

Návod k obsluze stroje Agilent 6530 Q-TOF LC/MS



Na stroji nesmí pracovat nikdo, kdo nebyl proškolen.

Krok 1: Kontrola stroje a přihlášení

Před vlastní prací učiňte následující kroky:

- a) Zkontrolujte stav rozpouštědel v zásobních lahvích (deionizovaná voda, acetonitril). Pokud je stav rozpouštědel příliš nízký, informujete o tom Michala Urbana.
- b) Přihlášení do operačního systému. **Příslušné údaje dostanete až po řádném proškolení.**

Krok 2: Spustíte software Data Acquisition

Na ploše uvidíte všechny ikony softwaru Agilent MassHunter. Pro spuštění programu Data Acquisition klikněte dvakrát na ikonu Data Acquisition



Poznámka:

Když se otevře program Data Acquisition, softwarové stroje se automaticky spustí. Pokud jsou z jakéhokoliv důvodu zastaveny a je třeba je restartovat, pak dvakrát klikněte na ikonu Acq System Launcher, která je na ploše a klikněte na start.



Okna, kde děláte většinu své práce.

Instrument Status Window

Chromatogram Plot window

Method Editor window

Spectrum Plot window

Actual window

The screenshot shows the Agilent MassHunter Workstation Data Acquisition software interface. The interface is divided into several main sections:

- Instrument Status Window:** Located at the top left, it displays the status of various instrument components: Sampler (Idle), Binary Pump (Standby), Column Comp. (Not Ready), VWD (Not Ready), and Q-TOF (Not Ready). It also shows a status message "Instrument Not Ready" and control buttons for On and Off.
- Chromatogram Plot window:** Located in the middle left, it displays a Total Ion Chromatogram (TIC) plot with a y-axis ranging from -1000000 to 8000000 and an x-axis ranging from 0 to 60 minutes.
- Method Editor window:** Located in the bottom left, it displays the configuration for the current method, including the path, estimated run time, and options for pre-run and post-run scripts.
- Spectrum Plot window:** Located in the middle right, it displays a UV-Vis spectrum plot with a y-axis labeled "mAU" and an x-axis labeled "nm" ranging from -5 to 105.
- Actual window:** Located at the top right, it displays a table of parameters and their values.

| Parameter | Value |
|----------------------------------|---------------|
| Q-TOF: TOF Vac | 1.64E-07 Torr |
| Q-TOF: Quad Vac | 2.43E-05 Torr |
| Q-TOF: Drying Gas | 3.0 l/min |
| Q-TOF: Error State | - |
| Q-TOF: Ready State | False |
| Q-TOF: Rough Vac | 2.81E+00 Torr |
| Q-TOF: Vaporizer/Sheath Gas Temp | 125 °C |
| Q-TOF: Gas Temp | 300 °C |

At the bottom of the interface, there is a navigation bar with three tabs: "Method Editor", "Worklist", and "Sample Run".

Editor metody, Worklist a Sample run sdílejí spodní okno. Klepnutím na záložku se přepnete do příslušného okna.

Zobrazení nebo skrytí oken

Na obrazovce můžete zobrazit vždy jedno okno nebo všech sedm oken. Nikdy nemůžete skrýt všechna okna. Chcete-li zobrazit nebo skrýt okno, klepněte na dané příkazy ve *View menu*. Okno můžete také skrýt kliknutím na ikonu **X** (křížek) v pravém horním rohu okna.

Po klepnutí na okno dojde ke změně barvy názvu aktivního okna. Stisknutím klávesnice **F1** získáte nápovědu v aktivním okně. Dále můžete měnit velikosti oken. Pokud kliknete na název okna, tak ho odejmete z hlavního okna. Naopak dalším poklepáním na název ho zpět ukotvíte do hlavního okna. Také můžete okno ukotvit či odejmout z hlavního okna tím, že na název příslušného okna klepnete pravým tlačítkem myši a kliknete na *Floating*.

Instrument Status window



V tomto okně si můžete prohlédnout stav každého jednotlivého zařízení. Vidíte, zda je zapnuto (*On*), vypnuto (*Off*) nebo v pohotovostním režimu (*Standby*). Dále se zde dají nastavovat parametry zařízení LC a hmotnostního spektrometru. **Nic nastavovat nemusíte, vše už je nakonfigurováno.** Můžete kliknout na ikonu **?** v jakémkoli podokně příslušných součástí stroje a získat tak nápovědu pro jednotlivé zařízení.

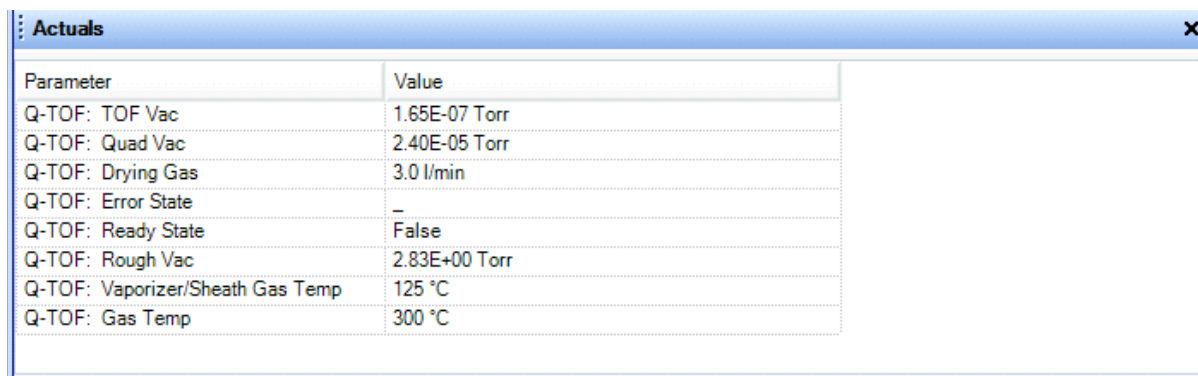
Toto okno dále zobrazuje aktuální stav každého zařízení podle barevného kódování (Tabulka 1).

Tabulka 1: Barevné kodování v *Instrument Status Window*

| Barva | Stav |
|---------------|---|
| červená | chyba (<i>Error</i>) |
| žlutá | zařízení není připraveno (<i>Not ready</i>) |
| purpurová | před spuštěním (<i>Pre run</i>)/po spuštění (<i>Post run</i>) |
| modrá | běží experiment (<i>Running</i>), nástřik (<i>Injecting</i>) |
| zelená | vše v pořádku, v nečinnosti (<i>Idle</i>) |
| tmavě šedivá | zařízení vypnuto, není připojeno (<i>Offline</i>) |
| světle šedivá | zařízení v pohotovostním režimu, například UV lampa je vypnutá (<i>Standby</i>) |

Actuals window

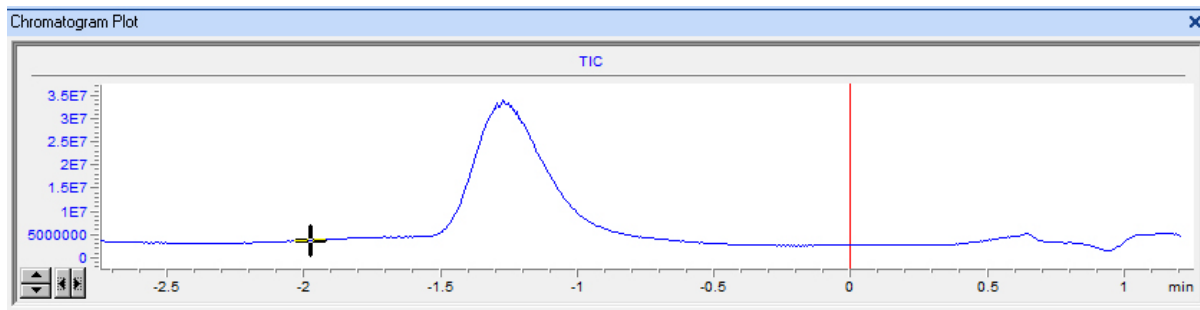
V tomto okně se zobrazuje aktuální hodnota vybraných parametrů přístroje.



| Parameter | Value |
|----------------------------------|---------------|
| Q-TOF: TOF Vac | 1.65E-07 Torr |
| Q-TOF: Quad Vac | 2.40E-05 Torr |
| Q-TOF: Drying Gas | 3.0 l/min |
| Q-TOF: Error State | - |
| Q-TOF: Ready State | False |
| Q-TOF: Rough Vac | 2.83E+00 Torr |
| Q-TOF: Vaporizer/Sheath Gas Temp | 125 °C |
| Q-TOF: Gas Temp | 300 °C |

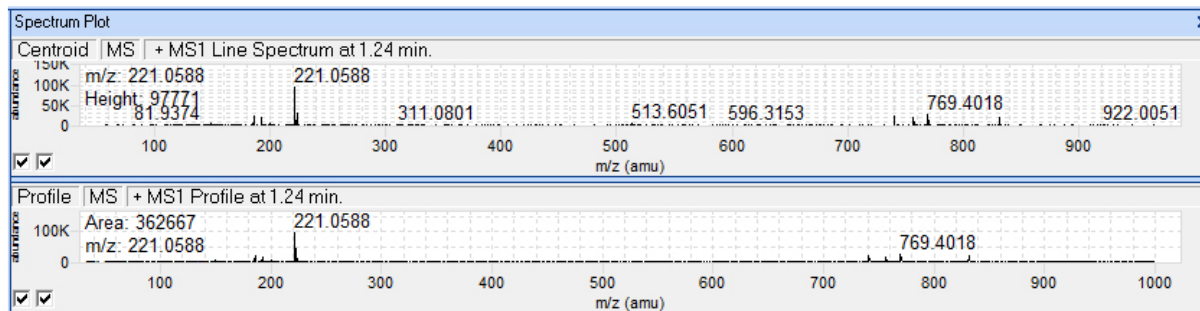
Chromatogram Plot window

V tomto okně můžete sledovat chromatogramy v aktuálním čase. Tyto chromatogramy zobrazují uživatelem definované signály nebo parametry přístroje.



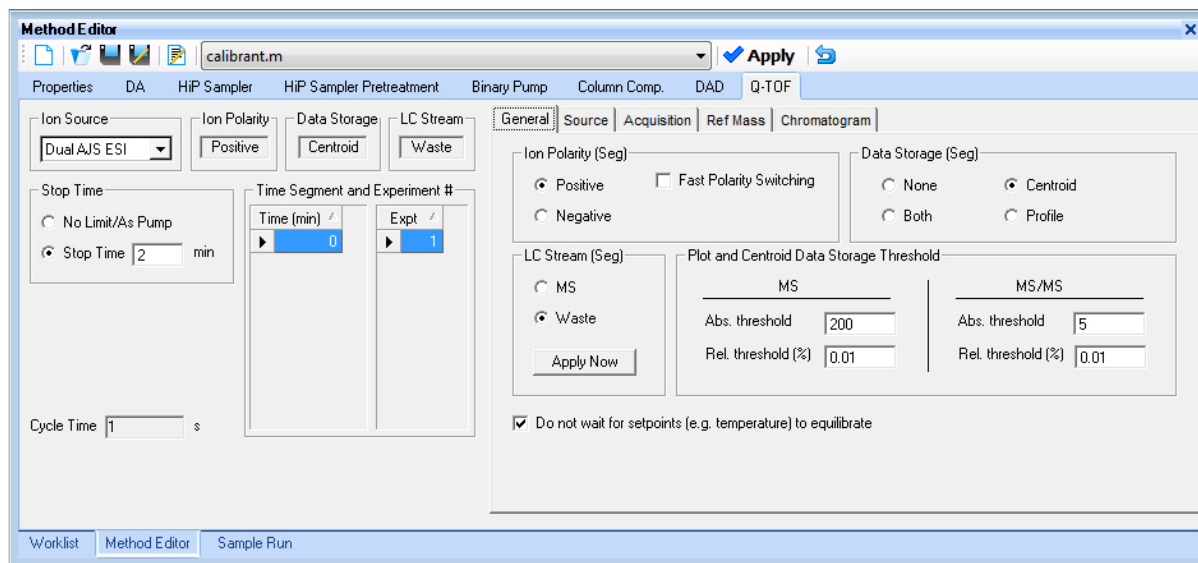
Spectrum Plot window

V tomto okně sledujete spektrální grafy v aktuálním čase.



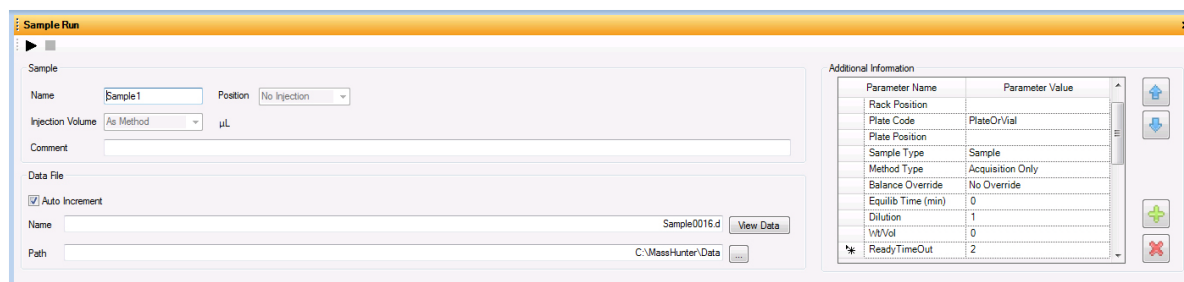
Method Editor window

Zde zadáváte jednotlivé parametry akvizice pro zvolenou metodu. **Není třeba nic upravovat, vše je nastaveno pro obecnou metodu!**



Sample Run window

V tomto okně zadáváte informace o vzorcích. Toto okno umožňuje spustit měření jednotlivých vzorků, ale lze spustit jen jedno měření, ne sekvenci měření více vzorků. Vyplňte označení vzorku, pozici vzorku v autosampleru.



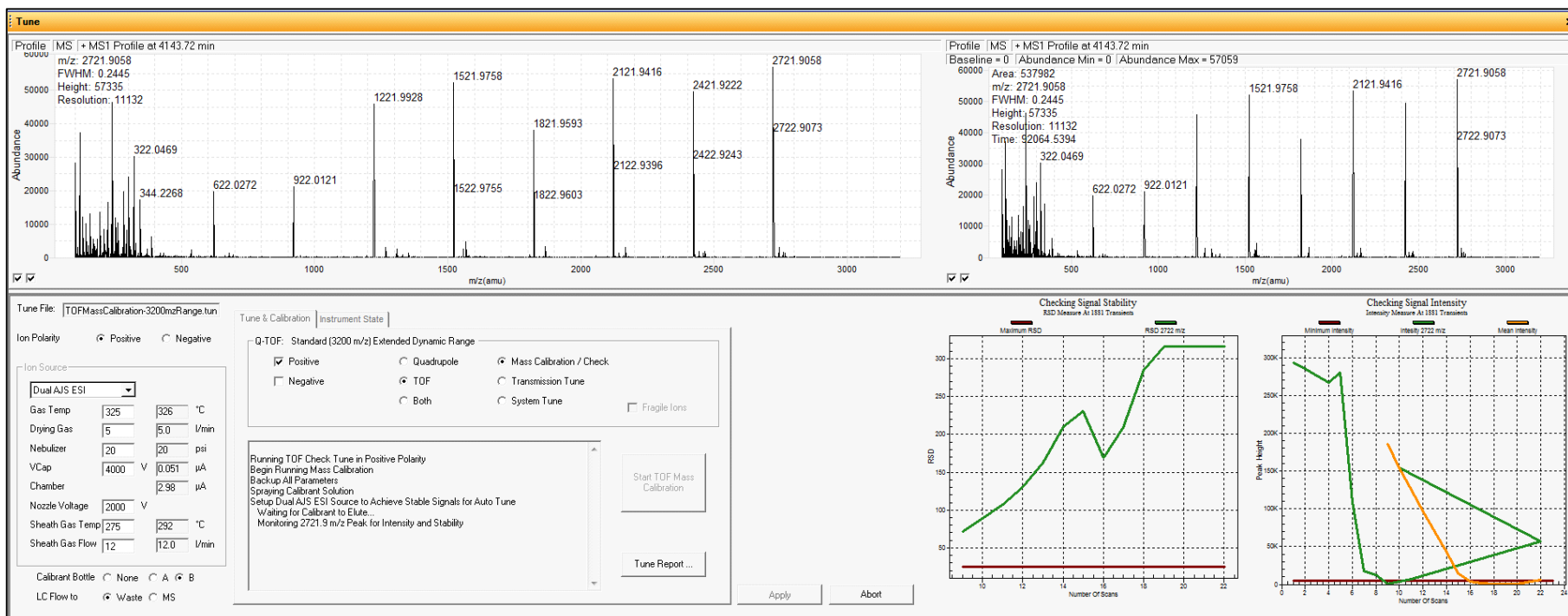
Worklist window

Ve worklistu zadáváte informace pro více vzorků. Při spuštění worklistu jsou vzorky automaticky měřeny v pořadí uvedeném ve worklistu.

| | Sample Name | Sample Position | Method | Data File | Sample Type | Level Name | Comment | Sample Group | Info |
|---|-------------|-----------------|------------------|-------------|-------------|------------|---------|--------------|------|
| 1 | Sulfa1 | P1-A1 | AJSESI_default.m | sulfas001.d | Sample | | | | |
| 2 | Sulfa1 | P1-A2 | AJSESI_default.m | sulfas002.d | Sample | | | | |
| 3 | Sulfa1 | P1-A3 | AJSESI_default.m | sulfas003.d | Sample | | | | |

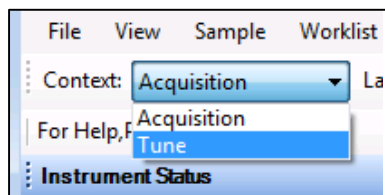
Tune window

V tomto okně vyladíte a kalibrujete hmotnostní spektrometr.



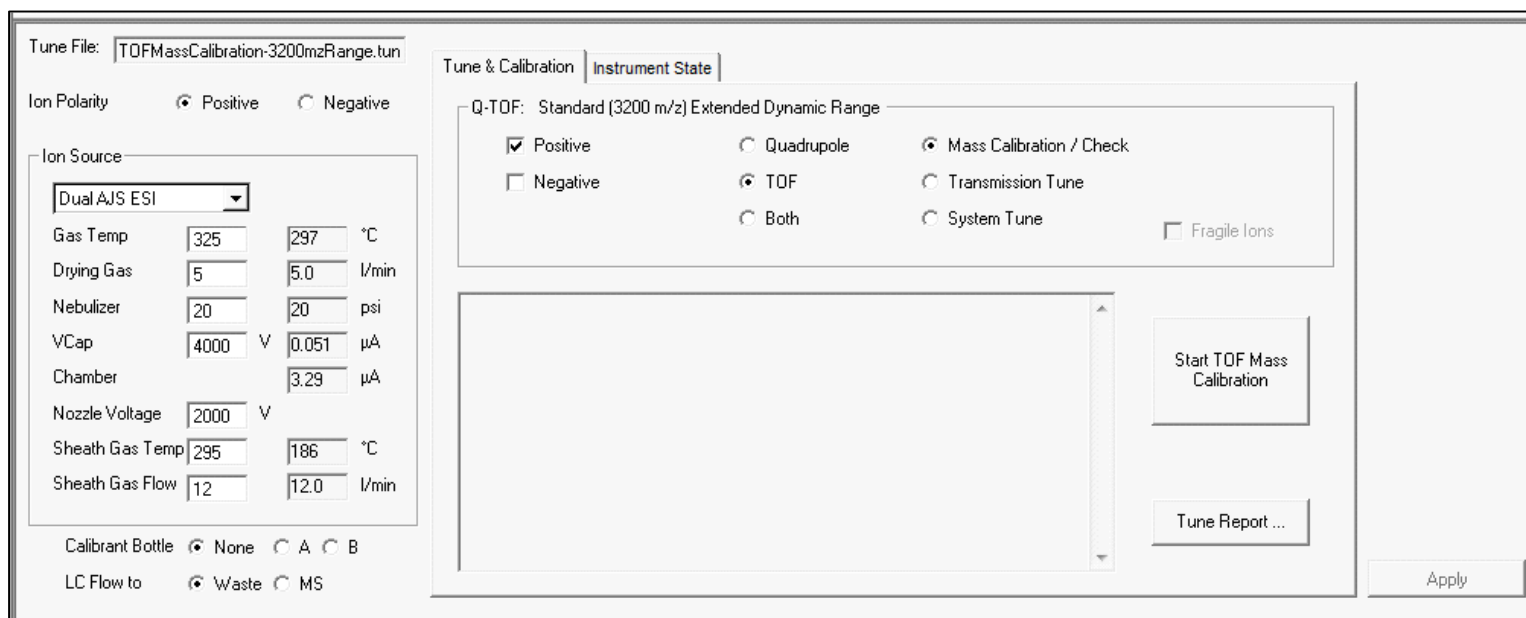
Krok 3: Kalibrace TOF a Q-TOF

a) V hlavním panelu úvodního okna vlevo nahoře v sekci *Context* změňte mód *Acquisition* na mód *Tune*.

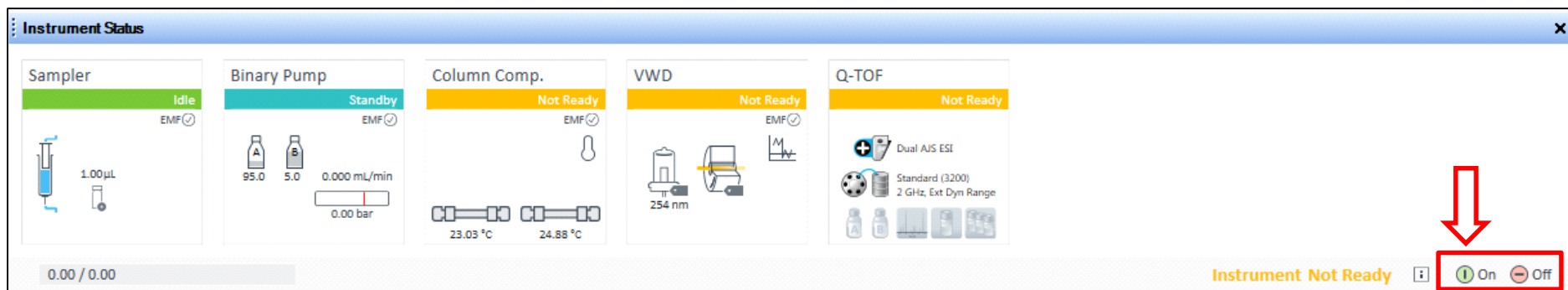


Objeví se okno *Tune*. Během kalibrace jsou otevřeny pouze následující okna: *Instrument status window*, *Actuals window* a *Tune window*. Všimněte si, že TOF vyladíte odděleně od kvadrupólu.

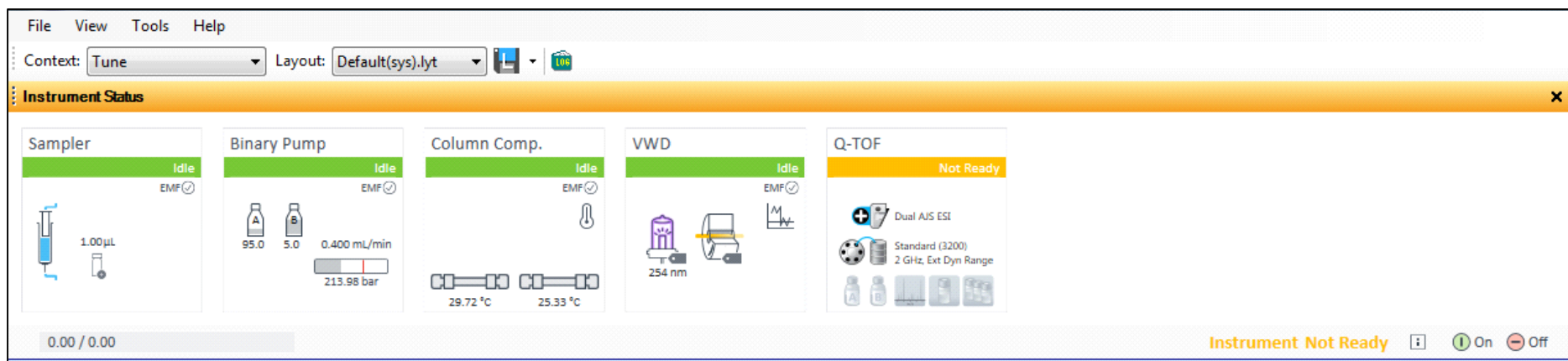
Tune window



b) Zapněte stoj, tedy všechny jeho součásti v *Instrument window*.



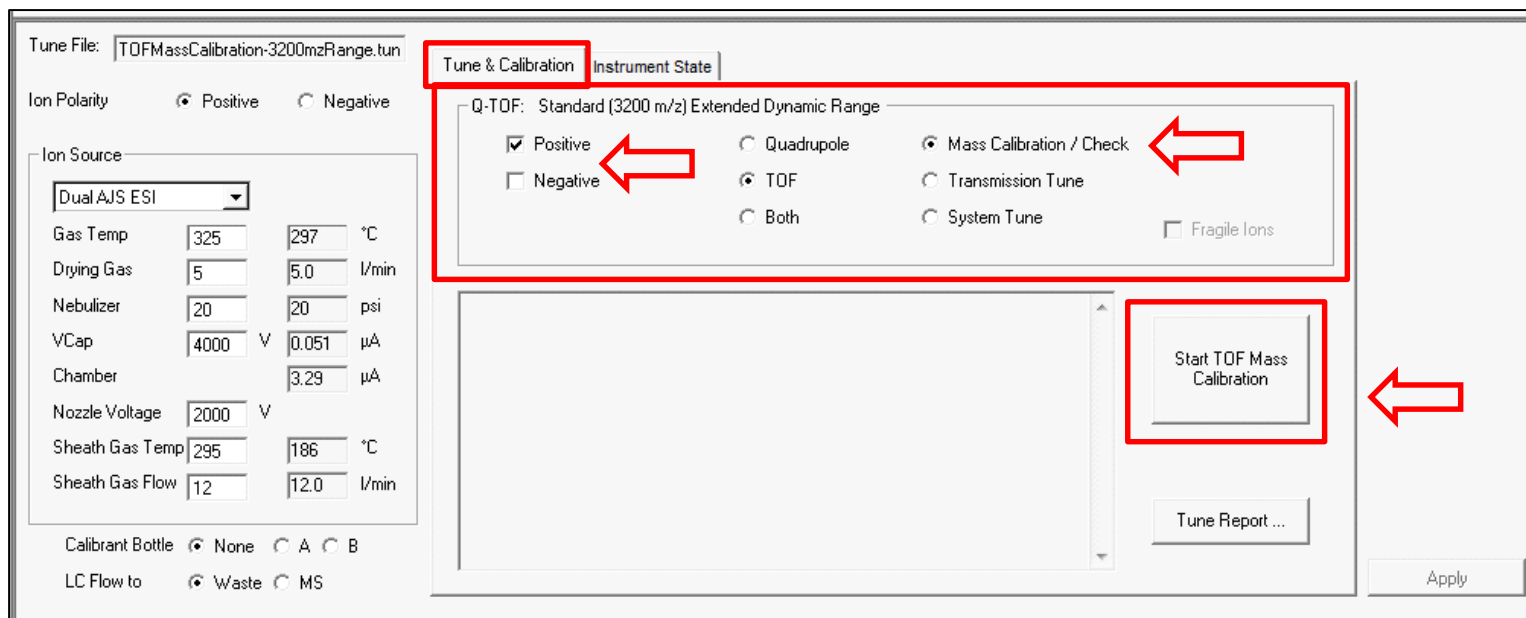
Dojde k zapnutí všech součástí stroje.



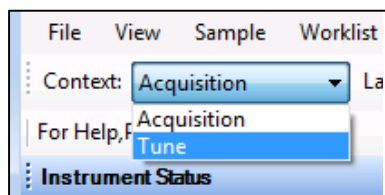
c) Následně klikněte na *Tune and Calibration*

d) Označte polaritu, kterou chcete použít při ladění TOF na záložce *Tune and Calibration*. Můžete označit pozitivní, negativní mód. Dále klikněte na *Mass Calibration/Check*.

e) Poté klikněte na *Start TOF Mass Calibration* a vyčkejte na report. Tato operace může trvat cca 5 minut. Pokud se zobrazí report, tak kalibrace stroje byla úspěšná.



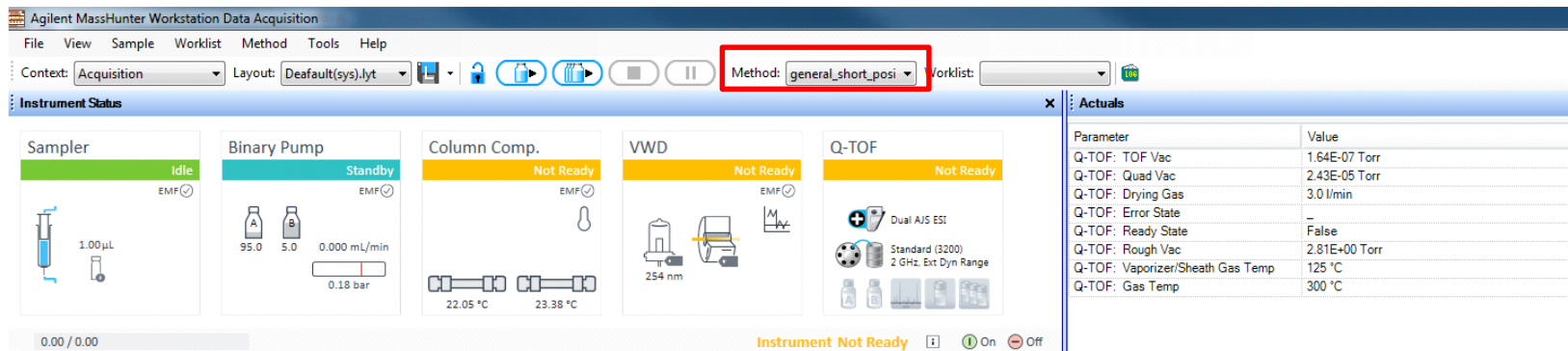
f) Po skončení kalibrace se v oddílu hlavního okna v sekci *Context* přepnete zpět do módu *Acquisition*.



Krok 3: Nastavení a spuštění metody pro změření vzorku

Před měřením vašeho vzorku je nutné zvolit vhodnou **metodu** měření.

a) Zvolení metody se provede v hlavním panelu hlavního okna v sekci *Method*.



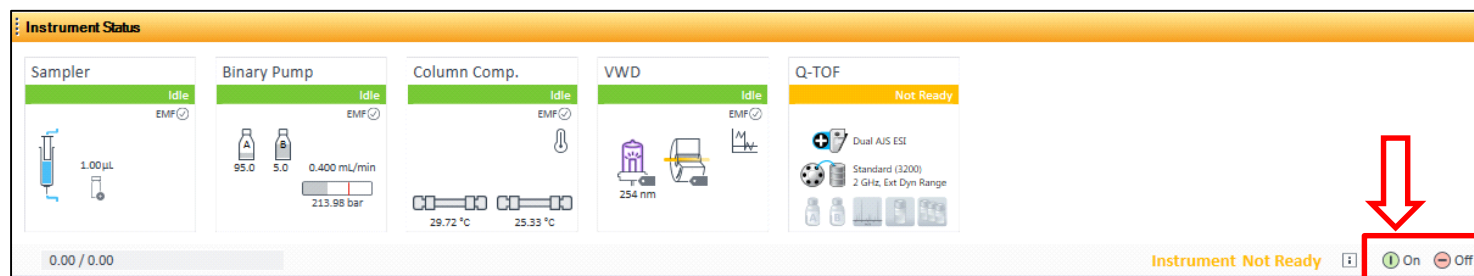
Pro běžná měření jsou už vytvořeny metody, které můžete použít. Především jde o metodu: ***general_short_positive(400ul).1ul.m***

Tato metoda umožňuje změřit většinu vzorků.

Poznámka: Pokud potřebujete vytvořit speciální metodu pro změření vaší látky, tak to nejprve diskutujte s Michalem Urbanem.

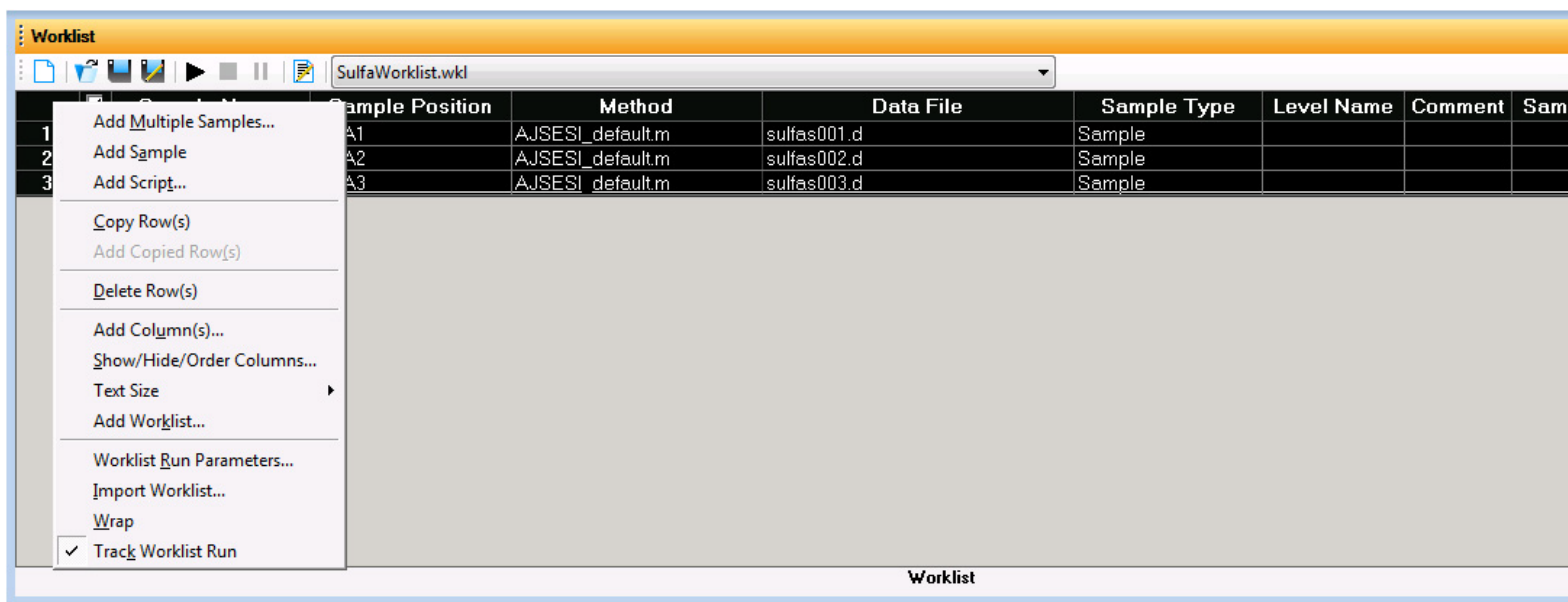
b) V záložce vyberte metodu: ***general_short_positive(400ul).1ul.m***

c) Zapněte všechny komponenty stroje tlačítkem On. Dojde k spuštění všech komponent stroje do aktivního módu, což se projeví zelenou barvou v okně *Instrument Status*.



Krok 4: Nastavení spuštění měření vzorků ve worklistu

- a) Klikněte na *Worklist*
- b) Klepnutím pravým tlačítkem myši do levého horního rohu worklistu zobrazíte následující nabídku.



- c) Klikněte na *Add Multiple Samples*.
- d) Vložte informace do tabulky worklistu, jako je název vzorku, název datového souboru a cestu pro uložení souboru. První řádek worklistu je vždy měření vzorku *Blank* s pozicí vialky 1. Následuje měření vašeho vzorku či sekvence vzorků. Jako poslední je promytí s napíchnutím čistého acetonitrilu ve vialce v pozici 1. Každá akvizice (řádek) se měří cca 15 minut. Přidání řádku ve worklistu provedete klepnutím pravým tlačítkem myši do levého horního rohu worklistu zobrazíte nabídku a zvolíte *Add Sample*.

Poznámka: Doporučuji dát měřit *Blank* vzorek dvakrát. První měření blanku vypláchne zbytky po předchozím měření a druhé měření blanku ekvilibruje stroj.

- e) Uveďte **pozici vzorku** v *Sample Position* (2-99).

| | Sample Name | Sample Position | Method | Data File | Sample Type | Level Name | Inj Vol (µl) | Comment | Sample Group | Info. |
|----|--|-----------------|-----------------------------|----------------------------------|-------------|------------|--------------|---------|--------------|-------|
| 1> | blank20.1.2020 | Vial 1 | general_short_positive(400u | D:\MassHunter\Data\Jindrich\Kasa | Sample | | As Method | | | |
| 2 | PK1069 | Vial 61 | general_short_positive(400u | D:\MassHunter\Data\Jindrich\Kasa | Sample | | As Method | | | |
| 3 | washing | Vial 1 | general_short_positive(400u | D:\MassHunter\Data\Jindrich\Kasa | Sample | | As Method | | | |
| 4 | Script: SCP_PumpsAllOff()\{MH_Acq_Scripts.exe} | | | | | | | | | |

- f) Do posledního řádku vložte požadavek na zastavení pumpy po změření worklistu z důvodu šetření rozpouštědel. Tento úkon provedete klepnutím pravým tlačítkem myši do levého horního rohu worklistu zobrazíte nabídku a zvolíte *Add Script*. A vyberete *SCP_PumpsAllOff*.
- g) Vzorek musí být dokonale rozpuštěný ve vialkách od firmy Agilent (<https://www.agilent.com/store/productDetail.jsp?catalogId=5190-4034>) s víčkem mající septum (<https://www.agilent.com/store/productDetail.jsp?catalogId=5182-0717>). **V žádném případě nepoužívejte jiná septa!!!**



Koncentrace vašeho vzorku se musí pohybovat v rozmezí 10-40 µg/ml. Příprava vzorku: 1 mg vaší látky rozpustíte v 1 ml acetonitrilu z toho vzít 0,01-0,04 ml a rozpustit v 1 ml.

h) Spuštění měření vzorků ve worklistu provedete kliknutím na ikonu ▶

i) Následuje napíchnutí *Blanku* z vialky 1 a jeho měření. Fialová barva u *Sampleru*. Potom pokračuje měření vašich vzorků dle worklistu. Modrá barva u všech součástí stroje.

Instrument Status

Sampler: Injecting (EMF) 1.00 µL Vial 1

Binary Pump: Prerun (EMF) 95.0 5.0 0.400 mL/min 190.62 bar

Column Comp.: Prerun (EMF) 30.00 °C 26.89 °C

VWD: Prerun (EMF) 254 nm

Q-TOF: Prerun (EMF) Dual AJS ESI Standard (S200) 2 GHz, Ext Dyn Range

Actuals

| Parameter | Value |
|----------------------------------|---------------|
| Q-TOF: TOF Vac | 1.65E-07 Torr |
| Q-TOF: Quad Vac | 2.34E-05 Torr |
| Q-TOF: Drying Gas | 8.0 l/min |
| Q-TOF: Error State | - |
| Q-TOF: Ready State | True |
| Q-TOF: Rough Vac | 2.65E+00 Torr |
| Q-TOF: Vaporizer/Sheath Gas Temp | 350 °C |
| Q-TOF: Gas Temp | 300 °C |

Chromatogram Plot

TIC Binary Pump: Pressure VWD: Signal A

Spectrum Pane

UV | UV

mAU x10⁻²

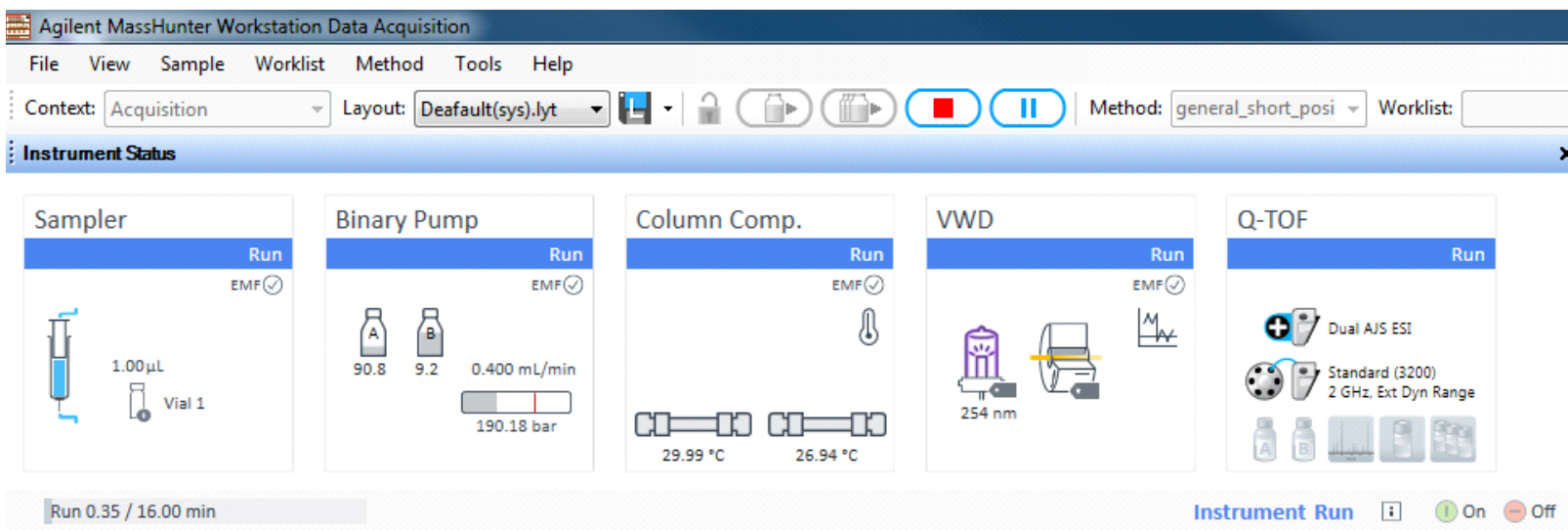
nm

Worklist

| | Sample Name | Sample Position | Method | Data File | Sample Type | Level Name | Inj Vol (µl) | Comment | Sample Group | Info. |
|---|--|-----------------|-----------------------------|--|-------------|------------|--------------|---------|--------------|-------|
| 1 | blank20.1.2020 | Vial 1 | general_short_positive(400u | D:\MassHunter\Data\Jindrich\Kasal\Sample | | | As Method | | | |
| 2 | PK1069 | Vial 61 | general_short_positive(400u | D:\MassHunter\Data\Jindrich\Kasal\Sample | | | As Method | | | |
| 3 | washing | Vial 1 | general_short_positive(400u | D:\MassHunter\Data\Jindrich\Kasal\Sample | | | As Method | | | |
| 4 | Script: SCP_PumpsAll0#0\MH_Acq_Scripts.exe | | | | | | | | | |

Errors and warnings

1. Skipping overlapped injection because High throughput Optimization is not en...
2. Skipping overlapped injection because High throughput Optimization is not en...
3. Skipping overlapped injection because High throughput Optimization is not en...



j) Po skončení měření všech vašich vzorků a závěrečného promytí dojde k automaticky k vypnutí pump.

Krok 5: Analýza změřených dat

Vaše naměřené vzorky můžete analyzovat a hledat příslušné hmoty v programu *Qualitative Analysis*. Tento program naleznete na ploše.

