ciclo	49
Come ottenere una maggiore produttività	52
Come ridurre al minimo l'effetto memoria	53
Come ottenere una maggiore risoluzione	55
Configurazione ottimale dello strumento per l'alta risoluzione	59
Come ottenere una maggiore sensibilità	63
Configurazione ottimale dello strumento per l'alta sensibilità	64
Scelta della cella di flusso	66
Come prevenire ostruzioni della colonna	68

Nel presente capitolo sono discusse l'applicazione della teoria e l'utilizzo delle caratteristiche del sistema LC per sviluppare separazioni ottimizzate.



## Configurazione del volume di ritardo ottimale

### Volume di ritardo e volume extra-colonna

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

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

#### Volume di ritardo

Nelle separazioni in gradiente, questo volume causa un ritardo tra la modifica della miscela nella pompa e l'istante in cui la nuova miscela raggiunge la colonna. Il ritardo dipende dalla velocità di flusso e dal volume di ritardo del sistema. In pratica ciò significa che in ogni sistema HPLC all'avvio di ogni analisi è presente un segmento isocratico aggiuntivo nel profilo del gradiente. In genere il profilo del gradiente viene descritto in termini di impostazioni della miscela all'altezza della pompa mentre il volume di ritardo non viene citato, sebbene abbia un effetto sulla cromatografia. Questo effetto diventa più significativo a basse velocità di flusso e per colonne di volume ridotto e può incidere in notevole misura sulla trasferibilità dei metodi a gradiente. Pertanto, per eseguire separazioni in gradiente rapide è importante che i volumi di ritardo siano ridotti, in particolare nel caso delle colonne narrow bore (ossia di diametro interno pari a 2,1 mm) spesso utilizzate nella rivelazione tramite spettrometria di massa.

A titolo di esempio, nei metodi HPLC con impaccamento da 5 µm si utilizzano in genere velocità di flusso pari a 1 ml/min con colonne di diametro interno di 4,6 mm e pari a circa 0,2 ml/min con colonne di diametro interno di 2,1 mm (stessa velocità lineare nella colonna). In un sistema avente un volume di ritardo tipico pari a 1000 µl e con una colonna da 2,1 mm, il segmento isocratico iniziale "nascosto" sarebbe pari a 5 min mentre in un sistema con volume di ritardo pari a 600 µl il ritardo sarebbe di 3 min. Volumi di ritardo di questa entità sarebbero eccessivi per tempi di analisi di uno o due minuti. Nel caso degli impaccamenti con particelle di dimensioni inferiori a due µm, la velocità di flusso ottimale (in base alla curva di van Deemter) è leggermente più elevata e, pertanto, la cromatografia rapida può utilizzare velocità di flusso da tre a cinque volte superiori, producendo ritardi di circa un minuto. Tuttavia, il

volume di ritardo deve essere ulteriormente ridotto per ottenere ritardi pari a una frazione del tempo di analisi desiderato. Ciò è possibile con il sistema LC binario Agilent 1260 Infinity grazie al basso volume di ritardo del circuito idraulico della pompa e al basso volume del circuito idraulico attraverso l'autocampionatore.

### **Volume extra-colonna**

Il volume extra-colonna è un fattore di dispersione dei picchi che riduce la risoluzione della separazione e, pertanto, deve essere ridotto al minimo. Colonne di diametro più piccolo richiedono volumi extra-colonna proporzionalmente più piccoli per mantenere su valori minimi la dispersione dei picchi.

In un cromatografo liquido il volume extra-colonna dipende dai tubi di collegamento tra l'autocampionatore, la colonna e il rivelatore, nonché dal volume della cella di flusso nel rivelatore. Nel sistema LC binario Agilent 1260 Infinity il volume extra-colonna è ridotto al minimo grazie ai tubi narrow bore (diametro interno pari a 0,12 mm), agli scambiatori di calore a basso volume nel comparto colonne e alla cella a cartuccia Max-Light nel rivelatore.

## Volumi di ritardo nel sistema LC binario Agilent 1260 Infinity

In [Tabella 4](#), pagina 42 e [Tabella 5](#), pagina 42 sono mostrati i volumi dei componenti che contribuiscono al volume di ritardo del sistema LC binario Agilent 1260 Infinity .

**Tabella 4** Volumi di ritardo dei moduli del sistema LC binario 1260 Infinity

<b>Componenti</b>	<b>Volume di ritardo (µL)</b>
Pompa binaria <sup>1</sup>	120
Pompa binaria <sup>2</sup>	600 – 800
Miscelatore a basso volume	200
Miscelatore	400
Autocampionatore	270
Scambiatore di calore a bassa dispersione	1,6
Scambiatore di calore integrato	3 e 6

<sup>1</sup> nella configurazione per volume di ritardo basso con smorzatore e miscelatore by-passati

<sup>2</sup> nella configurazione per volume di ritardo standard

**Tabella 5** Volumi di ritardo delle configurazioni del sistema LC binario 1260 Infinity

<b>Configurazione di sistema</b>	<b>Volume di ritardo (µL)</b>
Configurazione per volume di ritardo basso	Pompa: 120 Autocampionatore:
Configurazione per volume di ritardo medio	Pompa: 320
Configurazione per volume di ritardo standard	Pompa: 600 – 800

È possibile alternare tra loro le configurazioni in due modi diversi:

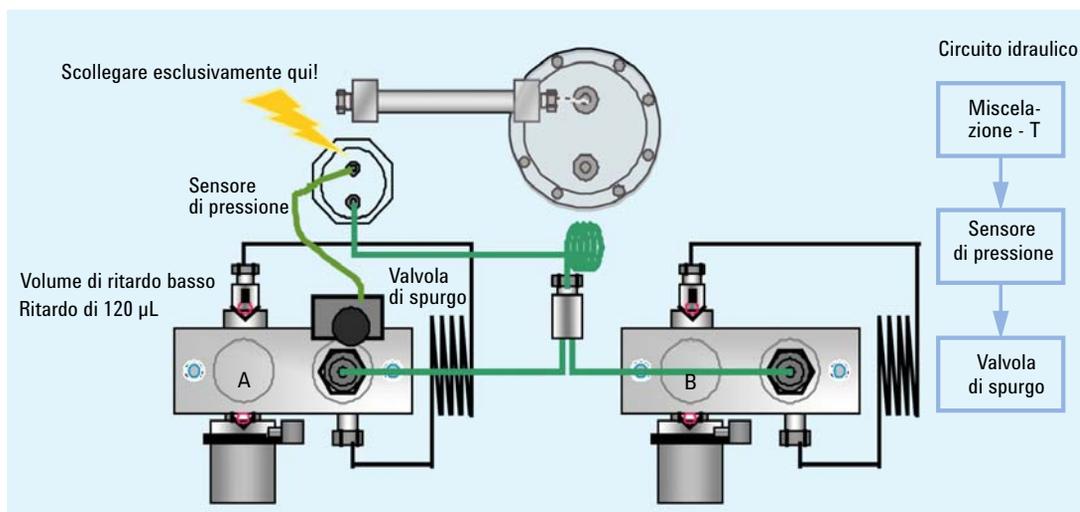
- manualmente, scollegando e ricollegando i capillari
- automaticamente, utilizzando una valvola (opzionale) a 2PS/6PT da 600 bar

## Configurazione ottimale dello strumento per colonne di diametro interno di 2,1 mm

### Configurazione per volume di ritardo basso per ottenere il minimo ritardo del gradiente per separazioni in gradiente ultra-rapide

Nella configurazione per volume di ritardo basso della pompa binaria Agilent 1260 Infinity lo smorzatore e il miscelatore vengono by-passati per ridurre il volume di ritardo della pompa a circa 120  $\mu\text{L}$ . In [Figura 13](#), pagina 43 sono mostrati i collegamenti del circuito idraulico per questa configurazione. Questa configurazione permette di ridurre al minimo il ritardo del gradiente per separazioni in gradiente ultra-rapide. Per sfruttare al massimo il controllo elettronico dello smorzamento, che sostituisce lo smorzamento fisico del volume, è importante selezionare la rispettiva funzione **Enhanced Solvent Compressibility** nella schermata ausiliaria del menu della pompa.

Per ridurre al minimo la dispersione dei picchi è necessario installare il kit a bassa dispersione (Kit a bassa dispersione (G1316-68744)). Il kit include capillari corti con diametro interno di 0,12 mm e scambiatori di calore a bassa dispersione (1,6  $\mu\text{L}$  e 1,5  $\mu\text{L}$ ) per il comparto colonne termostato. Per mantenere la risoluzione nel rivelatore UV, è necessario utilizzare una cella di flusso a basso volume. Vedere ["Scelta della cella di flusso"](#), pagina 66 per indicazioni sulla cella di flusso.



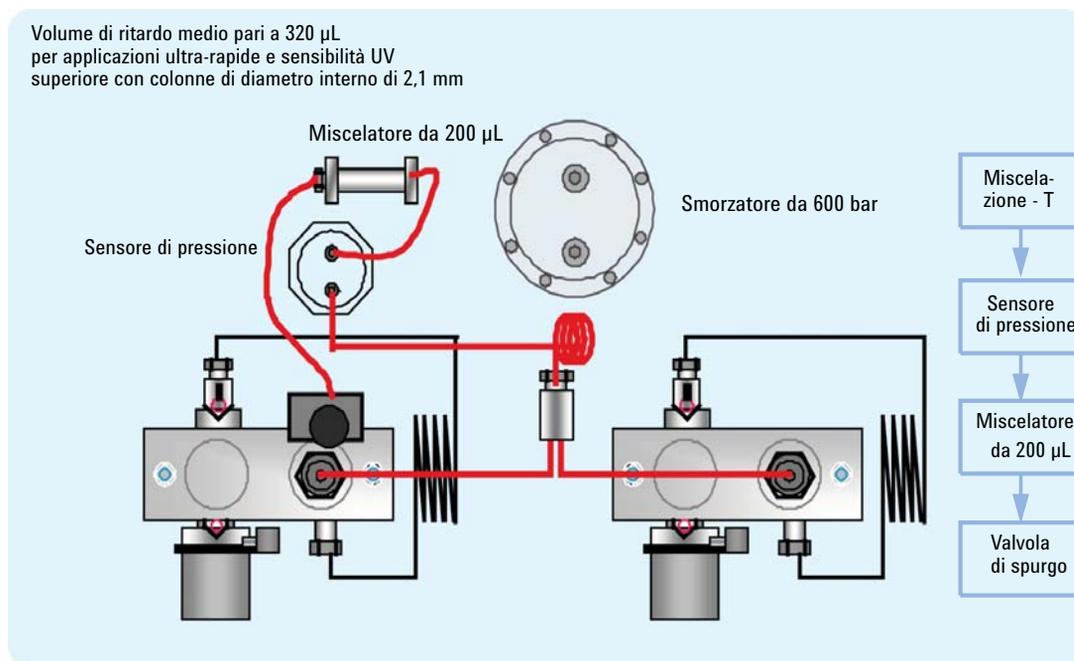
**Figura 13** Configurazione a basso ritardo per colonne di diametro interno pari a 2,1 mm

### 3 Ottimizzazione del sistema LC binario Agilent 1260 Infinity Configurazione del volume di ritardo ottimale

È importante ricordare di impostare il parametro corretto nella schermata ausiliaria della pompa. Ciò assicura che siano sempre applicati i valori corretti di compressibilità per le fasi mobili utilizzate. Sono disponibili curve di calibrazione per i solventi più comuni.

#### Configurazione per volume di ritardo medio per ottenere la massima sensibilità UV

Per le applicazioni UV ad alta sensibilità è possibile installare un miscelatore aggiuntivo da 200  $\mu\text{L}$  (Miscelatore a basso volume (200  $\mu\text{L}$ ) (5067-1565)) al fine di ridurre l'eventuale rumore residuo di miscelazione. Questo piccolo miscelatore permette di ottenere il più basso rumore della linea di base UV anche in presenza di condizioni estreme di gradiente. Vedere [Figura 14](#), pagina 44.

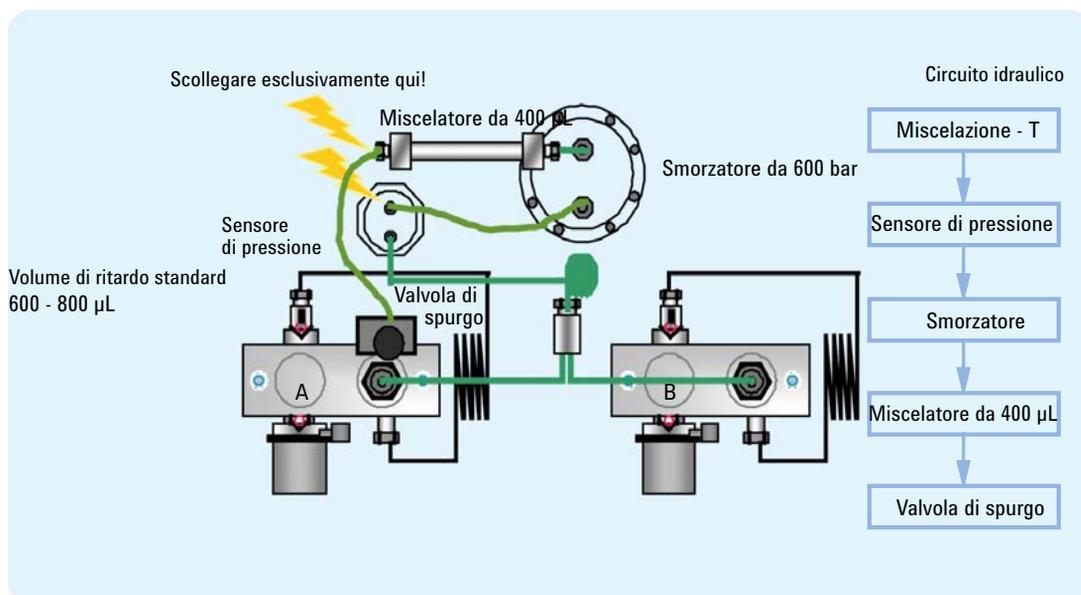


**Figura 14** Configurazione per volume di ritardo medio per colonne di diametro interno di 2,1 mm e massima sensibilità UV

## Configurazione ottimale dello strumento per colonne di diametro interno di 3 e 4,6 mm

### Configurazione per volume di ritardo standard per la massima sensibilità UV e la trasferibilità diretta dei metodi

I volumi relativi delle colonne di diametro interno pari a 3 mm e 4,6 mm sono circa due e cinque volte superiori rispetto a colonne di pari lunghezza e diametro interno di 2,1 mm; inoltre le velocità di flusso impiegate sono proporzionalmente più alte. Pertanto, il volume di ritardo standard della pompa binaria non comporta un ritardo del gradiente superiore in misura significativa.

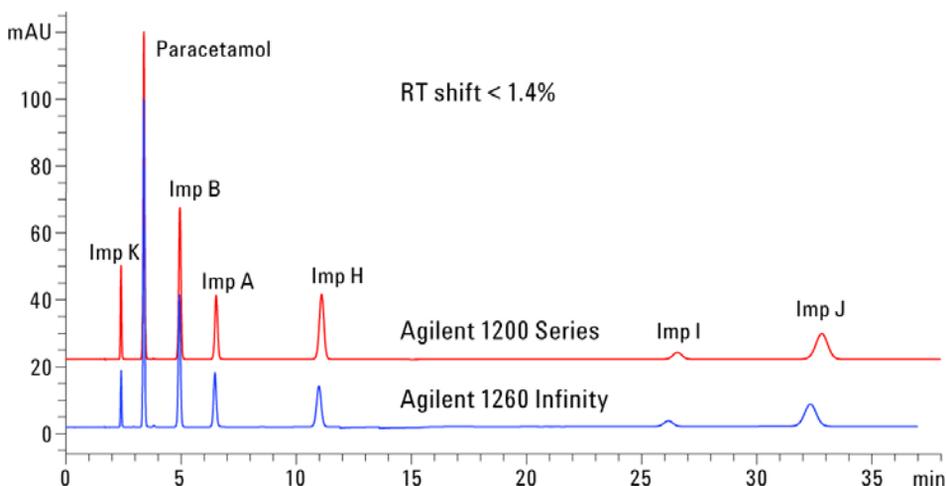


**Figura 15** Configurazione per volume di ritardo standard per colonne di diametro interno di 3 e 4,6 mm e massima sensibilità UV

### 3 Ottimizzazione del sistema LC binario Agilent 1260 Infinity

#### Configurazione del volume di ritardo ottimale

La configurazione per volume di ritardo standard è anche la configurazione che permette il trasferimento diretto dei metodi dai sistemi LC Agilent serie 1100 e 1200 al sistema LC binario 1260 Infinity o viceversa. In [Figura 16](#), pagina 46 sono mostrati due cromatogrammi sovrapposti di un metodo di analisi del paracetamolo e relative impurezze. Il metodo è stato trasferito da un sistema LC Agilent serie 1200 a un sistema LC binario Agilent 1260 Infinity senza alterare le condizioni cromatografiche (colonna, fase mobile, impostazioni della pompa, volume di iniezione, temperatura della colonna, impostazioni del rivelatore). Come è evidente dalla figura, è possibile trasferire direttamente il metodo.



**Figura 16** Confronto tra sistema Agilent serie 1200 e sistema LC Agilent 1260 Infinity sulla stessa configurazione

## Come ottenere volumi di iniezione maggiori

La configurazione standard dell'autocampionatore Agilent 1260 Infinity consente di iniettare un volume massimo pari a 100  $\mu\text{L}$  con il capillare del loop standard. Per aumentare il volume di iniezione è possibile installare il Kit di aggiornamento multiaspirazione (G1313-68711). Il kit consente di aumentare il volume di iniezione dell'iniettore di un massimo di 400  $\mu\text{L}$  o 1400  $\mu\text{L}$ . In tal caso il volume totale è pari a 500  $\mu\text{L}$  o 1500  $\mu\text{L}$  per l'autocampionatore 1260 Infinity con testa analitica da 100  $\mu\text{L}$ . Tenere presente che il volume di ritardo dell'autocampionatore aumenta se si utilizzano i capillari prolungati della sede disponibili nel kit multiaspirazione. Quando si calcola il volume di ritardo dell'autocampionatore è necessario raddoppiare il volume dei capillari prolungati. Il volume di ritardo del sistema associato all'autocampionatore aumenta di conseguenza.

Ogni volta che si scala un metodo verso il basso da una colonna più grande a una colonna più piccola, è importante che il trasferimento del metodo consenta di ridurre il volume di iniezione in proporzione al volume della colonna, in modo da mantenere inalterate le prestazioni del metodo. Ciò serve a mantenere costante il rapporto percentuale tra il volume di iniezione e il volume della colonna. Ciò è particolarmente importante se il solvente di iniezione è più forte (più eluotropico) rispetto alla fase mobile iniziale e qualsiasi aumento influirà sulla separazione, in particolare per i picchi che eluiscono all'inizio dell'analisi (fattore di ritenzione basso). In alcuni casi ciò causa la distorsione dei picchi; la regola generale prevede di utilizzare un solvente di iniezione identico o più debole rispetto alla composizione iniziale del gradiente. Ciò determina se, o quanto, il volume di iniezione può essere aumentato; l'utente deve verificare l'eventuale aumento della dispersione (picchi più ampi o più asimmetrici e minore risoluzione dei picchi) in corrispondenza dei tentativi di aumento del volume di iniezione. Se si esegue un'iniezione in un solvente debole, è probabile che il volume possa essere ulteriormente aumentato, poiché si avrà l'effetto di concentrare l'analita sulla testa della colonna all'avvio del gradiente. Al contrario, se l'iniezione avviene in un solvente più forte della fase mobile iniziale, l'aumento del volume di iniezione comporta un allargamento della banda dell'analita lungo la colonna, prima del gradiente, causando la dispersione dei picchi e perdita di risoluzione.

Probabilmente il fattore principale di cui tenere conto nella determinazione del volume di iniezione è il diametro della colonna, in quanto incide in misura

### 3 Ottimizzazione del sistema LC binario Agilent 1260 Infinity

#### Come ottenere volumi di iniezione maggiori

notevole sulla dispersione dei picchi. Le altezze dei picchi possono essere maggiori su una colonna stretta rispetto al caso di un'iniezione più grande su una colonna più larga, poiché la dispersione dei picchi è minore. Nel caso delle colonne di diametro interno pari a 2,1 mm, i volumi di iniezione tipici massimi possono essere compresi tra 5 e 10  $\mu\text{l}$ ; ciò tuttavia dipende molto dalla natura chimica dell'analita e della fase mobile, come discusso in precedenza. Nel caso di una separazione in gradiente, si possono ottenere volumi di iniezione pari a circa 5 % del volume della colonna, mantenendo al tempo stesso buone caratteristiche di risoluzione e dispersione dei picchi.

## Come ridurre i tempi di ciclo

È possibile ridurre i tempi di ciclo scegliendo una colonna corta dotata di buona selettività. Le dimensioni della colonna dipendono anche dal sistema di rivelazione utilizzato. Per la rivelazione UV, le colonne di diametro interno pari a 3,0 mm sono ideali, in quanto consentono di ottenere le velocità lineari più elevate. È possibile ottenere velocità lineari elevate anche con colonne di diametro interno pari a 4,6 mm, ma la velocità di flusso massima è limitata a 5 mL/min.

La pompa deve essere utilizzata nella configurazione per volume di ritardo standard (vedere [Figura 13](#), pagina 43) per le colonne di diametro interno pari a 4,6 mm e 3,0 mm. Per le colonne di diametro interno pari a 2,1 mm, deve essere utilizzata la configurazione per volume di ritardo basso. Inoltre, in caso di utilizzo di colonne di diametro interno di 2,1 mm, è necessario installare il kit a bassa dispersione per ottenere il più basso volume extra-colonna. Per la massima sensibilità UV si raccomanda inoltre di utilizzare il miscelatore corto (Miscelatore a basso volume (200 µL) (5067-1565)).

Le condizioni cromatografiche dipendono in misura notevole dai composti da analizzare, sebbene sia possibile seguire alcune regole empiriche per ridurre i tempi di ciclo:

- Utilizzare le più alte velocità di flusso compatibili con la risoluzione desiderata, la contropressione e il sistema di rivelazione.
- Utilizzare gradienti ripidi.
- Si consiglia di operare a temperature elevate della colonna per permettere l'utilizzo di alte velocità di flusso e ridurre ulteriormente il tempo di analisi. Le colonne Zorbax SB sono compatibili con una temperatura massima di 90 °C, a pH basso.

### Rigenerazione alternata delle colonne

L'utilizzo congiunto di una valvola di rigenerazione delle colonne e di una pompa di rigenerazione consente di ridurre ulteriormente i tempi di ciclo. Utilizzando questa configurazione, la rigenerazione della colonna utilizzata in precedenza ha luogo durante l'analisi eseguita sulla seconda colonna. Ciò consente di ridurre in misura notevole il tempo di ciclo.

### 3 Ottimizzazione del sistema LC binario Agilent 1260 Infinity

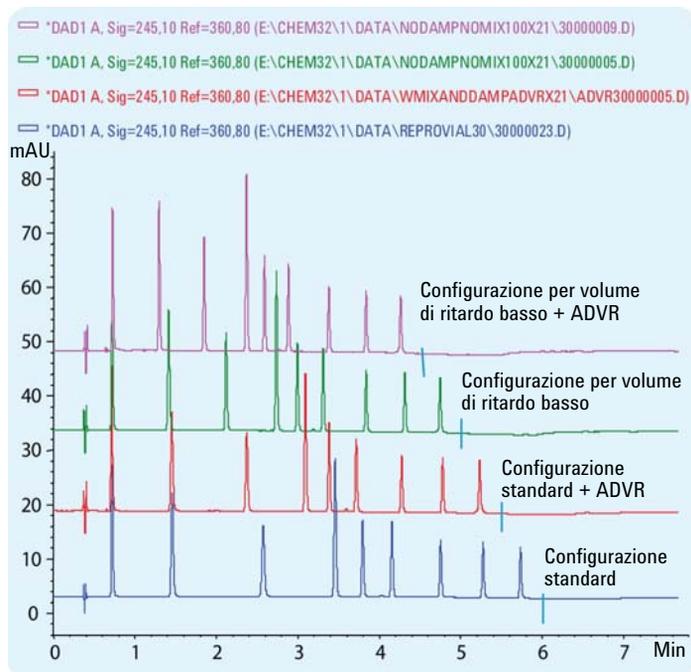
#### Come ridurre i tempi di ciclo

Utilizzando due colonne, due pompe e una valvola a 2 posizioni e 10 porte è possibile alternare tra loro le colonne per ridurre al massimo i tempi di ciclo tra iniezioni successive. In genere, colonne della stessa natura chimica e appartenenti allo stesso lotto garantiscono una precisione dei tempi di ritenzione tale da consentire l'elaborazione dei dati basata sull'utilizzo della stessa tabella di calibrazione.

Fare riferimento al manuale per l'utente delle soluzioni basate su valvole per una descrizione più dettagliata della rigenerazione alternata delle colonne.

#### Riduzione automatica del volume di ritardo (ADVR)

L'autocampionatore ad alte prestazioni Agilent 1260 Infinity offre la possibilità di eseguire iniezioni sovrapposte (OI) e/o la riduzione automatica del volume di ritardo (ADVR). Ciò significa che la valvola di iniezione viene rimossa dal circuito idraulico una volta che il campione ha raggiunto la testa della colonna. In questo modo si ottiene una riduzione significativa del volume di ritardo; vedere [Figura 17](#), pagina 50.



**Figura 17** Riduzione del volume di ritardo

Tanto più bassa è la velocità di flusso, tanto più ingenti sono le conseguenze negative risultanti dal volume di ritardo. In [Figura 17](#), pagina 50, è stata utilizzata una colonna di diametro interno pari a 2,1 mm a una velocità di flusso di 0,6 mL/min. Il volume di ritardo si riduce gradualmente dalla traccia più in basso alla traccia più in alto. L'influenza sul tempo di analisi totale e l'impatto, in particolare sull'ampiezza e sull'altezza dei primi picchi, è evidente.

Lo svantaggio delle iniezioni sovrapposte e della riduzione automatica del volume di ritardo è rappresentato dal fatto che l'autocampionatore non è inserito nel circuito idraulico per l'intera durata del tempo di analisi. Nel caso di composti molto aderenti, ciò potrebbe comportare un maggiore effetto memoria e/o discriminazione dei composti.

L'effetto memoria è la percentuale di composto che rimane nei componenti dello strumento che vengono a contatto con il campione e non viene introdotta nella colonna per l'analisi. Ciò significa che questa percentuale va perduta ai fini della misurazione quantitativa, ossia è discriminata. È possibile misurare l'effetto memoria iniettando solvente puro al termine dell'analisi del campione. Discriminazione ed effetto memoria possono essere anche più significativi se i composti degli analiti sono non polari e la fase iniziale del gradiente contiene un'alta percentuale di acqua. Nel caso peggiore, il composto non polare precipita sulla superficie di contatto. Piccole prese di dimetilsolfossido, per esempio, prima e dopo la presa del campione possono consentire di ridurre al minimo il problema.

Per le iniezioni sovrapposte o la riduzione automatica del volume di ritardo, l'intervallo temporale che precede la commutazione della valvola di iniezione nella modalità di bypass deve essere incrementato utilizzando il fattore di eliminazione impostato su 20. Ciò amplia l'intervallo durante il quale il volume di ritardo dell'autocampionatore viene lavato con la fase mobile.

## Come ottenere una maggiore produttività

L'iniezione può essere ottimizzata in termini di velocità, tenendo presente che un'aspirazione troppo rapida del campione può ridurre la riproducibilità. I vantaggi ottenibili sono comunque marginali in quanto i volumi di campione utilizzati tendono in ogni caso verso l'estremità inferiore dell'intervallo. Una frazione significativa del tempo di iniezione è rappresentata dal tempo necessario per introdurre ed estrarre l'ago dal vial e nella porta di lavaggio. Queste operazioni possono essere eseguite mentre è in corso la separazione precedente. Questo metodo è noto come "iniezione sovrapposta" e può essere facilmente attivato dalla schermata di impostazione dell'autocampionatore nel software di controllo. L'autocampionatore può essere impostato in modo da commutare su bypass il flusso attraverso l'autocampionatore dopo che l'iniezione è stata eseguita e quindi, dopo che sono trascorsi i primi 3 minuti di un'analisi di 4 minuti, avviare il processo di aspirazione del campione successivo e di preparazione dell'iniezione. In questo modo in genere è possibile risparmiare da 0,5 minuti a 1 minuto per iniezione.

## Come ridurre al minimo l'effetto memoria

L'effetto memoria si verifica quando picchi residui derivanti da un'iniezione precedente di campione compaiono in un'iniezione successiva di bianco. L'effetto memoria tra iniezioni successive di campioni può generare risultati errati. Il livello dell'effetto memoria è espresso come rapporto percentuale tra l'area del picco nella soluzione del bianco e l'area nell'iniezione di campione precedente. L'autocampionatore Agilent 1260 Infinity è ottimizzato per ridurre al minimo l'effetto memoria grazie all'attenta progettazione del circuito idraulico e all'utilizzo di materiali caratterizzati da un assorbimento minimo del campione. Dovrebbe essere possibile ottenere un valore di effetto memoria pari a 0,002 % anche nel caso in cui si utilizzi come rivelatore uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo. Le impostazioni operative dell'autocampionatore consentono all'utente di impostare i parametri opportuni per ridurre al minimo l'effetto memoria per le applicazioni che interessano composti in grado di permanere nel sistema.

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

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

Il circuito idraulico, incluso l'interno dell'ago, viene lavato costantemente durante il normale funzionamento; nella maggior parte dei casi ciò assicura un'efficace eliminazione dell'effetto memoria. La funzione di riduzione automatica del volume di ritardo (ADVR) consente di ridurre il volume di ritardo, ma riduce anche il lavaggio dell'autocampionatore e non deve essere utilizzata con analiti potenzialmente in grado di provocare problemi di effetto memoria.

Per ottenere un effetto memoria minimo, osservare le seguenti raccomandazioni:

- Utilizzare sempre l'autocampionatore con la valvola di iniezione nella posizione di mainpass.
- Lavare la superficie esterna dell'ago con un solvente adatto utilizzando la porta di lavaggio. La durata del lavaggio deve essere pari ad almeno 10 s.

### 3 Ottimizzazione del sistema LC binario Agilent 1260 Infinity

#### Come ridurre al minimo l'effetto memoria

- Se possibile, ridurre la velocità di aspirazione a 10  $\mu\text{L}/\text{min}$ .
- Utilizzare vial con tappo Agilent da 2 mL (Fiala con tappo a vite, 2 mL (5182-0556)).
- Se la sede è contaminata, utilizzare un'opportuna procedura di lavaggio della sede.
- Utilizzare solventi di lavaggio in grado di dissolvere i composti del campione.
- Utilizzare fasi mobili acide per i composti basici.

#### **Lavaggio e pulizia dell'autocampionatore per ottenere un effetto memoria pressoché nullo**

Nel corso della routine di iniezione, il loop del campione, la parte interna dell'ago, il capillare della sede e il canale principale della valvola di iniezione sono inseriti nel circuito idraulico e vi rimangono per l'intera durata dell'analisi. Ciò significa che questi componenti sono lavati in continuo dalla fase mobile durante l'intera analisi. È soltanto durante l'aspirazione del campione che la valvola di iniezione viene rimossa dal circuito idraulico. In questa posizione, l'effluente della pompa viene inviato direttamente nella colonna. Prima dell'iniezione, le superfici esterne dell'ago vengono lavate con solvente fresco. Questa operazione viene eseguita utilizzando la porta di lavaggio dell'autocampionatore e previene la contaminazione della sede dell'ago. La porta di lavaggio dell'autocampionatore viene nuovamente riempita con solvente fresco da una pompa peristaltica installata nell'alloggiamento dell'autocampionatore. Il volume della porta di lavaggio è pari a circa 680  $\mu\text{L}$  e la pompa eroga 6 mL/min. Impostando il tempo di lavaggio su 10 s, il volume della porta di lavaggio viene riempito più di una volta con solvente fresco, il che è sufficiente nella maggior parte dei casi per pulire la superficie esterna dell'ago.

## Come ottenere una maggiore risoluzione

L'aumento della risoluzione di una separazione migliora l'analisi dei dati qualitativi e quantitativi, permette di separare un maggior numero di picchi o consente di ampliare il ventaglio di possibilità volte ad accelerare la separazione. In questa sezione vengono illustrati i metodi disponibili per aumentare la risoluzione esaminando quanto segue:

- Ottimizzazione della selettività
- Impaccamento con particelle di dimensioni più ridotte
- Colonne di maggiore lunghezza
- Gradienti meno pronunciati, maggiore velocità di flusso
- Volume extra-colonna minimo
- Ottimizzazione di volume e solvente di iniezione
- Raccolta dati sufficientemente rapida

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

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

in cui

- $R_s$  = risoluzione
- $N$  = piatti teorici (misura dell'efficienza della colonna)
- $\alpha$  = selettività (tra due picchi)
- $k_2$  = fattore di ritenzione del secondo picco (in precedenza noto come fattore di capacità)

Il termine che incide in misura più significativa sulla risoluzione è la selettività,  $\alpha$ , che in pratica può essere variata utilizzando un diverso tipo di fase stazionaria (C18, C8, fenile, nitrile e così via) e modificando la fase mobile e la temperatura per aumentare al massimo le differenze di selettività tra i soluti da separare. Si tratta di un complesso di operazioni piuttosto impegnative che è preferibile affrontare ricorrendo a un sistema automatico di sviluppo di metodi, che consente di valutare un ampio spettro di condizioni su varie colonne e con diverse fasi mobili tramite un preciso protocollo di esplora-

### 3 Ottimizzazione del sistema LC binario Agilent 1260 Infinity

#### Come ottenere una maggiore risoluzione

zione. In questa sezione viene discusso come incrementare la risoluzione con una qualsiasi combinazione scelta di fase stazionaria e fase mobile. Se per scegliere le fasi si è fatto ricorso a un sistema automatico di sviluppo di metodi, è probabile che siano state utilizzate colonne corte per eseguire analisi rapide in ciascuna fase dell'esplorazione.

In base all'equazione della risoluzione, il secondo termine più significativo è rappresentato dai piatti teorici o efficienza ( $N$ ), un fattore che può essere ottimizzato in vari modi.  $N$  è inversamente proporzionale alle dimensioni delle particelle e direttamente proporzionale alla lunghezza della colonna; pertanto, utilizzando particelle più piccole e una colonna di maggiore lunghezza i piatti teorici aumentano. La pressione aumenta con l'inverso del quadrato delle dimensioni delle particelle e proporzionalmente alla lunghezza della colonna. La risoluzione aumenta con la radice quadrata di  $N$  e, pertanto, se si raddoppia la lunghezza della colonna la risoluzione aumenta di un fattore pari a 1,4. Ciò che è possibile ottenere dipende dalla viscosità della fase mobile, che è direttamente correlata alla pressione. Le miscele di metanolo generano una contropressione superiore rispetto alle miscele di acetonitrile. Spesso si preferisce l'acetonitrile in quanto i picchi presentano forme migliori, sono più stretti e la viscosità è inferiore; il metanolo, tuttavia, in genere consente di ottenere una migliore selettività (in particolare per piccole molecole con peso molecolare inferiore a circa 500 Da). La viscosità può essere ridotta aumentando la temperatura tenendo presente, tuttavia, che ciò può modificare la selettività della separazione. L'aumento o la diminuzione della selettività devono essere determinate sperimentalmente. Tenere presente che all'aumentare di velocità di flusso e pressione aumenta anche il riscaldamento per attrito nella colonna. Ciò può provocare un leggero aumento della dispersione e una lieve variazione della selettività, che possono tradursi in una diminuzione della risoluzione. Quest'ultimo fenomeno può essere contrastato riducendo di alcuni gradi la temperatura del termostato e determinando sperimentalmente l'effetto risultante.

La curva di van Deemter evidenzia che la velocità di flusso ottimale attraverso una colonna con particelle di dimensioni inferiori a 2 micron (STM) è più alta rispetto al caso di particelle di dimensioni maggiori e assume un andamento piuttosto piatto all'aumentare della velocità di flusso. In genere, in prossimità delle condizioni ottimali, le velocità di flusso per le colonne STM sono: 2 ml/min per colonne di diametro interno pari a 4,6 mm e 0,4 ml/min per colonne di diametro interno pari a 2,1 mm.

Nel caso delle separazioni isocratiche, l'aumento del fattore di ritenzione  $k$  si traduce in una migliore risoluzione, in quanto il soluto viene ritenuto più a lungo. Nelle separazioni in gradiente, la ritenzione è descritta dal fattore  $k^*$  in base alla seguente equazione:

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

in cui:

- $k^*$  = valore  $k$  medio
- $t_G$  = durata temporale del gradiente (o del segmento del gradiente) in minuti
- $F$  = velocità di flusso (mL/min)
- $V_m$  = volume di ritardo della colonna
- $\Delta\%B$  = variazione nella frazione di solvente B durante il gradiente
- $S$  = costante (circa 4-5 per piccole molecole)

L'equazione dimostra che è possibile aumentare  $k$ , e quindi la risoluzione, utilizzando un gradiente meno pronunciato (indicativamente una variazione da 2 a 5 %/min), una velocità di flusso più alta e una colonna di volume più contenuto. L'equazione dimostra inoltre come accelerare un gradiente esistente: se la velocità di flusso raddoppia ma la durata del gradiente si dimezza,  $k^*$  rimane costante e la separazione ha un aspetto identico ma avviene in metà tempo.

Una qualsiasi riduzione del volume extra-colonna riduce la dispersione e migliora la risoluzione. Il volume extra-colonna è già ottimizzato nel sistema LC binario 1260 Infinity grazie all'uso di capillari narrow bore (diametro interno pari a 0,12 mm; verificare che la lunghezza del collegamento tra colonna e rivelatore sia ridotta al minimo) e della cella di flusso a cartuccia Max-Light.

Infine, qualsiasi guadagno in termini di risoluzione deve essere preservato utilizzando una velocità di raccolta dati sufficientemente rapida da ottenere profili accurati dei picchi stretti.

Riepilogando, per aumentare la risoluzione tenere presente quanto segue:

- Il primo passaggio nel miglioramento della risoluzione consiste sempre nel testare una serie di fasi stazionarie in modo da selezionare la colonna caratterizzata dalla separazione migliore. Si tratta del parametro più importante per quanto riguarda la risoluzione.

### 3 Ottimizzazione del sistema LC binario Agilent 1260 Infinity

#### Come ottenere una maggiore risoluzione

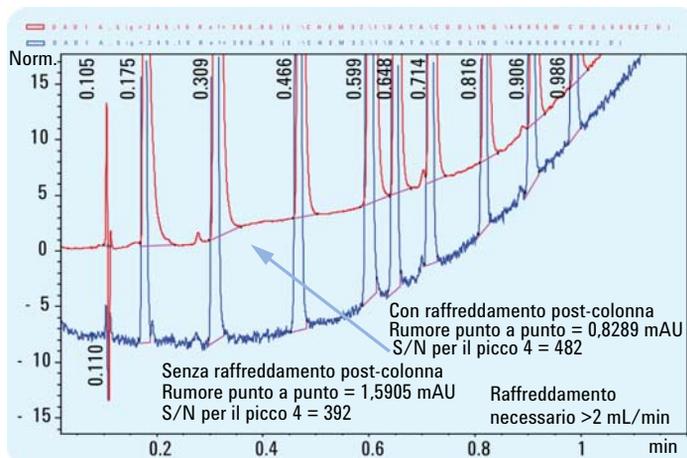
- Il secondo passaggio consiste nell'utilizzo di colonne lunghe o addirittura di colonne accoppiate per aumentare i piatti teorici.
- Un terzo passaggio consiste nello spostare i picchi a fattori di ritenzione più alti. Nel caso di valori  $k$  compresi tra 5 e 10, le conseguenze sono significative. Nel caso di valori  $k$  più alti, l'effetto è molto contenuto.

In pratica, ciò significa che colonne più lunghe aventi selettività adeguata forniscono una migliore risoluzione.

## Configurazione ottimale dello strumento per l'alta risoluzione

### Comparto colonne

Il comparto colonne può essere utilizzato nella versione standard per colonne di diametro interno pari a 4,6 mm. A velocità di flusso superiori a 2 mL/min e temperature superiori a 60 °C, l'effluente dalla colonna deve essere raffreddato alla temperatura del rivelatore utilizzando il dispositivo di raffreddamento/riscaldamento da 1,5 µL nel comparto colonne. Ciò consente di ridurre al minimo il rumore con i rivelatori UV, anche a velocità di flusso di 5 mL/min e temperature di 80 °C (vedere [Figura 18](#), pagina 59).



**Figura 18** Influenza del raffreddamento post-colonna (PCC) sul rumore della linea di base

Se si utilizzano colonne di diametro interno pari a 2,1 mm a basse velocità di flusso, è necessario impiegare il dispositivo di riscaldamento piccolo per ridurre al minimo il volume extra-colonna.

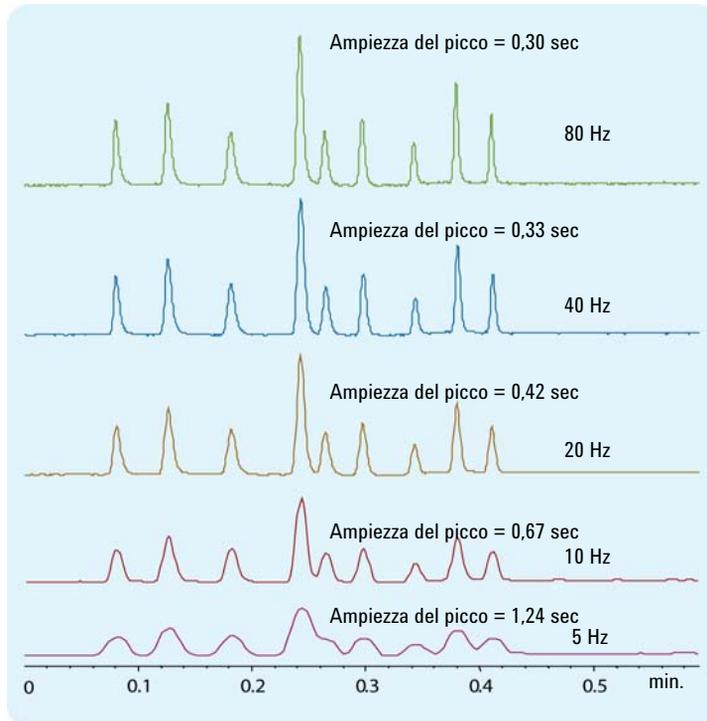
### **Volume extra-colonna**

Per preservare l'alta risoluzione ottenuta con la colonna, il volume extra-colonna, in particolare a valle della colonna, deve essere il più piccolo possibile.

- Per le colonne di diametro interno pari a 4,6 mm, è necessario utilizzare la configurazione per ritardo standard per la pompa; vedere [Figura 15](#), pagina 45.
- Per le colonne di diametro interno pari a 2,1 mm, è necessario utilizzare la configurazione per ritardo basso per la pompa e installare il kit a bassa dispersione nel comparto colonne. Per ottenere la massima sensibilità UV, si consiglia di utilizzare anche il miscelatore corto. Vedere [Figura 13](#), pagina 43 e [Figura 14](#), pagina 44.
- Anche il volume di iniezione è un fattore importante, in particolare se il campione è dissolto in un solvente organico. In questo caso, il gradiente deve iniziare con una bassa percentuale di fase organica per concentrare i composti in testa alla colonna. Ciò evita la dispersione dei picchi derivante dall'iniezione.
- La cella a cartuccia Max-Light da 10 mm presenta un basso volume di dispersione ( $\sigma$  volume 1,0  $\mu$ L) e non richiede alcuna ulteriore ottimizzazione del volume.
- Nei casi in cui si utilizza la cella alternativa Max-Light da 60 mm ad alta sensibilità per ottenere una maggiore sensibilità, il volume della cella è ottimizzato per l'uso con colonne di diametro interno pari a 3 mm e 4,6 mm.

## Velocità di campionamento

L'impostazione della velocità di campionamento del rivelatore UV deve essere selezionata in maniera opportuna. La selezione di una velocità di campionamento troppo bassa comporta l'aumento dell'ampiezza dei picchi e una minore risoluzione; vedere [Figura 19](#), pagina 61.



**Figura 19** Ampiezza del picco in funzione della velocità di campionamento UV

In [Tabella 6](#), pagina 62 è mostrata la dipendenza dalla velocità di campionamento dell'ampiezza del picco, della risoluzione e della capacità del picco. Per analisi LC rapide e ultra-rapide sono necessarie velocità di campionamento elevate; in caso contrario, la separazione ottenuta con la colonna viene perduta nel rivelatore.

**Tabella 6** Relazione tra velocità di campionamento e prestazioni cromatografiche

Velocità di campionamento	Ampiezza del picco	Risoluzione	Capacità del picco
80 Hz	0,300	2,25	60
40 Hz	0,329	2,05	55
20 Hz	0,416	1,71	45
10 Hz	0,666	1,17	29
5 Hz	1,236	0,67	16

80 Hz (velocità di campionamento) confrontati con 20 Hz evidenziano miglioramenti per quanto riguarda:

- Ampiezza del picco:
  - 30 %
- Risoluzione:
  - + 30 %
- Capacità del picco:
  - + 40 %
- Efficienza apparente della colonna:
  - + 70 %

### Condizioni cromatografiche

Come ricordato in precedenza, le condizioni cromatografiche dipendono dai composti da analizzare. Anche in questo caso, tuttavia, è possibile tenere presente alcune regole empiriche.

- Utilizzare velocità di flusso moderate; tenere presente, tuttavia, che alcuni esperimenti recenti hanno dimostrato che anche velocità di flusso elevate possono risultare vantaggiose ai fini del miglioramento della separazione. Per colonne di diametro interno pari a 4,6 mm impaccate con particelle di dimensioni inferiori a 2 micron, si raccomanda di utilizzare una velocità di flusso iniziale pari a 2 mL/min. Per colonne di diametro interno pari a 2,1 mm con particelle di dimensioni inferiori a 2 micron, una velocità di flusso di 0,4 mL/min è un buon punto di partenza.
- Utilizzare gradienti moderati, per esempio una variazione di gradiente pari a 2 – 5 % al minuto.
- La temperatura della colonna è un altro parametro ottimizzabile. La temperatura può incidere sulla separazione ed è un fattore da non trascurare.

## Come ottenere una maggiore sensibilità

La sensibilità di una separazione è correlata alla fase mobile e alla fase stazionaria scelte. Le caratteristiche auspicabili di una buona separazione sono la presenza di picchi stretti e di una linea di base stabile caratterizzata da rumore minimo. La scelta della configurazione strumentale incide sulla separazione; particolarmente rilevante è l'impostazione del rivelatore.

## Configurazione ottimale dello strumento per l'alta sensibilità

### Considerazioni generali

- Per ottenere il più basso rumore della linea di base, si consiglia la configurazione per volume di ritardo standard per la pompa binaria 1260 Infinity .
- Anche in questo caso, il volume di iniezione e il solvente di dissoluzione del campione sono fattori importanti. Operare in maniera attenta a concentrare i composti in testa alla colonna per evitare la dispersione dei picchi causata dall'iniezione, che ridurrebbe l'altezza dei picchi. A tale scopo, il campione deve essere dissolto in un solvente la cui composizione presenta una capacità di eluizione inferiore rispetto alla fase mobile.
- La temperatura della colonna non deve essere troppo bassa al fine di evitare una ritenzione prolungata dei picchi nella colonna. Una temperatura troppo bassa comporta anche dispersione dei picchi e riduzione della loro altezza.
- La velocità di campionamento del rivelatore UV deve essere selezionata in base all'ampiezza effettiva del picco. Velocità di campionamento superiori al necessario devono essere evitate a causa dell'incremento dei livelli di rumore.
- I rivelatori UV disponibili sono il rivelatore a serie di diodi Agilent 1260 Infinity (G4212B) e il rivelatore a lunghezza d'onda variabile Agilent 1260 Infinity (G1314F), con velocità di campionamento di 80 Hz e livelli di rumore e deriva notevolmente più bassi.
- “Scelta della cella di flusso” , pagina 66 fornisce una panoramica sulle celle di flusso disponibili con il rivelatore DAD G4212B . Per informazioni sulle celle di flusso utilizzate con il rivelatore VWD G1314F , fare riferimento al manuale per l'utente del rivelatore a lunghezza d'onda variabile Agilent 1260 Infinity .

### Condizioni cromatografiche

Per ottenere un valore ottimale del rapporto segnale-rumore, è conveniente che l'eluizione dei picchi sia rapida.

- Utilizzare velocità di flusso elevate per eluire i picchi a bassi valori k.
- È possibile inoltre applicare gradienti più rapidi per eluire i picchi a bassi valori k.

## Colonne

La sensibilità è espressa in termini di rapporto segnale-rumore (S/N) e, pertanto, è necessario aumentare al massimo l'altezza dei picchi e ridurre al minimo il rumore della linea di base. La riduzione della dispersione dei picchi permette di mantenere l'altezza dei picchi e, pertanto, il volume extra-colonna deve essere ridotto al minimo utilizzando capillari di collegamento corti e di diametro interno ridotto e raccordi installati correttamente. L'utilizzo di colonne di diametro interno più ridotto dovrebbe consentire di aumentare l'altezza dei picchi e, pertanto, è ideale per le applicazioni in cui la quantità di campione è limitata. Se è possibile iniettare la stessa quantità di campione in una colonna di minore diametro interno, la diluizione associata al diametro della colonna è inferiore e la sensibilità aumenta. Per esempio, la riduzione del diametro interno della colonna da 4,6 mm a 2,1 mm si traduce in un aumento teorico dell'altezza dei picchi pari a 4,7 times a causa della minor diluizione in colonna. Nel caso di uno spettrometro di massa, le velocità di flusso più basse tipiche delle colonne più strette possono incrementare l'efficienza dei fenomeni di ionizzazione e migliorare quindi la sensibilità.

## Impostazioni del rivelatore

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

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

## Scelta della cella di flusso

Sono disponibili svariati modelli della cella di flusso a cartuccia Max-Light; vedere [Tabella 7](#), pagina 66.

**Tabella 7** Specifiche delle celle di flusso a cartuccia Max-Light

Celle a cartuccia	<ul style="list-style-type: none"><li>• Cella a cartuccia Max-Light (10 mm, V(s) 1,0 µL) (G4212-60008)</li><li>• Cella a cartuccia Max-Light bioinerte (10 mm, V(s) 1,0 µL) (G5615-60018)</li><li>• Cella a cartuccia Max-Light (60 mm, V(s) 4,0 µL) (G4212-60007)</li><li>• Cella a cartuccia Max-Light bioinerte (60 mm, V(s) 4,0 µL) (G5615-60017)</li><li>• Cella a cartuccia Max-Light HDR (3,7 mm, V(s) 0,4 µL) (G4212-60032)</li><li>• Cella a cartuccia Max-Light ULD (10 mm, V(s) 0,6 µL) (G4212-60038)</li><li>• Cella a cartuccia Max-Light per test (G4212-60011)</li></ul>
Pressione massima	70 bar (1015 psi) pressione operativa massima (MOP) <sup>1</sup> 150 bar (2175 psi) pressione incidentale massima (MIP) <sup>2</sup>
Intervallo di pH	1,0-12,5 (a seconda del solvente)

<sup>1</sup> Pressione operativa massima (MOP): la pressione massima alla quale il sistema è in grado di funzionare ininterrottamente in condizioni normali.

<sup>2</sup> Pressione incidentale massima (MIP): la pressione massima alla quale il sistema può essere soggetto per un breve intervallo.

### Applicazioni normali

La Cella a cartuccia Max-Light (10 mm, V(s) 1,0 µL) (G4212-60008) è compatibile con un'ampia gamma di applicazioni:

- tutte le colonne di diametro minimo pari a 2,1 mm ID o addirittura inferiore
- applicazioni con dispersione dei picchi (ampiezza del picco x flusso) minima pari a ~2 µL [esempio: ampiezza del picco = 0,04 min e flusso = 0,1 mL/min comporta una dispersione dei picchi pari a 0,04 min x 0,1 mL/min = 0,004 mL = 4 µL]

### Alta sensibilità

Se è necessaria una maggiore sensibilità, è possibile utilizzare la Cella a cartuccia Max-Light (60 mm, V(s) 4,0 µL) (G4212-60007). Questa cella migliora il rivelatore riducendo il limite di rivelazione (LOD) di un fattore circa pari a 3 (a seconda dell'applicazione).

### Dispersione ultra-bassa

La cella ULD a cartuccia Max-Light può essere utilizzata con i rivelatori DAD G4212A e G4212B . La cella è un requisito obbligatorio nel caso del kit a dispersione ultra-bassa attualmente esistente come Kit a dispersione ultra-bassa 1290 Infinity (5067-5189). La cella deve far parte della soluzione a dispersione ultra-bassa.

### Alto intervallo dinamico

La cella HDR a cartuccia Max-Light può essere utilizzata con i rivelatori DAD G4212A e G4212B . La cella è obbligatoria come componente della soluzione HDR (High Dynamic Range) ad alto intervallo dinamico che sarà introdotta a marzo/aprile 2013.

#### NOTA

Per proteggere la cella di flusso dalla sovrappressione (ad esempio nei sistemi LC/MS), installare il Kit della valvola limitatrice della pressione in linea (G4212-68001); vedere il manuale dei *rivelatori a serie di diodi Agilent serie 1200 Infinity*.

---

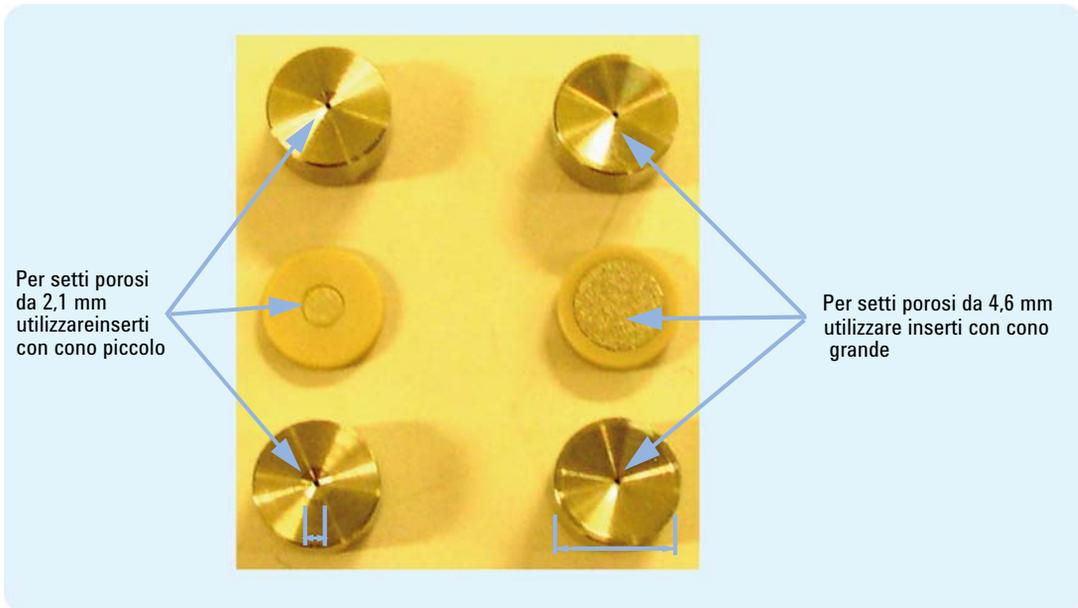
## Come prevenire ostruzioni della colonna

Le colonne impaccate con particelle di dimensioni inferiori a 2 micron necessitano anche di setti porosi con pori di piccole dimensioni per impedire che il materiale di impaccamento venga trascinato via. Ciò comporta un immediato aumento del rischio di ostruzione di questi setti porosi con particolati provenienti dal campione, dalla fase mobile e/o dallo stesso strumento. Per proteggere la colonna, è possibile utilizzare ulteriori filtri di piccole dimensioni (Figura 20, pagina 69) a monte della colonna. Si consiglia inoltre di sottoporre il campione a filtrazione o/e centrifugazione accurate e di evitare la presenza di qualsiasi tipo di particolato nelle fasi mobili.

Per ottenere risultati ottimali, osservare le seguenti semplici linee guida per l'uso:

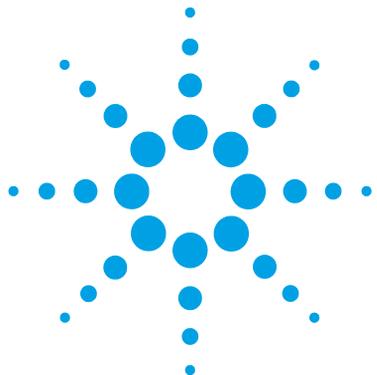
- 1 Installare e far funzionare la colonna solo nella direzione di flusso indicata sulla colonna stessa.
- 2 Utilizzare esclusivamente solventi di alta qualità e grado cromatografico.
- 3 Prima dell'uso, filtrare tutte le soluzioni tampone acquose e tutti i campioni attraverso un filtro adatto da 0,2 µm.
- 4 Sostituire le bottiglie di tampone della fase mobile ogni 24 – 48 h – non aggiungere fase mobile alla bottiglia; utilizzare sempre una bottiglia nuova.
- 5 Non utilizzare una fase mobile a base di soluzione tampone altamente salina (>50 mM) insieme a concentrazioni elevate di acetonitrile perché potrebbe formarsi del precipitato.
- 6 Si raccomanda l'uso di un filtro in linea per intrappolare i particolati e prolungare la durata della colonna. Utilizzare il filtro in linea 1260 Infinity adeguato per la colonna specifica: filtro in linea LC 1260 Infinity, 2,1 mm, filtro con pori di dimensioni pari a 0,2 µm, max 600 bar, capillare di collegamento SS da 70 x 0,12 mm (5067-1551) per colonne di diametro interno pari a 2,1 , filtro in linea LC 1260 Infinity, 4,6 mm, filtro con pori di dimensioni pari a 0,2 µm, max 600 bar, capillare di collegamento SS da 90 x 0,17 mm (5067-1553) per colonne di diametro interno pari a 4,6 mm o 3,0 mm. Sostituire il filtro quando la pressione aumenta del 10 %.
- 7 Spurgare le pompe (i collegamenti fino alla colonna) da tutte le fasi mobili a base di soluzioni tampone e farvi fluire 5 mL di solvente prima di collegare la colonna allo strumento.

- 8 Lavare la colonna con una fase mobile compatibile, iniziando lentamente a 0,1 mL/min per una colonna con diametro interno di 2,1 mm, a 0,2 mL/min per una colonna con diametro interno di 3,0 mm e a 0,4 mL/min per una colonna con diametro interno di 4,6 mm. Aumentare la velocità di flusso fino al valore desiderato nell'arco di 5 minuti.
- 9 Quando la pressione si è stabilizzata, collegare la colonna al rivelatore.
- 10 Prima dell'uso, equilibrare la colonna e il rivelatore con 10 volumi di colonna della fase mobile. (1 – 5 mL a seconda delle dimensioni della colonna.)
- 11 Evitare una pressione eccessiva. Controllare l'intervallo di pressione del gradiente utilizzato (che può essere pari o superiore a 100 – 130 bar) prima di avviare qualsiasi sequenza.



**Figura 20** Protezione per colonne di diametro interno pari a 4,6 e 2,1 mm impaccate con particelle da 1,8  $\mu\text{m}$ , setto poroso d'ingresso con pori di dimensioni pari a 0,2  $\mu\text{m}$

### **3** **Ottimizzazione del sistema LC binario Agilent 1260 Infinity** Come prevenire ostruzioni della colonna



## 4 Configurazione e installazione del sistema

Installazione del software	72
Installazione dei moduli	74
Installazione dei moduli del sistema	74
Integrazione in rete	74
Capillari e tubi di collegamento nel circuito idraulico	75
Adescamento del sistema	80

Nel presente capitolo vengono fornite informazioni su installazione del software, installazione dei moduli e preparazione del sistema per l'utilizzo.



## **Installazione del software**

### **Installazione del software di controllo e del sistema di dati**

Per informazioni dettagliate sulle procedure di installazione del software, fare riferimento al manuale del rivelatore e ai manuali del software.

## Installazione del software Agilent Lab Advisor

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

Agilent Lab Advisor sostituisce e amplia le funzioni diagnostiche in precedenza disponibili esclusivamente nel software ChemStation.

Agilent Lab Advisor è un'applicazione basata su Windows che monitora gli strumenti del laboratorio in tempo reale e senza interruzioni e aumenta la produttività tramite la notifica automatica delle esigenze di manutenzione e assistenza mediante l'uso di contatori avanzati. Ciò consente di risolvere un problema prima che possa incidere sui risultati. Il software include una suite estesa di informazioni e documentazione per l'utente, un insieme di calcolatori e strumenti che facilitano la configurazione, la calibrazione e la manutenzione dello strumento, oltre a test e routine diagnostiche per verificare la correttezza delle prestazioni. Agilent Lab Advisor fornisce anche avvisi e soluzioni per tutti gli errori strumentali che potrebbero insorgere. Il software funziona con o senza i sistemi di dati Agilent.

Il software monitora:

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

Inoltre, il software:

- Rende automatici test utili
- Tenta di identificare gli strumenti a interfaccia LAN supportati che sono accesi e collegati al PC dell'utente o alla rete del laboratorio
- Suggerisce automaticamente le parti da sostituire e le attività di risoluzione dei problemi per alcuni problemi strumentali più frequenti.

## Installazione dei moduli

### Installazione dei moduli del sistema

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

### Integrazione in rete

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

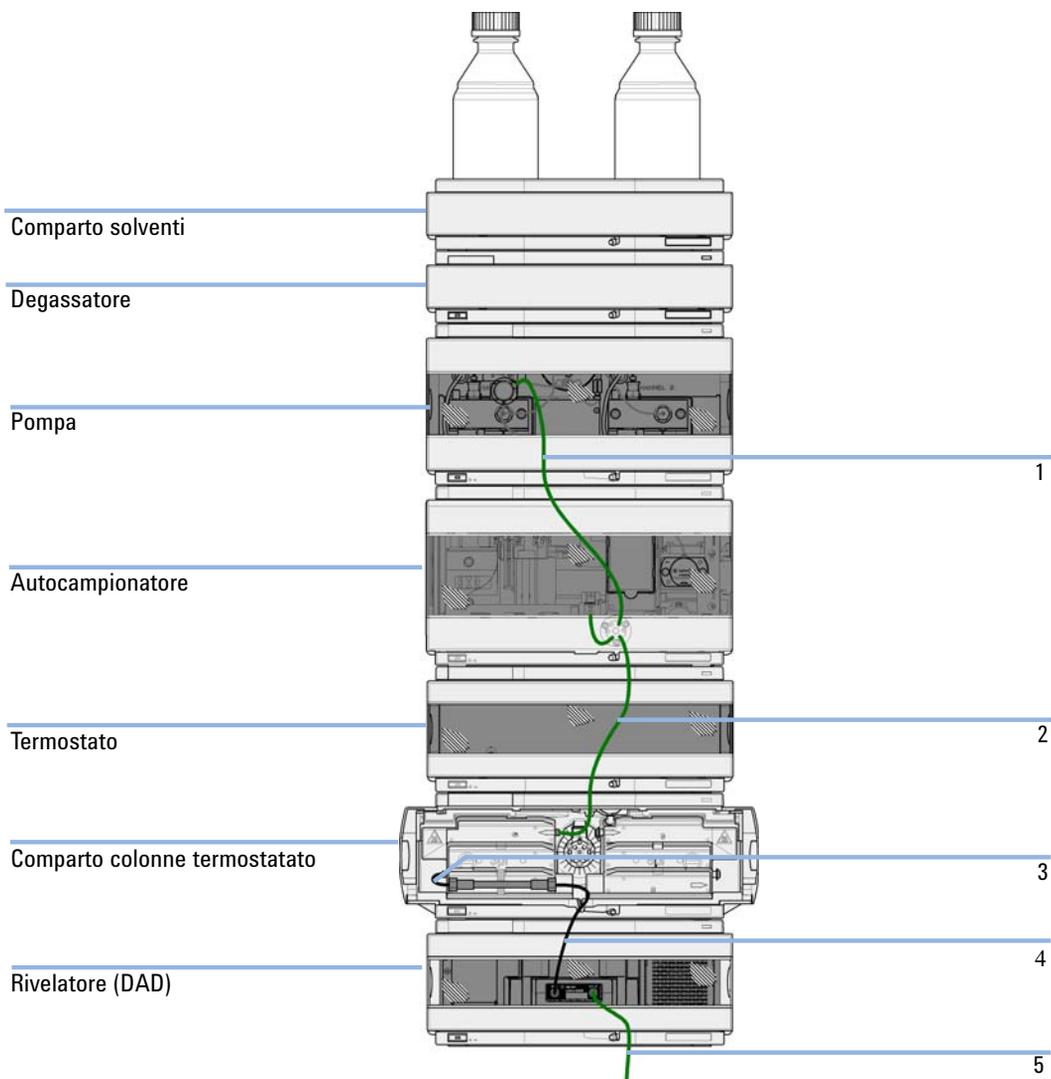
## **Capillari e tubi di collegamento nel circuito idraulico**

A seconda della configurazione del sistema, si utilizzano capillari di varia lunghezza e diametro. I capillari sono descritti di seguito.

Vedere i manuali dei moduli per informazioni sui tubi e capillari di collegamento interni dei moduli.

### Collegamenti per la configurazione per volume di ritardo standard

In [Figura 21](#), pagina 76 sono mostrati i capillari e tubi di collegamento nel circuito idraulico per la configurazione per volume di ritardo standard del sistema LC binario 1260 Infinity.



**Figura 21** Capillari e tubi di collegamento nel circuito idraulico (configurazione per volume di ritardo standard)

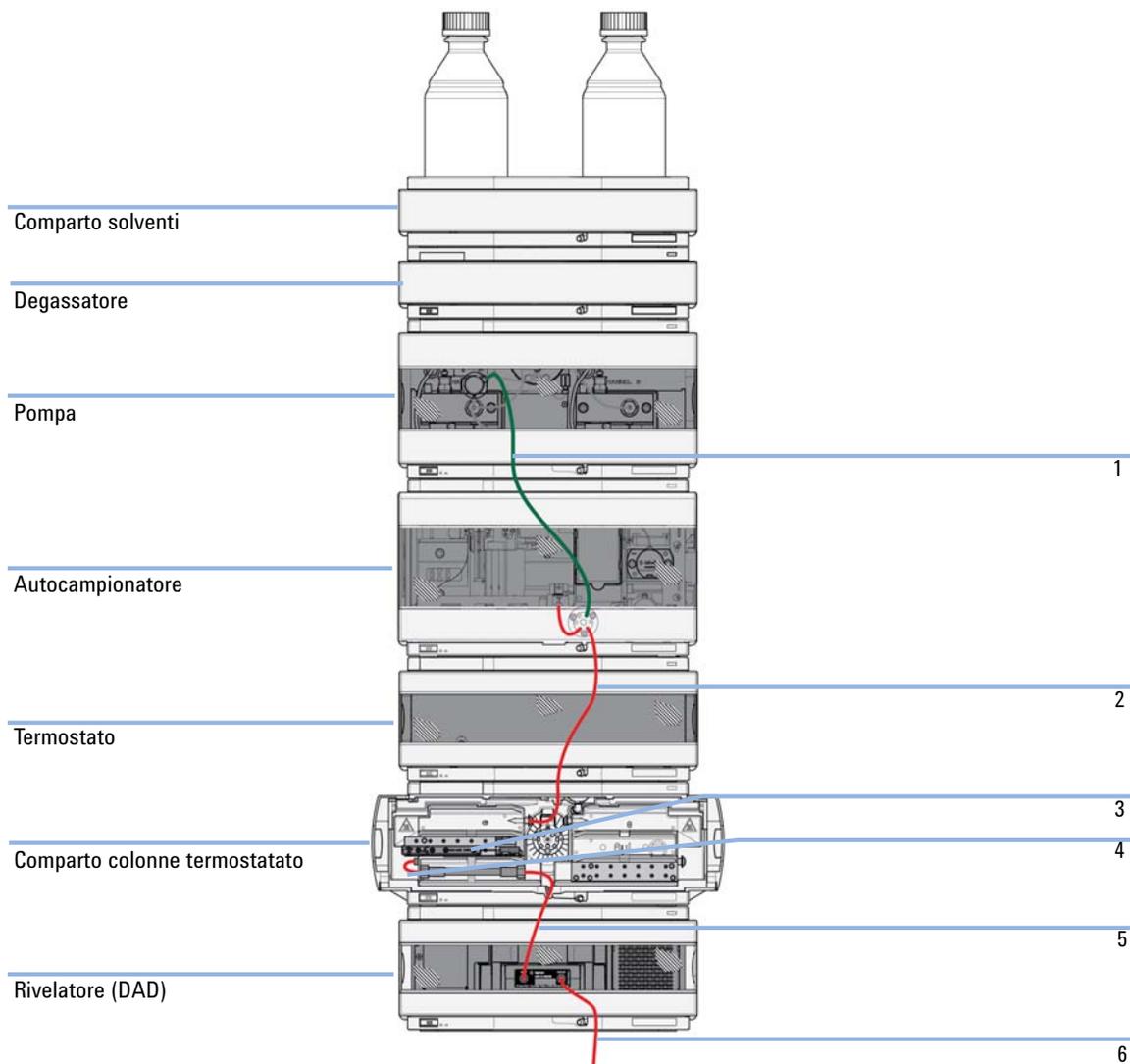
<b>Parte</b>	<b>Codice</b>	<b>Descrizione</b>
1	G1312-87303	Capillare ST 0,17 mm x 400 mm S/S (Da pompa ad autocampionatore)
1	G1312-87304	Capillare ST 0,17 mm x 700 mm S/S (Da pompa ad autocampionatore raffreddato)
2	G1367-87304	Capillare ST 0,17 mm x 250 mm S/S (Da autocampionatore a TCC)
2	01090-87306	Capillare ST 0,17 mm x 380 mm S/S (Da autocampionatore raffreddato a TCC)
3	G1316-87300	Capillare ST 0,17 x 90 mm S/S (Da TCC a colonna)
4	G1315-87311	Capillare ST 0,17 mm x 380 mm S/S (Da colonna a rivelatore DAD)
5	5062-2462	Tubo in PTFE 0,8 mm x 2 m, riordinazione 5 m (Da rivelatore DAD a scarico)
5	5062-8535	Kit di accessori di scarico (Da rivelatore VWD a scarico)

## 4 Configurazione e installazione del sistema

### Installazione dei moduli

#### Collegamenti per la configurazione per volume di ritardo medio e basso

In [Figura 22](#), pagina 78 sono mostrati i capillari e tubi di collegamento nel circuito idraulico per le configurazioni per volume di ritardo medio e basso del sistema LC binario 1260 Infinity.



**Figura 22** Capillari e tubi di collegamento nel circuito idraulico (configurazioni per volume di ritardo medio e basso)

<b>Parte</b>	<b>Codice</b>	<b>Descrizione</b>
1	G1312-87303	Capillare ST 0,17 mm x 400 mm S/S (Da pompa ad autocampionatore)
1	G1312-87304	Capillare ST 0,17 mm x 700 mm S/S (Da pompa ad autocampionatore raffreddato)
2	G1313-87304	Capillare ST 0,12 mm x 180 mm S/S (Da autocampionatore a TCC)
2	01090-87610	Capillare ST 0,12 mm x 280 mm S/S (Da autocampionatore raffreddato a TCC o al componente 3 se installato)
3	G1316-80002	Unità di riscaldamento lunga lato superiore 0,12 mm d.i., 1,6 µL volume interno)
3	G1316-80003	Unità di riscaldamento lunga lato inferiore (0,12 mm d.i., 1,6 µL volume interno)
4	01090-87611	Capillare ST 0,12 mm x 105 mm S/S (Da TCC a colonna, non necessario se è installato il componente 3)
5	G1315-87312	Capillare ST 0,12 mm x 150 mm S/S (Da colonna a rivelatore DAD)
6	5062-2462	Tubo in PTFE 0,8 mm x 2 m, riordinazione 5 m (Da rivelatore DAD a scarico)

## Adescamento del sistema

### Adescamento iniziale

<b>Quando</b>	Prima di utilizzare un degassatore o un tubo del solvente, è necessario eseguire l'adescamento del sistema. Il solvente consigliato per eseguire l'adescamento è l'isopropanolo poiché è miscibile con quasi tutti i solventi per HPLC e presenta eccellenti proprietà bagnanti.	
<b>Parti richieste</b>	<b>Quantità</b>	<b>Descrizione</b>
	1	Isopropanolo
<b>Preparazioni</b>	Effettuare il collegamento idraulico di tutti i moduli come descritto nei rispettivi manuali. Riempire ogni bottiglia di solvente con circa 100 mL di isopropanolo Accendere il sistema	

#### ATTENZIONE

**L'apertura dei capillari o dei raccordi dei tubi potrebbe provocare la fuoriuscita del solvente.**

**I solventi e reagenti tossici o pericolosi possono essere dannosi per la salute.**

→ Rispettare le procedure di sicurezza appropriate (indossare gli occhiali protettivi, i guanti e gli abiti antinfortunistici) come descritto nelle schede sulla sicurezza dei materiali fornite dal fornitore di solventi, specialmente in caso di utilizzo di sostanze tossiche o pericolose.

#### NOTA

Per spurgare automaticamente la pompa, è possibile utilizzare lo strumento di spurgo di Lab Advisor.

#### NOTA

Se la pompa non è in grado di prelevare il solvente dalle bottiglie, utilizzare una siringa per far fluire manualmente il solvente attraverso i tubi e il degassatore.

#### NOTA

Quando si esegue l'adescamento del degassatore sottovuoto con una siringa, il solvente viene aspirato molto velocemente attraverso i tubi del degassatore. Pertanto, il solvente all'uscita del degassatore non sarà completamente degassificato. Pompate per circa 10 minuti alla velocità di flusso desiderata prima di avviare un'analisi. In questo modo il degassatore sottovuoto sarà in grado di degassificare adeguatamente il solvente contenuto nei tubi.

- 1** Aprire la valvola di spurgo della pompa
- 2** Impostare la velocità di flusso su 5 mL/min.
- 3** Selezionare il canale A1
- 4** Attivare il flusso
- 5** Verificare che il solvente nel tubo del canale A1 avanzi verso la pompa. In caso contrario, scollegare il tubo del solvente dalla valvola di selezione del solvente, attaccare una siringa con un apposito adattatore ed estrarre il liquido attraverso il sistema di degasaggio. Ricollegare il tubo alla valvola di selezione del solvente.
- 6** Pompate 30 mL di isopropanolo per rimuovere bolle d'aria residue.
- 7** Passare al successivo canale del solvente e ripetere le operazioni 5 e 6 fino a spurgare tutti i canali.
- 8** Disattivare il flusso e chiudere la valvola di spurgo.

## 4 Configurazione e installazione del sistema

### Installazione dei moduli

#### Adescamento normale

**Quando** Quando il sistema di pompaggio rimane spento per un lungo periodo di tempo (ad esempio, di notte), l'aria si diffonde nuovamente nel canale del solvente tra il degassatore sottovuoto e la pompa. Se i solventi che contengono componenti volatili vengono lasciati nel sistema di degassaggio senza flusso per un periodo di tempo prolungato, si verificherà una leggera perdita di tali componenti.

**Preparazioni** Accendere il sistema

#### NOTA

Per spurgare automaticamente la pompa, è possibile utilizzare lo strumento di spurgo di Lab Advisor.

- 1 Aprire la valvola di spurgo della pompa ruotandola in senso antiorario e impostare il flusso su 5 mL/min.
- 2 Lavare il sistema di degassaggio sottovuoto e tutti i tubi con almeno 10 mL di solvente.
- 3 Ripetere i passaggi 1 e 2 per gli altri canali della pompa.
- 4 Impostare la composizione e il flusso richiesti per l'applicazione e chiudere la valvola di spurgo.
- 5 Pompate per circa 10 minuti prima di avviare l'applicazione.

## Sostituzione dei solventi

**Quando** Quando è necessario sostituire il solvente di un canale con un altro solvente non compatibile (i solventi sono immiscibili o uno dei due contiene un tampone), è necessario attenersi alla procedura seguente per evitare che la pompa si ostruisca a causa della precipitazione di sale o che liquido residuo goccioli su parti del sistema.

Parti richieste	Quantità	Codice	Descrizione
	1		Spurgo dei solventi, vedere <a href="#">Tabella 8</a> , pagina 84
	1	5022-2184	Raccordo ZDV

**Preparazioni** Rimuovere la colonna e sostituirla con un raccordo ZDV.  
 Preparare le bottiglie con solventi intermedi appropriati (vedere [Tabella 8](#), pagina 84)

- 1 Se il canale non è riempito di tampone, andare al passo 4.
- 2 Inserire il filtro di immissione del solvente in una bottiglia di acqua.
- 3 Irrigare il canale con una velocità di flusso idonea al tubo installato (normalmente 3 – 5 mL/min) per 10 min.
- 4 Modificare il circuito idraulico del sistema in base ai requisiti della specifica applicazione.

### AVVERTENZA

*Il sale del tampone contenuto in soluzioni tampone acquose può precipitare nell'isopropanolo residuo.*

Di conseguenza potrebbe verificarsi l'ostruzione di capillari e filtri.

- Prima di procedere all'introduzione di solvente organico, irrigare con acqua le linee di solvente con concentrazioni elevate di sale.
- Non eseguire le operazioni dal passo 5 al passo 7 per i canali in cui si utilizza come solvente una soluzione tampone acquosa.

- 5 Sostituire la bottiglia del solvente con una bottiglia di isopropanolo.
- 6 Irrigare il canale con una velocità di flusso idonea al tubo installato (normalmente 3 – 5 mL/min) per 5 min.
- 7 Scambiare la bottiglia di isopropanolo con una bottiglia di solvente per l'applicazione.
- 8 Ripetere i passaggi da 1 a 7 per gli altri canali della pompa.

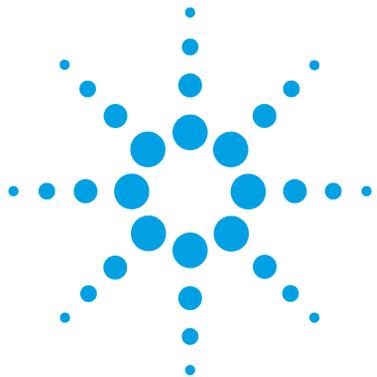
## 4 Configurazione e installazione del sistema

### Installazione dei moduli

- 9 Installare la colonna desiderata, impostare la composizione e il flusso richiesti dall'applicazione ed equilibrare il sistema per circa 10 minuti prima di avviare un'analisi.

**Tabella 8** Scelta dei solventi per l'adescamento in base al tipo di attività

Attività	Solvente	Commenti
Dopo l'installazione	Isopropanolo	Solvente ideale per far fuoriuscire l'aria dal sistema
Nel passaggio tra fase inversa e fase normale (entrambe le volte)	Isopropanolo	Miscibile con quasi tutti i solventi
Dopo l'installazione	Etanolo o metanolo	Alternativa all'isopropanolo (seconda scelta) se quest'ultimo non è disponibile
Per la pulizia del sistema in caso di utilizzo di tamponi	Acqua di grado HPLC	Solvente ideale per la dissoluzione dei cristalli di soluzione tampone
Dopo aver sostituito i solventi acquosi	Acqua di grado HPLC	Solvente ideale per la dissoluzione dei cristalli di soluzione tampone
Dopo l'installazione di guarnizioni per fase normale (Tenute PE (confezione da 2) (0905-1420))	Esano + 5 % di isopropanolo	Buone proprietà bagnanti



## 5 Guida introduttiva

Informazioni sulla guida introduttiva	86
Preparazione del sistema	87
Accensione del sistema	87
Caricamento del metodo predefinito	88
Configurazione del diagramma in linea	89
Spurgo della pompa	91
Acquisizione dei dati nella schermata del metodo e controllo analisi	92
Parametri del metodo per la verifica del sistema con il campione di verifica isocratico	92
Impostazione del metodo	96
Esecuzione del metodo per una singola iniezione	98
Analisi dei dati	100
Schermata dell'analisi dei dati	101
Integrazione di un segnale	102
Specificare il report	103

Nel presente capitolo vengono fornite informazioni sull'acquisizione e sull'analisi dei dati con il sistema LC binario 1260 Infinity.



## Informazioni sulla guida introduttiva

Nel presente capitolo vengono fornite informazioni sul funzionamento del sistema LC binario Agilent 1260 Infinity. La guida può essere utilizzata per eseguire rapidamente una prima analisi dopo l'installazione, fungendo sia da esempio per un'esercitazione sia da verifica del funzionamento complessivo del sistema. Include anche informazioni più dettagliate sui parametri dei metodi.

Questo esempio illustra la configurazione e l'esecuzione di un'analisi utilizzando le colonne e il campione di verifica forniti unitamente al sistema LC binario Agilent 1260 Infinity. L'esempio fa riferimento ai menu e ai comandi di OpenLAB CDS ChemStation Edition, ma funzioni identiche sono disponibili anche con le opzioni di controllo alternative quali OpenLAB CDS EZChrom Edition e il software MassHunter.

Di seguito, i termini ChemStation ed EZChrom si riferiscono sempre ad Agilent OpenLAB CDS ChemStation Edition e ad Agilent OpenLAB CDS EZChrom Edition rispettivamente.

### NOTA

Per il punto di partenza si presuppone che il sistema sia stato installato, acceso e sia stato eseguito il primo adescamento (vedere [“Adescamento iniziale”](#), pagina 80). La lampada UV deve essere accesa almeno 30 minuti prima di eseguire qualsiasi determinazione quantitativa.

## Preparazione del sistema

### Accensione del sistema

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

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

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

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

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

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

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

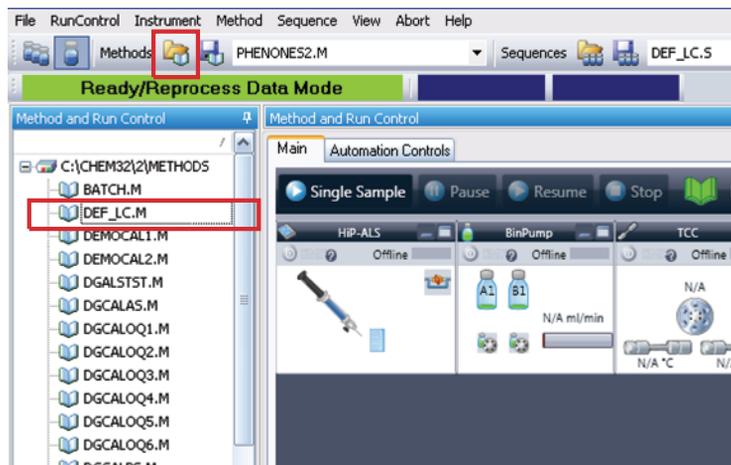
## Caricamento del metodo predefinito

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

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

- 1 Portarsi sulla schermata di ChemStation **Method and Run Control**.
- 2 Sulla barra del menu, selezionare **Method > New Method...** quindi selezionare **DEF\_LC.M** dal menu contestuale.

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



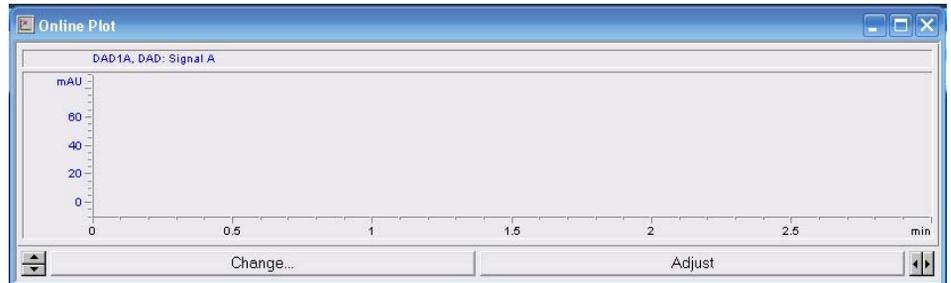
Il metodo predefinito (**DEF\_LC.M**) è caratterizzato da una serie di parametri predefiniti che possono essere modificati successivamente per creare un nuovo metodo. Ad esempio, la velocità di flusso è impostata su zero e **Method Information** e **Method History** sono vuoti.

### NOTA

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

## Configurazione del diagramma in linea

- 1 Se la finestra **Online Plot** non è visibile: fase clic su **View > Online Signals > Signal Window 1** per visualizzarla.



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

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

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

**NOTA**

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

---

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

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

Premendo il pulsante **Balance** tutti i rivelatori vengono azzerati.

**NOTA**

Le modifiche apportate nella pagina **Online Plot** non hanno alcun effetto sui dati archiviati nei singoli file dei dati.

---

## Spurgo della pompa

Spurgare la pompa se:

- È stato eseguito per la prima volta l'adescamento della pompa.
- La pompa deve essere spurgata con solvente fresco prima di utilizzare il sistema oppure si deve sostituire il solvente con un solvente diverso.
- La pompa è rimasta inattiva per alcune ore o per un periodo più lungo (può essersi diffusa aria nelle linee dei solventi e si raccomanda di eseguire lo spurgo).
- I serbatoi dei solventi sono stati rabboccati e la pompa deve essere spurgata per riempire il sistema con solvente fresco. Se si devono utilizzare solventi diversi, assicurarsi che il nuovo solvente sia miscibile con il solvente precedente e, se necessario, inserire un passaggio intermedio utilizzando un solvente co-miscibile (l'isopropanolo è spesso una buona scelta; consultare una tavola di miscibilità dei solventi).

Per informazioni sulla procedura di spurgo, fare riferimento a [“Adescamento normale”](#), pagina 82.

## Acquisizione dei dati nella schermata del metodo e controllo analisi

### Parametri del metodo per la verifica del sistema con il campione di verifica isocratico

Per la verifica del sistema LC binario 1260 Infinity, viene eseguita un'analisi di prova con una miscela di prova isocratica (Campione di verifica isocratica Agilent (01080-68704)) sulla colonna ordinata e fornita con il sistema in uso.

Campione di verifica isocratica Agilent (01080-68704) contiene i seguenti componenti dissolti in metanolo:

- dimetilftalato
- dietilftalato
- bifenile
- o-terfenile

I parametri del metodo per la separazione di questa miscela di prova sono riepilogati in [Tabella 9](#), pagina 93 per la configurazione per volume di ritardo standard e in [Tabella 10](#), pagina 94 per la configurazione per volume di ritardo basso.

**Tabella 9** Parametri del metodo per la prima analisi di separazione - configurazione per volume di ritardo standard

Modulo	Parametro	Impostazione
Pompa	Solvente A	Acqua
	Solvente B	Acetonitrile
	Velocità di flusso	4,0 mL/min
	Composizione del solvente	40 % A, 60 % B
	Tempo finale	1 min (1 min tempo post-analisi)
Autocampionatore	Iniezione	1 µL
Comparto colonne	Colonna	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Colonna Eclipse Plus C18, 4,6 x 100 mm, 3,5 µm (959961-902)</li> <li>• Colonna Poroshell 120 EC-C18, 3,0 x 50 mm, 2,7 µm (699975-302)</li> <li>• Colonna Poroshell 120 EC-C18, 4,6 x 50 mm, 2,7 µm (699975-902)</li> </ul>
	Temperatura	40 °C
Rivelatore	Segnale A	Lunghezza d'onda: 250 nm, larghezza di banda: 4 nm Lunghezza d'onda di riferimento: 360 nm, larghezza di banda di riferimento: 100 nm

**Tabella 10** Parametri del metodo per la prima analisi di separazione - configurazione per volume di ritardo basso

Modulo	Parametro	Impostazione
Pompa	Solvente A	Acqua
	Solvente B	Acetonitrile
	Velocità di flusso	0,75 mL/min
	Composizione del solvente	40 % A, 60 % B
	Tempo finale	1,2 min (1 min tempo post-analisi)
Autocampionatore	Iniezione	1 µL
Comparto colonne	Colonna	Colonna: SB-C18, 4,6 x 50 mm, 1,8 µm, 600 bar (827975-902)
	Temperatura	40 °C
Rivelatore	Segnale	Lunghezza d'onda: 250 nm, larghezza di banda: 4 nm Lunghezza d'onda di riferimento: 360 nm, larghezza di banda di riferimento: 100 nm

Specifiche della verifica:

- nel cromatogramma sono visibili quattro picchi
- **Intensity Test** – superato
- **Wavelength Calibration** ±1 nm

## Preparazione della verifica

- 1 Riempire la bottiglia di solvente A con acqua di grado HPLC. Riempire la bottiglia di solvente B con acetonitrile di grado HPLC.
- 2 Se installato, spurgare ogni canale del degassatore in linea utilizzando la siringa in dotazione.
- 3 Aprire la valvola di spurgo della pompa e spurgare ogni canale a 5 mL/min. Questa operazione dovrebbe essere sufficiente per rimuovere l'aria dal sistema.
- 4 Installare la colonna in dotazione nel comparto colonne.
- 5 Lavare la cella di flusso con acqua di grado HPLC per 5 min.
- 6 Eseguire un test di calibrazione della lunghezza d'onda e un test dell'intensità se pertinenti.
- 7 Attendere l'equilibratura del sistema alle condizioni della verifica elencate in [Tabella 9](#), pagina 93 e in [Tabella 10](#), pagina 94 per 10 min.
- 8 Preparare un vial del campione di verifica isocratico.

## Impostazione del metodo

In questa sezione è illustrato come impostare rapidamente le condizioni del metodo per un'analisi.

### Prerequisiti

Il metodo predefinito **DEF\_LC.M** è stato caricato in modo da predisporre la preparazione del nuovo metodo. Ora si possono modificare i parametri principali per creare il nuovo metodo.

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

Tutti i moduli vanno impostati in questo modo.

- 2 Fare clic con il pulsante destro del mouse sull'area della pompa e selezionare **Method...** dal menu contestuale.

**a** Nella pagina **Method** di **1260 Infinity Binary Pump**, inserire i seguenti parametri:

- Flow rate (Velocità di flusso): 4,0 ml/min
- Solvent A (Solvente A): selezionare **Water** dall'elenco a discesa relativo alla compressibilità.
- Solvent B (Solvente B): selezionare la casella di controllo per attivare il solvente B.
- Impostare il valore di %B su 60 %
- Stop Time (Tempo finale): 1 min
- Post Time (Tempo post-analisi): 1 min

**b** Per gli altri parametri si possono lasciare i valori delle impostazioni predefinite. Fare clic su **OK** per uscire dalla finestra.

Le modifiche vengono inviate al modulo della pompa.

- 3 Fare clic con il pulsante destro del mouse sull'area dell'autocampionatore e selezionare **Method...** dal menu contestuale.

**a** Nella pagina **Method** di **1260 Infinity Autosampler**, inserire i seguenti parametri:

- Injection volume (Volume di iniezione): 1,0 µl
- Injection with Needle Wash (Iniezione con lavaggio dell'ago)
- Mode Flush Port, Time (Modalità porta di lavaggio, tempo): 6 s

- b** Per gli altri parametri si possono lasciare i valori delle impostazioni predefinite. Fare clic su **OK** per uscire dalla finestra.
- Le modifiche vengono inviate al modulo dell'autocampionatore.
- 4** Fare clic con il pulsante destro del mouse sull'area del comparto colonne termostata (TCC) e selezionare **Method...** dal menu contestuale.
- a** Nella pagina **Method** di **1290 Infinity TCC**, inserire i seguenti parametri:
- Left Temperature (Temperatura sinistra) 40 °C
  - Right Temperature Combined (Temperatura destra combinata)
- b** Per gli altri parametri si possono lasciare i valori delle impostazioni predefinite. Fare clic su **OK** per uscire dalla finestra.
- Le modifiche vengono inviate al modulo TCC.
- 5** Fare clic con il pulsante destro del mouse sull'area del rivelatore a serie di diodi e selezionare **Method...** dal menu contestuale.
- a** Nella pagina **Method** del rivelatore **1260 Infinity DAD**, inserire i seguenti parametri:
- **Use Signal:** disattivare tutti i segnali eccetto **Signal A** deselezionando le caselle di controllo.
  - Signal A (Segnale A): 254 nm, larghezza di banda 4 nm, riferimento 550 nm, larghezza di banda 100 nm
  - Peak width (Ampiezza del picco): 0,02
- b** Nella sezione **Advanced**, impostare **Spectrum Store** su **All**.
- c** Per gli altri parametri si possono lasciare i valori delle impostazioni predefinite. Fare clic su **OK** per uscire dalla finestra.
- Le modifiche vengono inviate al modulo DAD.
- 6** Sono stati così inseriti tutti i parametri necessari dei moduli. Selezionare **Method > Save Method As...** e immettere **ISO-1.M** per salvare il metodo con un nuovo nome.
- ChemStation non consente di salvare il metodo con il nome **DEF\_LC.M** per evitare che il modello del metodo predefinito venga modificato.
- 7** Lasciar equilibrare il sistema per almeno 10 min e prima di avviare l'analisi verificare che la linea di base in **Online Plot** sia stabile.

## Esecuzione del metodo per una singola iniezione

In questa sezione è illustrato come eseguire una singola iniezione del campione di verifica isocratico utilizzando le condizioni impostate nella sezione precedente.

Su ChemStation le analisi possono essere eseguite in due modalità.

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

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

### NOTA

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

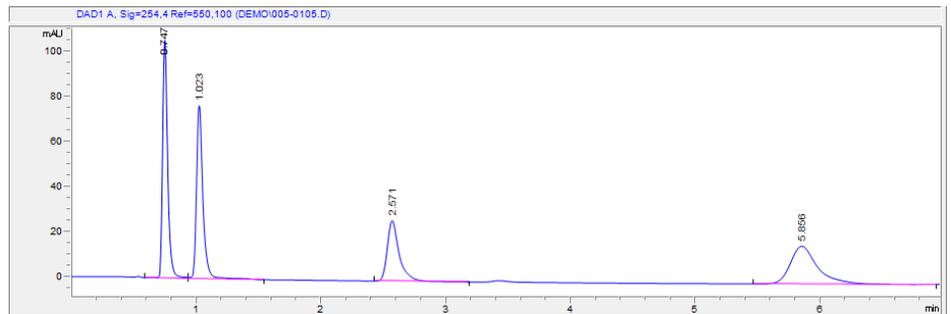
- 3 Posizionare la fiala del campione in posizione 1, ossia la posizione frontale delle 10 posizioni delle fiale da 2 ml sul lato destro del vassoio portacampioni.
- 4 Selezionare **Run Control > Sample Info** e immettere i parametri del campione necessari.  
Per esempio:
  - **Subdirectory** (opzionale)
  - **Name Pattern**
  - **Vial/Location**
  - **Sample name**
  - **Comment**
- 5 Se il sistema è già equilibrato e la linea di base è stabile, fare clic su **Run Method** nella pagina **Sample Info** per avviare l'iniezione. In alternativa, fare

## Acquisizione dei dati nella schermata del metodo e controllo analisi

clic su **OK** e, quando il sistema è pronto, selezionare **Run Control > Run Method**. L'elemento viene aggiunto a **Run Queue** e quindi avviato automaticamente dalla coda.

- 6** L'iniezione viene eseguita e il cromatogramma appare in **Online Plot**. L'acquisizione dei dati si arresta quando viene raggiunto l'istante **Stop Time**.

L'aspetto del cromatogramma deve essere simile a quello riportato di seguito:



## Analisi dei dati

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

The screenshot shows the ChemStation software interface with several red boxes highlighting key features:

- Origine del metodo:** Points to the 'Method' menu in the top toolbar.
- Tavola di navigazione:** Points to the 'Navigation Table' (table with columns: Overlay, Type, Date/Time, Operator, Unit, Reference, Data File, Sample Name, etc.).
- Attività di integrazione:** Points to the 'Integration' button in the toolbar.
- Attività dello spettro:** Points to the 'Spectrum' button in the toolbar.
- Pannello di navigazione:** Points to the 'Method and Run Control' panel on the left side of the interface.

The interface also displays a chromatogram with peaks and a table of integration events.

#	Time	Area	Height	Width	Analysis	Summary
1	0.747	31.1	223.9	0.0452	26.729	0.718
2	1.121	176.9	36.9	0.1319	27.277	0.446
3	1.331	136.2	35.9	0.1213	17.834	0.574
4	5.898	252.1	65.9	0.1225	25.411	0.676

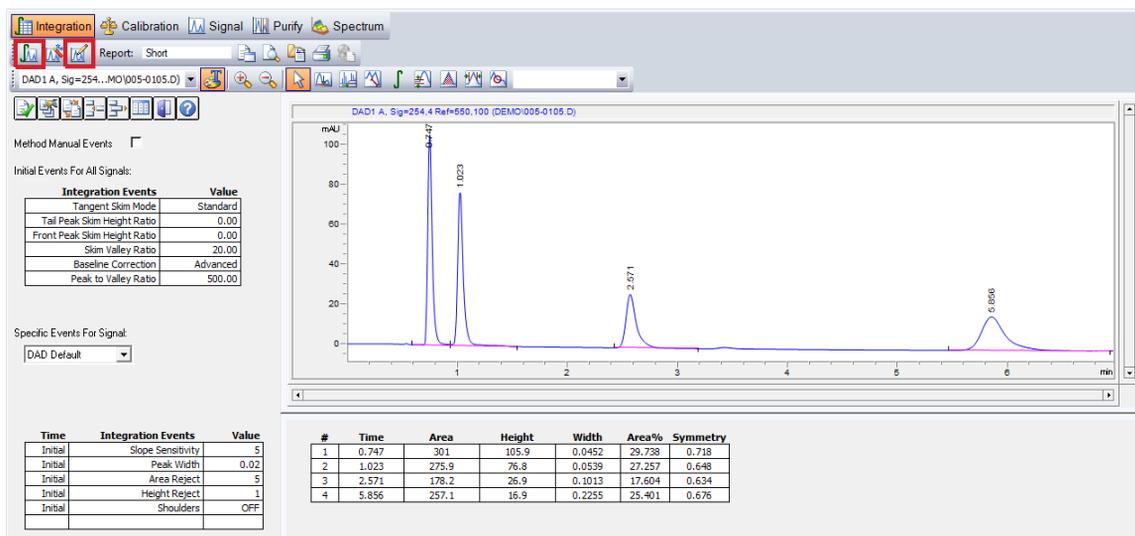
## Schermata dell'analisi dei dati

### Per aprire un cromatogramma nella schermata Data Analysis:

- 1 lanciare una sessione di ChemStation in modalità off-line;
- 2 Fare clic su **Data Analysis** sul lato in basso a sinistra della schermata.
- 3 Nel Pannello di navigazione, trovare la directory dei dati contenente i file dei dati. Tutti i dati relativi alle singole iniezioni sono raggruppati sotto **Single Runs**. Fare doppio clic su **Single Runs** per caricare questi file dei dati nella Tavola di navigazione.
- 4 Selezionare un file nella Tavola di navigazione e fare doppio clic su essa per caricare il cromatogramma nel visualizzatore.

## Integrazione di un segnale

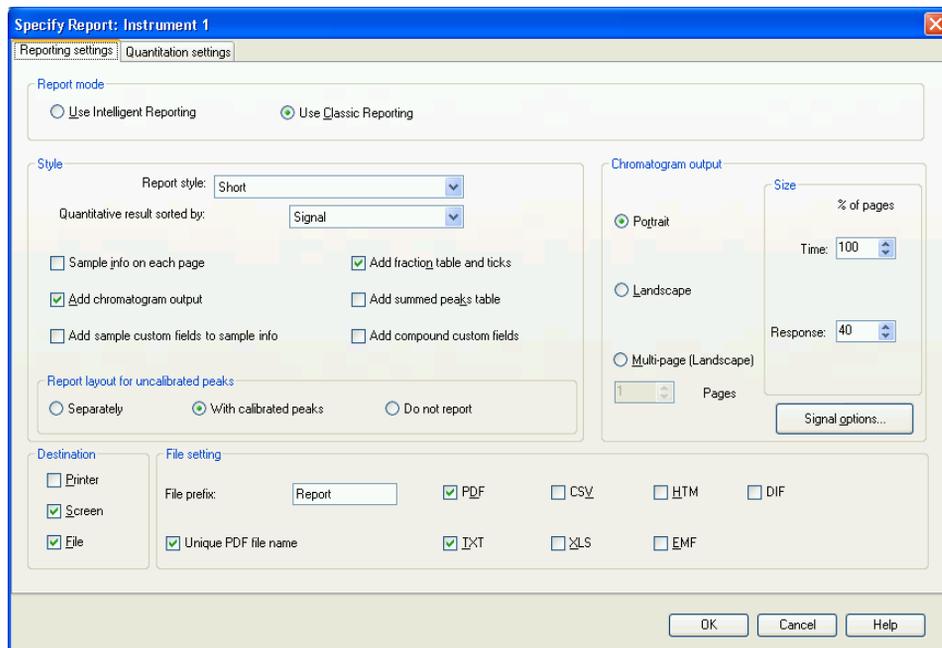
- 1 Selezionare lo strumento delle attività di integrazione (vedere la figura riportata di seguito). Nella figura seguente sono evidenziate le icone **Integrate** e **Set Integration Events Table**.

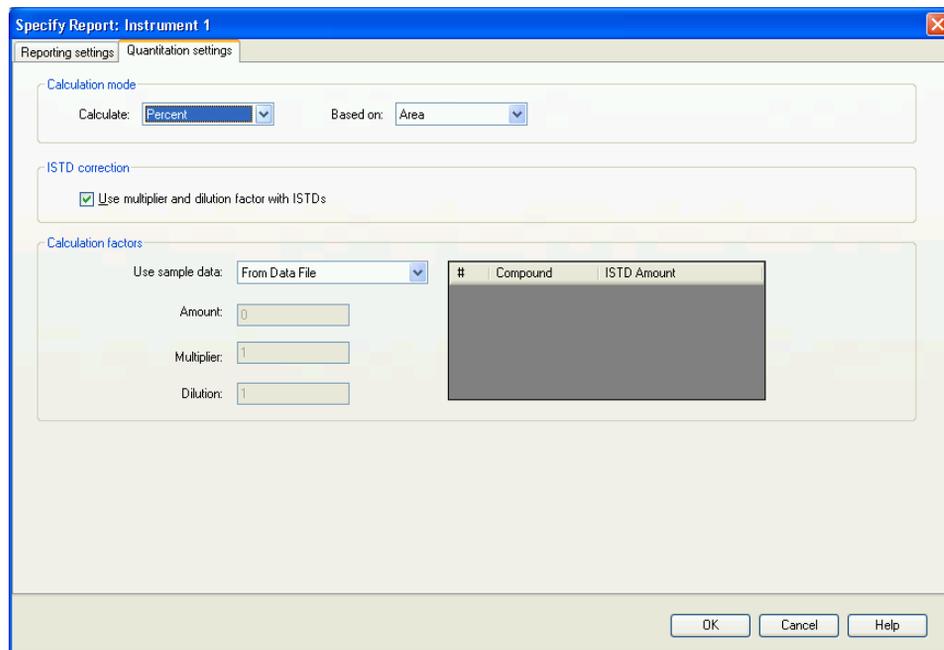


- 2 Fare clic sull'icona **Set Integration Events Table**  per aprire la tabella come mostrato.
- 3 Per le analisi del gradiente impostare **Baseline Correction** in **Advanced**.
- 4 Impostare **Slope Sensitivity** su 5 .  
Valori superiori integrano i picchi più ripidi e ignorano i picchi meno ripidi.
- 5 Impostare il valore **Peak Width** sul picco di interesse più stretto, in questo caso circa 0,02 .
- 6 Per scartare i picchi più bassi si possono impostare **Area Reject** e **Height Reject**.
- 7 Fare clic sull'icona **Integrate**  per aggiornare i risultati in base a queste nuove impostazioni.
- 8 Uscire dalla tabella **Integration Events** utilizzando l'icona con il segno di spunta verde .

## Specificare il report

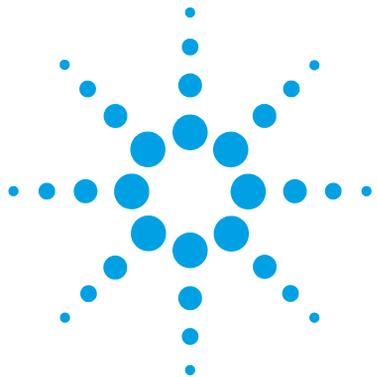
- 1 Sulla barra del menu, fare clic su **Report > Specify Report** per visualizzare la finestra mostrata in figura.





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

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



## 6 Appendice

Informazioni per la sicurezza	106
Informazioni sui solventi	109
Informazioni sui materiali	109
Agilent Technologies su Internet	114
Impostazione di un metodo con la funzione di modifica di tutto il metodo	115
Informazioni sul metodo	117
Strumento/Acquisizione	118
Analisi dei dati	134
Lista di controllo del tempo di analisi	141

Nel presente capitolo vengono fornite ulteriori informazioni di natura legale, sulla sicurezza e sulle risorse disponibili sul Web oltre che sull'impostazione di un metodo.



## Informazioni per la sicurezza

### Informazioni generali sulla sicurezza

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

#### **ATTENZIONE**

**Verificare che lo strumento venga utilizzato correttamente.**

**La protezione fornita dallo strumento potrebbe risultare insufficiente.**

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

---

### Standard di sicurezza:

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

## Funzionamento

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## Simboli di sicurezza

Tabella 11 Simboli di sicurezza

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

### ATTENZIONE

#### L'indicazione **ATTENZIONE**

**segnala situazioni che potrebbero potenzialmente causare lesioni gravi o mortali.**

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

### AVVERTENZA

#### L'indicazione **AVVERTENZA**

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

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

## Informazioni sui solventi

Osservare le seguenti raccomandazioni sull'uso dei solventi.

- Attenersi alle raccomandazioni per evitare la comparsa di alghe; fare riferimento ai manuali della pompa.
- Piccole particelle possono ostruire in modo permanente i capillari e le valvole. Filtrare sempre i solventi con filtri da 0,4 µm.
- Evitare o ridurre al minimo l'uso di solventi che possano corrodere le parti del circuito idraulico. Osservare le specifiche relative all'intervallo di pH consigliato per i diversi materiali, ad esempio, le celle di flusso, i materiali delle valvole e così via, nonché le raccomandazioni riportate nelle sezioni seguenti.

## Informazioni sui materiali

I materiali nel circuito idraulico sono selezionati accuratamente sulla base dell'esperienza ultradecennale di Agilent nello sviluppo di strumenti della massima qualità per le analisi HPLC. Tali materiali vantano un'eccellente robustezza in presenza delle condizioni HPLC tipiche. Qualora si operi in presenza di condizioni speciali, consultare la sezione relativa alle informazioni sui materiali o rivolgersi ad Agilent.

### Esclusione di responsabilità

I dati successivi sono stati raccolti da risorse esterne e devono essere intesi come riferimento. Agilent non garantisce la correttezza e la completezza di tali informazioni. I dati sono basati sulle librerie di compatibilità, che non sono specifiche per la stima della durata utile a lungo termine in presenza di condizioni specifiche ma estremamente variabili di solventi, miscele di solventi, campioni e sistemi UHPLC. Inoltre, le informazioni non possono essere generalizzate a causa degli effetti catalitici di impurità quali ioni metallici, agenti complessanti, ossigeno e così via. Oltre alla pura corrosione chimica, è necessario tenere in considerazione altri effetti quali elettro-corrosione, formazione di cariche elettrostatiche (in particolare nel caso dei solventi organici non conduttori), rigonfiamento delle parti in materiale polimerico e così via. La mag-

gior parte dei dati fa riferimento alla temperatura ambiente (in genere 20 – 25 °C, 68 – 77 °F). Se sono possibili processi di corrosione, essi in genere si verificano più velocemente a temperature più elevate. In caso di dubbi, consultare la letteratura tecnica relativa alla compatibilità chimica dei materiali.

### **PEEK**

Il PEEK (polietereterchetone) coniuga eccellenti proprietà di resistenza chimica e stabilità meccanica e termica. È stabile in un intervallo di pH compreso tra 1 e 12,5 ed è inerte nei confronti di molti solventi di uso comune. È nota l'incompatibilità con diversi prodotti chimici quali cloroformio, cloruro di metilene, THF, DMSO > 1 %, acidi forti (acido nitrico > 10 %, acido solforico > 10 %, acido tricloroacetico, acidi sulfonici), alogeni o soluzioni acquose di alogeni, fenolo e derivati (cresoli, acido salicilico, ecc.). Se utilizzato a temperature superiori alla temperatura ambiente, il PEEK è sensibile nei confronti di basi e vari solventi organici e può essere soggetto a rigonfiamenti.

### **Poliimmide**

Agilent utilizza poliimmide semicristallina per le guarnizioni del rotore nelle valvole e per le sedi degli aghi negli autocampionatori. Un fornitore di poliimmide è DuPont, che la commercializza con il marchio Vespel, utilizzato anche da Agilent.

La poliimmide è stabile in un intervallo di pH compreso tra 1 e 10 e nella maggior parte dei solventi organici. È incompatibile con gli acidi minerali concentrati (per esempio l'acido solforico), l'acido acetico glaciale, il DMSO e il THF. Inoltre, è soggetta a degradazione da parte di sostanze nucleofile quali l'ammoniaca (per esempio i sali ammoniacali in presenza di condizioni basiche) o gli acetati.

### **Polietilene (PE)**

Agilent utilizza miscele di PTFE/PE UHMW (peso molecolare ultra-elevato) per le guarnizioni gialle dei pistoni e le guarnizioni di lavaggio, presenti nelle pompe 1290 Infinity e per le applicazioni in fase normale nelle pompe 1260 Infinity.

Il polietilene è dotato di buona stabilità nei confronti della maggior parte dei solventi inorganici comuni, inclusi acidi e basi in un intervallo di pH compreso tra 1 e 12,5. È compatibile con molti solventi organici utilizzati nei sistemi cromatografici quali metanolo, acetonitrile e isopropanolo. È caratterizzato da

una stabilità limitata nei confronti di idrocarburi alifatici, aromatici e alogenati, THF, fenolo e derivati, acidi e basi concentrati. Per le applicazioni in fase normale, la pressione massima non deve superare 200 bar.

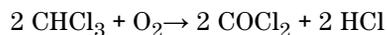
### **Tantalio (Ta)**

Il tantalio è inerte nei confronti della maggior parte dei solventi HPLC e di quasi tutti gli acidi eccetto l'acido fluoridrico e gli acidi con anidride solforica libera. Può essere corrosivo da basi forti (per esempio soluzioni di idrossidi > 10 %, dietilammina). Non è consigliato per l'uso con l'acido fluoridrico e i fluoruri.

### **Acciaio inossidabile (SST)**

L'acciaio inossidabile è inerte nei confronti di molti solventi comuni. In presenza di acidi e basi è stabile nell'intervallo di pH compreso tra 1 e 12,5. Può essere corrosivo da acidi con pH inferiore a 2,3. Inoltre può essere soggetto a corrosione nei seguenti solventi:

- Soluzioni di alogenuri di metalli alcalini e relativi acidi (ad esempio, ioduro di litio, cloruro di potassio e così via) e soluzioni acquose di alogeni.
- Concentrazioni elevate di acidi inorganici quali l'acido nitrico e solforico e solventi organici, in particolare a temperature più elevate (se il metodo cromatografico lo consente, sostituirli con acido fosforico o tampone fosfato, meno corrosivi nei confronti dell'acciaio inossidabile).
- Solventi alogenati o miscele che formano radicali e/o acidi, ad esempio:



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

- Eteri di grado cromatografico, che possono contenere perossidi (ad esempio, THF, diossano, diisopropiletero). Tali eteri devono essere filtrati attraverso ossido di alluminio anidro che assorbe i perossidi.
- Soluzioni di acidi organici (acido acetico, formico e così via) in solventi organici. Ad esempio, una soluzione di acido acetico 1 % in metanolo è in grado d'intaccare l'acciaio.
- Soluzioni che contengono agenti complessanti forti (ad esempio EDTA, acido etilendiamminotetracetico).
- Miscele di tetracloruro di carbonio con 2-propanolo o THF.

### **Carbonio simile al diamante (DLC)**

Il carbonio simile al diamante è inerte nei confronti di quasi tutti gli acidi, le basi e i solventi di uso comune. Non sono note incompatibilità documentate per le applicazioni HPLC.

### **Silice fusa e quarzo (SiO<sub>2</sub>)**

La silice fusa è utilizzata nei capillari e nelle celle di flusso 1290 Infinity. Il quarzo è utilizzato nelle finestre delle celle di flusso tradizionali. È inerte nei confronti di tutti i solventi e acidi comuni fatta eccezione per l'acido fluoridrico e i solventi acidi contenenti fluoruri. È soggetto a corrosione da parte di basi forti e non deve essere utilizzato a pH superiore a 12 a temperatura ambiente. La corrosione delle finestre delle celle di flusso può incidere negativamente sui risultati delle misure. Se il pH è superiore a 12, si consiglia di utilizzare celle di flusso con finestre in zaffiro.

### **Oro**

L'oro è inerte nei confronti di tutti gli acidi, le basi e i solventi HPLC di uso comune nell'intervallo di pH specificato. Può essere corrosivo da cianuri complessanti e acidi concentrati quali l'acqua regia.

### **Ossido di zirconio (ZrO<sub>2</sub>)**

L'ossido di zirconio è inerte nei confronti di quasi tutti gli acidi, le basi e i solventi di uso comune. Non sono note incompatibilità documentate per le applicazioni HPLC.

### **Platino/iridio**

Il platino/iridio è inerte nei confronti di quasi tutti gli acidi, le basi e i solventi di uso comune. Non sono note incompatibilità documentate per le applicazioni HPLC.

### **Polimeri fluorurati (PTFE, PFA, FEP, FFKM)**

I polimeri fluorurati quali il PTFE (politetrafluoroetilene), il PFA (perfluoroalcoxi) e il FEP (etilene propilene fluorurato) sono inerti nei confronti di quasi tutti gli acidi, le basi e i solventi di uso comune. FFKM è una gomma perfluorurata resistente alla maggior parte dei composti chimici. Trattandosi di un ela-

stomero, può dare luogo a rigonfiamenti in presenza di alcuni solventi organici quali gli idrocarburi alogenati.

I tubi di copolimero in TFE/PDD, utilizzati in tutti i degassatori Agilent eccetto il modello G1322A, non sono compatibili con i solventi fluorurati quali Freon, Fluorinert o Vertrel. In presenza di esafluoroisopropanolo (HFIP) presentano una durata utile ridotta. Per ottenere la massima durata utile possibile in presenza di HFIP, è preferibile dedicare una camera specifica a questo solvente, non cambiare solventi e non lasciare asciugare la camera. Per ottimizzare la durata del sensore di pressione, non lasciare HFIP nella camera quando l'unità è spenta.

### **Zaffiro, rubino, e ceramiche basate su $\text{Al}_2\text{O}_3$**

Zaffiro, rubino e ceramiche basate su ossido di alluminio ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) sono inerti nei confronti di quasi tutti gli acidi, le basi e i solventi di uso comune. Non sono note incompatibilità documentate per le applicazioni HPLC.

## **Agilent Technologies su Internet**

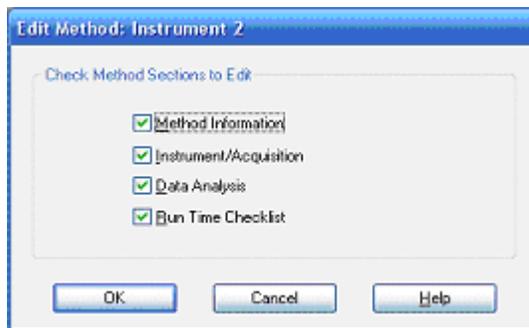
Per informazioni aggiornate su prodotti e servizi, visitare il sito Web di Agilent al seguente indirizzo:

<http://www.agilent.com>

## Impostazione di un metodo con la funzione di modifica di tutto il metodo

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

Per modificare solo alcuni parametri, è possibile passare direttamente alle pagine di impostazione relative ai parametri da cambiare. Gli utenti meno esperti possono preferire l'utilizzo della funzione **Edit Entire Method**, poiché scorre automaticamente tutte le pagine. Ad essa si accede dal menu **Method > Edit Entire Method**, che apre la finestra di dialogo **Check Method Sections to Edit**.



**Figura 23** Controlla le sezioni del metodo da modificare

Questa finestra di dialogo fornisce un riepilogo delle sezioni che verranno visualizzate e offre la possibilità di escludere parti specifiche deselezionandole.

A seconda delle parti selezionate, la funzione mostra in sequenza diverse schermate.

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

#### NOTA

Mentre si utilizza la funzione **Edit Entire Method**, facendo clic su **OK** si chiude la schermata corrente per l'immissione dei valori e si passa alla schermata successiva. Si tratta di un processo a senso unico.

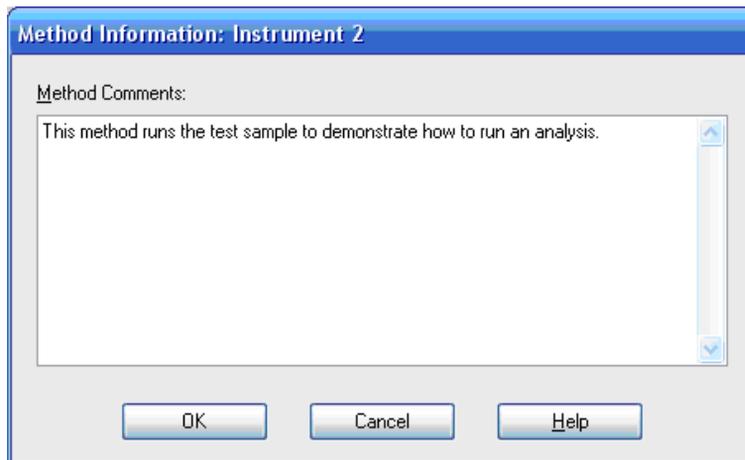
Se si preme inavvertitamente **OK** prima di aver immesso tutti i valori, è necessario utilizzare il tasto **Cancel** e ricominciare la procedura **Edit Entire Method**. In alternativa, proseguire e tornare alla schermata non completata una volta terminato. Facendo clic su **Cancel** viene visualizzato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

---

## Informazioni sul metodo

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

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



**Figura 24** Informazioni sul metodo

## Strumento/Acquisizione

### Impostazione del metodo dello strumento

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

Le schede sono:

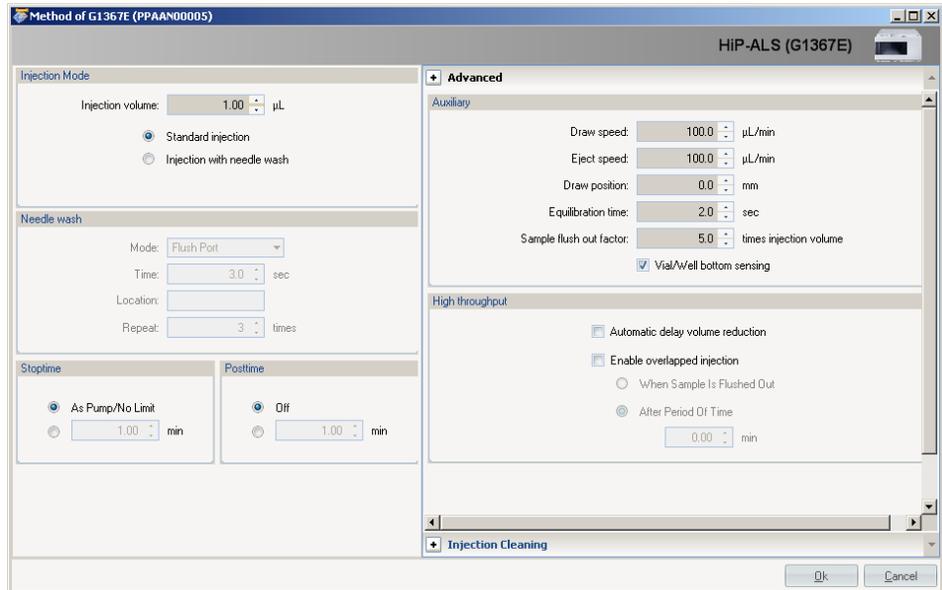
- autocampionatore ad alte prestazioni (**HiP-ALS**)
- **HiP-ALS Injector Program**
- pompa binaria (**BinPump**)
- Comparto colonna termostata (**TCC**)
- Rivelatore a serie di diodi (**DAD**)
- **Instrument Curves**

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

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

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

## Scheda dell'autocampionatore



**Figura 25** Schermata di impostazione del metodo – Scheda dell'autocampionatore ad alte prestazioni

- **Injection Mode**
  - **Injection volume:** imposta il volume da iniettare (ad esempio 1 µl).
  - **Standard injection:** indica che non viene eseguito il lavaggio esterno dell'ago.
  - **Injection with needle wash:** utilizzata per ridurre il potenziale effetto memoria. Si tratta dell'opzione consigliata che viene configurata nel passaggio successivo.
- **Needle Wash:** se è stato selezionato in precedenza.
  - **Mode** determina la modalità di lavaggio della superficie esterna dell'ago: o il lavaggio attivo in **Flush Port** o per immersione in uno specifico **Wash Vial**.
  - **Time:** intervallo espresso in secondi durante il quale la pompa peristaltica collegata alla porta di lavaggio pompa il solvente di risciacquo. Al termine il solvente viene pompato per altri 15 s per pulire la porta di lavaggio.

- **Location:** determina il vial o la piastra a pozzetti da utilizzare, qualora sia stata selezionata l'opzione **Wash Vial**.

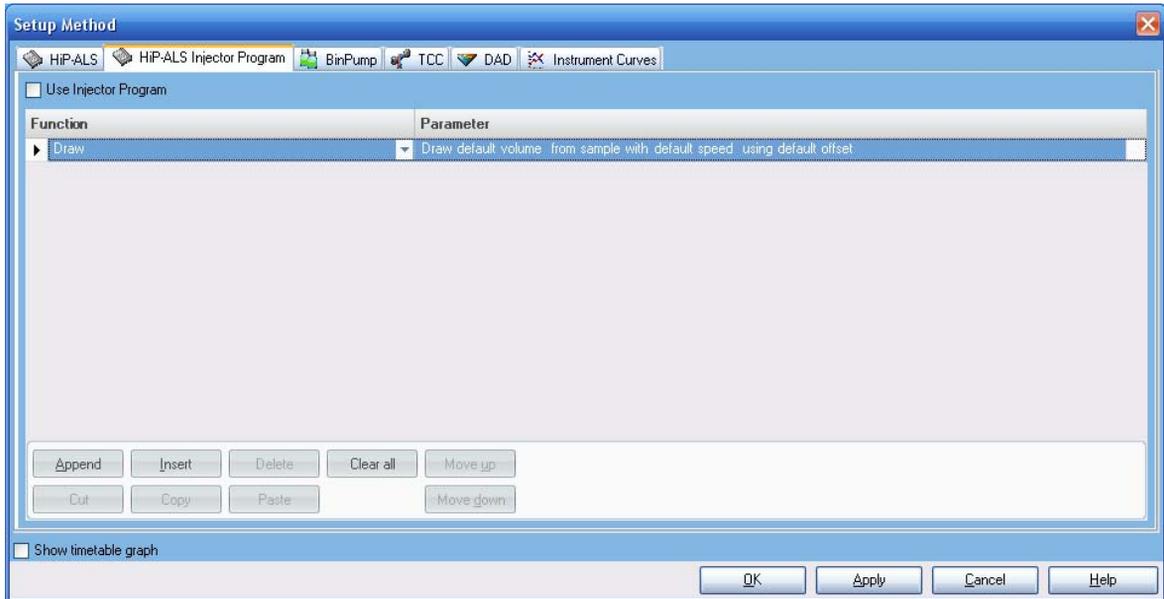
#### NOTA

I vial devono essere privi di setto, ossia devono essere aperti per evitare il trasferimento di materiale sul setto con conseguente effetto memoria.

- **Repeat** determina, nel caso in cui sia stata selezionata la funzione relativa al vial di lavaggio, quante volte l'ago viene immerso nel vial (impostazione predefinita 3, valore massimo 5).
- **Stop Time / Post Time** vengono impostati su **No Limit / Off** e questi valori vengono quindi definiti nella scheda della pompa.
- **Advanced - Auxiliary**
  - **Draw speed:** è la velocità alla quale il campione viene introdotto nell'ago. Il valore predefinito è 100 µl/min. La velocità deve essere ridotta in caso di campioni viscosi o per una maggiore precisione con piccoli volumi (<2 µL) di campione.
  - **Eject speed:** è la velocità di emissione dall'ago.
  - **Draw position:** è lo scarto verticale dalla posizione di iniezione nominale di 10 mm al di sopra del fondo di un vial. Ciò corrisponde a circa metà corsa lungo un vial da 2 ml; pertanto è necessario impostare uno scarto negativo affinché il campione venga prelevato in prossimità del fondo del vial; ad esempio, un valore pari a -7 mm posizionerebbe la punta dell'ago a 3 mm dal fondo del vial.
  - **Equilibration time:** indica il tempo di ritardo tra l'aspirazione del campione e il movimento dell'ago.
  - **Sample flush out factor:** stabilisce il tempo di attesa dell'autocampionatore dopo l'iniezione prima di permettere alla valvola di commutare in posizione di bypass. Ciò assicura che la zona del campione sia libera dall'ago, dalla sede e dalla valvola di iniezione. Il valore predefinito è 5.
  - **Vial/Well bottom sensing:** è un'alternativa all'utilizzo dello scarto per la posizione di aspirazione. L'ago si muove lentamente verso il basso finché non tocca il fondo del vial o del pozzetto e quindi si solleva di 1 mm. Si tratta di un modo versatile per assicurarsi che l'ago si trovi in prossimità del fondo del vial, ma il completamento dell'iniezione richiede un tempo leggermente superiore; inoltre questa opzione non deve essere utilizzata se sul fondo del vial sono presenti particolati che potrebbero ostruire l'ago.

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

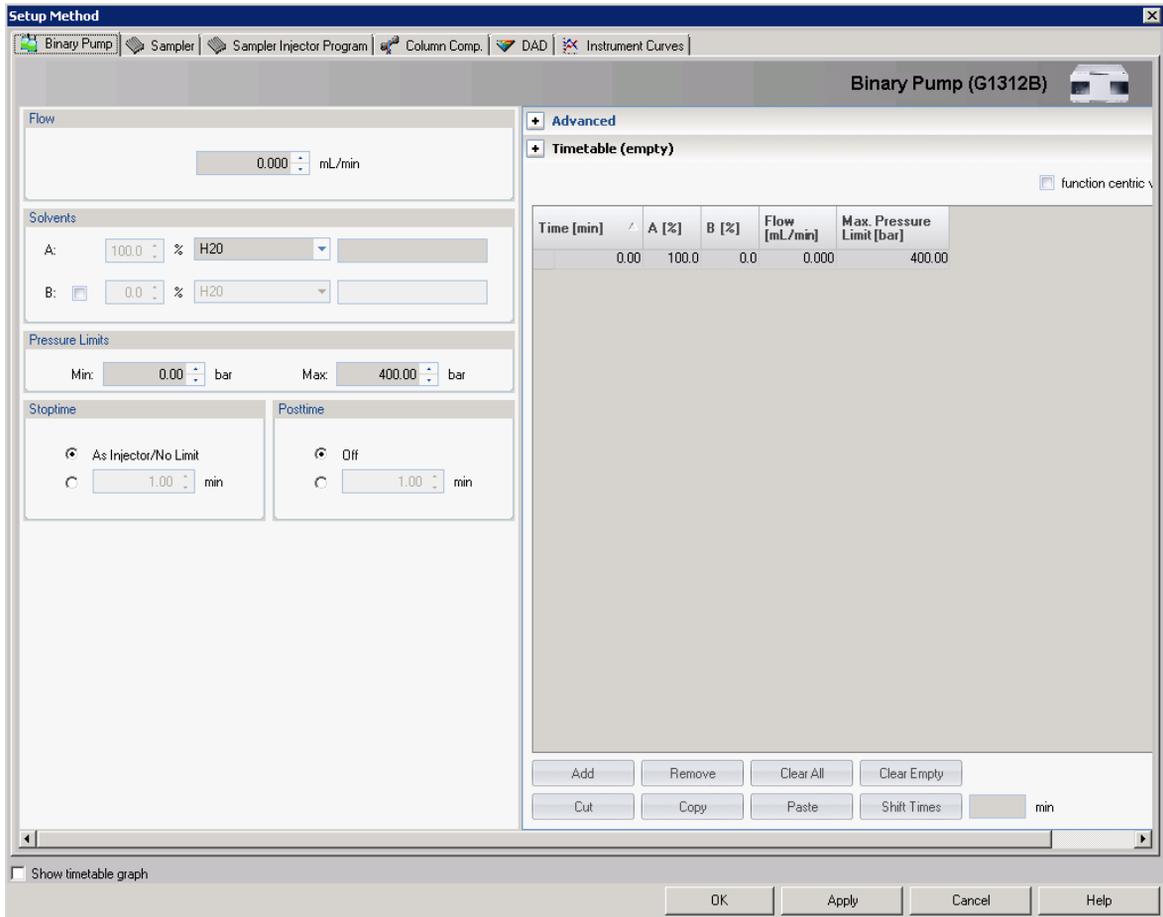
## Scheda dell'autocampionatore ad alte prestazioni (HiP-ALS Injector Program)



**Figura 26** Schermata Imposta metodo – Scheda del programma dell'iniettore dell'autocampionatore HiP

Consente di creare procedure di iniezione specialistiche che prevedono la manipolazione di aliquote da più vial come, ad esempio, nella derivatizzazione pre-colonna. I reagenti chimici vengono miscelati automaticamente con il campione per incrementare la rivelabilità o la sensibilità. Un esempio spesso citato è la derivatizzazione di amminoacidi con i reagenti OPA e FMOC. Per informazioni dettagliate fare riferimento al *manuale dell'autocampionatore ad alte prestazioni Agilent 1260 Infinity*.

### Scheda della pompa binaria



**Figura 27** Schermata di impostazione del metodo – Scheda della pompa binaria

- **Flow:** consente di impostare la velocità di flusso fino a 5 mL/min. Per la separazione di esempio si utilizza la velocità di 4 mL/min. Se la contropressione raggiunge per qualche istante la pressione massima impostata, il flusso viene ridotto per alcuni secondi per diminuire la pressione. Se la pressione continua a essere limitata in questo modo, viene generata una condizione di errore e il flusso viene interrotto.

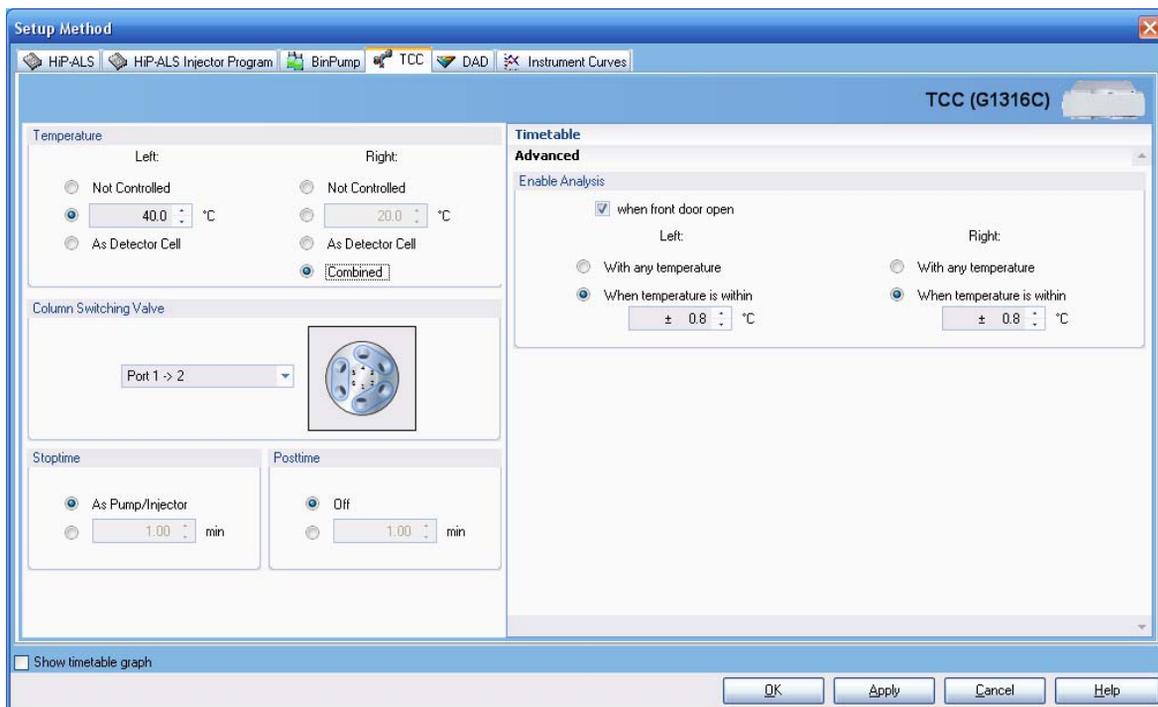
- **Solvents:** definisce le fasi mobili disponibili e le proporzioni percentuali pompate nei due canali, A e B. Su ciascun canale, una casella a discesa permette di selezionare un solvente da un elenco in modo che il controllo della pompa utilizzi le impostazioni di compressibilità ottimali. Ciò consente di ottimizzare le proprietà del flusso, come descritto in “[Configurazione ottimale dello strumento per colonne di diametro interno di 2,1 mm](#)”, pagina 43. Una seconda casella di testo consente di inserire una descrizione della fase mobile. Se nella pompa è installata la valvola di selezione del solvente, ogni canale ha due opzioni per il solvente e l'opzione corretta per il metodo va selezionata mediante il pulsante di scelta alla sinistra della descrizione del solvente. La pompa forma miscele binarie dei canali selezionati A e B, ad esempio A2 e B1; non è possibile miscelare A1 con A2 o B1 con B2. Il valore immesso per le proporzioni di A e B definisce la composizione di un metodo isocratico o le condizioni iniziali di un metodo a gradiente e le condizioni di equilibratura tra analisi in gradiente. È necessario immettere solo il valore B, in quanto A si aggiorna al valore pari a 100 % meno B quando si sposta il cursore. Nella separazione di esempio, impostare A sull'acqua e B sull'acetonitrile al 60 % A sarà pari a 40 %.
- **Timetable:** indica in dettaglio le modifiche che devono essere apportate durante l'analisi alle composizioni percentuali di A e B nella fase mobile o, se necessario, alla velocità di flusso e la pressione massima consentita. La tabella di programmazione apporta variazioni lineari ai parametri tra i valori di regolazione definiti. Le impostazioni specificate altrove in questa schermata fungono da condizioni iniziali e cambiano solo se si modifica uno dei valori della tabella di programmazione. Ad esempio, se durante l'analisi il flusso è costante non sussiste la necessità di immettere un valore relativo al flusso nella tabella di programmazione. Per immettere un valore nella tabella di programmazione, fare clic sul pulsante **Add** per aggiungere una riga alla tabella; inserire il tempo del valore di regolazione, selezionare la voce da modificare dall'elenco a discesa (composizione, flusso, pressione) e fare clic sulla casella **Parameter** per aprire la casella in cui immettere il valore. Se l'inserimento dei valori nella tabella di programmazione viene effettuato senza seguire una sequenza logica, i valori immessi vengono riordinati automaticamente in ordine temporale. Le righe della tabella di programmazione possono essere modificate direttamente e per aggiungerne o rimuoverne altre si possono utilizzare i pulsanti **Cut**, **Paste** e **Remove**. Per creare un profilo di gradiente, si possono aggiungere più righe per ottenere una serie di segmenti a gradiente lineare. Per impostare un gradiente semplice, se sono presenti valori nella tabella di programmazione questi vanno prima cancellati utilizzando il pulsante **Clear all**, quindi aggiungere una riga e immettere il tempo e la composizione del solvente necessari. Se è necessa-

rio un gradiente a gradini, questo può essere creato inserendo due valori per le impostazioni "prima del gradino" e "dopo il gradino" separati da 0,01 min. Questa procedura viene spesso utilizzata per eluire rapidamente da una colonna picchi a forte ritenzione in prossimità della fine di un'analisi aumentando la percentuale di solvente più forte e/o la velocità di flusso in un gradiente a gradini, ad esempio aumentando la % di B da 75 % a 95 %. Non è necessario inserire nella tabella di programmazione le impostazioni per il tempo 0,00 min in quanto questi valori vengono ricavati da altri valori di regolazione presenti in questa schermata. Alcuni utenti, tuttavia, desiderano visualizzare un elenco "completo" nella tabella di programmazione e quindi inseriscono un valore per 0,00 min. Ciò non costituisce un problema, tuttavia ogni volta che le condizioni iniziali vengono modificate le nuove impostazioni vanno inserite sia nella tabella di programmazione sia nella sezione della schermata relativa ai valori di regolazione **Solvents**.

- **Show timetable graph:** se questa casella è selezionata, le modifiche apportate alla tabella di programmazione vengono rappresentate graficamente.
- **Stop Time:** definisce il tempo complessivo della separazione o dell'analisi e a volte è denominato "tempo di analisi" da alcuni utenti. Indica il momento (in minuti a partire dall'esecuzione dell'iniezione) in cui l'analisi finisce, ossia il momento in cui termina l'acquisizione dei dati. Il flusso, la composizione e altre impostazioni del sistema ritornano ai valori iniziali per il metodo e il sistema diventa disponibile per eseguire l'iniezione successiva. Questo tempo deve essere sempre pari o superiore all'ultimo valore immesso nella tabella di programmazione; in caso contrario l'analisi si interrompe e vengono ripristinate le condizioni iniziali prima che vengano completati gli eventi previsti dalla tabella. Il parametro **Stop Time** può essere impostato su **No Limit**, nel qual caso l'utente deve interrompere manualmente l'analisi. Anche se tutti i moduli del sistema possiedono parametri **Stop Time** propri, il parametro **Stop Time** della pompa viene considerato il principale e gli altri moduli in genere vengono impostati per seguire questo valore.
- **Post Time:** definisce un intervallo di conto alla rovescia dopo il termine dell'analisi, durante il quale non può essere eseguita l'iniezione successiva. Consente di attendere il tempo necessario per l'equilibratura del sistema dopo un'analisi in gradiente. Per un metodo isocratico può essere impostato su **Off**. Per un metodo a gradiente, il valore può essere determinato sperimentalmente osservando il comportamento della linea di base, ma in genere sarà pari alla somma tra il tempo del volume di ritardo del sistema e almeno l'equivalente di tre-cinque volumi di colonna da far fluire attraverso il sistema.

- **Pressure Limits:** questo parametro controlla il comportamento della pompa in termini di pressione. La pompa binaria 1260 Infinity è compatibile con una pressione massima di 600 bar, ma alcune colonne possono tollerare solo pressioni inferiori e impostando qui questo valore si protegge la colonna. La pompa genera una condizione di errore se si supera questo valore di pressione. Qualsiasi analisi in corso viene arrestata e la pompa viene impostata nella modalità di attesa senza flusso. Le informazioni sulla pressione massima di una particolare colonna sono fornite insieme alla colonna. Le colonne Agilent ZORBAX RRHT sono adatte per operare a 600 bar. Il limite di bassa pressione è "disattivato" quando il valore impostato è zero, ma se è impostato un qualsiasi altro valore la pompa genera un errore nel caso in cui durante il funzionamento la pressione scenda al di sotto di tale valore. Si tratta di una misura di salvaguardia alternativa nel caso in cui la colonna non si trova all'interno di un modulo dotato di sensore delle perdite o qualora il sistema pompi a secco. In genere per il limite minimo di pressione si imposta un valore compreso tra 10 e 20 bar.

### Scheda del comparto colonne termostato (TCC)



**Figura 28** Schermata Imposta metodo – Scheda del comparto colonna termostato

- Temperature:** consente di definire la temperatura dei supporti di colonna destro e sinistro, che possono essere controllati in modo indipendente o interconnesso facendo clic sul pulsante di scelta **Combined**. Se si utilizza l'opzione combinata, le impostazioni per il lato sinistro controllano entrambe le sezioni e ciò è sicuramente necessario quando la colonna supera i 15 cm di lunghezza e deve essere supportata da entrambe le sezioni. I due lati possono operare separatamente quando è necessario disporre di due colonne che funzionano a temperature diverse. Questa funzione può essere attivata quando è installata anche una valvola di commutazione per alternare tra loro le due colonne. Un altro impiego di zone di temperatura separate si ha quando la colonna viene fatta funzionare a una temperatura elevata (ad esempio superiore a 60 °C) da un lato, mentre lo scambiatore di calore sull'altro lato viene utilizzato per raffreddare l'eluente prima che entri nel rivelatore, riducendo così il rumore dovuto agli

effetti termici nella cella di flusso. Selezionando l'opzione **As Detector Cell** viene letta automaticamente la temperatura della cella nel rivelatore.

La temperatura di ogni zona può essere impostata da -5 °C a 100 °C e spetta all'utente verificare che la specifica colonna sia compatibile con la temperatura impostata. (La fase StableBond delle colonne Agilent ZORBAX RRHT possono essere utilizzate all'estremo superiore dell'intervallo.) La temperatura è controllata con una precisione pari a  $\pm 0,15$  °C fino a 10 °C al di sotto della temperatura ambiente; tenere presente, tuttavia, che sono poche le applicazioni eseguite a temperature inferiori a 12-15 °C. Evitare l'utilizzo del modulo TCC a temperature così basse da formare condensa di acqua dall'umidità dell'aria in quanto ciò provoca l'attivazione del sensore delle perdite.

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

### Scheda del rivelatore a serie di diodi

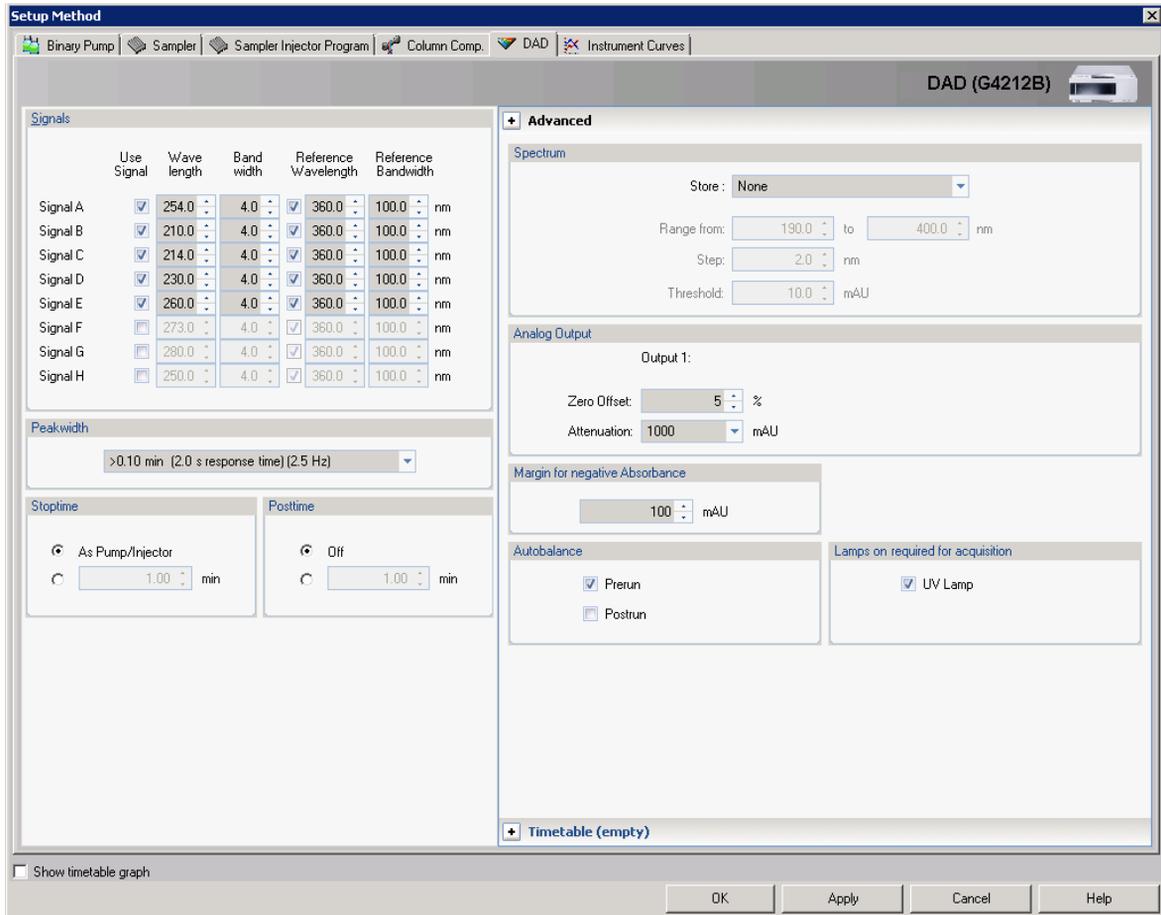


Figura 29 Schermata di impostazione del metodo – Scheda del rivelatore a serie di diodi

- **Signals:** si possono registrare fino a otto segnali (cromatogrammi) separati. Affinché un segnale venga contrassegnato per la raccolta, selezionare la casella **Use Signal** per il segnale di interesse, definire la lunghezza d'onda e la larghezza di banda e, se è necessario un segnale di riferimento, selezionare e definire anche la relativa casella.
  - **Wavelength:** consente di impostare la lunghezza d'onda centrale (nm) del segnale;
  - **Bandwidth:** consente di impostare l'ampiezza (nm) del segnale;

- **Reference Wavelength:** consente di impostare la lunghezza d'onda centrale (nm) della banda di riferimento che viene sottratta dal segnale analitico;
- **Reference Bandwidth:** consente di impostare l'ampiezza (nm) della banda di riferimento;
- **Peakwidth:** consente di impostare la velocità di campionamento dati e il filtraggio del segnale.
- **Stoptime / Posttime** vengono impostati su **As Pump/Injector** e **Off** e questi valori in genere vengono definiti nella scheda **Pump**. Tuttavia, è possibile impostare un tempo finale del rivelatore diverso dal tempo finale della pompa se è necessario interrompere l'analisi dei dati prima della fine dell'analisi definita nella pompa. Ciò può verificarsi nel caso in cui al termine del gradiente è stata impostata una rampa di equilibrizzazione del gradiente. Per esempio, %B può aumentare fino a 95 % a 10 min e si prevede che tutti i picchi siano stati eluiti dalla colonna. L'analisi è praticamente completata ma si aggiunge un segmento extra di gradiente per riportare %B al valore iniziale nell'arco di due minuti per iniziare gradualmente la riequilibrizzazione della colonna. Durante questa rampa discendente non si prevedono dati e, pertanto, il tempo finale del rivelatore è impostato su 10 min e la raccolta dei dati si interrompe, mentre il tempo finale della pompa è pari a 12 min per consentire il completamento della rampa discendente. Si tratta di una scelta personale dell'utente e in alcuni casi, pur sapendo che i minuti finali del cromatogramma non contengono informazioni utili, li si registra comunque per evitare l'inconveniente che il tempo finale del rivelatore sia diverso da quello della pompa. Il tempo finale del rivelatore non ha la priorità rispetto a quello della pompa e non determina l'interruzione dell'analisi come invece accadrebbe nel caso di un tempo finale anticipato in un qualsiasi altro modulo; ne risulta, pertanto, la praticità di impostare il tempo finale su **As Pump/Injector**.
- **Timetable** funziona come negli altri moduli: aggiungere una riga, selezionare la funzione da modificare e immettere i nuovi valori di tale funzione. Le modifiche apportate che interessano il rivelatore si verificano immediatamente in corrispondenza dell'istante specificato. Le seguenti funzioni possono essere modificate durante l'analisi:
  - **Balance**
  - **Change Signal**
  - **Change Threshold**
  - **Change Peak –detector Peakwidth**
  - **Change Spectra Acquisition Mode**

- **Change Contacts**

- **Advanced - Spectrum**

Durante l'analisi gli spettri possono essere salvati su base continua o controllata dai picchi (valido per il software ChemStation; alcuni pacchetti software, ad esempio EZChrom, supportano solo la raccolta continua di tutti gli spettri e le opzioni per il controllo da parte dei picchi non compaiono). La raccolta degli spettri e la raccolta dei segnali sono operazioni indipendenti eseguite dal firmware del rivelatore e non dipendono dal software del computer che estrae i dati dalla matrice di dati 3D. La velocità di acquisizione degli spettri è determinata dall'impostazione **Peakwidth**; durante l'intervallo specificato da **Peakwidth** vengono acquisiti otto spettri. Il firmware esegue la rivelazione dei picchi sul segnale A solo per determinare quando devono essere salvati gli spettri controllati dai picchi. Per i segnali multipli, può essere necessario impostare il segnale A come rivelatore a banda ampia per assicurarsi che siano disponibili spettri dei picchi per tutti i segnali alle varie lunghezze d'onda.

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

**None:** non viene memorizzato alcuno spettro.

**Apex+Baselines:** vengono acquisiti tre spettri in corrispondenza dell'inizio, dell'apice e della fine del picco.

**Apex+Slopes+Baselines:** vengono acquisiti cinque spettri in corrispondenza dell'inizio, della pendenza ascendente, dell'apice, della pendenza discendente e della fine del picco.

**All in Peak:** vengono memorizzati tutti gli spettri disponibili in un picco.

**All:** vengono memorizzati tutti gli spettri dell'analisi.

**Every 2nd Spectrum:** vengono memorizzati solo spettri alternati acquisiti durante l'analisi.

- **Range:** gli spettri possono essere salvati sull'intero intervallo del rivelatore, da 190 nm a 640 nm, o su un qualsiasi intervallo ridotto ritenuto opportuno dall'utente. Ciò riduce la quantità di dati da memorizzare.
- **Step:** controlla l'intervallo (nm) dei dati memorizzati in uno spettro e quindi incide sulla risoluzione spettrale osservata. L'impostazione predefinita pari a 2 nm è una buona scelta per la maggior parte delle applicazioni.
- **Threshold:** stabilisce che non vengono memorizzati spettri per altezze di picco inferiori a questo valore (mAU).

- **Advanced - Analog Output**

Il rivelatore DAD 1260 Infinity possiede un connettore di uscita del segnale analogico per l'uso con i sistemi di dati che non accettano un segnale digitale in ingresso. Si possono inserire le seguenti impostazioni:

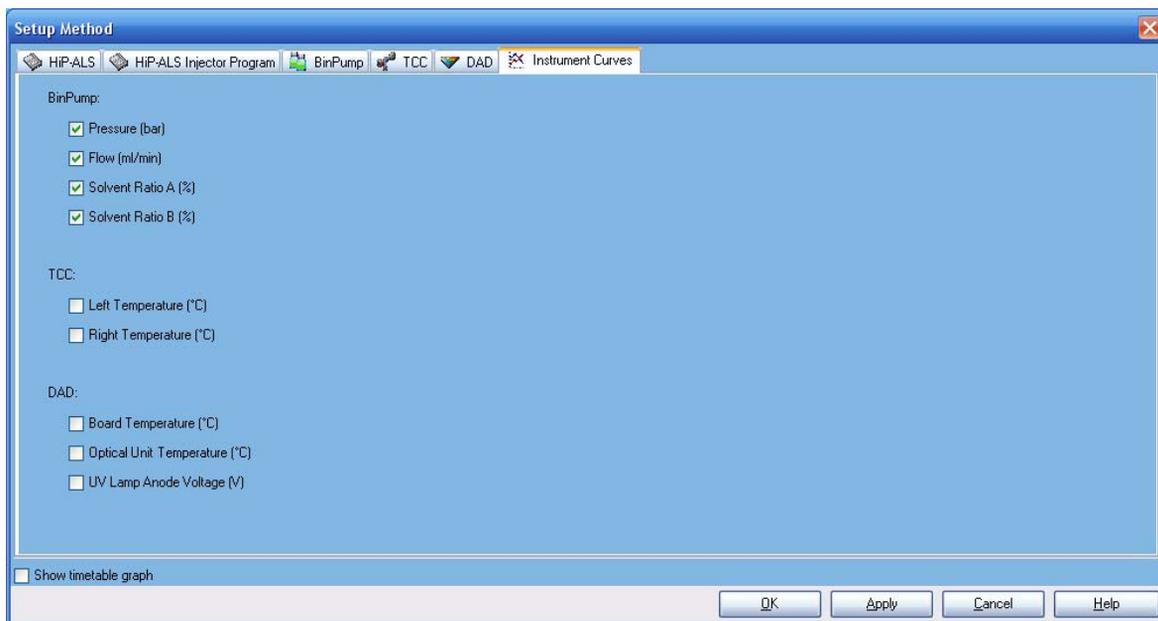
- **Zero Offset:** imposta il livello zero su una determinata percentuale del segnale in uscita, consentendo quindi una certa tolleranza per la deriva negativa.
- **Attenuation:** riporta in scala sull'uscita completa l'assorbanza impostata.

- **Advanced - Margin for Negative Absorbance**

L'impostazione predefinita è 100 mAU, che significa che l'intervallo dinamico del rivelatore è sufficiente, tenendo in considerazione l'impostazione del livello zero, per misure fino a questo valore. Per misurare picchi negativi più ampi o per seguire una linea di base con una forte deriva negativa, il valore va regolato verso il basso per impedire al segnale di appiattirsi sul fondo dell'intervallo. Tuttavia, non va cambiato senza un buon motivo, perché rendendolo più negativo si aumenta il rumore della linea di base e si riduce l'intervallo disponibile per la misura dei picchi positivi.

- **Advanced - Autobalance:** imposta su zero il livello di assorbanza a tutte le lunghezze d'onda (ossia bilancia tutti i punti dello spettro su zero) e pertanto azzerava anche il segnale della linea di base. **Prerun:** questa opzione viene selezionata per eseguire il bilanciamento subito prima dell'inizio dell'analisi; si tratta della situazione normale. In alternativa a volte viene selezionata l'opzione **Postrun** per eseguire il bilanciamento al termine dell'analisi, una volta trascorso il tempo post-analisi. Ad esempio, se il segnale mostra sempre una deriva negativa e l'utente preferisce che l'analisi termini ad assorbanza zero, allora questa opzione consente di impostare il livello zero corretto per l'analisi successiva. Questa opzione non modifica retrospettivamente l'analisi al termine della quale ha eseguito il bilanciamento.
- **Advanced - Lamps on required for acquisition:** il rivelatore DAD 1260 Infinity è dotato di una lampada UV che deve essere accesa per l'analisi; pertanto questa casella deve essere selezionata.

## Scheda Instrument Curves



**Figura 30** Schermata Imposta metodo – Scheda delle curve relative allo strumento

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

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

## Analisi dei dati

### Dettagli segnale

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

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

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

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

Impostazione di un metodo con la funzione di modifica di tutto il metodo

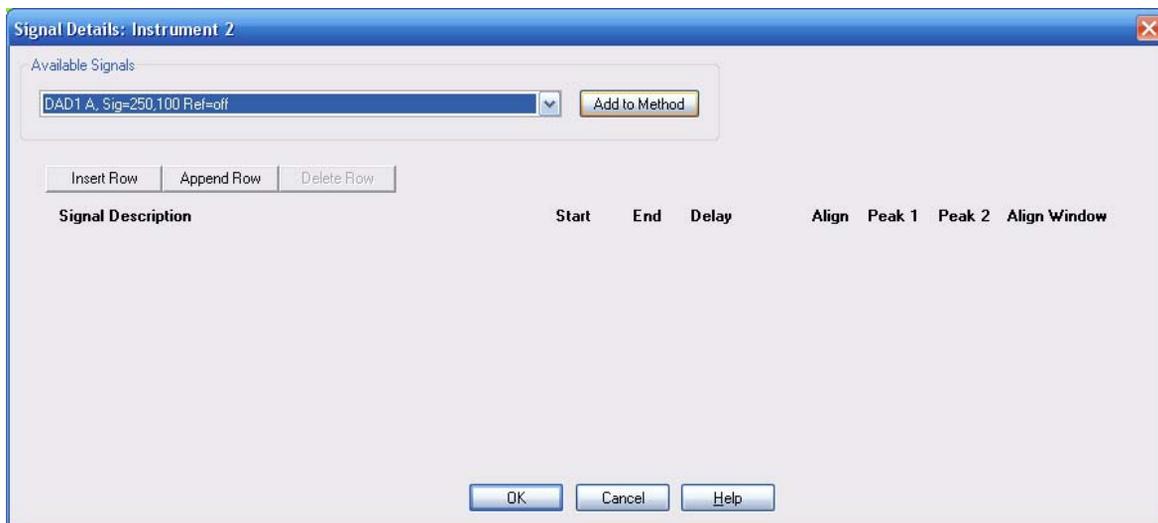
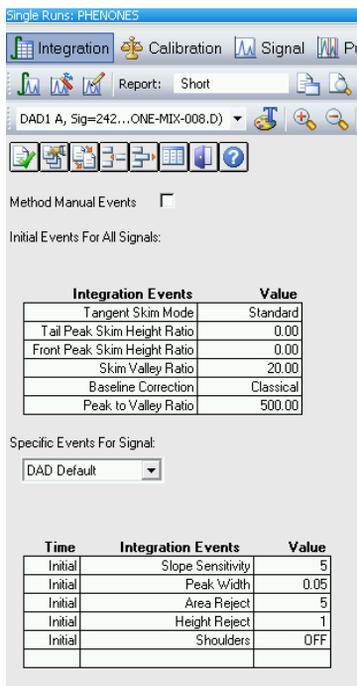


Figura 31 Dettagli segnale

## Modifica eventi di integrazione

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



**Figura 32** Schermata Modifica eventi di integrazione

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

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

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

In questa tabella i parametri principali sono quelli sotto elencati.

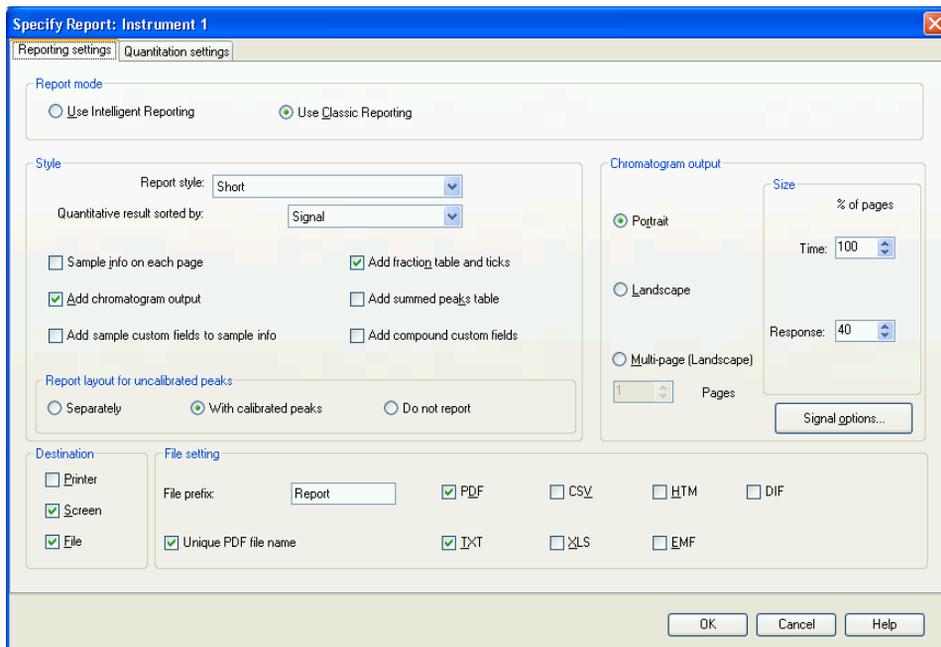
- **Slope Sensitivity:** rappresenta la pendenza e la curvatura della linea di base necessarie per marcare l'inizio e la fine di un picco.
- **Peak Width:** vanno inseriti i valori dell'ampiezza a metà altezza del picco di interesse più stretto. Questo serve all'integratore per distinguere tra rumore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

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

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

## Specifica rapporto

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



**Figura 33** Schermata Specifica rapporto

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

Sulla scheda **Reporting settings**

- **Report mode:** utilizza la stesura classica dei rapporti
- **Style**
  - **Report Style:** breve

Impostazione di un metodo con la funzione di modifica di tutto il metodo

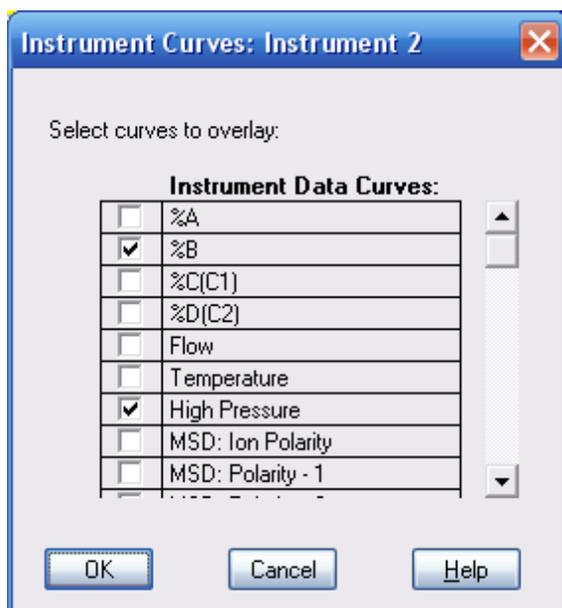
- **Quantitative results sorted by:** segnale
- **Add Chromatogram Output:** verificato
- **Chromatogram Output:** verticale
- **Size:**
  - Asse del **Time:** 100 % della pagina
  - Asse della **Response:** 40 % della pagina
- **Destination**
  - **Printer:** verificata
  - **Screen:** non verificata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

Sulla scheda **Quantitation settings**

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

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

### Curve relative allo strumento

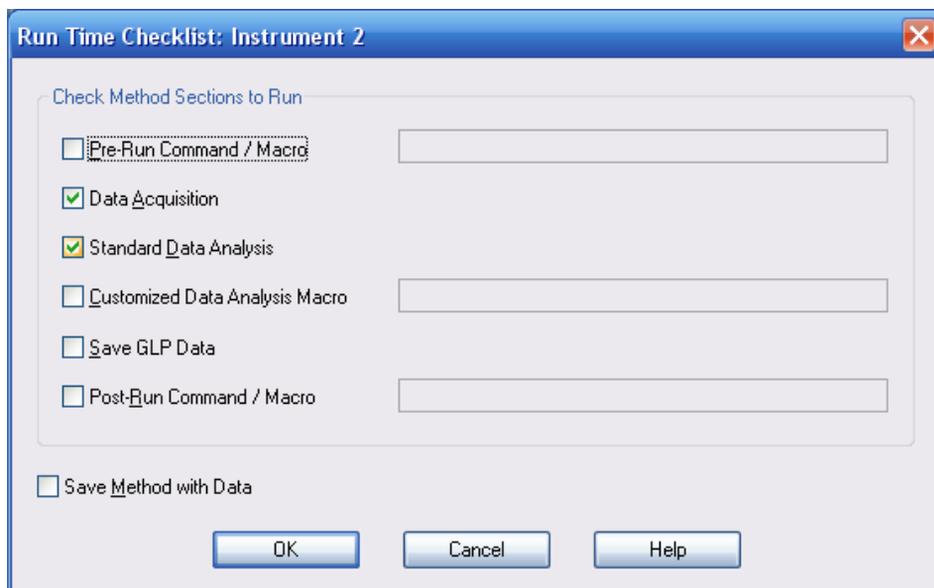


**Figura 34** Schermata Curve relative allo strumento

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

## Lista di controllo del tempo di analisi

La schermata della **Run Time Checklist** può anche essere raggiunta direttamente dal menu **Method > Run Time Checklist...** o facendo clic sull'icona **Run Time Checklist** sulla parte alta della schermata.



**Figura 35** Schermata Lista di controllo del tempo di analisi

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

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

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

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

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

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

# Glossario-IU

## 1

1260 Infinity Autosampler  
Autocampionatore 1260 Infinity

1260 Infinity Binary Pump  
Pompa binaria 1260 Infinity

1260 Infinity DAD  
DAD 1260 Infinity

1290 Infinity TCC  
TCC 1290 Infinity

## A

Add  
Aggiungi

Add Chromatogram Output  
Aggiungi uscita cromatogramma

Add to Method  
Aggiungi al metodo

Adjust  
Regola

Advanced  
Avanzate

Advanced - Analog Output  
Avanzate - Uscita analogica

Advanced - Autobalance  
Avanzate - Bilanciamento automatico

Advanced - Auxiliary  
Avanzate - Ausiliarie

Advanced - High Throughput  
Avanzate - Alta produttività

Advanced - Lamps on required for acquisition  
Avanzate - Lampade accese richieste per l'acquisizione

Advanced - Margin for Negative Absorbance  
Avanzate - Margine per l'assorbanza negativa

Advanced - Spectrum  
Avanzate - Spettro

All  
Tutti

All in Peak  
Tutto nel picco

All Programs  
Tutti i programmi

Apex+Baselines  
Apice+Linee di base

Apex+Slopes+Baselines  
Apice+Pendenze+Linee di base

Apply  
Applica

Apply to Method  
Applica al metodo

Area Reject  
Scarto area

Area Reject / Height Reject  
Scarto area / Scarto altezza

As Detector Cell  
Come cella nel rivelatore

As Pump/Injector  
Come pompa/iniettore

Attenuation  
Attenuazione

Automatic delay volume reduction  
Riduzione automatica del volume di ritardo

Available Signals  
Segnali disponibili

## B

Balance  
Bilanciamento

Bandwidth  
Larghezza di banda

Based on  
Basato su

Baseline Correction  
Correzione della linea di base

BinPump  
PompaBin

## C

Calculate  
Calcola

Calculation mode  
Modalità calcolo

Calibration  
Calibrazione

Cancel  
Annulla

Change Contacts  
Modifica contatti

Change Peak –detector Peakwidth  
Modifica picco - Ampiezza del picco del rivelatore

Change Signal  
Modifica segnale

Change Spectra Acquisition Mode  
Modifica modalità di acquisizione degli spettri

Change Threshold  
Modifica soglia

## Glossario-IU

Change...  
Cambia...  
Check Method Sections to Edit  
Controlla le sezioni del metodo da modificare  
Chromatogram Output  
Uscita cromatogramma  
Clear all  
Cancella tutto  
Column Switching Valve  
Valvola di commutazione della colonna  
Combined  
Combinata  
Comment  
Commento  
Customized Data Analysis Macro  
Macro personalizzata per l'analisi dei dati  
Cut  
Taglia

## D

Data Acquisition  
Acquisizione di dati  
Data Analysis  
Analisi dei dati  
Delete Row  
Elimina riga  
Destination  
Destinazione  
Draw position  
Posizione di aspirazione  
Draw speed  
Velocità di aspirazione

## E

Edit Entire Method  
Modifica tutto il metodo

Edit Integration Events  
Modifica eventi di integrazione  
Edit Signal Plot  
Modifica diagramma del segnale  
Eject speed  
Velocità di emissione  
Enable overlapped injection  
Abilita iniezione sovrapposta  
Enhanced Solvent Compressibility  
Compressibilità migliorata del solvente  
Equilibration time  
Tempo di equilibrizzazione  
Every 2nd Spectrum  
Ogni 2 spettri

## F

File Setting  
Impostazione file  
Flow  
Flusso  
Flush Port  
Porta di lavaggio

## H

Height Reject  
Scarto altezza  
HiP-ALS Injector Program  
programma dell'iniettore di HiP-ALS

## I

Initial Events For All Signals  
Eventi iniziali per tutti i segnali  
Injection Mode  
Modalità di iniezione  
Injection Valve Cleaning  
Pulizia della valvola di iniezione  
Injection volume  
Volume di iniezione

Injection with needle wash  
Iniezione con lavaggio dell'ago  
Injector Cleaning  
Pulizia dell'iniettore  
Instrument  
Strumento  
Instrument Curves  
Curve relative allo strumento  
Instrument/Acquisition  
Strumento/Acquisizione  
Instruments  
Strumenti  
Integrate  
Integra  
Integration  
Integrazione  
Integration Events  
Eventi di integrazione  
Integration OFF/ON  
Integrazione ATTIVA/DISATTIVA  
Intensity Test  
Test dell'intensità

## L

Launch online  
Lancia in linea  
Load Method  
Carica metodo  
Location  
Posizione

## M

Method  
Metodo  
Method and Run Control  
Metodo e controllo analisi  
Method History  
Cronologia del metodo

Method Information  
Informazioni sul metodo

Method Menu  
Menu del Metodo

Method...  
Metodo...

Methods  
Metodi

Mode  
Modalità

## N

Name Pattern  
Nome pattern

Needle Wash  
Lavaggio dell'ago

New Method...  
Nuovo metodo...

No Limit  
Nessun limite

No Limit / Off  
Nessun limite / Disattivato

None  
Nessuno

## O

Off  
Disattivato

Online Plot  
Diagramma in linea

Online Signals  
Segnali in linea

OpenLAB Control Panel  
Pannello di controllo OpenLAB

## P

Parameter  
Parametro

Parameter Mismatch  
Accoppiamento errato dei parametri

Paste  
Incolla

Peak Width  
Ampiezza del picco

Peakwidth  
Ampiezza picco

Post Time  
Tempo post-analisi

Postrun  
Post-analisi

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

Posttime  
Tempo post-analisi

Prerun  
Pre-analisi

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

Pressure Limits  
Limiti di pressione

Printer  
Stampante

Pump  
Pompa

## Q

Quantitation settings  
Impostazioni quantificazione

Quantitative results sorted by  
Risultati quantitativi suddivisi per

## R

Range  
Intervallo

Reference Bandwidth  
Larghezza di banda di riferimento

Reference Wavelength  
Lunghezza d'onda di riferimento

Remove  
Rimuovi

Repeat  
Ripeti

Report  
Rapporto

Report mode  
Modalità del rapporto

Report Style  
Stile del rapporto

Reporting settings  
Impostazioni del rapporto

Response  
Risposta

Run Control  
Controllo analisi

Run Method  
Esegui metodo

Run Queue  
Coda di analisi

Run Sequence  
Esegui sequenza

Run Time Checklist  
Lista di controllo del tempo di analisi

## S

Sample flush out factor  
Fattore di eliminazione del campione

Sample Info  
Informazioni sul campione

Sample name  
Nome campione

Save  
Salva

Save As  
Salva con nome

## Glossario-IU

Save Method As	Skip	Temperature
Salva metodo con nome	Ignora	Temperatura
Save Method As...	Slope Sensitivity	Threshold
Salva metodo con nome...	Sensibilità della pendenza	Soglia
Save Method with Data	Solvents	Time
Salva metodo con dati	Solventi	Tempo
Screen	Specific Events For Signal	Timetable
Schermata	Eventi specifici per segnale	Tabella di programmazione
Select Run Method Task	Specify Report	
Seleziona attività di esecuzione del metodo	Specifica rapporto	
Selected Signal	Spectrum Store	<b>U</b>
Segnale selezionato	Memorizzazione spettro	Unique PDF file name
Selected Signals	Standard Data Analysis	Nome unico del file PDF
Segnali selezionati	Analisi standard dei dati	Unique Sequence Folder Creation
Set Integration Events Table	Standard injection	Creazione della cartella di sequenza unica
Imposta tabella degli eventi di integrazione	Iniezione standard	Use Signal
Setup Instrument Method...	Step	Usa segnale
Imposta metodo dello strumento...	Passo	
Setup Method	Stop Time	<b>V</b>
Imposta metodo	Tempo finale	Vial/Location
Show timetable graph	Stop Time / Post Time	Vial/Posizione
Mostra grafico della tabella di programmazione	Tempo finale / Tempo post-analisi	Vial/Well bottom sensing
Signal A	Stoptime	Rilevazione del fondo del vial/pozzetto
Segnale A	Tempo finale	View
Signal Description	Store	Visualizza
Descrizione segnale	Memorizza	
Signal Details	Style	<b>W</b>
Dettagli segnale	Stile	Wash Vial
Signal Window 1	Subdirectory	Vial di lavaggio
Finestra del segnale 1	Sottodirectory	Water
Signals	Switch [module name] on	Acqua
Segnali	Accendi [nome del modulo]	Wavelength
Single Runs	System On/Off	Lunghezza d'onda
Analisi singole	Accensione/Spengimento del sistema	Wavelength Calibration
Size		Calibrazione della lunghezza d'onda
Dimensioni	<b>T</b>	<b>Z</b>
	TCC)	Zero Offset
	TCC	Scarto zero

# Indice

## A

- accuratezza del flusso 24
- accuratezza della composizione 25
- adescamento
  - tramite pompa 82
- ADVR 50
- Agilent
  - internet 114
- altitudine non operativa 23
- altitudine operativa 23
- analisi dei dati 116
- analisi
  - dati 100

## C

- calcolatore
  - costi 34
- caricamento
  - predefinito 88
- cella di flusso 66
- classe di sicurezza I 106
- colonna
  - stabilizzazione termica 37
  - temperatura 37
- colonne
  - particelle di dimensioni inferiori a 2 micron 34
- comparto colonne termostato
  - descrizione 17
- compensazione della compressibilità 24
- compensazione, compressibilità 24
- componenti del sistema
  - comparto colonne termostato 17
  - rivelatore a serie di diodi 19

- configurazione e installazione del sistema
  - integrazione in rete 74
- configurazione ottimizzata
  - colonne di diametro interno di 2,1 mm 43
  - colonne di diametro interno di 3 e 4 mm 45
- configurazione per volume di ritardo basso 43
- configurazione per volume di ritardo medio 44
- configurazione per volume di ritardo standard 45
- configurazione
  - diagramma in linea 89
  - volume di ritardo basso 43
  - volume di ritardo medio 44
  - volume di ritardo standard 45
- consumo elettrico 23
- controllo e valutazione dei dati 25

## D

- dati
  - analisi 100
- DEF\_LC.M 115
- degassatore sottovuoto 26
- design con due pistoni in serie 11
- design 11
- diagramma in linea
  - configurazione 89
- dimensioni 23

## E

- effetto memoria 51, 53

- equazione di van Deemter 29

## F

- fattore di ritenzione 32
- formazione del gradiente 24
- frequenza di rete 23

## G

- gruppo di controllo 14
- guida introduttiva
  - introduzione 86

## I

- impostazione del metodo dello strumento 118
- Informazioni sul metodo 116, 117
- iniezioni sovrapposte 50
- installazione
  - Lab Advisor 73
  - sistema di dati 72
  - software di controllo 72
- integrazione in rete 74
- integrazione 102
- internet 114
- intervallo di composizione 25
- intervallo di flusso impostabile 24
- intervallo di flusso
  - impostabile 24
  - operativo 24
- intervallo di frequenza 23
- intervallo di pH consigliato 24
- Intervallo di pH 24
- intervallo di tensione 23
- introduzione al degassatore 14

## Indice

### L

lavaggio attivo delle guarnizioni 11  
Lista di controllo del tempo di analisi 116

### M

metodo  
  impostazione 96  
  modifica tutto il metodo 115  
  predefinito 115  
  singola iniezione 98  
miscelatore 11  
miscelazione ad alta pressione 11

### O

ostruzioni della colonna  
  prevenzione 68  
ottimizzazione della risoluzione  
  comparto colonne 59  
  condizioni cromatografiche 62  
  velocità di campionamento 61  
  volume extra-colonna 60  
ottimizzazione  
  cella di flusso 66  
  condizioni per l'analisi HPLC 31  
  ottenimento di una maggiore  
  risoluzione 55  
  ottenimento di una maggiore  
  sensibilità 63  
  sensibilità del rivelatore 65  
  separazione cromatografica 31  
  uso delle colonne 65  
  volumi di iniezione 47

### P

particelle di dimensioni inferiori a 2  
micron 34  
peso 23  
piatti teorici 32  
pompa a vuoto 14

pompa binaria 11  
precisione del flusso 24  
precisione della composizione 25  
pressione  
  intervallo operativo 24  
  pulsazione 24  
prestazioni  
  specifiche 24  
principio di funzionamento 14

### R

rapporto  
  specifiche 103  
riduzione automatica del volume di  
ritardo 50  
rigenerazione alternata delle colonne 49  
riscaldamento per attrito 37  
risoluzione  
  aumento 55  
  ottimizzazione 55  
rivelatore a serie di diodi  
  descrizione 19  
rivelatore  
  ottenimento di una maggiore  
  sensibilità 65

### S

sensibilità  
  configurazione dello strumento 64  
  ottimizzazione 63  
sensore di pressione 14  
sicurezza  
  informazioni generali 106  
  simboli 108  
  standard 23  
sistema idraulico 24  
sistema  
  accensione 87  
soluzioni tampone 11

solventi, sostituzione 83  
sostituzione dei solventi 83  
specifiche fisiche 23  
specifiche  
  comunicazioni 25  
  controllo e valutazione dei dati 25  
  fisiche 23  
  prestazioni 24  
  uscita del segnale analogico 25  
spurgo 91  
Strumento/Acquisizione 116

### T

tabella degli eventi di integrazione 102  
temperatura ambiente non operativa 23  
temperatura ambiente operativa 23  
temperatura non operativa 23  
temperatura operativa 23  
tempo di ciclo  
  configurazione dello strumento 49  
tensione di rete 23

### U

umidità 23  
uscita del segnale analogico 25

### V

valutazione dei dati e controllo 25  
valvola di selezione del solvente 11  
volume di iniezione  
  ottenimento di volumi maggiori 47  
volume di ritardo  
  commutazione automatica 42  
  descrizione 40  
  esempio 40  
volume extra-colonna  
  descrizione 41



[www.agilent.com](http://www.agilent.com)

## In questo volume

Il presente manuale contiene informazioni sul sistema LC binario Agilent 1260 Infinity.

Vengono trattati i seguenti argomenti:

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

© Agilent Technologies 2006, 2008-2011, 2013

Printed in Germany  
02/2013



G1312-94303



**Agilent Technologies**