

Sistema per analisi farmaceutiche PA 800 Plus

Guida allo sviluppo dei metodi



Il presente documento è fornito ai clienti che hanno acquistato le apparecchiature SCIEX come guida per l'uso e il funzionamento. Il presente documento è protetto da copyright e qualsiasi riproduzione, parziale o totale, dei contenuti del presente documento è severamente vietata, salvo il rilascio di un'autorizzazione scritta da parte di SCIEX.

Il software menzionato nel presente documento viene fornito con un contratto di licenza. La copia, le modifiche e la distribuzione del software attraverso qualsiasi mezzo sono vietate dalla legge, salvo diversa indicazione presente nel contratto di licenza. Inoltre il contratto di licenza può vietare che il software venga disassemblato, sottoposto a reverse engineering o decompilato per qualsiasi fine. Le garanzie sono indicate nel presente documento.

Alcune parti di questo documento possono far riferimento a produttori terzi e/o ai loro prodotti, che possono contenere parti i cui nomi siano registrati e/o siano usati come marchi registrati dai rispettivi proprietari. Tali riferimenti mirano unicamente a designare i prodotti di terzi forniti da SCIEX e incorporati nelle sue apparecchiature e non implicano alcun diritto e/o licenza circa l'utilizzo o il permesso concesso a terzi di utilizzare i nomi di tali produttori e/o dei loro prodotti come marchi registrati.

Le garanzie di SCIEX sono limitate alle garanzie espresse fornite al momento della vendita o della licenza dei propri prodotti e costituiscono le uniche ed esclusive dichiarazioni, garanzie e obblighi di SCIEX. SCIEX non concede altre garanzie di nessun tipo, né espresse né implicite, comprese, a titolo esemplificativo, garanzie di commerciabilità o di idoneità per uno scopo particolare, derivanti da leggi o altri atti normativi o dovute a pratiche ed usi commerciali, tutte espressamente escluse, né si assume alcuna responsabilità o passività potenziale, compresi danni indiretti o conseguenti, per qualsiasi utilizzo da parte dell'acquirente o per eventuali circostanze avverse conseguenti.

Solo per scopi di ricerca. Non usare nelle procedure diagnostiche.

AB Sciex opera con il marchio SCIEX.

I marchi registrati menzionati nel presente documento sono di proprietà di AB Sciex Pte. Ltd. o dei rispettivi proprietari.

AB SCIEX™ è utilizzato su licenza.

© 2019 AB Sciex



AB Sciex LLC
500 Old Connecticut Path
Framingham, Massachusetts 01701
USA

CAPITOLO 1: Informazioni sulla guida, 9

Panoramica, 9

Istruzioni per l'uso dei dati di esempio, 10

Scopo di questi file, 11

Uso dei file, 11

CAPITOLO 2: Introduzione all'elettroforesi capillare, 13

Panoramica, 13

Descrizione generale, 13

Modalità comuni di elettroforesi, 14

Elettroforesi di zona capillare (CZE), 14

Cromatografia elettrocinetica micellare (MEKC) su capillare, 14

Elettroforesi su gel capillare (CGE), 14

Isoelettrofocalizzazione o focalizzazione isoelettrica capillare (cIEF), 15

Elettrocromatografia capillare (CEC), 15

Applicazioni supportate, 15

Saggi di purezza/eterogenicità IgG, 15

Analisi del peso molecolare SDS, 15

Analisi di isoelettrofocalizzazione (cIEF), 16

Analisi dei carboidrati, 16

CAPITOLO 3: Panoramica del sistema, 17

Strumento, 17

Sistema di gestione dei campioni, 20

Cartuccia del capillare, 22

Erogazione del fluido, alimentatore e dispositivo di blocco, 24

Pompa a siringa, 24

Alimentatore ad alta tensione, 24

Indicatori LED, 24

Dispositivo di blocco per la cartuccia e per il coperchio dei campioni, 24

Sistema ottico del rilevatore UV, 25
Rilevatore a serie di fotodiodi (PDA), 26
Rilevatore di fluorescenza indotta da laser (LIF), 28
 Modulo laser, 29
 Modulo laser a 488 nm, 29

CAPITOLO 4: Software 32 Karat, 31

Avvio del software, 31
 Barra degli strumenti, 32
 Barra dei menu, 32

Creazione e configurazione di uno strumento, 32
 Creazione di un nuovo strumento, 33
 Configurazione del nuovo strumento, 33
 Configurazione automatica, 35
 Opzioni di configurazione, 38
 Opzioni della scheda General, 38
 Scheda Instrument Options, 39
 Standard CE, 39
 CEC/LC, 39
 Configurazione manuale, 40
 Configurazione manuale del rilevatore UV, 40
 Configurazione manuale dei rilevatori PDA e LIF, 41

CAPITOLO 5: Direct Control, 43

Introduzione, 43

Finestra Direct Control, 43

Esercizio: condizionamento dei capillari, 46

CAPITOLO 6: Creazione e modifica di un metodo, 53

Introduzione, 53

Creazione e modifica di un metodo, 53

Scheda Initial Conditions, 54

Condizioni iniziali del rilevatore, 56
 Scheda UV Detector Initial Conditions, 57
 Electropherogram Channel, 57
 Filter, 57
 Sezioni Relay 1 e Relay 2, 58
 Absorbance Signal, 58

Scheda PDA Detector Initial Conditions, 59
 Electropherogram Scan Data, 59
 Filter, 59
 Sezioni Relay 1 e Relay 2, 60
 Reference Channel, 60
 Absorbance Signal, 60

	Electropherogram Channel Data, 60
	Scheda LIF Detector Initial Conditions, 61
	Sezioni Electropherogram Channel 1 e 2, 61
	Signal, 62
	Data Rate, 62
	Sezioni Relay 1 e Relay 2, 62
	Scheda Time Program, 62
	Eventi di programmazione oraria, 63
	Evento separato, 63
	Evento Rinse, 65
	Evento Inject, 66
	Evento Autozero, 68
	Evento Stop Data, 68
	Evento End, 68
	Creazione di un programma orario, 69
	Salvataggio del metodo, 72
CAPITOLO 7:	Utilizzo del sistema, 75
	Esecuzione singola e con sequenze, 75
	Materiali necessari, 75
	Esecuzione singola, 76
	Programmazione di una sequenza, 78
	Esecuzione della sequenza, 84
	Verifica della sequenza, 85
CAPITOLO 8:	Integrazione, 87
	Descrizione, 87
	Integrazione dei dati, 88
	Ottimizzazione dell'integrazione, 90
	Parametri di integrazione, 91
	Width, 92
	Threshold, 94
	Integrazione di un cluster di picchi, 95
	Disattivazione dell'integrazione, 96
	Risultati e report di integrazione, 98
CAPITOLO 9:	Calibrazione, 99
	Introduzione, 99
	Componenti dell'analisi, 99
	Analisi qualitativa, 99
	Analisi quantitativa, 100

- Creazione di una calibrazione, 100
 - Sviluppo di un metodo di calibrazione, 101
 - Generazione della curva di calibrazione, 104

- Analisi dei campioni sconosciuti, 108

CAPITOLO 10: Analisi qualitativa, 109

- Analisi dei dati e creazione di report, 109

CAPITOLO 11: Mobilità, 113

- Funzioni della mobilità, 113

- Marcatori di mobilità, 114
 - Assegnazione dei valori di mobilità, 114
 - Tracciato della mobilità, 117

- Dimostrazione: utilizzo delle funzioni di mobilità, 118

- Identificazione del picco in base alla mobilità, 120

CAPITOLO 12: Creazione di report, 123

- Introduzione, 123

- Creazione di un report di metodo personalizzato, 124

- Modifica di un modello di report, 124
 - Salvataggio di un report come modello, 128
 - Salvataggio di un report come report predefinito, 129
 - Modelli di report, 129
 - Modelli di report di metodo personalizzati, 129
 - Modelli di report di sequenza personalizzati, 129
 - Modelli di report standard, 130
 - Report di sequenza, 130

APPENDICE A: Risorse aggiuntive, 131

- Help online del software 32 Karat, 131

- Guida all'installazione e alla manutenzione, 131

- Assistenza SCIEX, 131

- Altri riferimenti, 131

APPENDICE B: Calcoli del sistema PA 800 Plus, 133

- Calcoli di elettroforesi capillare, 133

- Legge di Ohm, 133

- Tempo di migrazione corretto, 133

- Area corretta, 134

- Mobilità, 134

[Mobilità apparente](#), 135

[Tensione media applicata](#), 135

APPENDICE C: Informazioni sui dati PDA, 137

[Panoramica](#), 137

[Mixed View](#), 139

[Contour Plot](#), 140

[Spettro](#), 140

[Elettroferogramma](#), 140

[Tracciato 3D](#), 140

APPENDICE D: Amministrazione del sistema, 143

[Panoramica](#), 143

APPENDICE E: Incremento delle fiale, 145

[Introduzione](#), 145

[Esempi di uso](#), 147

[Esempio 1](#), 147

[Esempio 2](#), 150

[Riepilogo](#), 153

APPENDICE F: Report Sequence Vial, 155

[Panoramica](#), 155

[Report Sequence Vial Increment Preview](#), 155

[Report Sequence Vial - Confirmed](#), 157

[Cronologia delle revisioni](#), 165

[Contatti](#), 167

[Formazione clienti](#), 167

[Centro di formazione online](#), 167

[Assistenza SCIEX](#), 167

[Sicurezza informatica](#), 167

[Documentazione](#), 168



Informazioni sulla guida

**ATTENZIONE**

Prima di usare il sistema, consultare la *Guida descrittiva del sistema* per informazioni dettagliate sull'uso e sul funzionamento del sistema in sicurezza.

Panoramica

La *Guida allo sviluppo dei metodi* del sistema PA 800 Plus è un'introduzione autodidattica al funzionamento del sistema per analisi farmaceutiche SCIEX PA 800 Plus, che comprende il software 32 Karat. Contiene una breve introduzione alla tecnica dell'elettroforesi capillare (CE), una panoramica dell'hardware del sistema PA 800 Plus, le esercitazioni per le funzionalità software più usate e appendici con informazioni utili.

La Guida allo sviluppo dei metodi è stata ideata per assistere gli utenti che non hanno familiarità con l'elettroforesi capillare o con il software 32 Karat. Contiene esercizi dettagliati che consentono di creare metodi, generare e analizzare i dati e realizzare report dei risultati. Non descrive ogni caratteristica del sistema o ogni aspetto dell'elettroforesi capillare.

Le attività pratiche sullo strumento contengono istruzioni specifiche per gli utenti con sistemi di rilevazione a raggi ultravioletti (UV), a serie di fotodiodi (PDA) e a fluorescenza indotta da laser (LIF). Le attività sono concepite come progressive: ciascuna si basa sulla precedente. Per ottenere il massimo da questa guida, è necessario svolgere tutte le attività nell'ordine.

Le attività che insegnano come rielaborare, calibrare e creare report dei dati sono tutte basate sui dati raccolti con un sistema di rilevazione a raggi ultravioletti. I passaggi di queste procedure sono molto simili indipendentemente dal tipo di rilevatore utilizzato, quindi questi esercizi sono importanti per gli utenti di tutti i tipi di rilevatore. I file di dati per gli esercizi successivi all'esecuzione vengono installati con il software 32 Karat.

Ulteriori informazioni sono disponibili nell'Help online del software 32 Karat. È possibile accedervi in qualsiasi momento durante l'uso del software 32 Karat. È possibile accedere alla Guida tramite il menu Help situato nella barra dei menu, premendo il tasto F1 mentre si lavora con il software o ogni volta che viene visualizzato un pulsante Help in una finestra dell'applicazione.

Istruzioni per l'uso dei dati di esempio

In alcuni esercizi di questa guida, viene richiesto di aprire file di dati e metodi specifici. Questi si trovano nella cartella Data, che è una sottodirectory della cartella 32 Karat creata al momento dell'installazione del software.

IMPORTANTE Prima di utilizzare i file di dati di esempio, leggere attentamente quanto segue.

La cartella dei dati contiene i seguenti file:

- CE Data Sample 1.dat
- CE Data Sample 2.dat
- CE Data Sample 3.dat
- CE Level 1.dat
- CE Level 2.dat
- CE Level 3.dat
- CE Level 4.dat
- CE Level 5.dat
- CE Mobility Data.dat
- CE PDA Data Sample.dat
- CE Unknown 1.dat
- ISTD Calib Level 1 Rep 1.dat
- ISTD Calib Level 1 Rep 2.dat
- ISTD Calib Level 2 Rep 1.dat
- ISTD Calib Level 2 Rep 2.dat
- ISTD Calib Level 3 Rep 1.dat
- ISTD Calib Level 3 Rep 2.dat
- ISTD Calib Level 4 Rep 1.dat
- ISTD Calib Level 4 Rep 2.dat
- multi calibration level 1.dat
- multi calibration level 2.dat
- multi calibration level 3.dat
- multi calibration level 4.dat
- multi calibration level 5.dat
- multi calibration level 6.dat

La cartella dei metodi contiene i seguenti file:

- CE calibrate.met
- multilevelcalibration.met
- pda estd.met

Scopo di questi file

La cartella dei dati contiene file di dati e di metodi utili per completare gli esercizi contenuti in questa guida. I file sono stati creati esclusivamente per gli scopi di questa guida. Sono destinati solo alla formazione e non devono essere utilizzati per la convalida del sistema o per altri scopi.

Uso dei file

Nella guida, i file sono indicati per nome. Per alcuni esercizi, può essere necessario aprire uno o più file. Usando questi file, le immagini prodotte dal software corrisponderanno a quelle della guida.

IMPORTANTE Prima dell'uso, creare copie di questi file.

L'elaborazione di questi file di dati e metodi nel software 32 Karat determina modifiche ai file.

Per mantenere i file originali inalterati e disponibili per l'uso successivo in questi esercizi, attenersi alla procedura riportata di seguito.

- 1 Aprire Esplora risorse. Per aprire questa utilità, fare clic con il pulsante destro del mouse sul pulsante **Start** della barra degli strumenti di Windows e fare clic su **Esplora file**.
- 2 Accedere alla cartella Data. Si tratta di una sottodirectory della cartella del software 32 Karat.
- 3 Nel riquadro sinistro della finestra di esplorazione, fare clic sulla cartella Data per aprirla.
- 4 Nella barra dei menu, fare clic su **File > New > Folder**. Una nuova cartella viene aggiunta alla cartella Data. Viene evidenziata la voce New Folder, che indica che il nome può essere modificato. Digitare il nuovo nome. Può essere utile scegliere il nome della persona che eseguirà gli esercizi del tutorial.
- 5 Selezionare tutti i file di dati elencati in precedenza, ma non selezionare la nuova cartella. Esistono diversi modi per selezionare più file.
Usare uno di quelli indicati di seguito:
 - Selezionare il primo file nell'elenco facendo clic su di esso. Tenere premuto il tasto MAIUSC e fare clic sull'ultimo file dell'elenco. Tutti i file compresi tra questi vengono selezionati.
 - Selezionare un file facendo clic su di esso. Tenere premuto il tasto **Ctrl** e fare clic sui singoli file dell'elenco.
 - Con il mouse, è possibile fare clic e trascinare un riquadro intorno a tutti i file da selezionare.
- 6 Quando tutti i file sono selezionati (evidenziati), fare clic su **Edit > Copy**. Fare doppio clic sulla nuova cartella per aprirla. Quindi fare clic su **Edit > Paste**. Ripetere i passaggi da 1 a 6 per la cartella dei metodi.

È stata creata una copia dei file di esempio in una nuova cartella. Quando la guida richiede di aprire un file, aprire la copia appena creata e non il file originale.

Salvare in questa nuova cartella tutti i metodi e le sequenze create come parte dell'esercitazione.

Introduzione all'elettroforesi capillare

Panoramica

Questa sezione descrive le modalità comuni dell'elettroforesi capillare e il modo in cui questi processi vengono eseguiti dallo strumento PA 800 Plus mediante i rilevatori a raggi ultravioletti (UV), a serie di fotodiodi (PDA) e a fluorescenza indotta da laser (LIF).

Descrizione generale

Il sistema PA 800 Plus separa i componenti del campione in un capillare di silice fusa, usando una delle varie modalità di elettroforesi. Tutte queste modalità sono generalmente note come elettroforesi capillare (CE).

Nel sistema PA 800 Plus, il campione viene iniettato nel capillare mediante l'applicazione di una pressione, del vuoto o di una tensione. Sotto l'influenza di un campo elettrico, i componenti del campione migrano in modo differenziale attraverso il capillare.

Esistono due metodi di base per individuare i campioni con l'elettroforesi capillare. Il primo è l'assorbanza della luce, usato nel rilevamento UV e PDA. Quando i componenti passano lungo una finestra del capillare, un singolo rilevatore UV di lunghezza d'onda o un rilevatore a serie di fotodiodi a più lunghezze d'onda (PDA) misura l'assorbanza e trasmette il segnale al computer. Il segnale può anche essere trasmesso a un registratore, a un integratore o a un sistema dati esterno attraverso un'uscita analogica. Il segnale può essere tracciato graficamente sotto forma di elettroferogramma per essere analizzato.

Il secondo metodo consiste nell'indurre la fluorescenza nei campioni e misurare la luce emessa. Ciò avviene mediante fluorescenza indotta da laser (LIF). In tal modo, le sostanze presenti nel capillare vengono rilevate mediante la reazione di fluorescenza alla lunghezza d'onda del laser. Il rilevatore LIF misura e registra la fluorescenza, che appare come un picco nella finestra del computer o sulla stampa dell'elettroferogramma.

Il sistema PA 800 Plus consente di separare molti tipi di campioni diversi, inclusi peptidi, proteine, acidi nucleici, ioni, enantiomeri e prodotti farmaceutici. Rispetto ad altre tecniche analitiche, l'elettroforesi capillare ha requisiti molto bassi per i campioni (50 µL, con il volume di iniezione effettivo generalmente compreso tra 5 nL e 50 nL). Rappresenta un'alternativa complementare ad altre tecniche di separazione quali la cromatografia.

Modalità comuni di elettroforesi

Elettroforesi di zona capillare (CZE)

Quando si applica una tensione a un tubo capillare di silice fusa non rivestito, riempito con una soluzione di elettroliti uniforme, ha luogo una separazione di specie cariche dovuta alla migrazione differenziale nel campo elettrico. Questo processo, in cui le particelle cariche nella soluzione migrano verso l'elettrodo con carica opposta, è chiamato elettroforesi. Se viene caricata anche la parete interna del capillare, il fluido all'interno del capillare si dirige verso l'elettrodo con la stessa carica della parete capillare. Questo movimento di massa del fluido è denominato flusso elettroosmotico o EOF.

Poiché l'entità del flusso EOF è solitamente superiore rispetto all'elettroforesi, gli analiti con entrambe le cariche elettriche vengono trasportati nella stessa direzione, anche se a velocità differenti. L'elettroforesi consente di separare l'uno dall'altro gli analiti con carica simile, ma altrimenti differenti. In questo modo, le molecole di analiti cariche sia positivamente che negativamente possono essere rilevate mentre passano accanto al rivelatore. La direzione del flusso EOF può essere modificata invertendo la carica degli elettrodi oppure modificando la carica della parete del capillare con mezzi chimici.

La quantità di tempo necessaria per la migrazione delle molecole del campione fino al rivelatore dipende dalla lunghezza del capillare, dalla mobilità elettroforetica delle molecole del campione, dallo specifico elettrolita usato, dall'entità dell'EOF e dalla tensione applicata. Molecole con una diversa mobilità elettroforetica vengono rilevate in momenti diversi. Altri fattori da considerare sono la dimensione, la forma e la carica delle particelle, la concentrazione di elettrolita, il pH del tampone di separazione e le dimensioni del capillare.

Cromatografia elettrocinetica micellare (MEKC) su capillare

Nell'elettroforesi capillare in fase libera, le molecole neutre viaggiano come banda singola. Per separare queste molecole, è possibile aggiungere alla soluzione di elettrolita additivi micellari come sodio dodecil solfato (SDS). In queste condizioni, durante l'elettroforesi, si separano molecole neutre con affinità differenti per le micelle caricate.

Elettroforesi su gel capillare (CGE)

Nelle tecniche descritte sopra, le molecole di analita si muovono in un liquido a bassa viscosità. Aumentando la viscosità di questo mezzo al punto in cui la migrazione delle molecole venga fisicamente impedita, è possibile separare specie differenti in base alla dimensione e alla forma, nonché alla carica. Per questa tecnica, è possibile impiegare una varietà di soluzioni gel.

Isoelettrofocalizzazione o focalizzazione isoelettrica capillare (cIEF)

Nella cIEF, una miscela di tamponi speciali chiamati anfiliti viene usata per creare un gradiente di pH lungo la lunghezza del capillare. Durante la separazione, le molecole migrano nel gradiente di pH verso il punto nel quale non hanno carica netta. Al termine del processo, i vari analiti vengono a trovarsi in zone discrete del capillare. In una fase di mobilizzazione separata, le bande vengono spostate prima del rilevatore per l'analisi. Questa tecnica viene spesso usata per l'analisi di proteine e peptidi.

Elettrocromatografia capillare (CEC)

Nella cromatografia CEC si usa un capillare impaccato con particelle porose simili a quelle usate nella cromatografia HPLC. Guidati dal flusso EOF, gli analiti si dividono tra fasi mobili e stazionarie mentre migrano lungo il capillare. In alcune condizioni, l'elettroforesi può anche partecipare alla separazione. La cromatografia CEC viene usata principalmente per separare molecole piccole quali quelle dei farmaci.

Applicazioni supportate

Saggi di purezza/eterogenicità IgG

Il saggio di purezza/eterogenicità IgG include metodi per risolvere le immunoglobuline, sia ridotte che non ridotte, in base alla dimensione e per quantificare successivamente l'eterogeneità e le impurità eventualmente presenti in una data preparazione IgG. La metodologia comporta la denaturazione termica di una concentrazione specifica di proteina in presenza di SDS. Una volta denaturato, il campione viene separato per dimensioni in un capillare contenente una matrice polimerica SDS sostituibile, che fornisce la selettività di setacciatura per la separazione.

Analisi del peso molecolare SDS

L'elettroforesi capillare (CE) è diventata un'efficace alternativa ai processi manuali di elettroforesi su gel in laboratorio grazie alle sue caratteristiche di automazione, quantificazione, velocità ed elevata efficienza. Molte biomolecole, quali proteine e acidi nucleici, vengono separate mediante elettroforesi a setacciatura molecolare usando matrici in gel, con un metodo chiamato elettroforesi su gel capillare (CGE). La separazione deriva dalla migrazione differenziale dell'analita attraverso la matrice in gel. In questo caso, le molecole più piccole si muovono attraverso il gel di separazione più velocemente rispetto alle molecole più grandi. Per i polipeptidi e le proteine, è necessario denaturare il campione in presenza di SDS, un detergente anionico che lega le proteine in un rapporto costante di 1:1,4 di proteina. La proprietà massa-carica costante delle proteine legate all'SDS consente la separazione secondo le differenze del peso molecolare della proteina.

Il saggio di analisi SDS-MW è progettato per la separazione di complessi proteina-SDS mediante una matrice in gel sostituibile. Il gel viene formulato per offrire un intervallo di setacciatura efficace compreso tra 10 kDa e 225 kDa circa. All'interno di questo intervallo di dimensioni, il logaritmo della massa molecolare della proteina è direttamente proporzionale all'inverso della mobilità elettroforetica. Il peso molecolare di una proteina sconosciuta può essere stimato in base a una curva standard di dimensioni proteiche note. Questo kit è in grado di quantificare la quantità di proteina e di calcolare la purezza di un prodotto proteico.

Analisi di isoelettrofocalizzazione (cIEF)

L'isoelettrofocalizzazione (IEF) viene usata per la separazione delle proteine sulla base delle differenze dei punti isoelettrici. Il metodo IEF viene realizzato mediante elettroforesi di proteine o peptidi attraverso un gradiente di pH stabile fino a raggiungere il pH equivalente al punto isoelettrico (pI), in cui la carica netta e la mobilità sono pari a zero.

Il punto isoelettrico (pI) di una proteina sconosciuta si può calcolare dal tracciato di calibrazione del tempo di migrazione dei marcatori pI interni rispetto ai pI noti. Pertanto, oltre a fornire separazione ad alta risoluzione, il saggio può essere usato per una vasta gamma di screening (pI 4-10) e di identificazioni pI di proteine e peptidi.

Analisi dei carboidrati

Il saggio di analisi e marcatura dei carboidrati separa e quantifica gli oligosaccaridi rilasciati dalle glicoproteine.

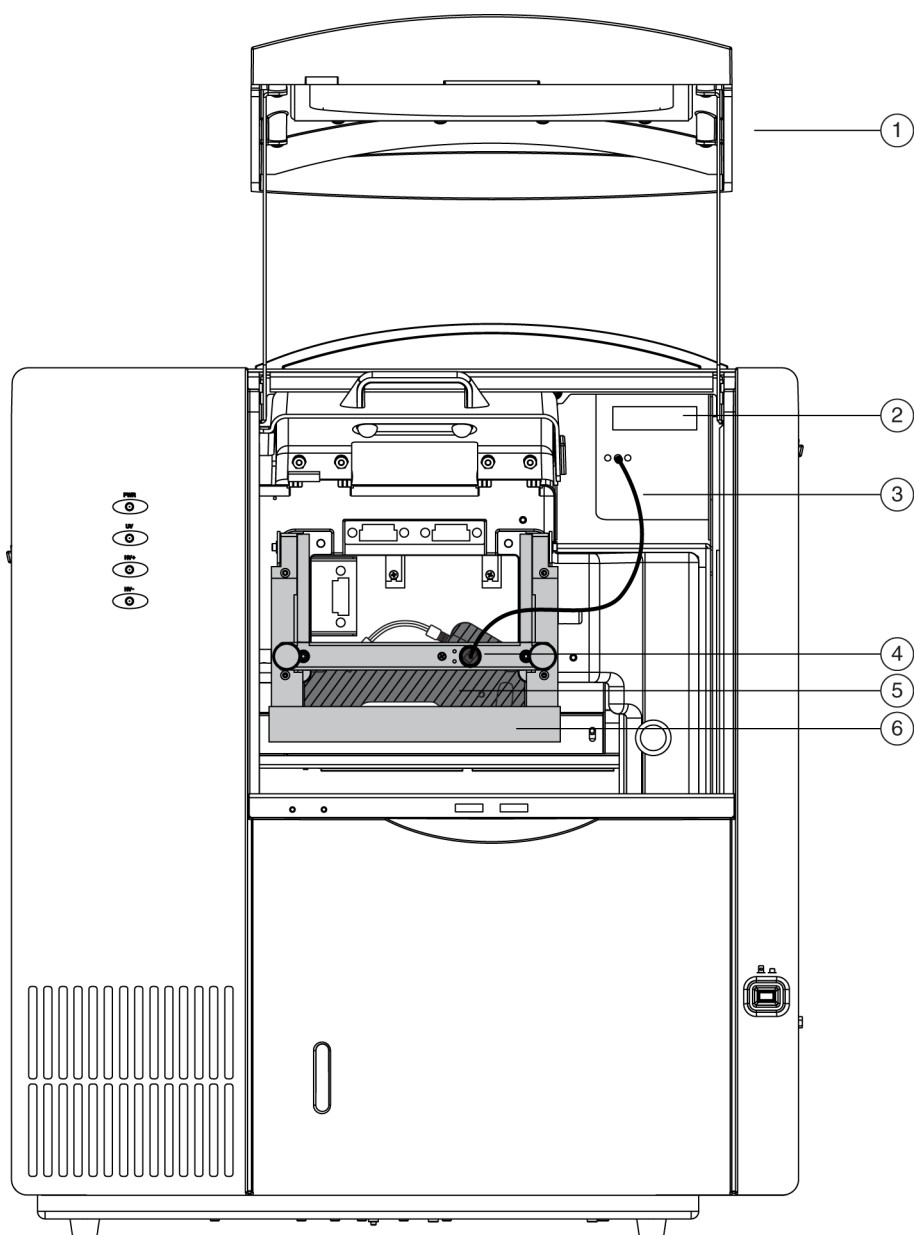
Il saggio contiene i reagenti, il tampone e i capillari rivestiti necessari per marcare, separare e quantificare gli oligosaccaridi. Questo saggio fornisce anche un marcatore della dimensione del glucosio per la determinazione della dimensione relativa e uno standard di maltosio per la quantificazione e la caratterizzazione della mobilità degli oligosaccaridi rilasciati.

Panoramica del sistema

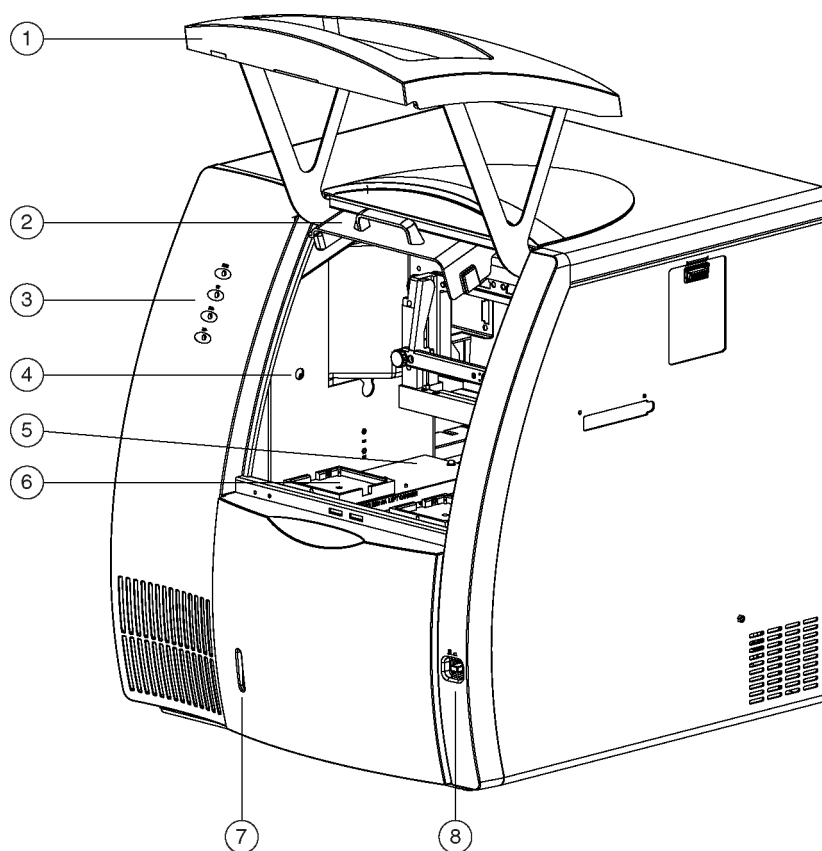
Strumento

I componenti principali del sistema per analisi farmaceutiche PA 800 Plus includono vassoi che contengono le fiale di campione, di tampone e di altre soluzioni, un blocco di interfaccia, un alimentatore ed elettrodi ad alta tensione, un modulo e un rilevatore ottico, l'hardware di controllo della temperatura e un meccanismo di iniezione del campione ([Figura 3.1](#), [Figura 3.2](#) e [Figura 3.3](#)).

Figura 3.1 Sistema PA 800 Plus



- | | |
|--|---------------------------------------|
| 1. Porta esterna (aperta) | 4. Barra morsetti e collegamento cavi |
| 2. Rilevatore UV | 5. Cartuccia del capillare |
| 3. Cavo in fibra ottica con due terminazioni | 6. Blocco di interfaccia |

Figura 3.2 Vista laterale del sistema PA 800 Plus

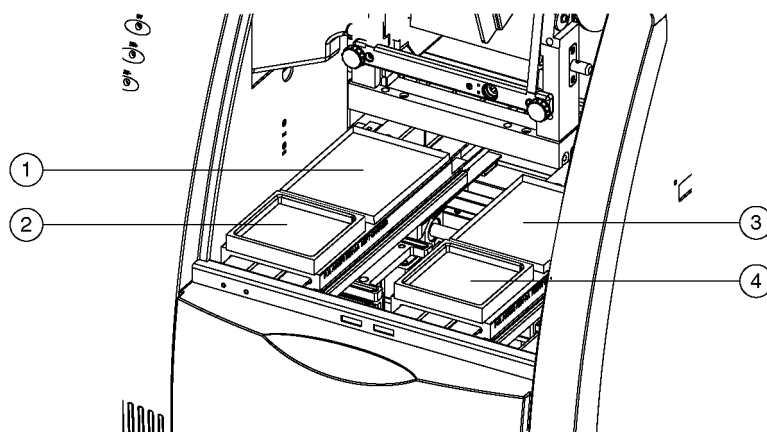
- | | |
|---|-------------------------------------|
| 1. Sportello esterno o coperchio dei campioni (aperto) | 4. Porta di rifornimento del fluido |
| 2. Sportello interno o coperchio della cartuccia (aperto) | 5. Vassoi per campioni |
| 3. Indicatori | 6. Vassoi per tamponi |
| | 7. Indicatore di bolle per i fluidi |
| | 8. Interruttore di alimentazione |

L'interruttore di alimentazione principale si trova sul lato inferiore destro della parte anteriore dello strumento. Tutti i collegamenti dei componenti esterni del sistema si trovano nella parte superiore del pannello laterale sinistro dello strumento, ad eccezione dell'ingresso CA e del portafusibili. Tre ventole convogliano il flusso dell'aria di raffreddamento ai componenti interni del sistema. L'aria viene scaricata attraverso gli sfiati laterale e posteriore dello strumento. Mantenere almeno 15 centimetri di spazio libero davanti a ogni sfiato per assicurare un flusso d'aria adeguato.

Sistema di gestione dei campioni

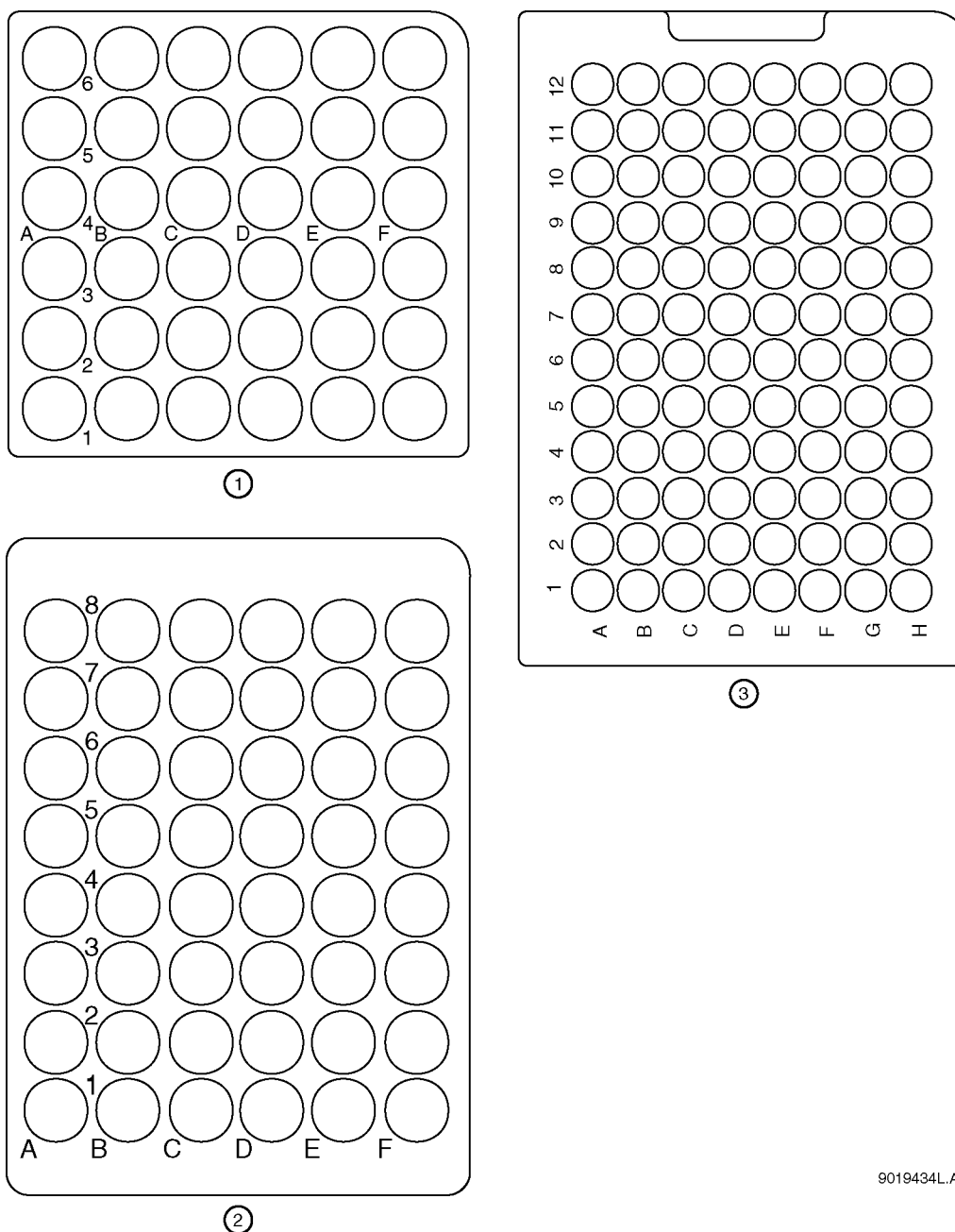
Il sistema di gestione dei campioni comprende quattro vassoi: due vassoi per campioni (ingresso e uscita) e due vassoi per tamponi (ingresso e uscita). I vassoi per campioni sono usati principalmente per i campioni; i vassoi per tamponi contengono le altre soluzioni necessarie per l'elettroforesi (ad esempio soluzioni tampone e di lavaggio). I vassoi si trovano su due guide parallele. Nelle normali condizioni operative, i vassoi sulla sinistra sono vassoi di ingresso per il campione e il tampone; i vassoi sulla destra sono quelli di uscita per il campione ed il tampone (Figura 3.3).

Figura 3.3 Vassoi del sistema PA 800 Plus



- | | |
|---|---|
| 1. Vassoio di ingresso per campioni (48)
o per piastra a 96 pozzetti | 3. Vassoio di uscita per campioni (48) o per piastra
a 96 pozzetti |
| 2. Vassoio di ingresso per tamponi
(per 36 fiale) | 4. Vassoio di uscita per tamponi (per 36 fiale) |

Ogni vassoio per tamponi presenta fessure per contenere 36 fiale universali. I vassoi per campioni possono contenere 48 fiale o una piastra a 96 pozzetti. A ciascun vassoio viene assegnato un numero crescente dal lato anteriore a quello posteriore, a partire da 1, e una lettera da sinistra a destra, a partire dalla lettera A (Figura 3.4).

Figura 3.4 Vassoi per campioni e per tamponi

9019434L.AI

1. Vassoio per tamponi
2. Vassoio per campioni da 48 fiale per fiale universali con o senza supporto per microfiale
3. Vassoio per campioni da 96 posti



AVVERTENZA

Il sistema per analisi farmaceutiche PA 800 Plus non è progettato per contenere materiali volatili in piastre a 96 pozzetti. I solventi volatili possono rilasciare vapori pericolosi o infiammabili che possono provocare incendi o esplosioni. I vapori di solvente possono danneggiare lo strumento. Non utilizzare solventi volatili nelle piastre a 96 pozzetti.



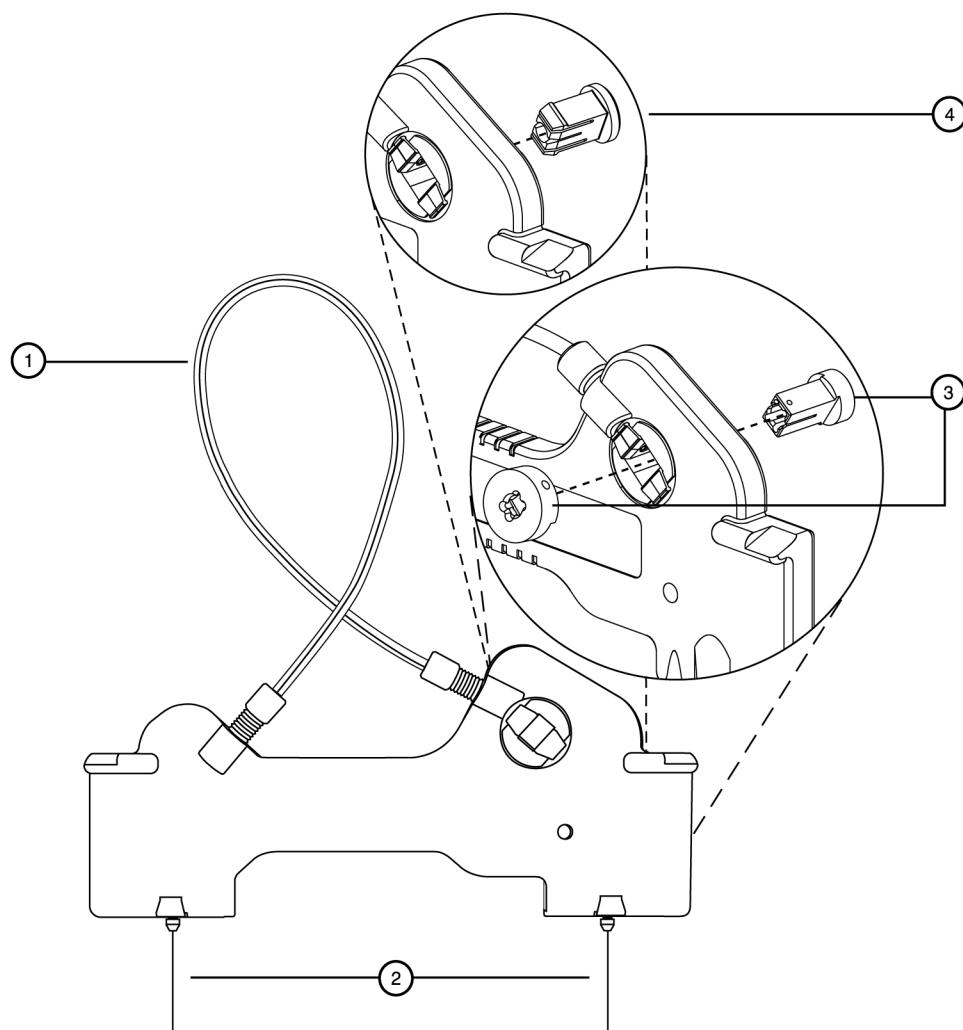
AVVERTENZA

Quando si apre il coperchio dei campioni e le fiale sono pressurizzate indossare occhiali di protezione.

Le fiale universali sono pressurizzate durante gli eventi di risciacquo e di separazione a pressione. Per ridurre il rischio di rotture e di particelle espulse, utilizzare solo fiale SCIEX (codice A62251) e controllare ogni fiala per rilevare eventuali danni prima dell'uso. Non utilizzare per nessun motivo fiale incrinates o danneggiate.

Cartuccia del capillare

Il capillare di separazione è installato in una cartuccia. Il design della cartuccia protegge il capillare, fornisce un percorso al liquido di raffreddamento, semplifica l'installazione nello strumento e consente di allineare la finestra di rilevamento delle lenti. I componenti della cartuccia sono illustrati nella [Figura 3.5](#).

Figura 3.5 Cartuccia del capillare

- | | |
|---|---|
| 1. Tubo del liquido di raffreddamento con capillare interno | 3. Finestra del rilevatore e apertura - Rilevatore LIF |
| 2. Guarnizione doppia | 4. Finestra del rilevatore e apertura - Rilevatori UV e PDA |

La finestra del rilevatore è un'area del capillare in cui il rivestimento di poliimmide viene rimosso per mostrare la silice fusa trasparente. Quest'area del capillare si trova in una parte della cartuccia contenente una spina che collega la finestra al sistema ottico. Un tipo di spina è usato per i rilevatori UV e PDA, mentre un altro è usato per i rilevatori LIF. Per installare un capillare nella cartuccia, fare riferimento alla *Guida alla manutenzione del sistema* o alle relative procedure.

La temperatura del capillare viene controllata mediante un liquido inerte che circola nella cartuccia. La temperatura è controllata in un intervallo da 10 °C al di sotto della temperatura ambiente (con un minimo di 15 °C) a 60 °C. Il liquido di raffreddamento fluisce nella cartuccia attraverso due aperture sul fondo dell'involucro che si trovano tra le estremità del capillare. Il fluido rimuove il calore generato dall'elettroforesi.

Erogazione del fluido, alimentatore e dispositivo di blocco

Pompa a siringa

Il sistema PA 800 Plus è in grado di generare pressioni grazie al meccanismo a pompa interno. La pompa può fornire da 0,1 psi a 25 psi per eseguire iniezioni a pressione o mobilitazioni a bassa pressione. La pompa può spostare i fluidi nel capillare con una pressione massima di 100 psi. Le iniezioni a vuoto possono essere eseguite da 0,1 psi a 5,0 psi. La pressione può essere applicata contemporaneamente su entrambe le estremità del capillare per impedire il degassamento dei gel.

Alimentatore ad alta tensione

L'alimentatore ad alta tensione può fornire un massimo di 30 kV con una corrente massima di 300 μ A. L'intervallo di tensione va da 1 kV a 30 kV con incrementi di 100 V. La polarità è configurata via software. L'intervallo di corrente va da 3,0 μ A a 300 μ A con incrementi di 0,1 μ A. Il software consente di selezionare corrente, tensione o potenza. Durante il funzionamento, il sistema aumenta la tensione o la corrente fino al valore programmato. Per proteggere il capillare è possibile immettere limiti di tensione, corrente e potenza. Ad esempio, se l'utente programma un'impostazione di tensione di 30 kV, ma l'impostazione per la corrente è solo 3,0 μ A, il sistema è in grado di raggiungere il limite impostato per la corrente prima di raggiungere l'impostazione di tensione e di controllare la tensione per mantenere la corrente.

Indicatori LED

Il pannello anteriore dello strumento presenta indicatori LED per l'alimentazione, la luce UV e l'alta tensione ([Figura 3.2](#)).

Dispositivo di blocco per la cartuccia e per il coperchio dei campioni

Gli sportelli incernierati dello strumento PA 800 Plus sono dotati di sensori con dispositivo di blocco che impediscono accessi non autorizzati all'interno dello strumento. La porta esterna è chiamata coperchio dei campioni; la seconda porta interna è chiamata coperchio della cartuccia ([Figura 3.2](#)).

L'apertura del coperchio dei campioni:

- arresta immediatamente qualsiasi movimento dei vassoi;
- impedisce l'esecuzione di eventi programmati che richiedano il movimento dei vassoi;
- interrompe un metodo quando viene rilevata una fase che richiede il movimento di un vassoio.

L'apertura del coperchio della cartuccia:

- disattiva l'alta tensione se è accesa;
- spegne la pompa che fa circolare il refrigerante del capillare;
- sposta il disco portafiltri del rilevatore sulla posizione chiusa.

Sistema ottico del rilevatore UV

Il sistema ottico UV comprende una sorgente di luce ultravioletta, filtri di lunghezza d'onda, un'apertura, un capillare e un rilevatore di fotodiodi, come illustrato nella [Figura 3.6](#).

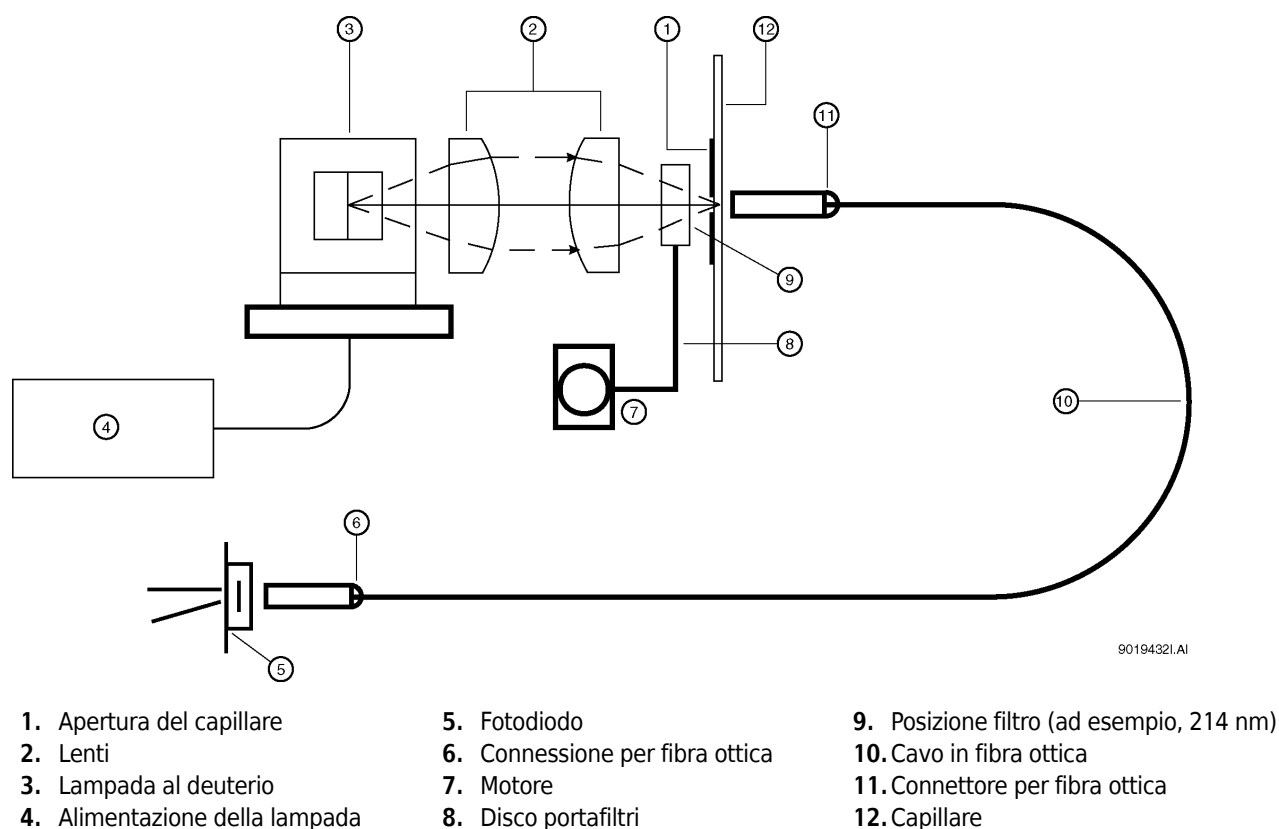
La sorgente UV è una lampada al deuterio con un range di lunghezze d'onda compreso tra 190 nm e 600 nm. Due lenti mettono a fuoco e dirigono la luce della lampada attraverso uno dei filtri di selezione della lunghezza d'onda situati nel disco portafiltri che si trova dietro la cartuccia del capillare. Il fascio attraversa l'apertura nella spina della cartuccia e passa attraverso una sezione del capillare appositamente trattata per rimuovere il rivestimento di poliimmide (finestra di rilevazione). Il fascio non assorbito prosegue poi attraverso un cavo a fibra ottica fino a un fotodiodo. Il segnale luminoso viene convertito in un segnale elettrico, digitalizzato, e inviato alla workstation 32 Karat per l'elaborazione ad opera del software. Questo segnale è disponibile anche come uscita analogica attraverso una connessione sul lato sinistro dello strumento.

Il design dello strumento garantisce l'allineamento del sistema ottico. Non è necessario che l'utente effettui allineamenti.

Nel disco portafiltri UV sono presenti otto posizioni. I sistemi di rilevazione UV vengono forniti con quattro filtri standard: 200 nm, 214 nm, 254 nm e 280 nm (larghezza di banda di 10 nm). I filtri sono installati rispettivamente nelle posizioni 2, 3, 4 e 5 del disco portafiltri. La posizione 1 è opaca e ha funzione di otturatore per il sistema di rilevamento.

Per ottenere altre lunghezze d'onda è possibile collocare filtri appropriati nelle posizioni 6, 7 e 8. Se lo si desidera, è possibile sostituire i filtri standard. Se lo strumento viene utilizzato con un rilevatore PDA, la posizione 8 deve essere lasciata aperta (senza filtro). Il disco portafiltri può contenere filtri del diametro di ½ pollice (12,7 mm) con lunghezze d'onda comprese tra 190 nm e 600 nm.

Figura 3.6 Layout dell'ottica UV



Rilevatore a serie di fotodiodi (PDA)

Il rilevatore a serie di fotodiodi, analogamente al rilevatore UV, usa l'assorbanza della luce per rilevare la presenza di campioni durante il passaggio attraverso la finestra di rilevazione. A differenza del rilevatore UV, il rilevatore PDA può eseguire l'analisi spettrale dei campioni.

Il rilevatore PDA utilizza la stessa configurazione della cartuccia del rilevatore UV. Per una descrizione della cartuccia fare riferimento alla *Guida alla manutenzione del sistema*.

Nel rilevamento PDA, il capillare viene illuminato dall'intero spettro luminoso proveniente dalla lampada al deuterio (Figura 3.7). La luce non assorbita dai campioni viene inviata, mediante un cavo in fibra ottica, ad un reticolo che suddivide la luce in uno spettro luminoso, proiettato su una serie di 256 fotodiodi. Grazie a questo design, è possibile misurare il profilo di assorbanza del campione. Il rilevatore PDA consente inoltre di misurare contemporaneamente diverse lunghezze d'onda discrete della luce. La serie di fotodiodi converte il segnale luminoso in un segnale elettrico. Il segnale elettrico viene digitalizzato e inviato alla workstation 32 Karat per l'elaborazione ad opera del software.

Il rilevatore PDA utilizza sempre la posizione 8 del disco portafiltri. Quando si utilizza il rilevatore PDA, è essenziale che nella posizione 8 non sia presente alcun filtro.

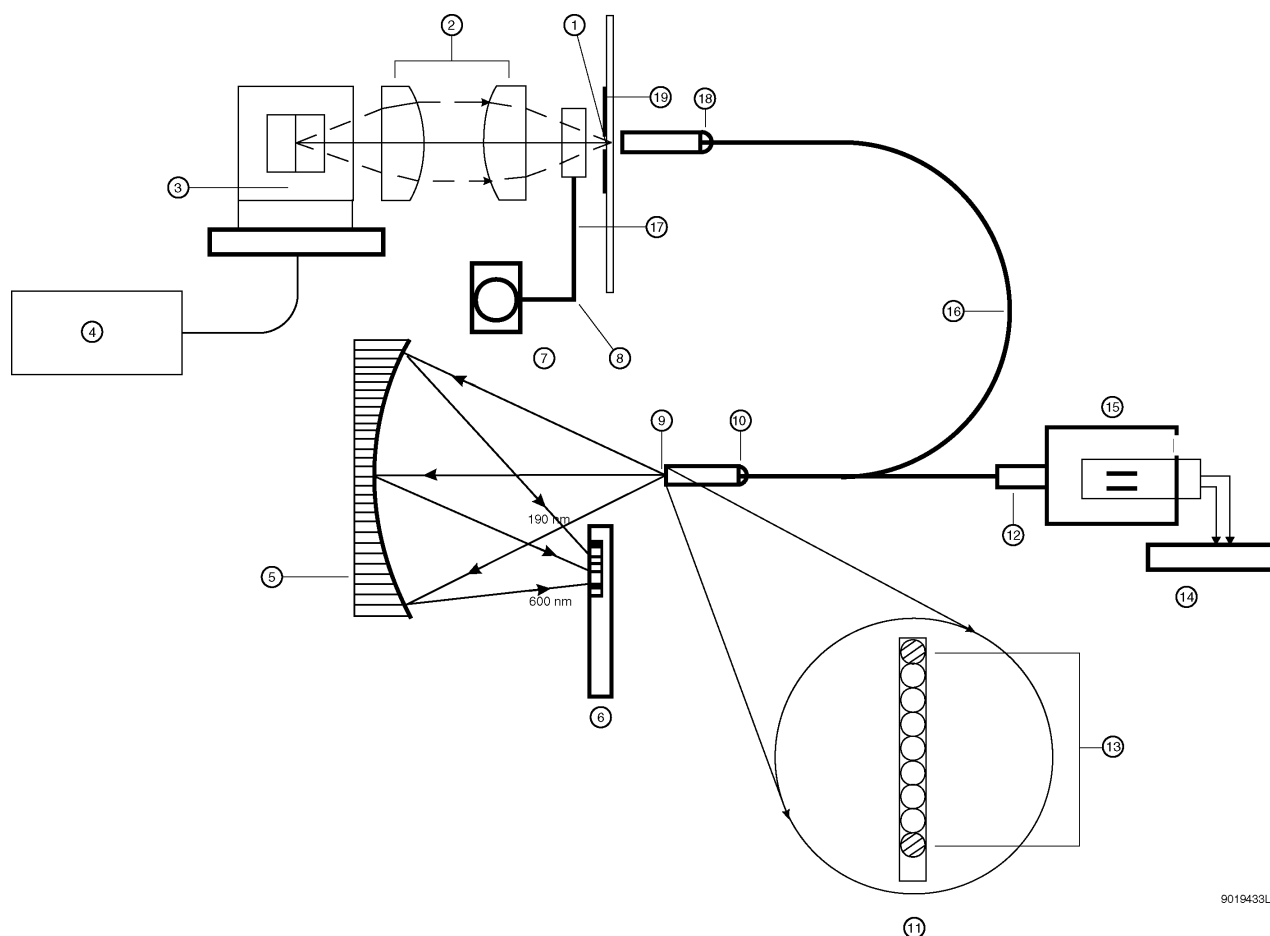
Il rilevatore PDA è calibrato utilizzando bande di emissione discreta delle lunghezze d'onda generate da una lampada a mercurio. La lampada a mercurio rappresenta una parte importante del sistema di rilevamento. Quando richiesto dall'utente, la calibrazione viene eseguita automaticamente.



AVVERTENZA

Non smaltire la lampada a mercurio con i rifiuti generici. Il mercurio è un materiale pericoloso e deve essere smaltito in conformità alle leggi locali, statali e comunitarie.

Figura 3.7 Layout dell'ottica della serie di diodi



9019433L.A1

- | | | |
|----------------------------------|---|--|
| 1. Apertura del capillare | 8. Disco portafiltri | 14. Alimentatore per lampada al mercurio |
| 2. Lenti | 9. Fessura di ingresso del monocromatore | 15. Lampada al mercurio |
| 3. Lampada al deuterio | 10. Connettore per fibra ottica | 16. Cavo in fibra ottica a Y |
| 4. Alimentazione della lampada | 11. Serie di 9 fibre da 200 μ m (fenditura) | 17. Disco portafiltri con posizione 8 aperta |
| 5. Reticolo olografico concavo | 12. Connettore per fibra ottica | 18. Connettore per fibra ottica |
| 6. Serie di diodi a 256 elementi | 13. Fibre di calibrazione al mercurio | 19. Capillare |
| 7. Motore | | |

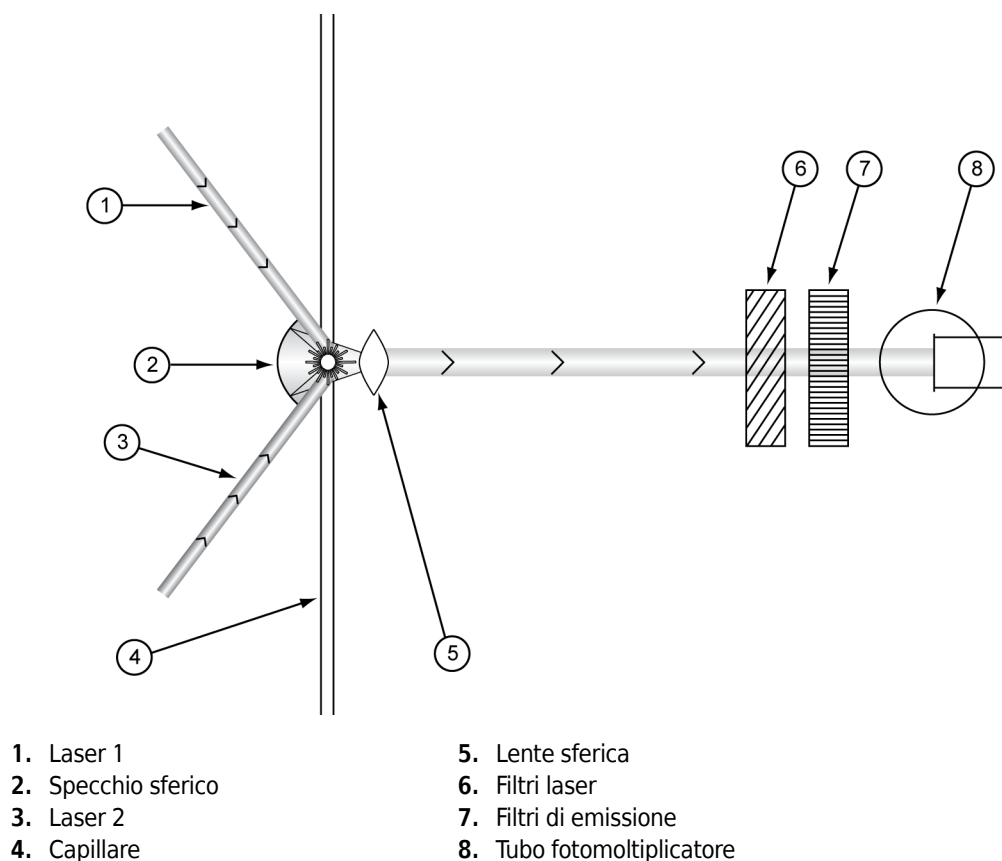
Rilevatore di fluorescenza indotta da laser (LIF)

Il rilevatore LIF è composto dal modulo rilevatore LIF e da un modulo laser. Per questo sistema è necessaria una cartuccia capillare PA 800 Plus con spina di rilevamento LIF installata.

Il rilevatore LIF utilizza una sorgente integrata di luce laser a 488 nm. Il cavo in fibra trasmette l'eccitazione luminosa dal laser al capillare della cartuccia. In tal modo, le sostanze presenti nel capillare vengono rilevate mediante la reazione di fluorescenza alla lunghezza d'onda del laser. Il rilevatore LIF misura e registra la fluorescenza, che appare come un picco sull'elettroferogramma. Per maggiori informazioni sul sistema LIF, fare riferimento alla *Guida alla manutenzione del sistema*.

L'installazione iniziale del rilevatore LIF viene eseguita da un responsabile dell'assistenza tecnica SCIEX. Il passaggio tra la modalità LIF e UV/PDA del sistema PA 800 Plus è agevole perché i componenti del rilevatore sono modulari. Fare riferimento alla [Figura 3.8](#) per un diagramma stilizzato del sistema ottico LIF.

Figura 3.8 Sistema ottico LIF



Modulo laser

La sezione seguente descrive il modulo laser da 488 nm e la relativa modalità di interfaccia con lo strumento PA 800 Plus e il rivelatore LIF.

AVVERTENZA

Durante il normale funzionamento del rivelatore LIF, la luce laser non è accessibile all'utente. Per evitare l'emissione di luce laser potenzialmente dannosa dall'estremità del cavo in fibra ottica, il dispositivo di blocco disattiva il laser se il cavo laser in fibra ottica viene scollegato dal modulo di interconnessione o se viene aperto il coperchio della cartuccia.

Prima di rimuovere uno qualsiasi dei moduli del sistema LIF, spegnere sempre lo strumento PA 800 Plus.

Modulo laser a 488 nm

Il laser SCIEX a 488 nm è un laser allo stato solido montato all'interno dello strumento. È dotato di un connettore per la fibra e di un connettore con dispositivo di blocco elettrico per il collegamento di un laser esterno, accessibile dal lato destro dello strumento. La connessione per laser esterno consente di utilizzare per il rilevamento LIF una sorgente laser esterna con accoppiamento in fibra ottica.



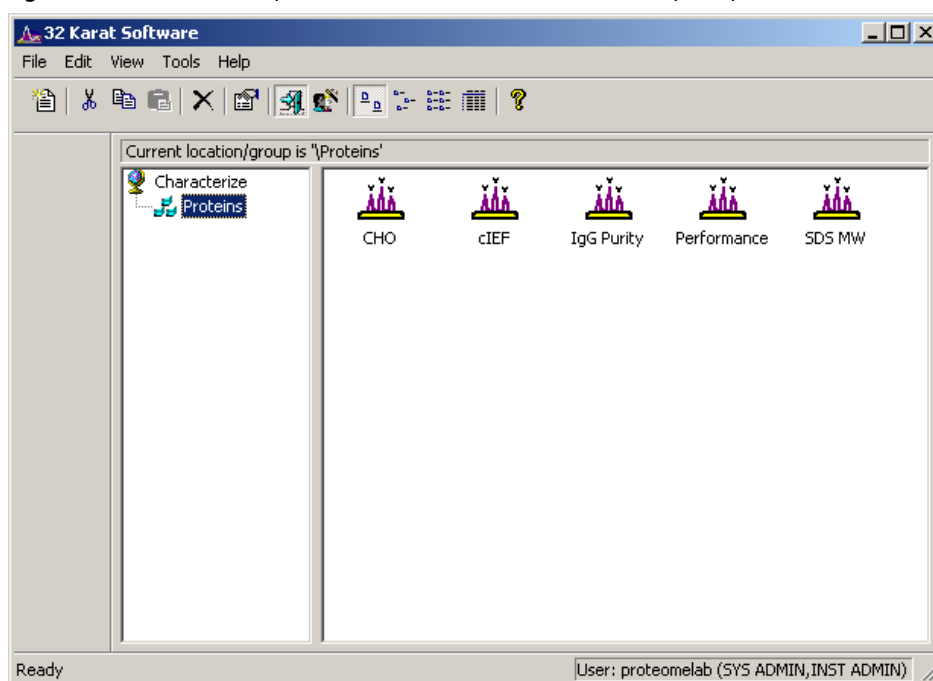
Software 32 Karat

Avvio del software

Per avviare il software 32 Karat, fare clic su **Programs > 32 Karat > 32 Karat** nel menu Start di Windows sulla barra degli strumenti.

Il software 32 Karat apre la finestra relativa a posizione/gruppo corrente con l'elenco degli strumenti configurati.

Figura 4.1 Finestra Enterprise del software del 32 Karat (menu principale)



Barra degli strumenti

La barra degli strumenti viene visualizzata nella parte superiore e, in alcuni casi, nella parte inferiore della finestra attiva. I pulsanti attivi nella barra degli strumenti consentono di accedere con un solo clic a molti comandi comuni. Nella finestra iniziale sono disponibili i seguenti pulsanti:

- Nuovo
- Taglia
- Copia
- Incolla
- Elimina
- Proprietà
- Accesso o uscita dell'utente Enterprise
- Procedura guidata System Administration
- Icone grandi
- Icone piccole
- Elenco
- Dettagli
- Help

Barra dei menu

La barra dei menu contiene tutti i comandi disponibili nel software 32 Karat. È possibile accedere alla barra dei menu con un solo clic o tenendo premuto il tasto **Alt** e la lettera sottolineata.

Creazione e configurazione di uno strumento

Questo esercizio consentirà di:

- creare un collegamento con uno strumento reale;
- creare uno strumento virtuale da usare per la rielaborazione dei dati offline.

NOTA Ulteriori informazioni sulla configurazione dello strumento sono disponibili nell'Help online del software 32 Karat.

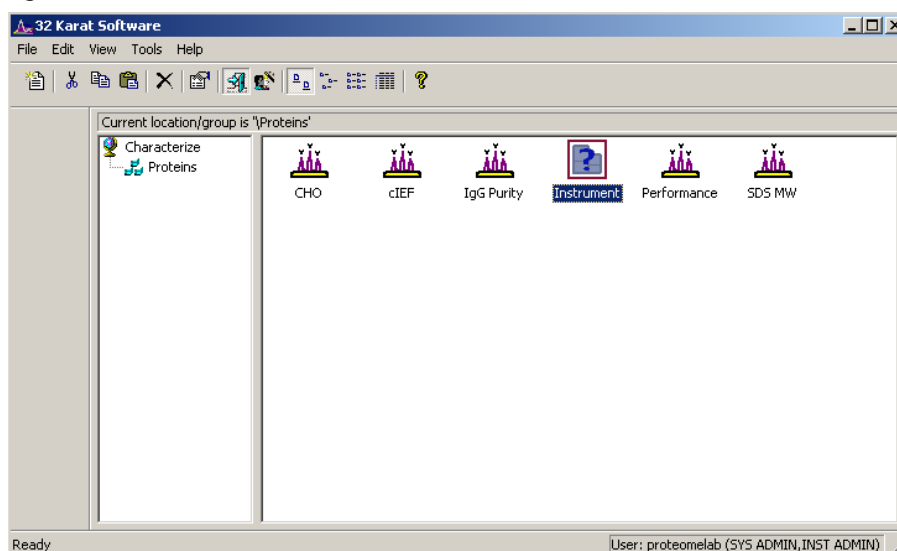
IMPORTANTE In questa sezione si suppone che siano state installate tutte le schede hardware e di interfaccia. Qualora non siano state installate, per istruzioni fare riferimento alla *Guida alla manutenzione del sistema*.

Creazione di un nuovo strumento

È possibile creare un numero illimitato di strumenti offline per la modifica di metodi o l'analisi dei dati offline. L'esercizio seguente consente di configurare un nuovo strumento. Selezionare i tipi di rilevatore appropriati per la configurazione hardware. Per creare correttamente un nuovo strumento, è necessario innanzitutto accedere come amministratore di sistema. Per maggiori informazioni, fare riferimento alla *Guida per l'amministrazione del sistema*.

- 1 Fare clic con il pulsante destro del mouse nel riquadro di destra e fare clic su **New > Instrument** nell'elenco a discesa.
- 2 Si apre un nuovo strumento con l'icona posizionata nel riquadro di destra. Digitare il nome dello strumento (Strumento 1 in questo esempio) nel campo Name evidenziato. Questo nome viene usato in tutto il software 32 Karat, nella finestra Instrument, nei report di dati e nei registri degli strumenti.

Figura 4.2 Finestra Enterprise del software del 32 Karat (menu principale)



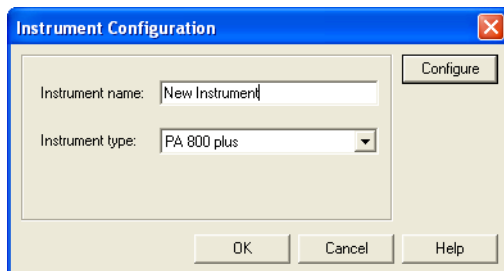
Configurazione del nuovo strumento

La configurazione dello strumento è un processo in cui il software viene predisposto per controllare l'hardware ed elaborare i dati. Consiste nell'identificazione iniziale di PA 800 Plus come strumento univoco e quindi nell'identificazione dei componenti hardware presenti. Ogni strumento fisico deve essere rappresentato da almeno due icone. Una di esse è utile per il controllo e l'acquisizione dei dati; l'altra per la rielaborazione dei dati offline. Nell'esempio seguente, come modello viene utilizzato un rilevatore UV.

- 1 Fare clic sull'icona Instrument e su **Configure > Instrument** nell'elenco a discesa.

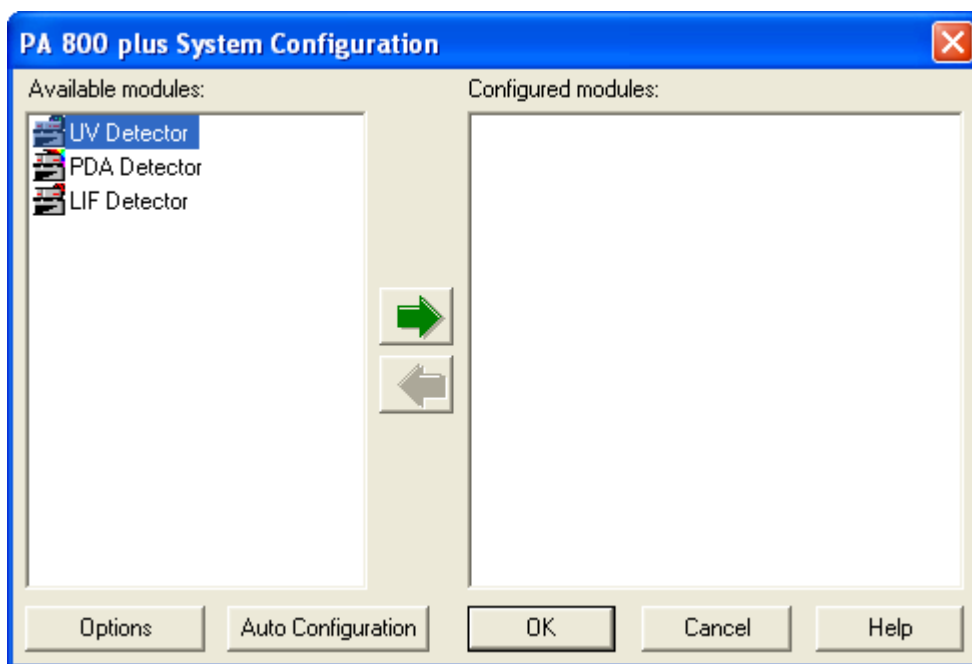
- 2 Fare clic su PA 800 plus nell'elenco a discesa **Instrument type** e digitare un nome che identifichi lo strumento.

Figura 4.3 Finestra di dialogo Instrument Configuration



- 3 Fare clic su **Configure**. Viene avviata la finestra di dialogo PA 800 Plus Configuration con i moduli disponibili per la configurazione elencati nel riquadro di sinistra.

Figura 4.4 Finestra di dialogo PA 800 Plus Configuration

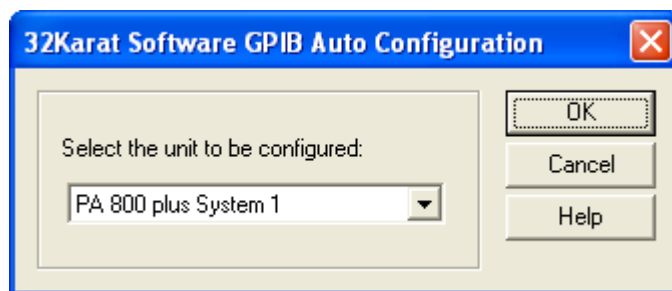


Configurazione automatica

Il software 32 Karat è in grado di configurare automaticamente il modulo PA 800 Plus dello strumento. Lo strumento deve essere collegato al PC e **acceso**.

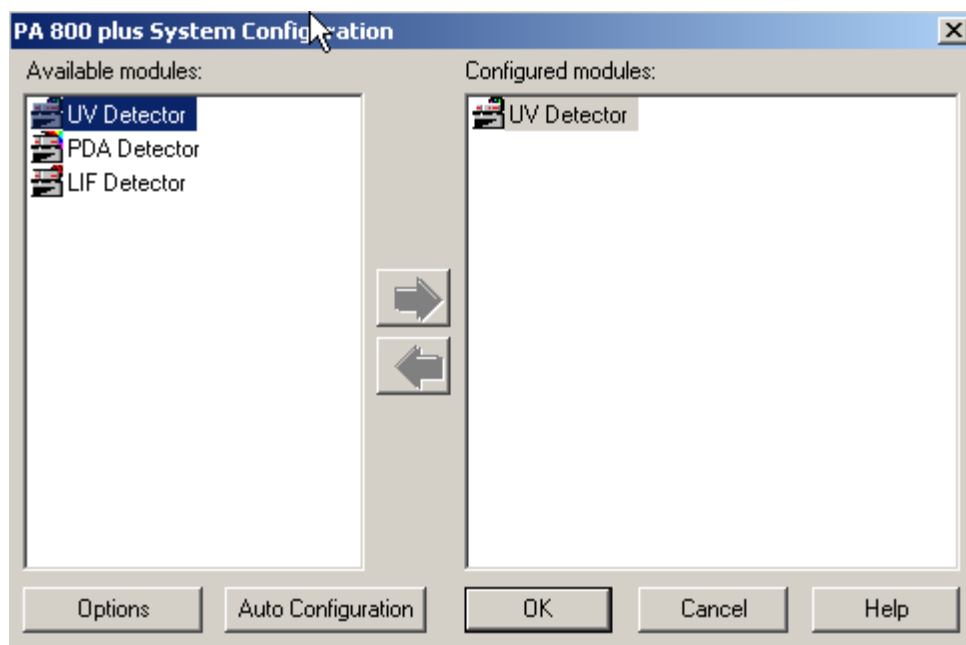
- 1 Fare clic su **Auto Configuration** nella parte inferiore della finestra di dialogo e ascoltare il movimento del vassoio nello strumento PA 800 Plus. Ciò indica che il software sta comunicando con lo strumento. Una volta completato correttamente il processo, viene visualizzata la seguente finestra di dialogo.

Figura 4.5 Stato della configurazione automatica



Il rilevatore installato si apre con la finestra di dialogo dei moduli configurati.

Figura 4.6 Finestra di dialogo PA 800 Plus System Configuration con il rilevatore UV installato



- 2 Fare clic sulla nuova icona e fare clic con il pulsante destro del mouse su **Open**. Verificare che lo strumento sia stato rilevato e configurato correttamente.

Figura 4.7 Configurazione dello strumento PA 800 Plus per il rilevatore UV

PA 800 plus System Instrument Configuration

Firmware Version: 10.1.34 Serial Number: A746031234

GPIB Communication
Board: GPIB0 Device ID: 1 Set Bus Address

Inlet trays
Buffer: 36 vials Sample: 48 vials Home position: BI:A1 Trays

Outlet trays
Buffer: 36 vials Sample: No tray Home position: BO:A1 Trays

Sample Trays
☐ Enable Tray Definition Height: 1 mm Depth: 1 mm

LIF Calibration Wizard

Filter (190nm - 600nm)

2: 200 nm	6: 300 nm
3: 214 nm	7: 320 nm
4: 254 nm	8: 340 nm
5: 280 nm	

Units
Pressure units: psi

Temperature Control
Available

Per ogni strumento PA 800 Plus collegato al computer deve esistere un ID di dispositivo univoco. Il valore predefinito è 1.

- 3 Dopo aver selezionato l'indirizzo del dispositivo, fare clic su **Set Bus Address** per inviare questa informazione allo strumento.

All'avvio vengono rilevati il tipo di vassoio per tamponi e per campioni. Il tipo di vassoio viene rilevato ogni volta che si apre o si chiude il coperchio dei campioni. Lo strumento rileva automaticamente due tipi di vassoio: vassoi per tamponi da 36 fiale e vassoio per campioni da 48 posti. Le piastre a 96 pozzetti non vengono rilevate automaticamente dallo strumento e devono essere configurate manualmente in questa finestra di dialogo. La configurazione dei vassoi può essere modificata manualmente in qualsiasi momento.

4 Quando si seleziona una piastra a 96 pozzetti come tipo di vassoio per campioni, viene abilitata la casella di controllo **Enable Tray Definition**.

- Se questa casella di controllo è selezionata, l'utente può definire l'altezza e la profondità delle piastre installate. Questa funzione consente l'uso di piastre a pozzetti profondi e di altre piastre non standard.
- Se questa casella di controllo non è selezionata, è possibile usare solo piastre standard a 96 pozzetti SCIEX.
- Se è stato rilevato un rilevatore di fluorescenza indotta da laser, viene attivata la procedura guidata di calibrazione LIF. Questa funzione viene descritta in dettaglio nella *Guida alla manutenzione del sistema*.

La finestra di dialogo Filter consente di definire i filtri specifici installati nel rilevatore UV. I dati devono essere inseriti manualmente. È importante che i valori immessi corrispondano esattamente ai filtri installati. Se è installato un rilevatore PDA, la posizione 8 deve essere vuota (nessun filtro installato), indicata dal valore 0 (zero).

Le unità di pressione possono essere espresse in psi (libbre per pollice quadrato) o in mbar (millibar). Le unità selezionate si riferiscono solo a questo strumento.

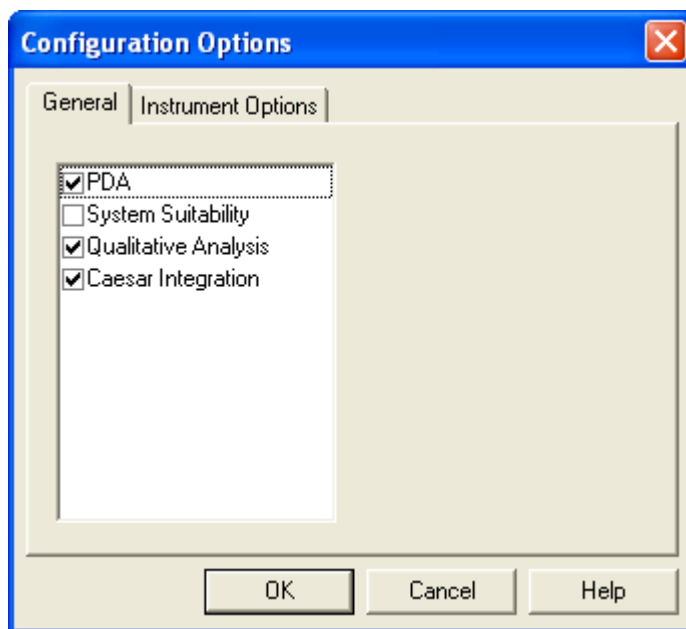
Il campo Temperature control indica che è installata un'unità di conservazione dei campioni. L'unità di conservazione può essere disattivata facendo clic su **Unavailable** nell'elenco a discesa.

5 Fare clic su **OK** per tornare alla finestra di dialogo Instrument Configuration.

Opzioni di configurazione

Facendo clic su **Options** si apre la finestra di dialogo **Configuration Options** (Figura 4.8).

Figura 4.8 Finestra di dialogo PA 800 Plus Instrument Configuration Options – Opzioni della scheda General



Opzioni della scheda General

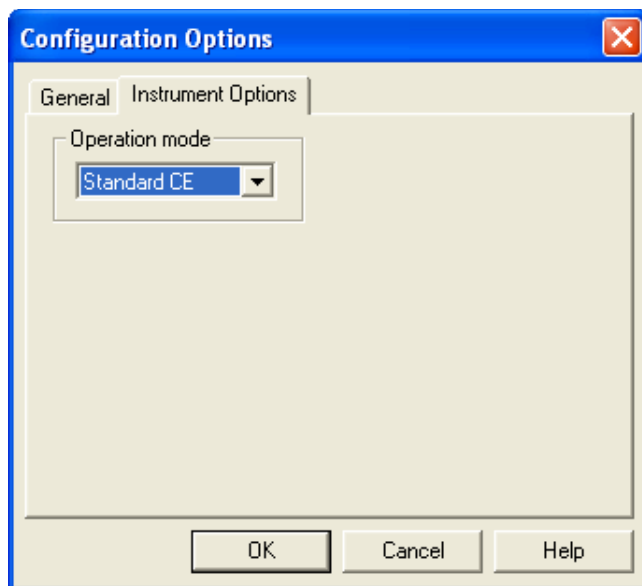
Nella scheda General sono definite le opzioni software disponibili per la rielaborazione dei dati. Sono disponibili le opzioni riportate di seguito.

- **PDA:** consente l'analisi dei dati multicanale provenienti dal rilevatore a serie di fotodiodi.
- **System Suitability:** consente la revisione automatica dei risultati. I risultati al di fuori degli intervalli selezionati possono attivare risposte definite.
- **Qualitative Analysis:** consente di identificare i picchi in base al tempo di migrazione, al tempo di migrazione relativo o alla mobilità.
- **Caesar Integration:** consente di rilevare l'inizio e la fine dei picchi. Questo metodo è utile per picchi che hanno transizioni brusche dalla linea di base al picco. È anche utile quando il rapporto segnale-rumore (S/N) è basso. Caesar Integration è il metodo migliore per rilevare picchi CE. Quando viene deselezionato, l'inizio e la fine del picco si basano sulla soglia della pendenza.

Scheda Instrument Options

La scheda Instrument Options consente di selezionare la modalità operativa **Standard CE** (valore predefinito) o **CEC/LC**.

Figura 4.9 Finestra di dialogo delle opzioni di configurazione dello strumento PA 800 Plus (Instrument Options)



Standard CE

Il tempo necessario perché un picco raggiunga la finestra è denominato Tempo di migrazione.

CEC/LC

Il tempo necessario perché un picco raggiunga la finestra è denominato Tempo di ritenzione. Questa selezione si riflette sugli elettroferogrammi e sui report.

- 1 Fare clic su **OK** per uscire e salvare la configurazione del modulo.
- 2 Fare clic su **OK** per tornare al menu iniziale.

Configurazione manuale

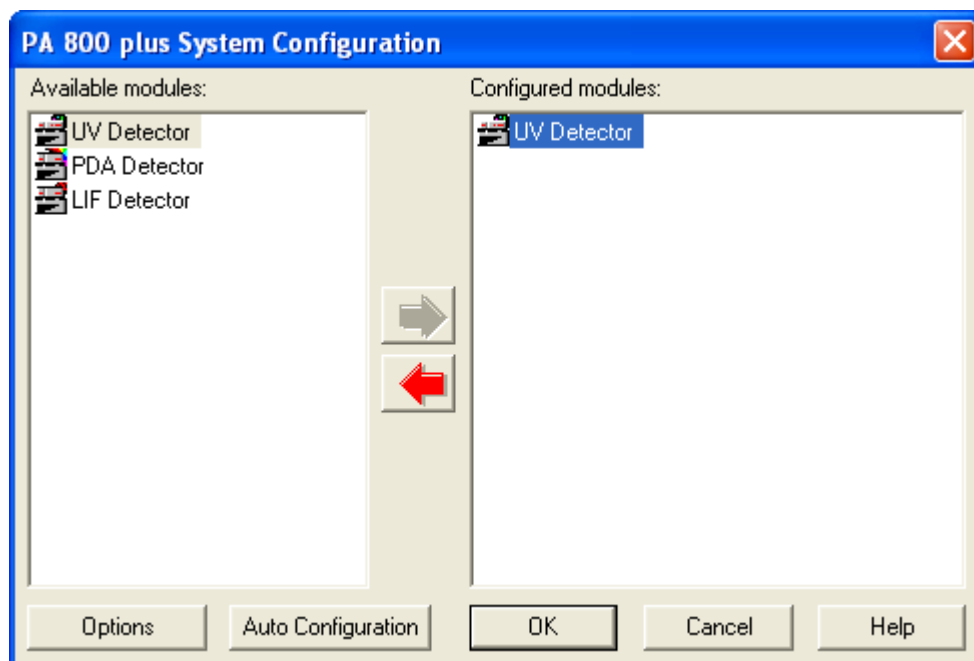
Configurazione manuale del rilevatore UV

La configurazione manuale può essere usata per creare uno strumento quando l'hardware è offline o in uso.

NOTA Molti esercizi di questa guida richiedono la configurazione di uno strumento UV virtuale. Utilizzare questa procedura per creare uno strumento UV, indipendentemente dal tipo di rilevatore installato.

- 1 Nella finestra principale di software 32 Karat, creare un nuovo strumento e aprire la finestra di dialogo Configuration. Assegnare allo strumento il nome UV Detector.
- 2 Per questo esercizio è necessario configurare un rilevatore UV. Fare clic su **UV Detector** nel riquadro sinistro, quindi fare clic sulla freccia verde. L'icona del rilevatore viene aggiunta e ora è necessario configurare lo strumento.

Figura 4.10 Rilevatore UV come modulo configurato



- 3 Fare clic sulla nuova icona e fare clic con il pulsante destro del mouse su **Open**. Viene aperta la finestra di dialogo PA 800 Plus System Instrument Configuration.

Figura 4.11 Finestra di dialogo Instrument Configuration

PA 800 plus System Instrument Configuration

Firmware Version: 10.1.34 Serial Number: A746031234 OK
Cancel
Help

GPIB Communication
Board: GPIB0 Device ID: 1 Set Bus Address

Inlet trays
Buffer: 36 vials
Sample: 48 vials
Home position: BI:A1 Trays

Outlet trays
Buffer: 36 vials
Sample: No tray
Home position: BO:A1 Trays

LIF Calibration Wizard

Filter (190nm - 600nm)

2:	200	nm	6:	300	nm
3:	214	nm	7:	320	nm
4:	254	nm	8:	340	nm
5:	280	nm			

Units
Pressure units: psi

Sample Trays
☐ Enable Tray Definition
Height: 1 mm Depth: 1 mm

Temperature Control
Available

Per informazioni sull'impostazione dei parametri di configurazione dello strumento del sistema PA 800 Plus, fare riferimento all'Help online del software 32 Karat.

- 4** Fare clic su **OK** per uscire e salvare la configurazione del modulo.

Configurazione manuale dei rilevatori PDA e LIF

La configurazione manuale dei rilevatori PDA e LIF viene eseguita selezionando le relative icone al posto del rilevatore UV. Uno strumento può avere un solo rilevatore interno.



Direct Control

Introduzione

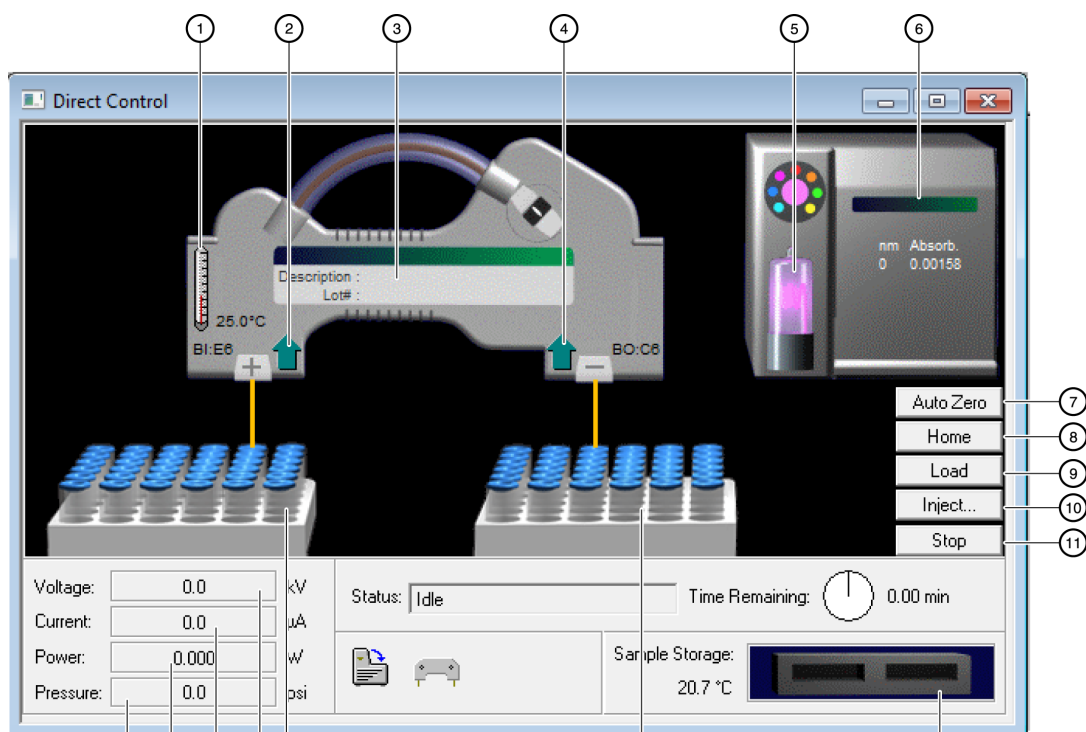
La finestra Direct Control può essere considerata come il pannello anteriore dello strumento. Consente di selezionare e modificare i parametri operativi con esecuzione immediata. Direct Control è utile nella preparazione di operazioni, nonché per la manutenzione e la risoluzione dei problemi.

L'interfaccia grafica di Direct Control consente di controllare lo strumento facendo clic sulle aree attive della finestra. Queste aree attivano la relativa finestra di dialogo, consentendo la modifica delle impostazioni dello strumento, o direttamente l'attività. La funzionalità Direct control apre un'animazione delle attività attuali dello strumento e dello stato dello strumento in tempo reale.

Ulteriori informazioni sulle funzioni di Direct control sono disponibili nell'Help online del software 32 Karat.

Finestra Direct Control

Per aprire la finestra Direct control, accedere al menu **Control** e fare clic su **Direct Control > View**.

Figura 5.1 Punti attivi della finestra Direct control

- | | |
|---------------------------------------|---|
| 1. Temperatura del capillare | 10. Finestra di dialogo Injection |
| 2. Vassoio su/giù | 11. Arresto dei processi in corso |
| 3. Finestra di dialogo dell'etichetta | 12. Temperatura di conservazione dei campioni |
| 4. Vassoio su/giù | 13. Finestra di dialogo Vial Position |
| 5. Lampada On/Off | 14. Finestra di dialogo Voltage |
| 6. Finestra di dialogo del rivelatore | 15. Finestra di dialogo Current |
| 7. Autozero | 16. Finestra di dialogo Power |
| 8. Vassoi in posizione di riposo | 17. Finestra di dialogo Pressure |
| 9. Vassoi in posizione di carico | |

Nella figura precedente è illustrato il rivelatore UV. I rivelatori PDA e LIF sono simili. Le funzioni sono definite nella [Tabella 5.1](#).

Tabella 5.1 Funzioni di controllo

Funzioni di controllo in Direct Control			
Gruppo	Azione/informazioni	Pulsante o punto attivo	Descrizione
Temperature	Temperatura del capillare	Punto attivo	Apri una finestra di dialogo per impostare la temperatura del liquido di raffreddamento
	Temperatura di conservazione	Punto attivo	Apri una finestra di dialogo per impostare la temperatura di conservazione del campione
Movimento vassoi	Su/giù	Punto attivo	Passa dal vassoio superiore a quello inferiore e viceversa
	Posizione fiala	Punto attivo	Apri la finestra di dialogo Vial position che consente di spostare la fiala selezionata all'estremità del capillare
	Load	Pulsante	Porta tutti i vassoi in avanti per il caricamento
	Home	Pulsante	Riporta tutti i vassoi alla posizione iniziale
Sistema ottico	Controllo rilevatore	Punto attivo	Apri la finestra di dialogo appropriata per il rilevatore configurato
	Stato lampada/laser	Punto attivo	Apri una finestra di dialogo che consente di attivare/disattivare la lampada o i laser
	Autozero	Pulsante	Regola l'uscita del rilevatore su zero
Comandi dell'alimentazione	Voltage	Pulsante	Apri una finestra di dialogo per avviare la separazione in base alla tensione
	Current	Pulsante	Apri una finestra di dialogo per avviare la separazione in base alla corrente
	Power	Pulsante	Apri una finestra di dialogo per avviare la separazione in base alla potenza
	Pressure	Pulsante	Apri una finestra di dialogo per avviare la separazione in base alla pressione; usata anche per il risciacquo dei capillari
Altri controlli	Inject	Pulsante	Apri una finestra di dialogo per avviare l'iniezione del campione nel capillare
	Stop	Pulsante	Arresta tutte le operazioni dello strumento
	Informazioni capillare	Punto attivo	Apri una finestra di dialogo per digitare le informazioni sull'ID capillare/cartuccia (utilizzate solo per la visualizzazione)

Tabella 5.2 Display di stato

Display di stato in Direct Control		
Nome	Tipo di display	Descrizione
Status	Testo	Indica la funzione e lo stato corrente dello strumento
Time Remaining	Testo/grafica	Tempo rimanente per il processo corrente dello strumento
Tray Position	Testo/grafica	Indica la fiala o il pozzetto in cui si trova l'estremità del capillare
Cartridge Status	Grafica	Indica se è installata una cartuccia.
Cover Status	Grafica	Indica se lo sportello è aperto o chiuso
Cartridge Temp	Testo/grafica/punto attivo	Viene visualizzata la temperatura corrente del liquido di raffreddamento
Storage Temp	Testo	Viene visualizzata la temperatura di conservazione corrente
Storage Status	Grafica	Indica la presenza di vassoi nell'unità di conservazione
Stato lampada/laser	Grafica/punto attivo	Indica l'accensione o lo spegnimento della lampada/laser

Tabella 5.2 Display di stato (Continua)

Display di stato in Direct Control		
Nome	Tipo di display	Descrizione
Voltage	Testo/grafica/pulsante	Indica la tensione attuale, desiderata e massima
Current	Testo/grafica/pulsante	Indica la corrente attuale, desiderata e massima
Power	Testo/grafica/pulsante	Indica la potenza attuale, desiderata e massima
Pressure	Testo/grafica/pulsante	Indica la pressione attuale, desiderata e massima
Pressure	Grafica tipo/direzione	Indica la pressione positiva o il vuoto, e l'estremità del capillare alla quale viene applicata la pressione
Polarity	Grafica	Indicazione del potenziale +/- dell'elettrodo

Esercizio: condizionamento dei capillari

Questo esercizio usa le funzioni di Direct Control per condizionare un capillare di silice fusa (BFS) senza rivestimento. Questo capillare verrà usato in altri esercizi della guida.

NOTA Questa procedura è applicabile solo ai capillari nudi di silice fusa. Questa procedura può distruggere i rivestimenti interni dei capillari.

Materiali necessari

- Capillare con diametro interno di 75 µm, lungo complessivamente 60 cm (50 cm fino al rilevatore) installato nella cartuccia appropriata per il tipo di rilevatore configurato. Per istruzioni sulla creazione di una nuova cartuccia o sull'installazione di un capillare, fare riferimento alla *Guida alla manutenzione del sistema*.
- Metanolo (grado HPLC)
- HCl 0,1 N in acqua
- Soluzione di rigenerazione A per capillare (1 M idrossido di sodio, PN 338424)
- Tampone per corsa A (PN 338426)
- Acqua distillata o deionizzata (grado HPLC)
- Fiale e tappi universali
- Vassoi per tamponi a 36 pozzetti

1 Preparare delle fiale delle quali una con metanolo, una con HCl, una con soluzione di rigenerazione A per capillare e una con acqua.

2 Preparare due fiale di tampone per corsa A.

3 Preparare una fiala vuota.

Le fiale devono essere riempite fino alla spalla come indicato nella *Guida alla manutenzione del sistema*. Tutte le fiale (compresa quella vuota) devono essere chiuse.

- 4 Collocare le fiale nei vassoi per tamponi come indicato nella tabella seguente:

Tabella 5.3 Posizioni delle fiale

Soluzione	Vassoio per tamponi di sinistra (ingresso)	Vassoio per tamponi di destra (uscita)
Metanolo	B1	
HCl 0,1 N	C1	
Soluzione di rigenerazione A	D1	
Acqua	E1	
Tampone per corsa A	A1	A1
Fiala vuota		B1

- 5 Verificare che la cartuccia del capillare e i vassoi per tamponi siano installati correttamente. Per maggiori informazioni, fare riferimento alla *Guida alla manutenzione del sistema*.

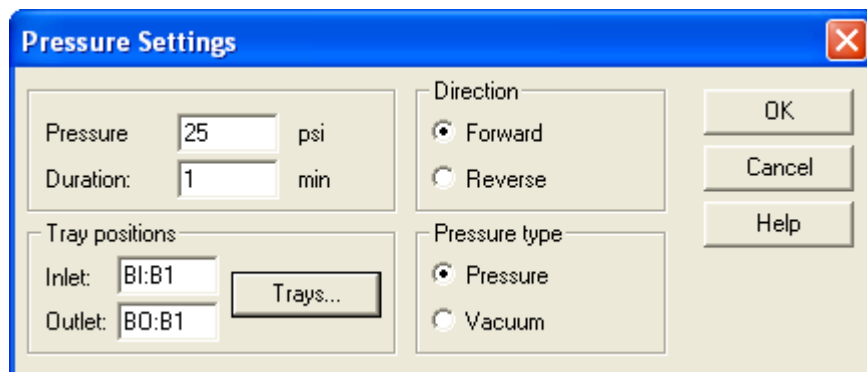
- 6 Chiudere lo sportello.

NOTA La finestra Direct Control viene aggiornata per indicare la presenza della cartuccia e lo sportello chiuso.

Deve essere possibile udire la circolazione del liquido di raffreddamento.

- 7 Fare clic sul punto attivo **Pressure** della finestra Direct Control. Si aprirà la finestra di dialogo Pressure Settings.

Figura 5.2 Finestra di dialogo Pressure Settings



Questa finestra di dialogo viene usata per impostare le condizioni del risciacquo o la separazione in base alla pressione. Presenta le seguenti opzioni:

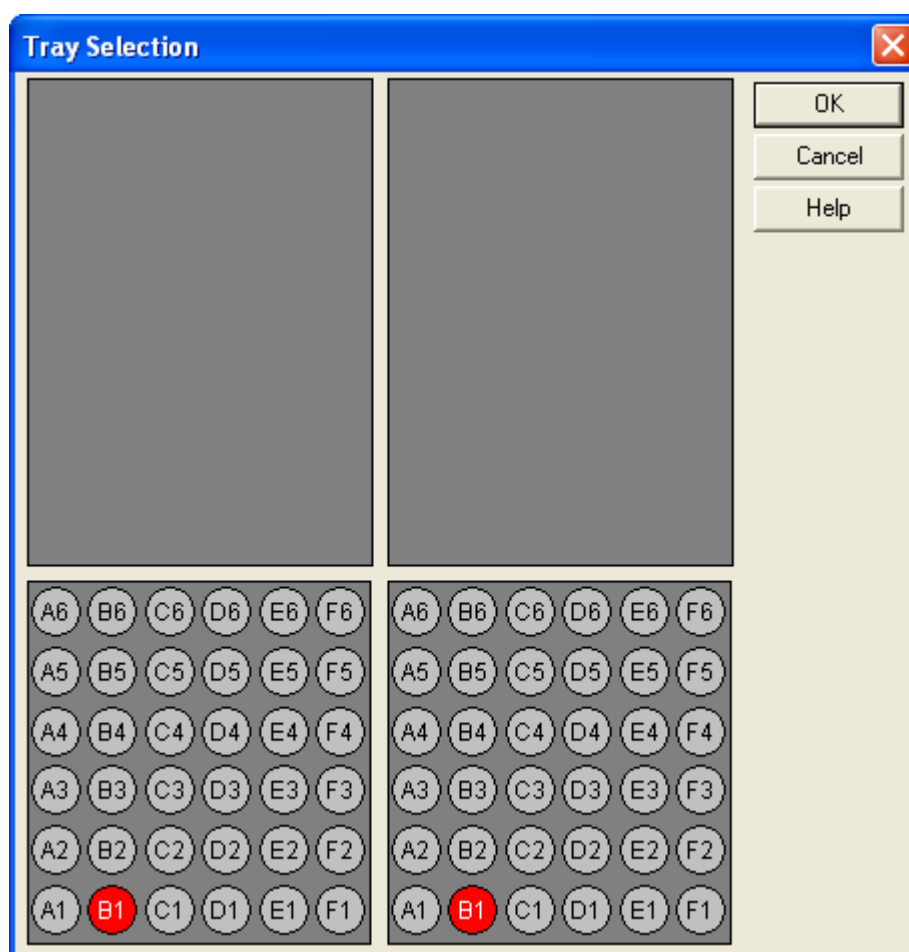
Pressure Settings

- **Pressure:** digitare la pressione desiderata in psi. La gamma valida per la pressione positiva è da 0,1 psi a 100 psi; per il vuoto è da 0,1 psi a 5 psi.

- **Duration:** indica per quanto tempo viene applicata la pressione.
- **Direction:** indica se il flusso del fluido è in avanti (dall'ingresso all'uscita o da sinistra a destra) o indietro (dall'uscita all'ingresso o da destra a sinistra).
- **Pressure Type:** specifica se viene usato il vuoto o la pressione positiva. Questa scelta definisce la gamma di pressione valida.
- **Tray Positions:** specifica quali fiale o pozzetti si trovino alle estremità del capillare durante le operazioni.

- 8 Per selezionare le posizioni, fare clic su **Trays** per aprire la finestra di dialogo Tray Selection (Figura 5.3).

Figura 5.3 Finestra di dialogo Tray Selection



- 9 Fare clic sulle posizioni appropriate per selezionarle.

Per questo esercizio, fare clic su **B1** nel vassoio sinistro e su **B1** nel vassoio destro per selezionare la fiala con metanolo e quella vuota.

- 10** Fare clic su **OK** per tornare alla finestra di dialogo Pressure Settings. Nell'area con le posizioni del vassoio ora dovrebbe essere indicato Inlet:BI:B1 e Outlet:BO:B1.
- 11** Digitare **25** nel campo **Pressure** e **1.0** nel campo **Duration**.
La direzione della pressione deve essere Forward e il tipo deve essere Pressure. Ora la finestra di dialogo dovrebbe apparire come quella mostrata nella [Figura 5.2](#).
- 12** Fare clic su **OK**. I vassoi si spostano nelle posizioni indicate e il risciacquo ha inizio automaticamente.
- 13** Osservare la finestra Direct Control durante il processo.
- 14** Eseguire ulteriori fasi di risciacquo in base a quanto indicato nella [Tabella 5.4](#).
Sarà necessario solo modificare i parametri indicati.

Tabella 5.4 Parametri della fase di risciacquo

Soluzione	Posizioni di ingresso (L)	Posizione uscita (R)	Pressure	Tempo
Metanolo	B1	B1	25	1
Acqua	E1	B1	25	0,5
HCl 0,1 N	C1	B1	20	2
Acqua	E1	B1	20	0,5
Rigeneratore A	D1	B1	20	2
Acqua	E1	B1	20	0,5
Tampone A	A1	B1	20	2

Al termine di queste fasi, il capillare è stato rigenerato e riempito con tampone per corsa. La fase successiva consiste nel testare la conduttività elettrica del capillare.

- 15** Fare clic sul punto attivo **Voltage** per aprire la finestra di dialogo. Questa opzione viene usata per configurare la separazione in base alla tensione.

Figura 5.4 Finestra di dialogo Voltage Settings

Parametri di impostazione della tensione

- **Voltage:** tensione alla quale viene eseguita la separazione (da 0,1 kV a 30 kV)
- **Duration:** tempo totale di applicazione della tensione (da 0,1 minuti a 999,9 minuti).
- **Ramp time:** tempo impiegato dall'alimentazione per raggiungere la tensione (da 0,10 minuti a 999,9 minuti). Ramp time non può superare Duration time.
- **Voltage max:** tensione massima che il sistema può raggiungere. Deve essere maggiore o uguale alla tensione impostata.
- **Current max:** corrente massima consentita per il sistema. Se questo valore viene raggiunto con una tensione inferiore a quella impostata, non è possibile ottenere la tensione impostata. La corrente massima consentita è 300 µA.
- **Tray positions:** i significati dei valori sono analoghi a quelli descritti in precedenza per Pressure.
- **With pressure:** consente l'applicazione simultanea di pressione e tensione. Se si seleziona questa opzione, diventano disponibili altri parametri relativi al livello di pressione e alla direzione. La pressione massima è di 100 psi. La pressione può essere applicata all'ingresso (Forward), all'uscita (Reverse) o a entrambe le estremità del capillare.
- **With vacuum:** consente l'applicazione simultanea di vuoto e tensione. Se si seleziona, diventano disponibili altri parametri relativi al livello di vuoto e alla direzione. Il vuoto massimo è di 5 psi. Il vuoto può essere applicato all'ingresso (Forward) o all'uscita (Reverse) del capillare, ma non a entrambe le estremità.
- **External adapter:** selezionare questa casella di controllo quando è in uso l'accessorio adattatore esterno. Per maggiori informazioni, fare riferimento alla *Guida alla manutenzione del sistema*.
- **Polarity:** determina il segno della carica sugli elettrodi. La grafica indica la selezione.
- Per questo esercizio, fare clic su **Trays** e su **A1** sul lato di ingresso e su **A1** sul lato di uscita. Entrambe le estremità del capillare sono inserite nel tampone per corsa A. Impostare gli altri parametri come segue:
 - Voltage: 30 kV
 - Duration: 2 minuti
 - Ramp time: 0,5 minuti

16 Fare clic su **OK**.

I vassoi si spostano per posizionare le fiale selezionate alle estremità del capillare. La tensione inizia a salire fino a 30 kV. Durante questo processo, osservare la finestra Direct Control, prendendo nota in particolare della tensione, della corrente e della potenza visualizzate. La corrente deve raggiungere un valore compreso tra 27 mA e 33 mA quando la tensione è a 30 kV. Dopo due minuti la tensione torna a zero e lo stato torna inattivo.

Questo completa l'esercizio Direct Control. Potrebbe essere utile sperimentare le altre funzioni di Direct Control prima di proseguire con la sezione successiva.



Creazione e modifica di un metodo

Introduzione

Nell'esercizio sulla rigenerazione di un capillare della sezione Direct Control era necessario che l'utente fornisse un input in ciascuna fase del processo.

Un metodo consente di combinare una serie di passaggi in un processo logico. I passaggi del metodo vengono eseguiti automaticamente dallo strumento. In questa sezione vengono descritti i passaggi di base per la creazione di un metodo strumentale per l'analisi dei dati. In un metodo è possibile incorporare numerose altre funzioni, come l'analisi dei dati e la creazione di report. Alcune saranno descritte successivamente in questa guida. Per maggiori informazioni, fare riferimento all'[APPENDICE A, Risorse aggiuntive](#).

Creazione e modifica di un metodo

Per creare o modificare un metodo, visualizzare la finestra Instrument.

1 Per aprire questa finestra, andare alla finestra principale di software 32 Karat.

2 Selezionare l'icona creata per il sistema e fare clic su **Open Offline**.

In pochi secondi si apre la finestra Instrument. Quando si apre la finestra, si apre anche la procedura guidata Instrument. È possibile aprire la finestra di dialogo Method Editing facendo clic su **Create or Modify a Method** in questa finestra.

3 Per chiudere la procedura guidata Instrument, fare clic su **OK**.

L'attività consiste nella scrittura di un nuovo metodo per eseguire un test con lo strumento.

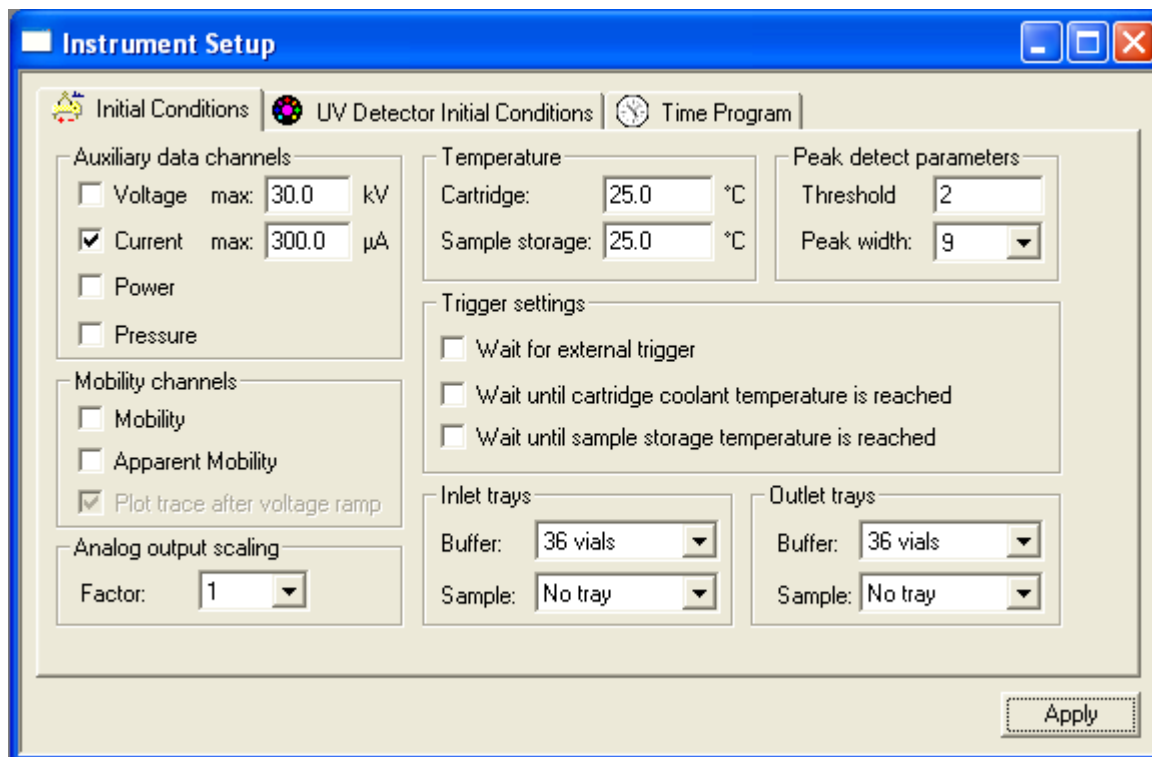
- 1 Per iniziare, fare clic su **File > Method > New** nella barra dei menu. Il nome del metodo nella barra del titolo della finestra Instrument diventa untitled.met.
- 2 Per accedere alle sezioni di controllo dello strumento e di acquisizione dati del metodo, fare clic su **Method > Instrument Setup** nella barra dei menu. Viene visualizzata una finestra con tre o quattro schede (a seconda del tipo di rilevatore).
- 3 Fare clic sulla scheda **Initial Conditions** per portarla in primo piano. Viene aperta la finestra di dialogo [Figura 6.1](#).
Questa finestra di dialogo viene utilizzata per impostare i parametri dello strumento all'inizio di un metodo, prima dell'inizio del processo di separazione.

Scheda Initial Conditions

Nell'esercizio sulla rigenerazione di un capillare della sezione precedente era necessario che l'utente fornisse un input in ciascuna fase del processo. Questa sezione illustra come combinare una serie di questi passaggi in un processo logico denominato Metodo. I passaggi del metodo vengono eseguiti automaticamente dallo strumento. Questa sezione descrive i passaggi fondamentali per la creazione di un metodo strumentale di acquisizione dati. In un metodo è possibile incorporare numerose altre funzioni, come l'analisi dei dati e la creazione di report. Alcune saranno descritte successivamente in questa guida. Per maggiori informazioni, fare riferimento all'[APPENDICE C, Informazioni sui dati PDA](#).

Questo esercizio prevede la scrittura di un metodo per eseguire una miscela di test strumentale.

- 1 Per scrivere un nuovo metodo, fare clic su **File > Method > New** nella barra dei menu.
- 2 Per accedere alle sezioni di controllo dello strumento e di acquisizione dati del metodo, fare clic su **Method > Instrument Setup** nella barra dei menu. Viene visualizzata una finestra contenente tre o quattro schede, a seconda della configurazione del rilevatore.
- 3 Fare clic su **Initial Conditions**.
Viene aperta la finestra di dialogo [Figura 6.1](#).

Figura 6.1 Finestra di dialogo Instrument Setup - Scheda Initial Conditions

Auxiliary Data Channels

Il software 32 Karat consente di raccogliere alcuni o tutti i parametri dello strumento: tensione, corrente, alimentazione e pressione. Selezionare i canali da registrare facendo clic sulle caselle di controllo appropriate.

I campi max kV e max μA consentono di impostare i limiti consentiti per questi parametri. La tensione e la corrente sono legate dall'espressione $V = IR$. Il sistema limita entrambi i parametri ogni volta che viene raggiunto un limite. Ad esempio, si supponga che la tensione sia impostata su 30 kV e il limite della corrente su 10 μA . Con alcuni sistemi tampone, una tensione di 12 kV genera una corrente di 10 μA . In questo caso la tensione non supera i 12 kV, poiché il limite di corrente è il fattore determinante.

Mobility Channels

Questo argomento verrà trattato successivamente nella guida.

Temperature

Consente di impostare la temperatura iniziale del liquido di raffreddamento della cartuccia e dell'unità di conservazione del campione, se installata.

Peak Detect Parameters

Questi parametri vengono utilizzati per attivare eventi specifici come la raccolta di frazioni. Non vengono utilizzati nell'integrazione dei picchi o nell'analisi dei dati. L'integrazione dei picchi verrà discussa successivamente nella guida.

Trigger Settings

È possibile impostare il sistema PA 800 Plus affinché attenda il verificarsi di alcune condizioni prima dell'inizio di un'esecuzione. Tali condizioni si possono selezionare facendo clic sulla casella di controllo appropriata. Se si seleziona **Wait for external trigger**, lo strumento PA 800 Plus diventa un dispositivo asservito che non si avvia finché non riceve un segnale esterno. Le due opzioni **Wait for temperature** garantiscono il raggiungimento della corretta temperatura operativa del sistema prima dell'inizio dell'esecuzione. Queste opzioni ritardano solo l'inizio del programma orario. I parametri impostati nelle condizioni iniziali non prevedono attese.

Inlet Trays e Outlet Trays

Specificare i tipi di vassoi utilizzati per l'esecuzione del metodo. Quando il metodo viene eseguito, queste informazioni vengono confrontate con i tipi di vassoio configurati per lo strumento. Se i tipi di vassoio non corrispondono, il metodo non viene eseguito.

Ulteriori informazioni su questi e altri parametri della finestra di dialogo Instrument sono disponibili nell'Help online del software 32 Karat.

Condizioni iniziali del rilevatore

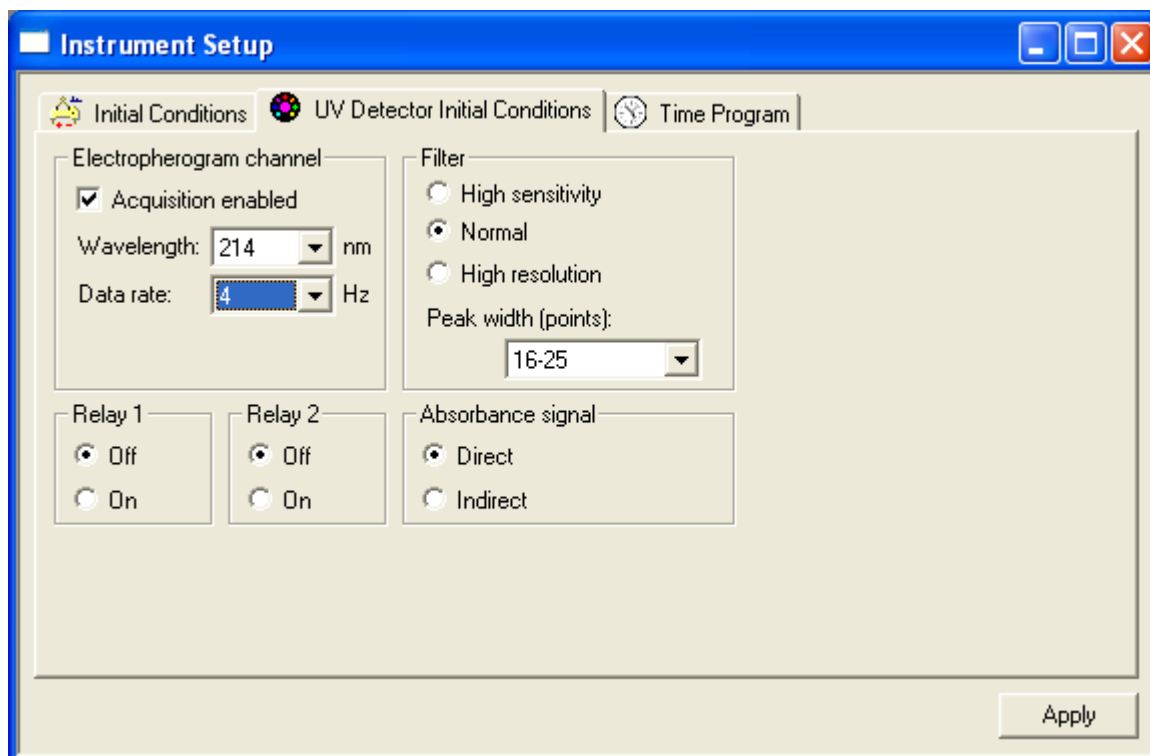
In questo esercizio, impostare le condizioni nella scheda Initial Conditions in modo che corrispondano a quelle della [Figura 6.2](#).

NOTA Nella scheda successiva vengono impostate le condizioni iniziali per il rilevatore. Fare clic sull'opzione seguente che corrisponde al tipo di rilevatore dello strumento.

Scheda UV Detector Initial Conditions

Fare clic sulla scheda **UV Detector Initial Conditions**.

Figura 6.2 Finestra di dialogo Instrument Setup - Scheda UV Detector Initial Conditions



Electropherogram Channel

Per raccogliere e salvare i dati è necessario selezionare la casella di controllo **Acquisition Enabled**.

L'opzione **Wavelength** consente di selezionare uno dei filtri installati nel disco portafiltri. Le selezioni disponibili sono quelle impostate durante la configurazione dello strumento.

La velocità dei dati è selezionabile da 0,5 Hz a 32 Hz (punti dati al secondo). I picchi stretti richiedono una velocità di trasmissione dei dati più elevata. La velocità di trasmissione dei dati interagisce con il parametro di ampiezza del picco, impostato in **Filter Settings** in questa finestra di dialogo.

Filter

Questo filtro si riferisce a un algoritmo per la filtrazione dei dati raccolti e non ai filtri di lunghezza d'onda. Filtrare i dati è necessario per eliminare il rumore estraneo che potrebbe interferire con l'analisi dei dati. L'impostazione del filtro richiede due passaggi: la selezione del tipo di filtro (High Sensitivity, Normal, o High Resolution) e l'impostazione dell'ampiezza del picco. High Sensitivity aumenta il rapporto segnale-rumore a scapito della risoluzione.

Analogamente, High Resolution aumenta la risoluzione a scapito del rapporto segnale-rumore. Normal è un compromesso indicato per la maggior parte delle analisi. L'algoritmo di filtrazione è più efficiente se contiene informazioni sul numero dei punti dati che costituiscono un picco. Il numero ottimale di punti è compreso tra 16 e 25. Sono disponibili anche opzioni che prevedono **less than 16** e **more than 25** punti dati per picco. È possibile regolare l'impostazione Data rate nella finestra di dialogo Electropherogram channel in modo che un picco tipico sia costituito da 16 a 25 punti dati. Le altre impostazioni sull'ampiezza del picco devono essere utilizzate solo se non si desidera modificare la velocità dei dati.

NOTA L'impostazione Peak Width in questa finestra non corrisponde all'impostazione Peak Width utilizzata nell'integrazione dei dati.

Sezioni Relay 1 e Relay 2

I due relè integrati nel sistema PA 800 Plus possono essere utilizzati per controllare o segnalare altri dispositivi. Questa finestra di dialogo consente di impostare lo stato dei relè all'inizio del metodo su **Off** (aperto) o **On** (chiuso). I relè possono essere controllati anche dalla programmazione oraria.

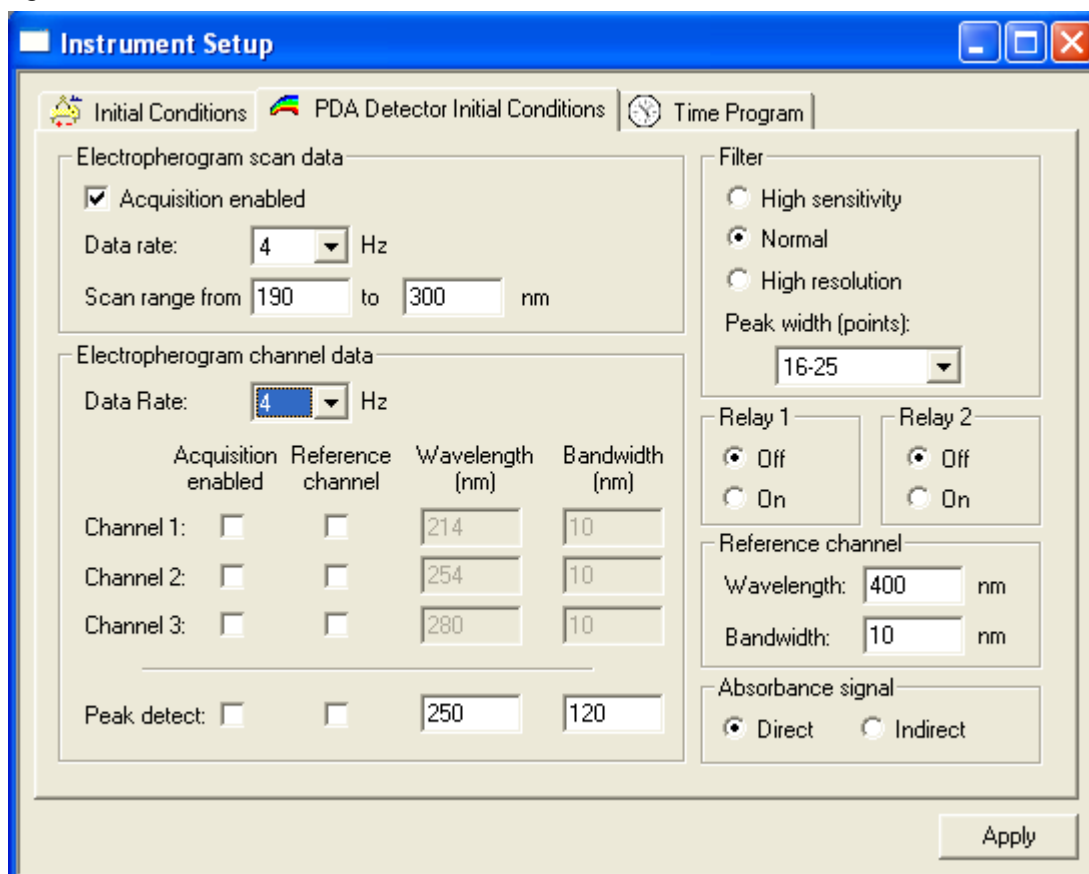
Absorbance Signal

Per questo parametro sono disponibili due opzioni **Direct** e **Indirect**. **Direct** viene usato quando gli analiti hanno un'assorbanza UV superiore a quella dell'elettrolita di fondo. In questo caso, i picchi di deflessione verso l'alto vengono prodotti quando gli analiti passano attraverso la finestra del rilevatore. In alcune modalità di elettroforesi capillare, l'elettrolita di fondo ha un'assorbanza maggiore rispetto agli analiti. In questo tipo di separazione, il passaggio degli analiti crea picchi negativi (valli) nell'elettroferogramma. Se si fa clic su **Indirect**, l'intero elettroferogramma viene invertito e i picchi negativi vengono visualizzati come positivi.

In questo esercizio, impostare le condizioni della finestra di dialogo UV Detector Initial Conditions in modo che corrispondano a quelle della [Figura 6.2](#).

Scheda PDA Detector Initial Conditions

Figura 6.3 Finestra di dialogo Instrument Setup - Scheda PDA Detector Initial Conditions



Electropherogram Scan Data

Questa finestra di dialogo controlla i parametri per la raccolta di dati 3D. Per raccogliere e salvare i dati è necessario selezionare la casella di controllo **Acquisition Enabled**. La velocità dei dati è selezionabile da 0,5 Hz a 32 Hz (punti dati al secondo). I picchi stretti richiedono una velocità di trasmissione dei dati più elevata. La velocità di trasmissione dei dati interagisce con il parametro relativo all'ampiezza del picco nelle impostazioni del filtro (descritto di seguito). I dati della scansione raccolti con velocità di trasferimento dati elevate possono generare file di dati di grandi dimensioni. L'intervallo di scansione specifica il range della lunghezza d'onda per cui vengono acquisiti i dati (limite da 190 nm a 600 nm).

Filter

Fare riferimento a [Scheda UV Detector Initial Conditions](#) per informazioni su questo argomento.

Sezioni Relay 1 e Relay 2

Fare riferimento a [Scheda UV Detector Initial Conditions](#) per informazioni su questo argomento.

Reference Channel

Per informazioni su questa funzione, fare riferimento alle fonti indicate nell'[APPENDICE A, Risorse aggiuntive](#).

Absorbance Signal

Per informazioni su questo argomento, fare riferimento a [Scheda UV Detector Initial Conditions](#).

Electropherogram Channel Data

Unitamente ai dati di scansione, è possibile raccogliere fino a tre canali dati indipendenti. Per ciascun canale è necessario immettere i seguenti dati:

Acquisition enabled: questa casella di controllo consente di attivare la raccolta di dati in questo canale.

Reference channel: per informazioni su questa funzione, fare riferimento alle fonti indicate nell'[APPENDICE A, Risorse aggiuntive](#).

Wavelength: questo parametro specifica la lunghezza d'onda centrale del canale dati.

Bandwidth: questo parametro specifica la larghezza, in nanometri, del canale di raccolta dati. Valori più grandi forniscono rapporti segnale/rumore superiori rispetto ai valori bassi. I valori bassi sono più specifici per la struttura molecolare rispetto ai valori superiori.

Peak detect: per informazioni su questa funzione, fare riferimento alle fonti indicate nell'[APPENDICE A, Risorse aggiuntive](#).

In questo esercizio, impostare le condizioni iniziali del rilevatore PDA in modo che corrispondano a quelle della [Figura 6.3](#).

Scheda LIF Detector Initial Conditions

Figura 6.4 Finestra di dialogo Instrument Setup - Scheda LIF Detector Initial Conditions

Instrument Setup

Initial Conditions | **LIF Detector Initial Conditions** | Time Program

Electropherogram channel 1

☒ Acquisition enabled

Dynamic range: 100 RFU

Filter settings

☐ High sensitivity

☒ Normal

☐ High resolution

Peak width (pts): 16-25

Signal

☒ Direct ☐ Indirect

Laser/filter description - information only

Excitation wavelength: 488 nm

Emission wavelength: 520 nm

Data rate

Both channels: 4 Hz

Electropherogram channel 2

☐ Acquisition enabled

Dynamic range: 100 RFU

Filter settings

☐ High sensitivity

☒ Normal

☐ High resolution

Peak width (pts): 16-25

Signal

☒ Direct ☐ Indirect

Laser/filter description - information only

Excitation wavelength: 635 nm

Emission wavelength: 675 nm

Relay 1

☒ Off ☐ On

Relay 2

☒ Off ☐ On

Apply

Sezioni Electropherogram Channel 1 e 2

Il rilevatore LIF è disponibile nelle versioni a uno e due canali. La programmazione di questi canali è identica. In questo esercizio verrà utilizzato un solo canale. Se il sistema è configurato con laser non SCIEX, la miscela di test utilizzata in questo esercizio potrebbe non funzionare come descritto.

Acquisition enabled: questa casella di controllo consente di attivare la raccolta di dati in questo canale.

Dynamic range: consente di specificare il limite superiore del range del segnale. Valori più elevati consentono la raccolta di picchi più grandi senza troncamento, ma a scapito della sensibilità. Valori inferiori forniscono maggiore sensibilità, ma i picchi di grandi dimensioni potrebbero essere troncati. Questo valore dovrebbe essere leggermente superiore a quello del picco massimo previsto.

Signal

Quando si separano i campioni a fluorescenza (picchi) su un elettrolita di fondo non fluorescente, fare clic su **Direct**. Se si utilizza un elettrolita di fondo fluorescente, possono essere rilevati campioni non fluorescenti. Facendo clic su **Indirect** si inverte il segnale e i picchi negativi vengono visualizzati come positivi.

Data Rate

Consente di specificare la velocità di acquisizione dei dati. Entrambi i canali di dati LIF hanno la stessa velocità di trasferimento dati. Non è possibile specificare velocità separate.

Sezioni Relay 1 e Relay 2

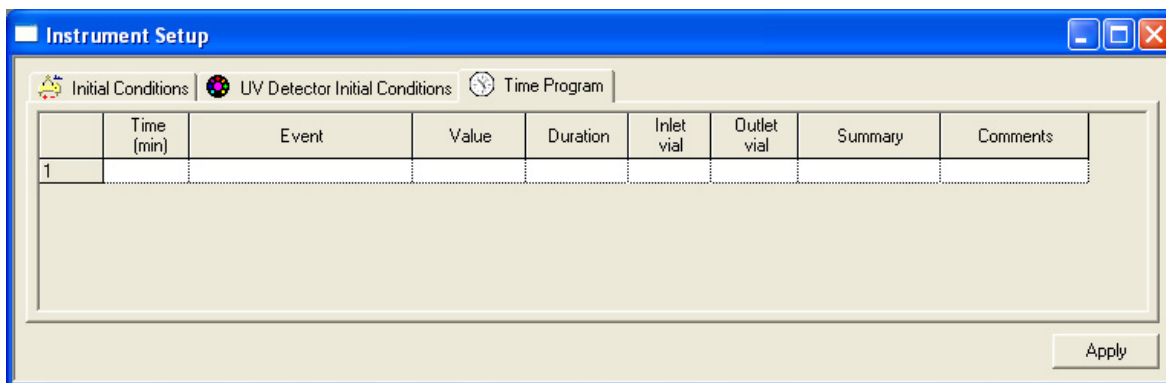
Fare riferimento a [Scheda UV Detector Initial Conditions](#) per informazioni su questo argomento.

In questo esercizio, impostare le condizioni iniziali del rilevatore LIF in modo che corrispondano a quelle della [Figura 6.4](#).

Scheda Time Program

La finestra Time Program è organizzata come un foglio di calcolo. Viene inserito un evento in ciascuna riga. Gli eventi vengono eseguiti in ordine, dall'alto verso il basso. Ogni riga della finestra contiene le seguenti colonne:

Figura 6.5 Finestra di dialogo Instrument Setup - Scheda Time Program



Time: momento successivo all'ora zero in cui si verifica l'evento.

Event: l'azione che si verifica (vedere successivamente).

Value: varia in base all'azione selezionata.

Duration: durata temporale dell'evento.

Inlet Vial e Outlet Vial: posizione delle estremità dei capillari durante l'evento.

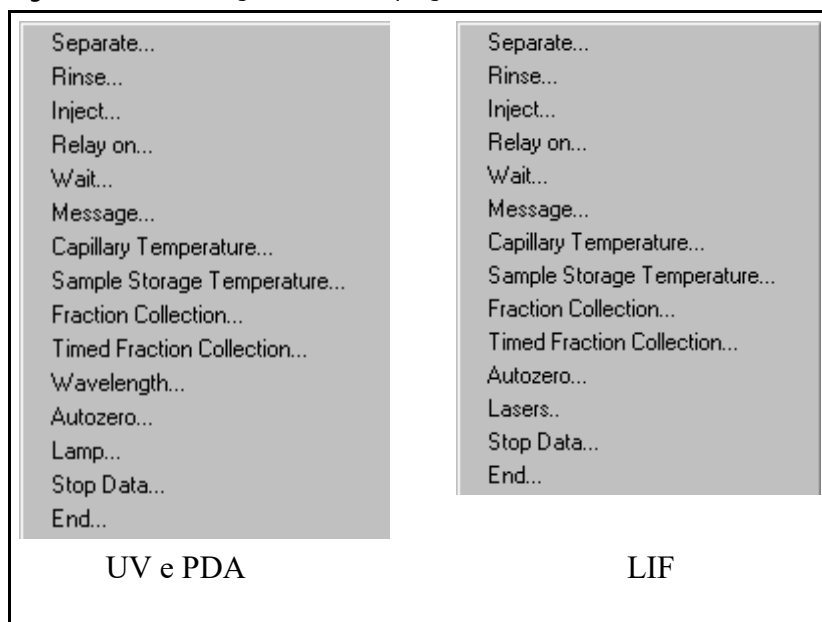
Summary: descrizione dell'evento generata dal sistema.

Comments: annotazione sull'evento generata dall'utente.

Il valore orario Time non è obbligatorio. Gli eventi privi del valore orario vengono eseguiti nell'ordine elencato, dall'alto verso il basso, e ciascuno deve concludersi prima che inizi l'evento successivo. Gli eventi con orario devono essere raggruppati insieme; un gruppo di eventi con orario non può essere interrotto da un evento senza orario. Gli eventi senza orario possono verificarsi solo prima di un gruppo di eventi con orario. Alcuni eventi non dispongono di un'opzione oraria, mentre per altri è possibile sia avere un orario che non averlo. L'acquisizione dati inizia con il primo evento temporizzato (orario 0.00); termina con la conclusione del metodo o il raggiungimento di un evento STOP DATA.

Per programmare una riga, fare clic nel campo **EVENT**. Per aprire il menu degli eventi, fare clic sulla freccia verso il basso. Selezionare un evento per aprire la relativa finestra di dialogo.

Figura 6.6 Elenco degli eventi della programmazione oraria



Di seguito vengono descritti solo gli eventi utilizzati in questo esercizio. Per informazioni sugli altri tipi di evento, fare riferimento alle risorse nell'[APPENDICE A, Risorse aggiuntive](#) o nell'Help online del software 32 Karat.

Eventi di programmazione oraria

Evento separato

La finestra di dialogo Separate consente di controllare le condizioni in cui avviene il processo di separazione. Ogni metodo deve avere almeno una fase di separazione. La fase all'orario 0.00 è di solito una separazione.

Figura 6.7 Finestra di dialogo Separate

In questa finestra di dialogo sono disponibili i parametri indicati di seguito.

Separation Type

Le separazioni condotte elettricamente possono essere effettuate controllando la tensione, la corrente o la potenza. Se si seleziona uno di questi parametri, gli altri due oscillano su un valore determinato dalla resistenza del contenuto del capillare. La tensione e la corrente non possono superare i limiti impostati nella finestra Initial Conditions. È inoltre possibile programmare le separazioni per spostare il fluido in grande quantità nel capillare mediante la pressione o il vuoto. La tensione, la corrente o l'alimentazione possono essere combinate con la pressione o il vuoto in modo che i due processi operino simultaneamente.

Polarity

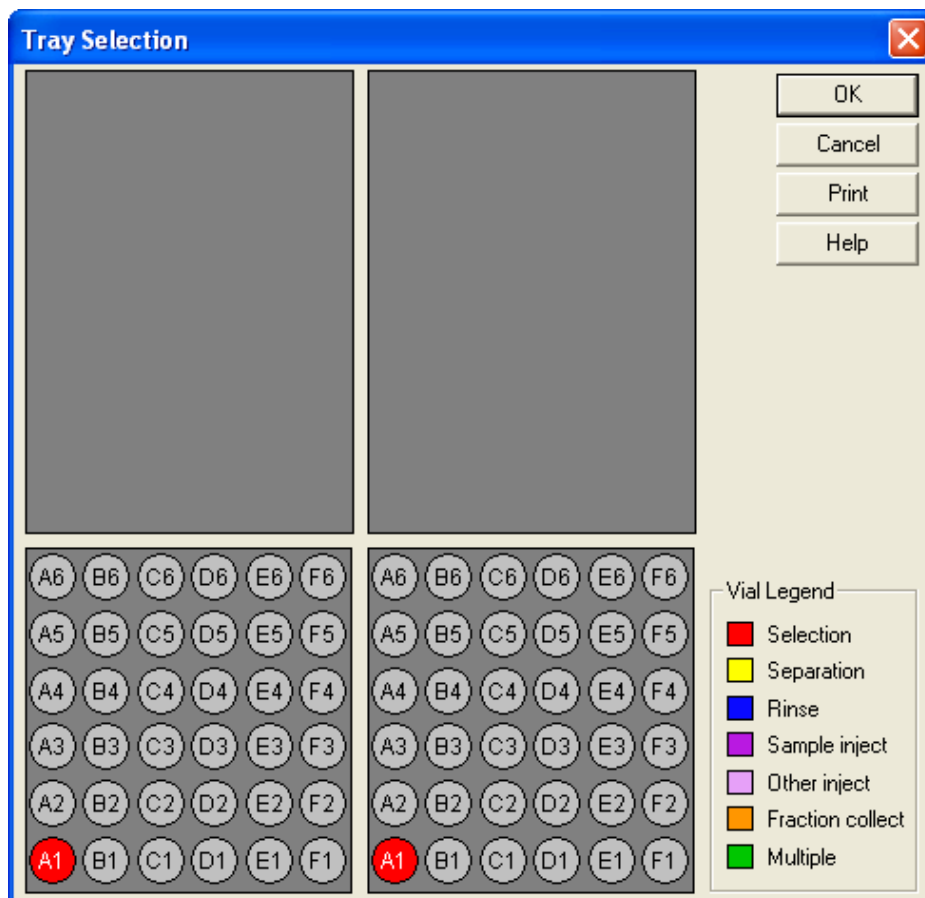
Determina la direzione della corrente. La carica sugli elettrodi è indicata dal grafico in questa finestra di dialogo.

Values

Consente l'immissione dei punti di regolazione per i parametri Separation Type. Le opzioni disponibili variano a seconda del tipo di separazione selezionato. Il tempo di incremento è valido solo per le separazioni elettriche. Determina il tempo impiegato per passare dal livello attuale a quello programmato di tensione, corrente o potenza.

Tray Positions

È possibile effettuare una selezione grafica facendo clic sul pulsante Trays. Il tipo di vassoi visualizzato è determinato dalle impostazioni della finestra di dialogo Initial Conditions. Quando si utilizza un metodo in una tabella delle sequenze, è possibile modificare la posizione delle fiale dopo uno specifico numero di cicli. La posizione di ingresso, la posizione di uscita o entrambe possono essere incrementate automaticamente selezionando le caselle di controllo appropriate e digitando il numero di cicli desiderato tra una modifica e l'altra.

Figura 6.8 Finestra di dialogo Tray Selection**Pressure Direction**

Specifica se applicare la pressione o il vuoto all'estremità di ingresso o di uscita del capillare. È possibile anche applicare la pressione (ma non il vuoto) contemporaneamente ad entrambe le estremità del capillare.

At Time

Consente di specificare l'ora di un evento con orario. La separazione è solitamente un evento con orario.

External Adapter

Modifica la gestione dell'alimentazione dello strumento. Selezionare questa casella di controllo solo se è in uso l'adattatore esterno accessorio. Per maggiori informazioni, fare riferimento alla *Guida alla manutenzione del sistema*.

Evento Rinse

L'evento Rinse consente di pulire il capillare e caricare un nuovo tampone o altri mezzi di separazione.

Figura 6.9 Finestra di dialogo Rinse

In questa finestra di dialogo sono disponibili i parametri indicati di seguito.

Pressure Type

Consente di selezionare il meccanismo per spostare il fluido nel capillare.

Tray Positions

Funziona esattamente come descritto nell'evento Separation.

Values

Specifica l'entità e la durata della pressione da erogare.

Pressure Direction

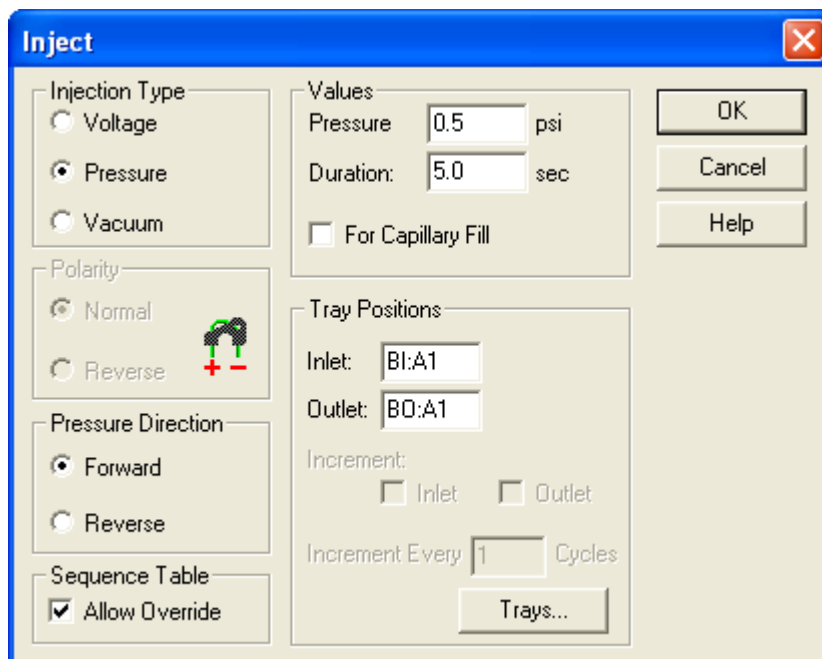
Consente di specificare se applicare la pressione all'ingresso o all'uscita del capillare.

At Time

Funziona esattamente come descritto nell'evento Separation.

Evento Inject

L'evento Inject viene utilizzato per erogare nel capillare una precisa quantità di campione. Questa fase è sempre senza orario e di solito precede la prima fase di separazione.

Figura 6.10 Finestra di dialogo Inject

In questa finestra di dialogo sono disponibili i parametri indicati di seguito.

Injection Type

Il campione può essere erogato nel capillare mediante pressione positiva, vuoto o mediante l'applicazione di una tensione (iniezione elettrocinetica).

Polarity

Specifica la carica degli elettrodi durante un'iniezione di tensione.

Pressure Direction

Specifica se la pressione o il vuoto sono applicati all'ingresso o all'uscita del capillare.

Values

Specifica l'entità della pressione, del vuoto o della tensione e la durata di applicazione. Maggiori sono i valori e maggiore la quantità di campione iniettato. L'opzione di riempimento capillare è utilizzata per la separazione cIEF, che richiede che il capillare sia completamente riempito con la miscela campione. Per maggiori informazioni sulle separazioni cIEF, visitare l'indirizzo sciex.com/ce o consultare la *Guida applicativa all'analisi cIEF (Capillary Isoelectric Focusing)*.

Tray Positions

Funziona esattamente come descritto nell'evento Separation.

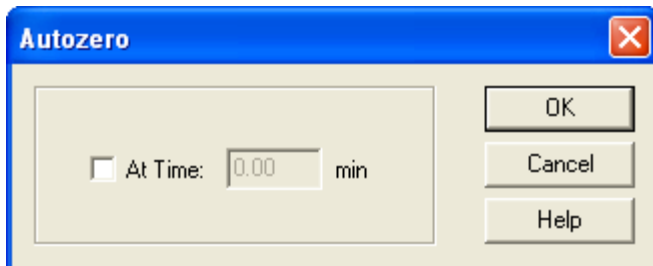
Sequence Table

Quando un metodo viene utilizzato in una tabella delle sequenze, alcuni parametri dell'evento Inject possono essere sovrascritti dai valori immessi per la sequenza. Questo parametro determina se la priorità debba essere attribuita all'evento Inject del metodo o alla tabella delle sequenze. Sono consentiti più eventi di iniezione. Se vengono utilizzate iniezioni multiple, nella tabella delle sequenze può essere sovrascritto o incrementato solo un evento di iniezione.

Evento Autozero

Questo evento fa sì che l'output del rilevatore venga reimpostato su zero. Può essere con o senza orario.

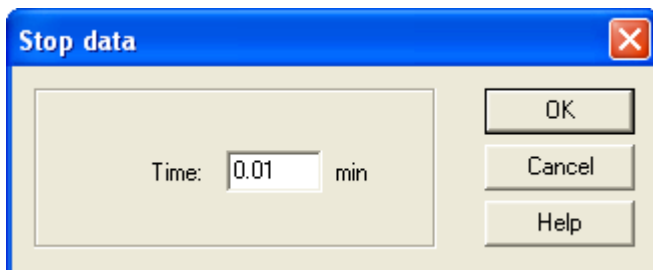
Figura 6.11 Finestra di dialogo Autozero



Evento Stop Data

La raccolta dei dati inizia all'orario = 0.00 e prosegue fino alla fine del metodo, a meno che non venga raggiunto un evento STOP DATA. Questo evento può essere utilizzato per evitare la raccolta dati durante fasi quali la pulizia dei capillari successiva all'esecuzione. STOP DATA è un evento sempre con orario.

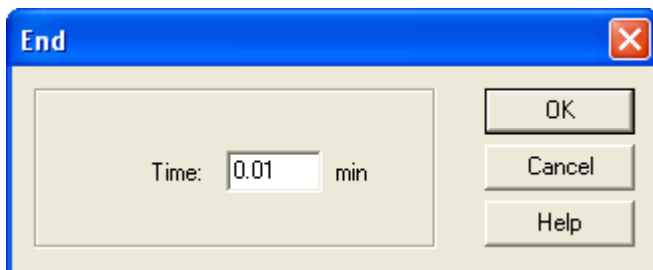
Figura 6.12 Finestra di dialogo Stop Data



Evento End

L'evento End è opzionale. Il metodo si arresta e non continua oltre un evento finale. È un evento sempre con orario.

Figura 6.13 Finestra di dialogo End



Nella parte successiva di questo esercizio viene creato un programma orario che utilizza le condizioni iniziali inserite in precedenza.

Creazione di un programma orario

Il metodo di esempio esegue le operazioni indicate di seguito.

- Mini-rigenerazione del capillare
- Riempimento del capillare con soluzione tampone
- Iniezione della miscela di test
- Separazione della miscela di test
- Risciacquo successivo all'esecuzione.

Questo metodo utilizza una configurazione del vassoio di fiale simile a quella utilizzata nella sezione Direct Control. Le posizioni delle fiale sono indicate nella tabella seguente.

Tabella 6.1 Posizioni delle fiale

Soluzione	Vassoio per tamponi di sinistra (ingresso)	Vassoio per tamponi di destra (uscita)
Miscela di test	C1	
Soluzione di rigenerazione A	D1	
Acqua	E1	
Tampone per corsa A	A1, A2	A1
Fiala vuota		B1

- 1 Fare clic sulla scheda **Time Program**. La scheda si apre con un foglio di calcolo vuoto.
- 2 Fare clic nel campo **Event** e utilizzare le frecce.
- 3 Fare clic su **Rinse** nell'elenco a discesa.
- 4 Fare clic su **Trays**.
- 5 Fare clic su **D1** sul lato Inlet (a sinistra) e su **B1** nel lato Outlet (a destra).
- 6 Prima di fare clic su **OK**, fare clic con il pulsante destro del mouse su una delle posizioni del tampone appena selezionato. Viene visualizzata una finestra di dialogo che consente di identificare il contenuto di tale posizione.
- 7 Inserire i commenti appropriati dalla tabella riportata sopra e ripetere per le altre fiale. Al termine, fare clic su **OK** per tornare alla finestra Rinse.

-
- 8** Per questa fase, accettare i valori predefiniti di tutti gli altri parametri.
Fare clic su **OK** per tornare al foglio di calcolo Time Program.
-

I parametri chiave sono stati inseriti automaticamente nella tabella. Questo risciacquo non prevede orario, pertanto non è presente alcun valore nella finestra Time.

- 1** Nella riga vuota situata nella parte inferiore della tabella, fare nuovamente clic sulla colonna **Event** e selezionare un altro evento di risciacquo. In questo caso, programmare un risciacquo con acqua dalla posizione BI:E1 alla posizione BO:B1.
-

- 2** Modificare il tempo di risciacquo impostando 0,5 minuti.
Quando si fa clic su **OK** nella finestra di dialogo, l'evento viene aggiunto alla tabella.
-

- 3** Fare nuovamente clic sulla colonna **Event** e aggiungere un passaggio per riempire il capillare con risciacquo di soluzione tampone dalla posizione BI:A1 alla posizione BO:B1.
-

- 4** Questa volta, impostare 25 psi per un minuto. Al termine fare clic su **OK**.
-

- 5** Fare nuovamente clic nella riga inferiore della colonna **Event**.
-

- 6** Selezionare **Inject** come tipo di evento.
-

- 7** Fare clic sull'opzione **Trays** e programmare l'iniezione dalla posizione **BI:C1** alla posizione **BO:A1**.
-

- 8** Fare clic su **OK**.
-

- 9** Digitare **0,5** psi come pressione e **4,0** secondi come durata.
-

- 10** Fare clic su **OK**.
-

A questo punto del metodo si è pronti per separare i componenti nella miscela di test.

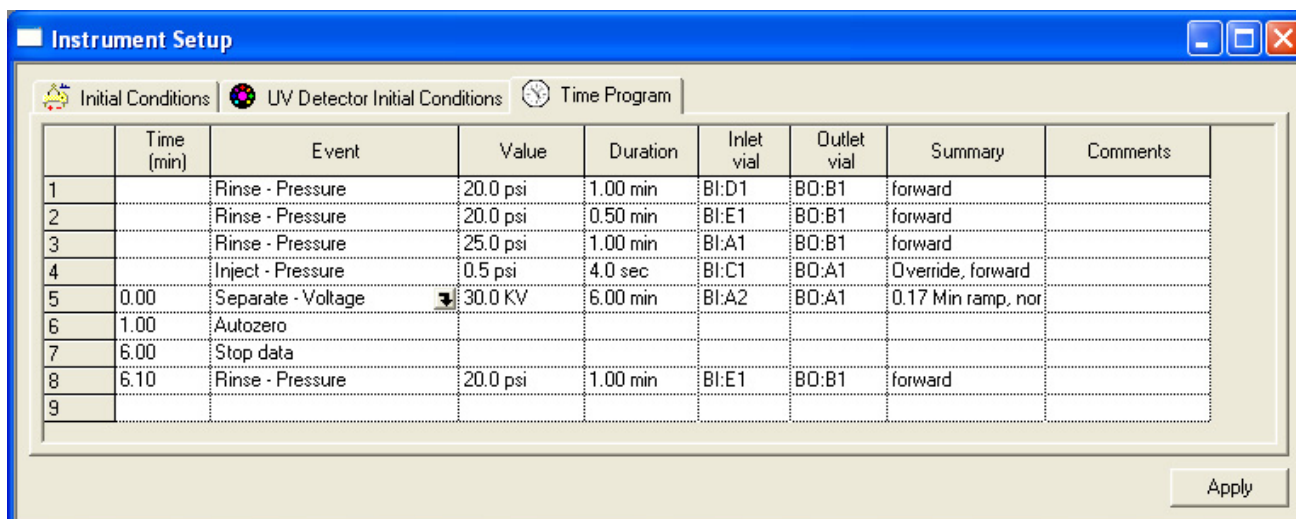
- 1** Selezionare un nuovo campo **Event** e scegliere **Separate** come tipo di evento.
-

- 2 Utilizzare il pulsante **Trays** per selezionare le posizioni **BI:A2** e **BO:A1**.
- 3 Fare clic su **OK**.
- 4 Selezionare una separazione **Voltage**.
- 5 Impostare la tensione su 30 kV, il tempo di incremento su 0,2 minuti e la durata su 6 minuti.
- 6 Controllare il pulsante **At time** perché si tratta di una fase con orario.
- 7 Impostare l'orario su **0,00** minuti.
- 8 Per inserire questo evento nella tabella, fare clic su **OK**.

Inserire nel metodo un risciacquo finale. A questo scopo è necessario inserire un evento Stop Data.

- 1 Selezionare il campo **Event** e scegliere **Stop Data** come tipo di evento.
- 2 Digitare il valore **6,00** minuti per forzare l'arresto della raccolta dati al termine del passaggio di separazione.
- 3 L'ultima fase di questo processo consiste nel risciacquo con acqua dalla fiala di acqua (EI) a quella vuota (BI).
 - Programmare il risciacquo per un minuto a 20 psi.
 - Fare clic su **At Time** e utilizzare il valore di 6,10 minuti.
- 4 È buona norma impostare il rilevatore su Autozero poco tempo dopo l'inizio dell'esecuzione. Nel campo New Event, fare clic su **Autozero**.
- 5 Fare clic su **At Time** e digitare il valore **1,00**. Quando questo elemento viene inserito nel foglio di calcolo Time Program, viene spostato automaticamente nella sequenza oraria corretta. A questo punto, la scheda Time Program dovrebbe avere un aspetto simile a quella della [Figura 6.14](#).

Figura 6.14 Instrument Setup - Scheda Time Program



In questa fase, è ancora possibile modificare il metodo. Per modificare le voci delle colonne Time, Value, Duration, Inlet e Outlet fare clic sul valore esistente e immettere quello desiderato. In alternativa, se si fa clic sul nome di un evento esistente, viene aperto l'elenco a discesa dei tipi di evento.

- 6 Fare clic su **Current Event** per riaprire la relativa finestra di dialogo o fare clic su **new event** per modificare il tipo di evento.

Salvataggio del metodo

IMPORTANTE Ricordarsi di salvare il metodo.

- 1 Fare clic su **File > Method > Save As** nella barra dei menu.

- 2 Assegnare al metodo un nome con il titolo e la data.

Ad esempio:

digitare: **TestMethod_032309**

- 3 Fare clic su **Save**.

Il percorso predefinito all'installazione è: **C:\32Karat\Projects\Default\Methods**.

L'amministratore di sistema potrebbe aver assegnato all'utente un percorso predefinito diverso.

Il metodo è pronto per essere eseguito.

Nel capitolo successivo verrà eseguito il metodo appena creato. I parametri e gli eventi non descritti qui, sono descritti nelle risorse dell'[APPENDICE A, Risorse aggiuntive](#) e nell'Help online del software 32 Karat.



Utilizzo del sistema

Esecuzione singola e con sequenze

Nell'ultimo capitolo è stato creato un metodo strumentale. In questo esercizio, il metodo verrà eseguito in modalità a esecuzione singola. In questa modalità, il metodo deve essere avviato manualmente prima di ogni esecuzione. La modalità singola è utile nella fase di sviluppo del metodo, in cui i risultati di un'esecuzione suggeriscono modifiche al metodo o ad altre procedure. Nella seconda parte di questa sezione, verrà creata una sequenza per più esecuzioni.

Per l'esecuzione di campioni e l'acquisizione di dati è necessario che lo strumento sia online. In caso contrario, nella barra del titolo della finestra Instrument viene visualizzato 'Offline'. Chiudere eventuali finestre offline prima di proseguire. Nella finestra principale del software 32 Karat, fare doppio clic sull'icona Instrument per passare alla modalità online.

NOTA Prima di avviare il metodo, è necessario accendere la lampada o i laser del rilevatore.

Materiali necessari

- Cartuccia preparata nell'esercizio Direct Control (diametro interno capillare 75 µm, lunghezza totale 60 cm, 50 cm al rilevatore), installata in una cartuccia adatta al tipo di rilevatore configurato. Per istruzioni sulla creazione di una nuova cartuccia o sull'installazione di un capillare, fare riferimento alla *Guida alla manutenzione del sistema*.
- Soluzione di rigenerazione A per capillare (1 M idrossido di sodio, PN 338424)
- Tampone per corsa A (PN 338426)
- Acqua distillata o deionizzata (grado HPLC)
- Fiale e tappi universali
- Vassoio per 36 fiale
- Per il rilevamento UV o PDA: miscela di test B (PN 501333)
- Per il rilevamento LIF con laser a ioni argon da 488 nm: miscela di test per rilevatore LIF (PN 726022)

Caricare i vassoi nel modo seguente:

Tabella 7.1 Posizioni delle fiale

Soluzione	Vassoio per tamponi di sinistra (ingresso)	Vassoio per tamponi di destra (uscita)
Miscela di test ^a	B1	
Soluzione di rigenerazione A	D1	
Acqua	E1	
Tampone per corsa	A1, A2	A1
Fiala vuota		B1

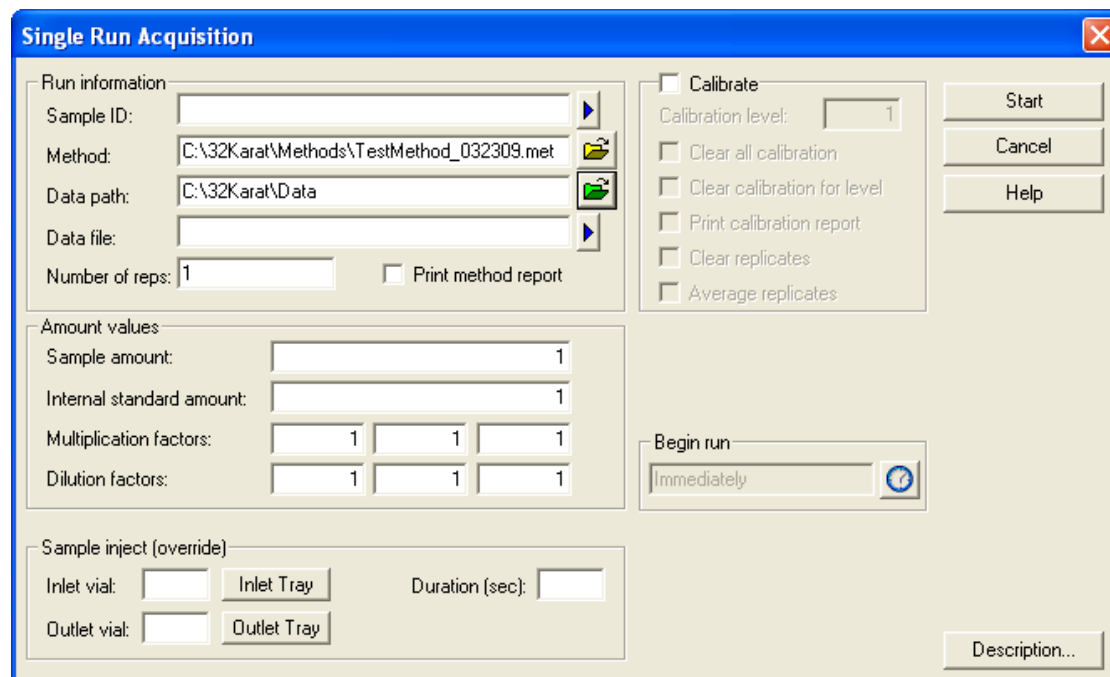
a. PN 501333 per il rilevatore UV o PDA
PN 726022 per il rilevatore LIF con laser da 488 nm

Installare i vassoi caricati e la cartuccia del capillare nello strumento come descritto in *Guida alla manutenzione del sistema*. Se non lo si è già fatto, aprire la finestra del software dello strumento.

Esecuzione singola

Fare clic su **Control > Single Run** nella barra degli strumenti o sull'icona **Single Run**  per aprire la finestra di dialogo Single Run Acquisition illustrata di seguito.

Figura 7.1 Finestra di dialogo Single Run Acquisition



È necessario indicare almeno un ID campione, un metodo e un file di dati. Il file di dati viene memorizzato nella directory indicata nel percorso dati. L'ID campione può essere qualsiasi stringa di testo che identifichi il campione. L'ID viene visualizzato in tutti i report successivi. È possibile selezionare il file del metodo facendo clic sull'icona Open e navigando fino al metodo desiderato. Per questo esercizio, selezionare il metodo creato nella sezione Method Editing.

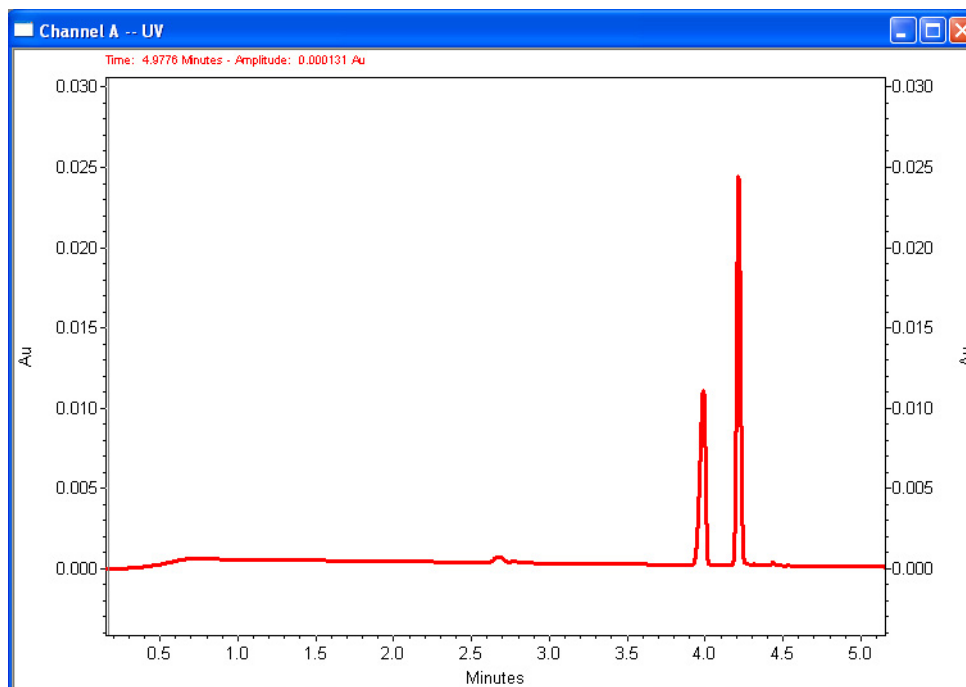
Il percorso dati viene selezionato con modalità analoghe a quelle utilizzate per la selezione del metodo. In questo caso, si seleziona una directory anziché un file. Il file di dati viene inserito digitando un nome univoco nel campo. Il nome del file non deve esistere nella directory dei dati; se il nome esiste, l'esecuzione non viene avviata.

Per eseguire il metodo non è necessario immettere gli altri elementi presenti nella finestra.

Quando si è pronti per iniziare, premere **Start**. Il sistema esamina il metodo per verificare che sia appropriato per la configurazione dello strumento. Il metodo viene quindi scaricato nel sistema PA 800 Plus. Lo strumento esegue un breve controllo iniziale, quindi avvia il metodo.

Se vengono visualizzati messaggi di errore o i dati non sono simili all'esempio mostrato nella [Figura 7.2](#), controllare quanto segue:

- Le fiale sono riempite correttamente con i fluidi appropriati?
- Le fiale si trovano nelle posizioni specificate per il metodo?
- È stato selezionato il metodo corretto?
- Il metodo è stato scritto per la configurazione attuale dello strumento (ad esempio, un metodo PDA non può essere eseguito su un sistema UV o LIF)?
- Il metodo è corretto?
- I tipi di vassoio specificato nelle condizioni iniziali del metodo corrispondono ai tipi di vassoio configurati per lo strumento?

Figura 7.2 Elettroferogramma della miscela di test

Questo metodo è utilizzato per gli esercizi aggiuntivi. Non continuare con la sezione successiva finché non si ottiene un esito positivo per almeno un'esecuzione.

Programmazione di una sequenza

Una sequenza è un elenco di metodi e file di dati che verranno utilizzati per eseguire test su un lotto di campioni senza l'intervento dell'utente. Le sequenze possono essere utilizzate per acquisire dati (mediante lo strumento) o per la rielaborazione a lotti dei file di dati esistenti. In questo esercizio, verrà creata una sequenza per acquisire dati da più esecuzioni del metodo per miscela di test. Più avanti in questa guida verrà utilizzata una sequenza per rielaborare il lotto dei dati. Questo esercizio richiede il collegamento online.

- 1 Per creare una nuova sequenza, fare clic su **File > Sequence > Sequence Wizard** nella finestra Instrument. Viene visualizzata la pagina della procedura guidata Sequence.
La procedura guidata è costituita da cinque pagine. Non vengono utilizzate tutte per ogni sequenza e in questo esercizio non vengono utilizzate tutte le funzioni di ciascuna finestra di dialogo.

Figura 7.3 Procedura guidata Sequence - Pagina Method

Sequence Wizard - Method

Method :

Data File Type

☒ For acquisition
☐ From existing data files


Amount values

Sample amount :

Internal standard amount :

Multiplication factors :

Dilution factors :

- 2 Nella prima pagina è necessario selezionare un metodo. Fare clic su  e navigare al file del metodo creato nell'ultima sezione.
- 3 In **Data File Type**, fare clic su **For Acquisition**. La voce **Amount Values** non viene utilizzata in questo esercizio.
- 4 Fare clic su **Next**.

Questa pagina consente di creare **Sample ID** e **Data File ID**.

Figura 7.4 Procedura guidata Sequence - Pagina Unknowns

Sequence Wizard - Unknowns

Sample ID :

Data path :

Data file :

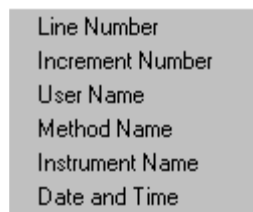
Number of unknown runs in sequence :

Repetitions per run :

☐ Create a separate row in the sequence for each repetition

- 5 Digitare una stringa di testo nel campo **Sample ID**. La freccia blu a destra del campo di testo consente di aprire il seguente menu:

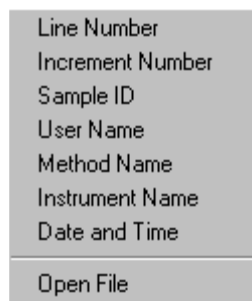
Figura 7.5 Opzioni del menu Sample ID Text



Selezionando una voce del menu nel campo **Sample ID** viene inserito un simbolo. Nell'esempio illustrato, è stato selezionato **Line Number**. Questo parametro viene automaticamente incorporato nell'ID campione quando viene eseguita la sequenza. È possibile selezionare qualsiasi combinazione di questi elementi. Il campo Data Path consente di specificare la directory in cui sono memorizzati i file di dati.

- 6 Fare clic su **Open**, selezionare **Data Path**, quindi navigare fino alla cartella.
- 7 Digitare una stringa di testo nel campo **Data File**. Con la freccia blu a destra del campo di testo viene aperto questo menu:

Figura 7.6 Opzioni del menu Data File Text

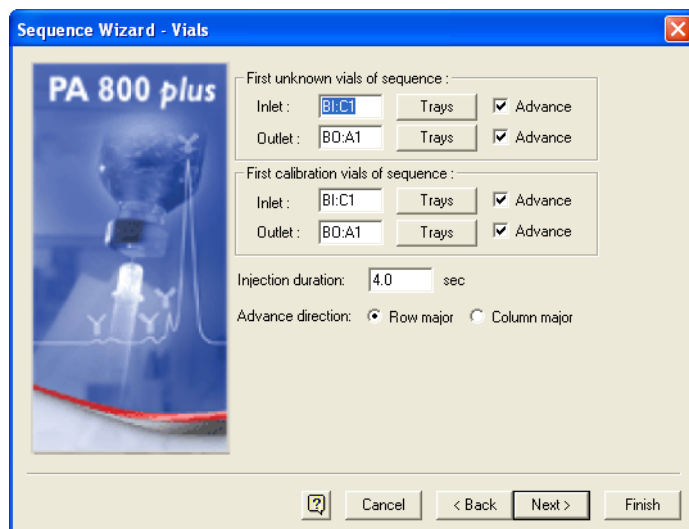


Come descritto in precedenza per il campo **Sample ID**, questo menu consente di inserire codici che vengono aggiunti automaticamente al nome file quando viene eseguita la sequenza. In questo esempio, sono stati selezionati i valori **Date** e **Time**. L'opzione **Open File** consente di rielaborare i file di dati esistenti, non di acquisirne di nuovi.

- 8 **Number of Unknown Runs in Sequence** determina la quantità di righe presenti nella tabella delle sequenze. Per questo esercizio, digitare **3**.
- 9 **Repetitions per Run** determina il numero di esecuzioni di ciascuna riga della **tabella delle sequenze**. Se si utilizza questa opzione, al nome del file viene aggiunto automaticamente un identificatore per ogni ripetizione. Per questo esercizio, digitare **1**.

10 Fare clic su **Next**.

Figura 7.7 Procedura guidata Sequence - Pagina Vials



Se il metodo utilizzato consente di sovrascrivere la posizione delle fiale (vedere [CAPITOLO 6, Creazione e modifica di un metodo](#)), immettere la posizione iniziale. Se non è possibile sovrascrivere la posizione o se si è impostato l'incremento automatico, qualsiasi valore immesso in questo campo verrà ignorato. In questa finestra è inoltre possibile identificare un set di fiale di calibrazione. Per maggiori informazioni sulla calibrazione mediante la tabella delle sequenze, fare riferimento alle risorse dell'[APPENDICE A, Risorse aggiuntive](#).

In **Advance Direction** è possibile immettere la direzione di avanzamento della sequenza.

Quando si seleziona la casella di controllo **Advance** per una o per entrambe le fiale di ingresso e di uscita, il software compila automaticamente i valori delle posizioni delle fiale nelle colonne **Sample Inject Inlet/Outlet** della **tabella delle sequenze**. La compilazione automatica evita di dover inserire manualmente e una alla volta le posizioni delle fiale nella **tabella delle sequenze**.

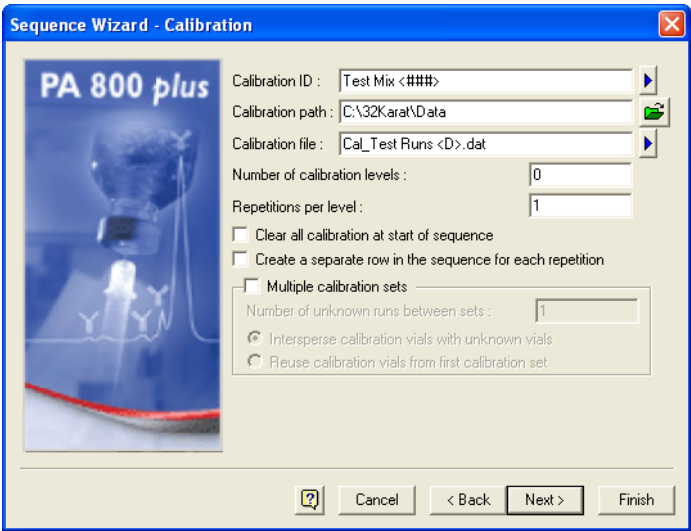
- Se si seleziona **Row Major** come **Advance Direction**, il software compila automaticamente le posizioni delle fiale, incrementandole per riga nello stesso vassoio (ad esempio, A1, A2, A3, A4, A5, A6, B1, B2, B3, B4 per la configurazione del vassoio di soluzioni tampone).
- Se si seleziona **Column Major** come **Advance Direction**, il software compila automaticamente le posizioni delle fiale, incrementandole per colonna dello stesso vassoio (ad esempio, A1, B1, C1, D1, E1, F1, A2, B2, C2, D2 per la configurazione del vassoio di soluzioni tampone).

Non confondere le posizioni di avanzamento delle fiale con l'operazione di incremento nelle esecuzioni dello strumento. L'avanzamento delle posizioni delle fiale in questo caso fa riferimento alla semplificazione della pianificazione e dell'organizzazione della **tabella delle sequenze**. I valori delle posizioni delle fiale possono essere modificati nella **tabella delle sequenze** e non vengono salvati con alcun metodo, ma vengono salvati nella sequenza.

Fare clic su **Next**.

11 Digitare **0** nel campo **Number of calibration levels** quindi fare clic su **Next** per proseguire.

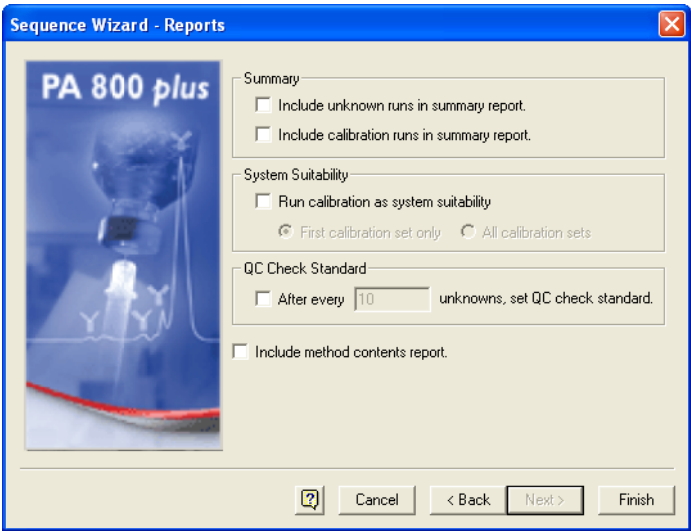
Figura 7.8 Procedura guidata Sequence - Pagina Calibration



NOTA Questo esempio non riguarda la calibrazione. La calibrazione viene descritta nel [CAPITOLO 9, Calibrazione](#).

12 La pagina **Reports** consente la creazione automatica di report al termine dell'esecuzione della sequenza. In questo esercizio non verranno creati report. Tutte le altre opzioni devono rimanere vuote.

Procedura guidata Sequence - Pagina Reports



Fare clic su **Finish**. Viene visualizzata una pagina simile a quella illustrata.

Figura 7.9 Tabella delle sequenze (parte A)

Sequence: untitled.seq												
Run #	Status	Run Type	Level	Conc Override	Custom Parameters	Reps	Sample Inject Inlet	Sample Inject Outlet	Sample Inject Duration	Sample ID	Method	Filename
1		Unknown	0	n/a	Unconfigured	1	BI:C1	BO:A1 4.0		Test Mix 001	TestMehod_032309.met	Test Runs <D>.dat
2		Unknown	0	n/a	Unconfigured	1	BI:C2	BO:A2 4.0		Test Mix 002	TestMehod_032309.met	Test Runs <D>.dat
3		Unknown	0	n/a	Unconfigured	1	BI:C3	BO:A3 4.0		Test Mix 003	TestMehod_032309.met	Test Runs <D>.dat
4												

Questa tabella contiene un numero di colonne maggiore rispetto a quelle che si possono visualizzare contemporaneamente. La maggior parte di queste informazioni può essere modificata.

- 13** Scorrere verso sinistra e verso destra per visualizzare l'intera finestra. Non tutte le colonne vengono utilizzate in questo esercizio. Le colonne principali sono descritte di seguito.

Run Type: poiché non è stato selezionato alcun report di riepilogo, tutte le esecuzioni sono di tipo sconosciuto.

Reps: indica al sistema quante volte eseguire la riga.

- 14** Fare clic nel campo **Reps** per la seconda riga e modificare **Reps** in **2**. La riga 2 viene ora eseguita due volte, per un totale di quattro esecuzioni in questa sequenza di tre righe.

- 15** Scorrere verso destra fino a quando la finestra avrà l'aspetto seguente.

Figura 7.10 Tabella delle sequenze (parte B)

Run #	Sample ID	Method	Filename	Sample Amt.	ISTD Amt.	Multiplier 1	Multiplier 2
1	Test Mix 001	TestMethod_032309.met	Test Runs <D>.dat	1	1	1	1
2	Test Mix 002	TestMethod_032309.met	Test Runs <D>.dat	1	1	1	1
3	Test Mix 003	TestMethod_032309.met	Test Runs <D>.dat	1	1	1	1
4							

Sample ID si basa sul testo dell'ID campione immesso nella procedura guidata **Sequence**. Il numero di riga è stato aggiunto all'ID campione immesso.

- 16** Fare clic nel campo **Sample ID** per l'esecuzione n. 2 e modificarla per visualizzare **Test Mix 002 Twice**.

Method indica il metodo immesso nella procedura guidata **Sequence**.

Per modificare il metodo, fare clic nel campo **Method** e sull'icona verde. In questo esercizio, non modificare il metodo.

Filename si basa sul testo del nome di file immesso nella procedura guidata **Sequence**. Nel nome di file viene visualizzato ancora il simbolo di data e ora <D>, perché la data e l'ora rimangono sconosciute fino all'esecuzione della sequenza.

- 17** Dopo aver modificato la tabella, fare clic su **File > Sequence > Save As**. Digitare un nome significativo, ad esempio, **TestSequence_021319**.

Esecuzione della sequenza

Ora è possibile eseguire la sequenza. Lo strumento deve essere preparato per il funzionamento come descritto in Single Run Mode, nelle pagine precedenti di questa sezione. Verificare tramite Direct Control che la lampada UV o il laser dello strumento siano accesi. Il campione di test e le fiale tampone devono essere caricati e installati. Prima di proseguire è necessario collegarsi online.


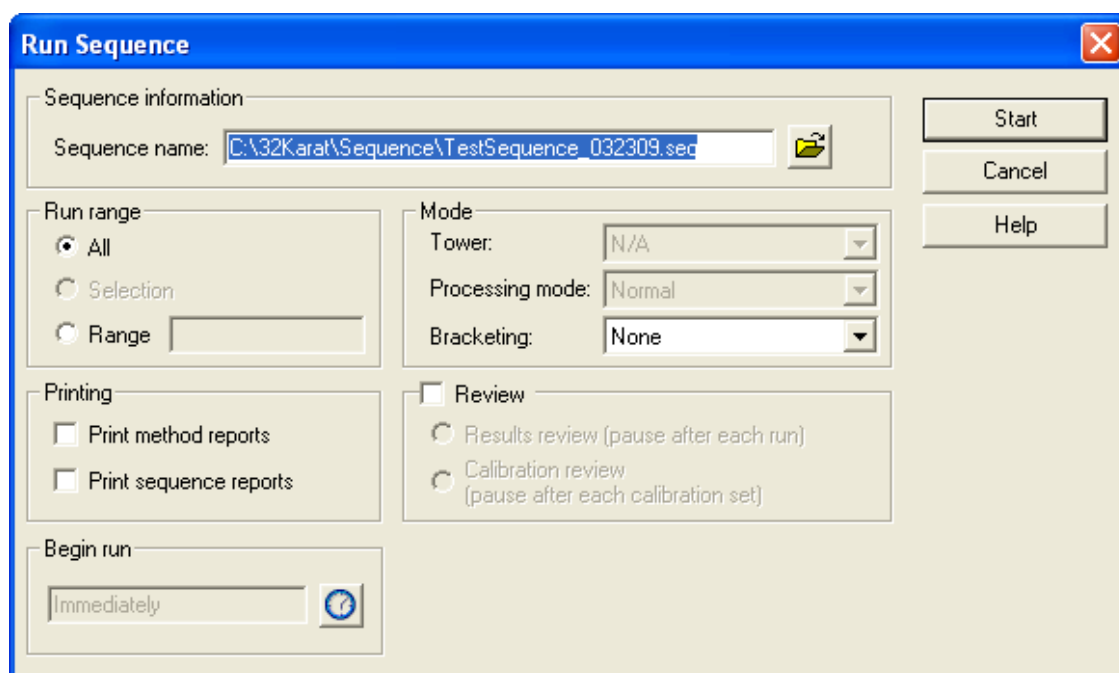

- 1 Fare clic sull'icona  nella barra degli strumenti della finestra Instrument. Questa icona non è disponibile in modalità Offline. Viene visualizzata la finestra di dialogo illustrata:

Figura 7.11 Finestra di dialogo Run Sequence



- 2 Fare clic sull'icona **Open**  e selezionare la sequenza appena creata. Il nome della sequenza viene visualizzato nel campo di testo.

Run Range consente di eseguire solo parte della sequenza.

- 3 Per questo esercizio fare clic su **All**.

Printing consente al sistema di stampare automaticamente i report una volta pronti. Se non si dispone di una stampante collegata, lasciare deselezionata questa casella di controllo.

Al termine, la finestra di dialogo dovrebbe essere simile a quella visualizzata nella [Figura 7.11](#), ma con il nome della sequenza scelto dall'utente.

-
- 4 Assicurarsi che lo strumento sia caricato e pronto per l'esecuzione, quindi fare clic su **Start**.
-

Verifica della sequenza

Il software verifica che i metodi della sequenza siano appropriati per la configurazione corrente dello strumento. In caso di problemi, viene visualizzato un messaggio e la sequenza non viene eseguita. Risolvere gli eventuali problemi rilevati e riavviare la sequenza.

Se la verifica ha esito positivo, il metodo della prima riga viene scaricato nel sistema PA 800 Plus e l'esecuzione viene avviata. Osservare il funzionamento dello strumento come guida alle operazioni future e alla risoluzione dei problemi. Durante l'acquisizione dei dati è possibile aprire la finestra Direct Control per visualizzare informazioni in tempo reale sullo stato dello strumento. Durante l'esecuzione, è possibile visualizzare i dati in tempo reale nelle finestre degli strumenti. Una finestra mostra il segnale di assorbanza (o fluorescenza) e una seconda mostra il segnale corrente, poiché nel metodo sono stati selezionati i canali. Se si utilizza un rilevatore PDA, una terza finestra apre un contour plot del segnale di assorbanza.

Al termine di ogni esecuzione, prima dell'inizio della successiva esecuzione viene scaricato il relativo metodo. In questo modo è possibile apportare modifiche a un metodo durante l'elaborazione di una sequenza. La versione del metodo eseguita è quella attualmente scaricata, salvata per ultima. Durante l'elaborazione è inoltre possibile modificare la tabella delle sequenze. È possibile modificare o eliminare le righe esistenti non ancora avviate e aggiungere righe supplementari alla tabella. Non è possibile modificare le righe già completate o in esecuzione.

NOTA Quando viene creata una sequenza utilizzando un metodo per il quale sia abilitata la funzione **auto-incrementing**, non sono ammesse modifiche delle posizioni generate automaticamente. Se non si seleziona **allow override**, le voci pertinenti della tabella delle sequenze non sono modificabili.

Al termine della sequenza, sono stati acquisiti dati derivanti da quattro esecuzioni. Le due esecuzioni replicate dalla riga 2 hanno nomi di file a cui sono stati aggiunti rep 1 e rep 2.

È utile approfondire la conoscenza della tabella delle sequenze prima di passare alla sezione successiva. Apportare modifiche, elaborare la sequenza e osservare gli effetti. È possibile combinare questi esperimenti con la scrittura di nuovi metodi. È possibile immettere nella tabella delle sequenze una serie di metodi diversi. Quando vengono elaborati, i risultati evidenziano gli effetti delle modifiche sui parametri. Ad esempio, è possibile creare una serie di metodi a diverse temperature di separazione (ad esempio, 20 °C, 22 °C, 24 °C, 26 °C, 28 °C e 30 °C) per esaminare l'effetto di tale parametro sulla separazione. Un'altra serie di esperimenti potrebbe esaminare gli effetti delle variazioni sul volume iniettato. Se il metodo consente le sovrascritture, per modificare il volume iniettato con un solo metodo modificare la colonna Sample Inject Duration della tabella delle sequenze.

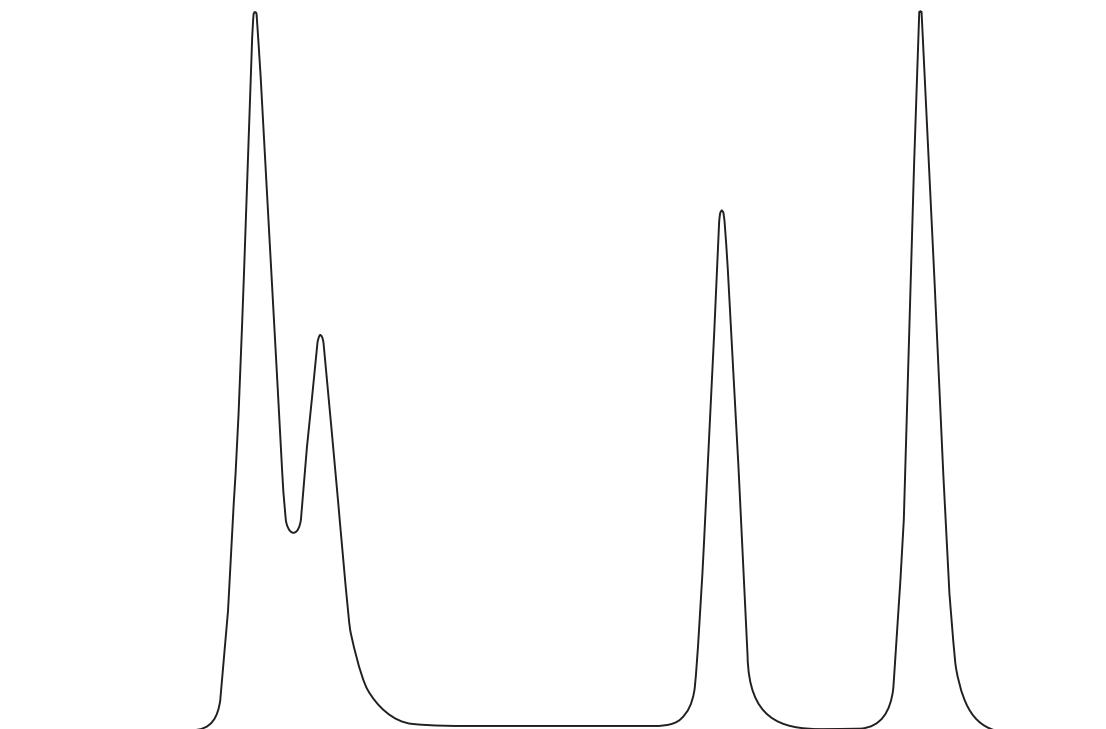


Integrazione

Descrizione

Un elettroferogramma è una rappresentazione grafica del passaggio di molecole attraverso la finestra del rilevatore. L'area sottesa dal picco è direttamente correlata alla quantità di analiti presente nel campione. Il processo di determinazione dell'area è noto come integrazione. In pratica, l'integrazione comprende le fasi per la determinazione dei punti iniziali e finali dei picchi e della forma e della posizione della linea di base. Se i componenti del campione non sono completamente separati l'uno dall'altro (risolti), è necessario anche valutare dove dividere l'area dei due picchi. Un insieme di dati molto semplice è illustrato nella figura seguente.

Figura 8.1 Set di dati tipico



In questo esempio, sono presenti quattro componenti. Due sono ben risolti rispetto agli altri. Gli altri lo sono solo parzialmente. L'area del picco dei quattro componenti è diversa. Ciò può indicare che sono presenti a livelli diversi, che producono risposte differenti nel rilevatore o entrambi le cose. La quantificazione è descritta nella sezione successiva. Questo esercizio si concentra sul rilevamento dei picchi e sulla definizione della linea di base.

Integrazione dei dati

Per l'integrazione dei picchi sono necessari due parametri: larghezza e soglia. Separazioni più complesse richiedono l'uso di più parametri. Le separazioni delle miscele di test usate negli esercizi precedenti producono elettroferogrammi molto semplici. In questo esercizio, gli esempi vengono installati con il software. I principi di integrazione sono gli stessi indipendentemente dal tipo di rilevatore. Configurazione di uno strumento UV per l'analisi offline.

Nella finestra Instrument fare clic su **File > Method > New**. Chiudere la finestra di dialogo Instrument Setup quando viene visualizzata. Non è necessaria per questo esercizio.

NOTA Rivedere le istruzioni presenti in [CAPITOLO 1](#) prima di utilizzare i file dei campioni. Esercitarsi con una copia dei file di dati e non con gli originali.

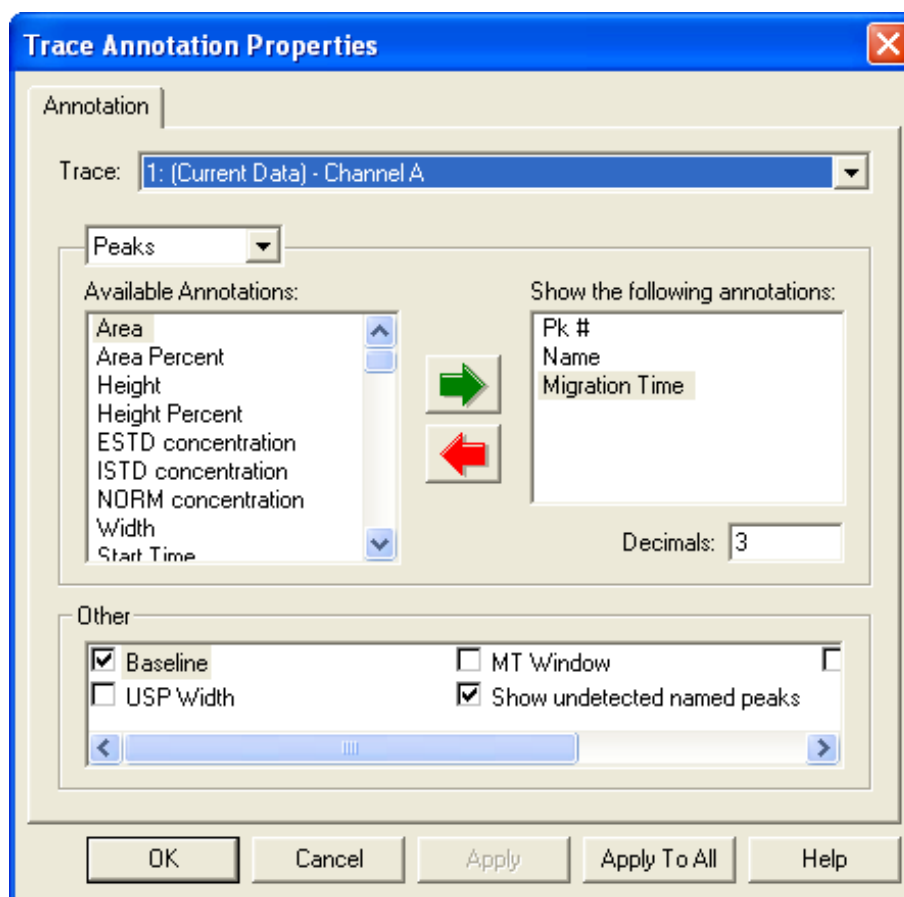
-
- 1** Nella finestra Instrument, fare clic su **File > Data > Open**.

 - 2** Passare alla copia della cartella Data e selezionare il file denominato **CE Data Sample 1.dat**. I dati vengono visualizzati nella finestra Instrument.

 - 3** Fare clic sulla finestra **CHANNEL A** per selezionarla, quindi digitare **Ctrl-Z** per ingrandire i dati alla dimensione massima. Vengono utilizzati solo i dati del canale A. I dati ausiliari (corrente, tensione, alimentazione, pressione) non possono essere integrati.

 - 4** Fare clic con il pulsante destro del mouse sull'elettroferogramma e selezionare **Annotations**. Viene aperta la seguente finestra di dialogo:

Figura 8.2 Finestra di dialogo Trace Annotations



Questa finestra di dialogo consente di selezionare gli elementi da visualizzare nella finestra dell'elettroferogramma.

- 1 Selezionare gli elementi desiderati (**Peak#**, **Area** e **Migration Time**) facendo clic sull'elemento nel riquadro di sinistra, quindi spostarlo nel riquadro di destra utilizzando la freccia verde.
- 2 Assicurarsi che siano selezionati **Baseline** e **Show undetected peaks** (abilitati).
- 3 Quando la finestra di dialogo ha l'aspetto della finestra precedente, fare clic su **OK**.

NOTA Alcuni elementi potrebbero non apparire sull'elettroferogramma fino all'integrazione dei dati.
- 4 Nel menu Method fare clic su **Integration Events**. Viene aperta la tabella Integration Events. Per impostazione predefinita, in questa tabella sono presenti due elementi: Width = 0,2 e Threshold = 50. Ogni tabella di integrazione deve contenere almeno un valore per la larghezza e uno per la soglia.

- 5 Fare clic su **Analysis > Analyze** nella barra dei menu o su **Analyze** utilizzando i parametri predefiniti per l'integrazione iniziale dei dati. Il processo di integrazione richiede pochi secondi; l'elaborazione dei file di dati di dimensioni maggiori e con più picchi richiede più tempo.

Durante l'integrazione, il pulsante Analyze diventa Stop. Facendo clic sul pulsante Stop si interrompe l'analisi.

Al termine dell'integrazione, vengono visualizzati circa 26 picchi. Al di sopra o al di sotto di ciascun picco vengono visualizzati il numero, l'area e l'ora di migrazione. Grazie ai parametri predefiniti è stato possibile identificare i picchi principali, ma anche acquisire numerosi artefatti della linea di base privi di interesse.

Per ingrandire la linea di base e visualizzare i risultati dell'integrazione in dettaglio, è possibile utilizzare il mouse per selezionare la vista da ingrandire. Fare clic e tenere premuto il pulsante in un punto qualsiasi dell'immagine, quindi trascinare il mouse per evidenziare l'area che si desidera visualizzare. Quando il pulsante del mouse viene rilasciato, l'area selezionata occuperà per intero la finestra. Premere **Ctrl-Z** per ridurre la visualizzazione.

Esaminando l'area compresa tra 3,0 minuti e 3,4 minuti si denota il rilevamento anche picchi negativi (valli).

Ottimizzazione dell'integrazione

- 1 Fare clic su **Window > Tile Horizontally** per visualizzare contemporaneamente l'elettroferogramma e la tabella Integration Events.
- 2 Ridimensionare le finestre come si desidera facendo clic e trascinando il bordo di una finestra con il mouse.
- 3 Fare clic sull'elettroferogramma, quindi premere **Ctrl-Z** per ridurre l'ingrandimento, se necessario.
- 4 Fare clic sulla colonna **Value** dell'evento Threshold della tabella Integration Events.
- 5 Digitare il numero **100**.
- 6 Analizzare nuovamente i dati.

In questo caso, i picchi visibili dovrebbero essere circa dieci. Un esame approfondito rivela che questi sono probabilmente picchi reali e non artefatti della linea di base, anche se alcuni sono piccoli. Esaminare l'area, ad esempio, tra 14 e 15 minuti.

La soglia determina di quanto un picco debba sovrastare il rumore di fondo per essere riconosciuto come picco dal software di integrazione. Aumentando il valore della soglia si eliminano gli artefatti di sfondo. Se si eccede nell'impostazione del valore, è possibile arrivare a rimuovere i dati reali.

- 7** Impostare il valore della soglia su **1000** e analizzare nuovamente i dati.
Si può osservare che i picchi minori non sono più integrati e la linea di base al di sotto dei picchi più grandi si è spostata significativamente.
- 8** Prima di esaminare gli effetti dell'impostazione della larghezza, ripristinare il valore della soglia su **100**.
- 9** Fare nuovamente clic su **Analyze**.
- 10** Ingrandire la base dei picchi principali.
- 11** Modificare il valore della larghezza su **0.1** e fare clic su **Analyze**. La coda del secondo picco principale dovrebbe ora essere suddivisa come area separata.
Modificare il valore della larghezza su **0.5** e fare clic su **Analyze**. La coda viene nuovamente divisa, ma in un punto diverso da quello relativo al valore inferiore per la finestra specificato in precedenza.
Si pone la domanda di quale sia la corretta integrazione. La risposta dipende dalla situazione. L'esperienza e la capacità di valutazione determinano la correttezza dei risultati dell'integrazione. In questo esempio, lo scodamento del picco è un artefatto di separazione e l'area delle code dovrebbe essere inclusa nell'area del picco. Per ottenere questo risultato, con il medesimo file di dati, sarebbero opportune una larghezza di 0,2 e una soglia pari a 100.

Parametri di integrazione

Oltre ai parametri obbligatori di larghezza e soglia, ne sono disponibili molti altri che possono essere utilizzati per generare un risultato di integrazione che rifletta correttamente i componenti del campione. Questi argomenti vengono descritti diffusamente nelle risorse elencate nell'[APPENDICE A, Risorse aggiuntive](#). Nella parte successiva di questo esercizio, questi parametri aggiuntivi vengono utilizzati per facilitare l'integrazione di un file di dati più complesso.

Per iniziare, riportare il valore della larghezza a 0,2 e quello della soglia a 50 (valori predefiniti). Aprire il file di dati CE Data Sample 2.dat. Premere **Ctrl-Z**, se necessario, per visualizzare il file completo. Questo file di dati differisce da quello dell'esempio precedente per diversi aspetti. Presenta un numero maggiore di picchi principali, distribuiti in tutta l'esecuzione. Esiste inoltre un lungo tratto, da 12 a 21 minuti circa, in cui sono presenti diverse caratteristiche che potrebbero essere annoverate tra picchi o artefatti. Da un esame approfondito, il picco tra 24 e 25 minuti risulta essere, infatti, costituito da almeno tre picchi separati non completamente risolti. I picchi principali sono più alti e più larghi dei picchi nell'esempio precedente.

Dopo aver esaminato il file, ridurre l'ingrandimento e analizzarlo con i valori predefiniti di larghezza e di soglia. Vengono identificati numerosi picchi. Il picco di grandi dimensioni alla fine dell'esecuzione non è incluso. L'analisi sembra terminare a circa 28 minuti. Ingrandire l'area compresa tra 27 e 28 minuti circa. Sono individuabili numerosi picchi abbastanza piccoli e l'ultimo picco è il numero 150. A causa del limite di 150 picchi del software, la fine dei dati viene ignorata e non vengono segnalati picchi.

Non tutti i 150 componenti presentano fattori di interesse. È necessario modificare alcuni parametri per ridurre il numero dei picchi identificati. In questa parte dell'esercizio, la programmazione grafica consente di creare la tabella di integrazione.

Width

- 1 Ridurre l'ingrandimento fino a raggiungere la visualizzazione completa, quindi ingrandire il primo picco principale (a 9,5 minuti circa). Questo picco è largo quasi 0,5 minuti alla base, ed è significativamente più largo dei picchi più piccoli circostanti.
- 2 Fare clic con il pulsante destro del mouse sull'elettroferogramma e fare clic su **Graphical Programming**. Viene aperto un nuovo menu di parametri di integrazione.
- 3 Fare clic su **Width**. Viene visualizzata una finestra di dialogo blu che indica di selezionare il punto di inizio del picco. Fare clic sull'inizio del picco.
- 4 Fare clic sulla linea di base a sinistra del picco principale.
Viene richiesto di fare clic sul punto finale del picco. Dopo aver immesso i punti iniziale e finale del picco, viene aperta la finestra di dialogo **Width**. I valori potrebbero differire leggermente da quelli visualizzati, in base al punto esatto in cui si è fatto clic.

Figura 8.3 Determinazione della larghezza del picco

In questa finestra di dialogo sono disponibili diverse opzioni. Gli orari di inizio e di fine si riferiscono ai punti in cui è stato fatto clic. Per il parametro relativo alla larghezza, il valore è dato dalla differenza tra questi due punti temporali (la larghezza del picco). È possibile aggiungere questo parametro alla tabella Integration Events o alla tabella Manual Integration Fixes; queste opzioni differiscono per un aspetto fondamentale:

- gli elementi aggiunti nella tabella Integration Events entrano a far parte del metodo e influiscono su qualsiasi file di dati integrato con tale metodo;
- gli elementi aggiunti nella tabella Manual Integration Fixes diventano parte del file di dati e influiscono sull'integrazione del solo file di dati a cui sono collegati.

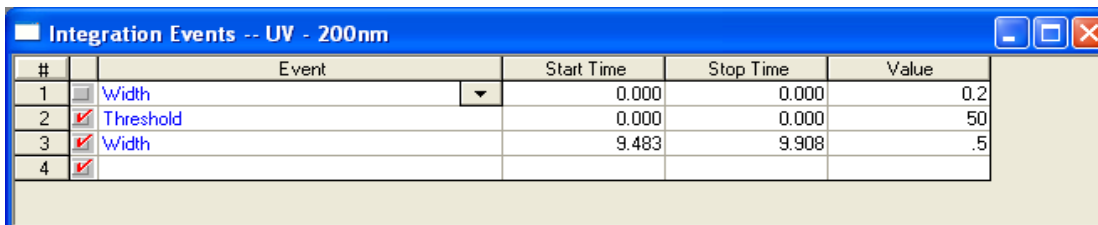
In questo esercizio, verrà utilizzata solo la tabella Integration Events. Le correzioni manuali sono descritte nelle risorse dell'[APPENDICE A, Risorse aggiuntive](#).

L'opzione **Add to Table** consente di aggiungere l'evento alla tabella Integration Events. **Analyze Now** consente di aggiungere l'evento alla tabella, ma determina anche la rielaborazione dell'integrazione con il nuovo parametro. Fare clic su **Add to Table**.

Il nuovo elemento Width è visibile nella tabella Integration Events. Questo elemento è attivo solo per l'intervallo compreso tra l'ora iniziale e l'ora finale. Si desidera che questo evento sia attivo per l'intero set di dati. Per avere un parametro attivo per l'intera esecuzione, impostare sia l'ora iniziale che l'ora finale su = 0. Modificare l'ora iniziale e l'ora finale del nuovo valore di larghezza in = 0. Per motivi di coerenza con questa guida, modificare il valore del nuovo evento Width impostandolo su 0,5. Il valore dovrebbe già essere molto vicino.

Ora sorge un problema. Esistono due istruzioni Width con valori diversi, entrambi dichiarati per l'intera esecuzione. È possibile eliminare la precedente istruzione Width, ma il software offre un'alternativa più semplice. A sinistra di ogni riga è presente una casella con un segno di spunta rosso. Fare clic sul segno rosso sulla riga 1 per deselectionarlo. Se questa riga è deselectionata viene ignorata. La tabella Integration Events quindi dovrebbe essere come segue:

Figura 8.4 Tabella Integration Events



#	Event	Start Time	Stop Time	Value
1	Width	0.000	0.000	0.2
2	Threshold	0.000	0.000	50
3	Width	9.483	9.908	.5
4	Width			

Threshold

- 1 Ridurre l'ingrandimento e fare clic su **Analyze**.
L'integrazione dovrebbe subire una lieve modifica. La modifica del solo parametro Width non è sufficiente per integrare questo set di dati. Sono ancora presenti troppi picchi molto piccoli privi di interesse.
- 2 Fare clic con il pulsante destro del mouse sull'elettroferogramma e fare clic su **Graphical Programming > Threshold**.
- 3 Seguendo le richieste visualizzate nella barra di stato, fare clic accanto all'inizio dell'elettroferogramma (tempo 0,0) e su 8,0 minuti circa.
- 4 Quando viene visualizzata la finestra di dialogo, fare clic su **Analyze Now**.
Il nuovo valore della soglia, che dovrebbe essere di circa 850, ha consentito di rimuovere molti dei picchi minori presenti nell'intervallo compreso tra 0 e 8 minuti. Anche il nuovo valore della soglia è stato aggiunto alla tabella Integration Events.
- 5 Analogamente al parametro relativo alla larghezza, modificare gli orari iniziale e finale del nuovo evento Threshold su **0** e deselectare il parametro Threshold precedente.
- 6 Sempre per motivi di coerenza, regolare il nuovo valore del parametro relativo alla soglia esattamente su **850**.
- 7 Analizzare il campione.
Il cambiamento di soglia dovrebbe aver avuto effetti significativi. Quasi tutti i picchi minori non vengono visualizzati nei risultati di integrazione. Sono stati individuati picchi in prossimità della fine dell'elettroferogramma. Ora però esiste un problema con il gruppo di picchi compreso tra 24 e 26 minuti.

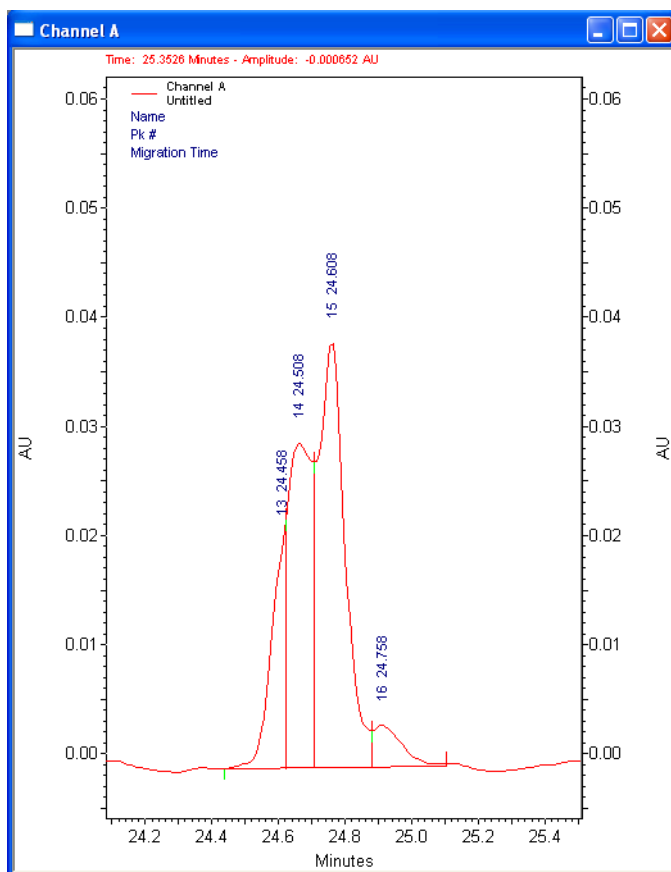
-
- 8** Ingrandire l'area e osservare che la linea di base parte a metà circa dell'inizio del picco. Ciò dimostra che i parametri globali non funzionano sempre per ogni picco nel set di dati. È necessario aggiungere nuove righe che influiscano solo sull'area dei picchi in cluster.
-

Integrazione di un cluster di picchi

È bene ricordare che con i valori originali di larghezza e soglia (rispettivamente 0,2 e 50) questo cluster è stato integrato correttamente. Forse uno o entrambi questi valori, applicati all'area circostante il cluster, potrebbero dare i risultati desiderati.

-
- 1** Con l'ingrandimento ancora attivo, fare clic con il pulsante destro del mouse su **Graphical Programming > Width**.
-
- 2** Quando richiesto, fare clic nel tratto compreso tra 24 e 25 minuti.
In questo caso, la funzione grafica viene utilizzata per definire l'ora iniziale e l'ora finale anziché la larghezza.
-
- 3** Nella finestra di dialogo visualizzata, modificare il valore impostandolo su **0.2**.
-
- 4** Fare clic su **Analyze Now**. Il cluster dovrebbe apparire simile a quanto illustrato nella figura seguente.
-

Figura 8.5 Cluster di picchi ben integrato



Questo cluster è ben integrato. È stata rilevata anche la curvatura dell'estremità iniziale del cluster. Premere **Ctrl-Z** per ridurre la visualizzazione. Nella tabella Integration Events sono ora disponibili due valori di larghezza. Uno è globale, l'altro (quello nuovo) è attivo solo nell'intervallo di tempo specificato per l'evento.

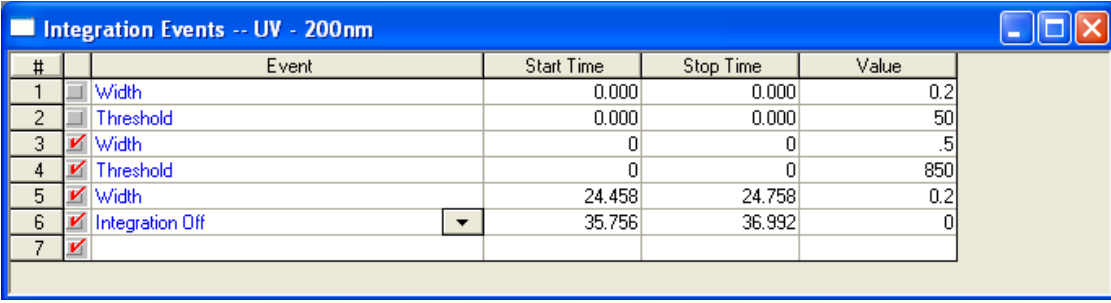
Disattivazione dell'integrazione

L'integrazione è quasi conclusa, ma esiste ancora un problema alla fine dell'elettroferogramma. Alla fine dell'esecuzione, è presente uno spostamento della linea di base che viene rilevato come picco.

- 1 Ingrandire l'area a partire da 34 minuti circa fino alla fine dell'esecuzione.
È possibile osservare l'assenza di eventi di rilievo oltre il picco a 35,2 minuti.
- 2 Per disattivare l'integrazione, fare clic con il pulsante destro del mouse su **Graphical Programming > Integration Off**.
- 3 Fare clic su 35,8 minuti circa, alla fine dell'elettroferogramma, quindi fare clic su **Analyze Now**.

I picchi nell'area specificata non vengono visualizzati nei risultati dell'integrazione e l'elemento Integration Off viene aggiunto alla tabella. Analogamente al valore della larghezza utilizzato per risolvere il cluster di picchi, la funzione Integration Off è attiva solo per un determinato periodo di tempo. Tutte le funzioni di integrazione, ad eccezione di Shoulder Sensitivity, possono essere utilizzate a livello globale o locale. Ad esempio, è possibile utilizzare un altro evento Integration Off dall'ora iniziale = 10 all'ora finale = 20 per eliminare i picchi minori rimasti. L'integrazione ora sembra accettabile. La tabella Integration Events dovrebbe essere simile alla seguente. Gli orari iniziale e finale possono differire leggermente, in base al punto in cui si è fatto clic.

Figura 8.6 Tabella Integration Events



#	Event	Start Time	Stop Time	Value
1	Width	0.000	0.000	0.2
2	Threshold	0.000	0.000	50
3	Width	0	0	.5
4	Threshold	0	0	850
5	Width	24.458	24.758	0.2
6	Integration Off	35.756	36.992	0
7				

4 Eliminare le righe 1 e 2, poiché non sono utilizzate. Lasciarle deselezionate non crea problemi.

5 Salvare il metodo per non perdere il lavoro precedente.

6 Fare clic su **File > Method > Save As**.

7 Salvare il metodo come **Integration Exercise.met**.

NOTA È possibile che venga visualizzato l'avviso che l'ora di separazione del metodo è 0.0. Per proseguire fare clic su **Yes**. Questo messaggio viene visualizzato perché, in questo esercizio, non è stato aggiunto nulla nella finestra di dialogo Instrument Setup relativa al metodo e questa omissione è stata rilevata dalla funzione software di verifica automatica. In questo esercizio, gli eventi di integrazione verranno aggiunti al metodo utilizzato per acquisire i dati.

Risultati e report di integrazione

I risultati del lavoro di integrazione non si limitano ad apporre alcune etichette sull'elettroferogramma. Questi risultati possono essere utilizzati per creare report, oltre che per identificare e quantificare campioni sconosciuti. Tali argomenti sono trattati nelle sezioni successive della guida. Per ora, acquisire i risultati correnti utilizzando un report predefinito. Nella barra dei menu, fare clic su **Reports > View > Area%**. Viene visualizzato un report che mostra i risultati dell'integrazione sotto forma di tabella. Se si desidera una copia cartacea del report e se al sistema è collegata una stampante, fare clic con il pulsante destro del mouse sul report e fare clic su **Print**.

Calibrazione

Introduzione

Nell'esercizio precedente è stato dimostrato come usare il software 32 Karat per la determinazione di parametri di picco quali il tempo di migrazione, l'area e l'altezza. Queste informazioni sono di uso limitato a meno di poterle tradurre in termini descrittivi dei componenti del campione. Le domande di base sono due: la natura del componente e la sua quantità nel campione.

Componenti dell'analisi

Analisi qualitativa

La prima domanda, sulla natura del componente, si riferisce all'analisi qualitativa. Esistono due modi per rispondere. In primo luogo, se si utilizza una sostanza nota come standard, il tempo di migrazione o la mobilità del picco risultante (eventualmente in combinazione con altre informazioni quali lo spettro di assorbanza PDA) può essere considerato come prova che un picco in un campione sconosciuto rappresenti la sostanza nota. In secondo luogo, se il tempo di migrazione o la mobilità varia in modo lineare con una proprietà molecolare come il peso molecolare o il numero di coppie di basi, è possibile creare una curva standard e utilizzarla per determinare la qualità definita (ad esempio, il peso molecolare) in base a una serie di standard. Con questo metodo, nella miscela standard non deve essere presente il componente sconosciuto.

Analisi quantitativa

Questo esercizio si riferisce alla seconda domanda, ossia alla quantità di componente presente nel campione che rappresenta un problema di analisi quantitativa. Nell'analisi quantitativa, viene eseguita una serie di esecuzioni con diverse concentrazioni di una o più sostanze note. Per ciascuna concentrazione di ogni componente viene determinata una risposta del rilevatore. Generando un grafico delle risposte del rilevatore rispetto alla concentrazione, è possibile determinare la concentrazione dei componenti in un campione sconosciuto. Il software 32 Karat semplifica questa operazione. Include strumenti per la raccolta di dati dalle esecuzioni di calibrazione, per la creazione di adattamenti di curva appropriati e per l'utilizzo dei dati di adattamento della curva per l'analisi di campioni sconosciuti. Questo esercizio insegna a usare una sequenza per la rielaborazione dei dati successiva all'esecuzione. Usa una calibrazione standard esterna i cui dati, provenienti da campioni standard e sconosciuti, vengono acquisiti in esecuzioni separate.

Creazione di una calibrazione

Nella directory Data Samples sono presenti cinque file denominati: **CE Level 1.dat**, **CE Level 2.dat**, **CE Level 3.dat**, **CE Level 4.dat** e **CE Level 5.dat**. Questi file di dati sono i risultati delle esecuzioni degli stessi due componenti in cinque diverse concentrazioni come indicato nella seguente tabella.

Tabella 9.1 File della directory Data Samples

Nome file	Componente (unità/ml)	
	Alfa	Beta
CE Level 1.dat	1,0	4,0
CE Level 2.dat	2,0	4,5
CE Level 3.dat	3,0	5,0
CE Level 4.dat	4,0	5,5
CE Level 5.dat	5,0	6,0

Il primo passo dell'analisi consiste nell'identificare i tempi di migrazione previsti dei due picchi. A tale scopo, aprire una finestra Instrument (continuare a utilizzare lo strumento UV offline dell'esercizio precedente). Fare riferimento al [CAPITOLO 4, Configurazione manuale](#).

1 Fare clic su **File > Data > Open** e navigare fino alla directory **Data Samples**.

2 Aprire la copia di **CE Level 3.dat**.

Sono presenti due canali di dati: Channel A (UV 214 nm) e Channel C (corrente).

È possibile ridurre a icona la finestra Channel C che non viene utilizzata in questo esercizio. Channel A rappresenta l'elettroferogramma dell'analisi della concentrazione intermedia dei calibratori. Il minore dei due picchi tra 3,5 minuti e 4,5 minuti è Alpha, mentre il maggiore è Beta (precedentemente determinato nelle esecuzioni dei singoli componenti).

Sviluppo di un metodo di calibrazione

In questo esercizio, verrà creato un nuovo metodo per calibrare il set di dati.

-
- 1** Fare clic su **File > Method > Open**.

 - 2** Navigare fino alla copia di Data directory e aprire il metodo **CE Calibrate.met**.

 - 3** Fare clic su **Analyze** per integrare il set di dati. I parametri di integrazione sono già stati ottimizzati.
I due picchi maggiori sono ben integrati con i parametri predefiniti.

 - 4** Fare clic con il pulsante destro del mouse sull'elettroferogramma e fare clic su **Graphical Programming**, quindi su **Define Peaks**.

 - 5** Fare clic sull'elettroferogramma per indicare i picchi maggiori (circa 3,7 minuti e 4,2 minuti). Viene visualizzata una finestra di dialogo con le istruzioni per fare clic sull'inizio e sulla fine dell'intervallo di picchi che si desidera definire. Dopo aver scelto l'intervallo di picchi, viene visualizzata la finestra di dialogo illustrata di seguito.

NOTA I valori temporali possono differire leggermente da quelli mostrati.

Figura 9.1 Finestra di dialogo Define Peaks

Define Peaks

Define peaks in range

Start time: 3.69 Minutes

Stop time: 4.19 Minutes

Migration time window

☒ Relative: ± 2.5 %

☐ Absolute: ± 0.092 Minutes

Units: %

Quantitate peaks on: Area

Minimum peak area: 0

☒ Add all peaks to table

☐ Replace existing peaks in table

OK

Cancel

Help

Le funzioni di Define Peaks consentono di inserire eventuali picchi della finestra specificata nella tabella Peaks/Groups del metodo. In un metodo è possibile immettere solo i picchi identificati durante l'analisi. I tempi di avvio e di arresto definiscono la parte dell'elettroferogramma che contiene i picchi da aggiungere. La finestra Migration time consente di specificare la variabilità del tempo di migrazione che deve trascorrere prima che un picco non sia più considerato un componente di interesse. La definizione è possibile sia come percentuale del tempo indicato che come intervallo di tempo assoluto. È possibile aggiungere tutti i picchi presenti nella finestra a una tabella esistente. Se si sceglie di sostituire i picchi esistenti, vengono eliminati tutti i picchi attualmente definiti che rientrino nelle finestre temporali appena definite.

Per questo esercizio, accettare le impostazioni predefinite facendo clic su **OK**.

- 1 Nella barra dei menu, fare clic su **Method > Peaks/Groups**.
Si apre una tabella nella quale sono riportati i due picchi appena aggiunti. Poiché questi picchi non sono ancora stati denominati, il sistema crea un nome basato sul tempo di migrazione.
- 2 Fare clic nella colonna **Name** e modificare il nome nella riga 1 in **Alpha** e quello della riga 2 in **Beta**.
- 3 Utilizzare la barra di scorrimento nella parte inferiore della finestra per esaminare le intestazioni di colonna della tabella.

Alcune colonne vengono usate in questo esercizio. Per maggiori informazioni, fare riferimento alle risorse nell'[APPENDICE A, Risorse aggiuntive](#).

È possibile modificare i seguenti elementi:

- tempo di migrazione definito e finestra consentita per un componente;
- canale dati da utilizzare (per i tipi di rilevatore multicanale);
- tipo di adattamento della curva da usare per il set di dati di calibrazione;
- fino a 10 livelli di calibrazione.

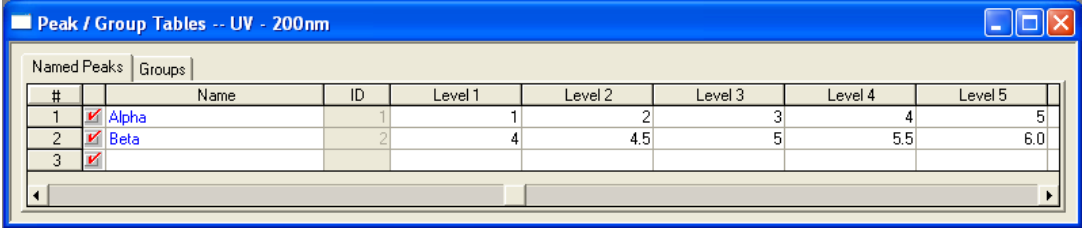
È necessario digitare i valori di concentrazione in base alla tabella precedente.

4 Scorrere verso destra fino a visualizzare le colonne con le intestazioni da Level 1 a Level 5.

5 Digitare i valori noti per Alpha e Beta. Level 1 è il valore inferiore, Level 5 il massimo.

Accettare i valori predefiniti per le altre colonne. Dopo aver inserito tutti i valori, la tabella dovrebbe essere simile a quella della [Figura 9.2](#).

Figura 9.2 Tabelle Peak/Group



#	Name	ID	Level 1	Level 2	Level 3	Level 4	Level 5
1	Alpha	1	1	2	3	4	5
2	Beta	2	4	4.5	5	5.5	6.0
3							

6 Salvare il metodo.

NOTA È possibile che venga visualizzato un messaggio di avvertenza secondo il quale l'orario di raccolta dati del metodo è 0.0. Fare clic su **Yes** per proseguire con il salvataggio.

7 Fare clic con il pulsante destro del mouse sull'elettroferogramma e selezionare **Annotations**.

8 Selezionare i parametri in modo che nella casella Show vengano visualizzati solo **Name** e **ESTD concentration**.

9 Fare clic su **OK**.

10 Analizzare nuovamente il campione.

Il nome del picco viene visualizzato sull'elettroferogramma. La concentrazione ESTD è di 0.000, perché il processo di calibrazione non è stato ancora completato. A questo punto, è stato utilizzato solo uno dei campioni di calibrazione per definire i picchi. È necessario usare tutti e cinque i calibratori per generare le curve standard per Alpha e Beta.

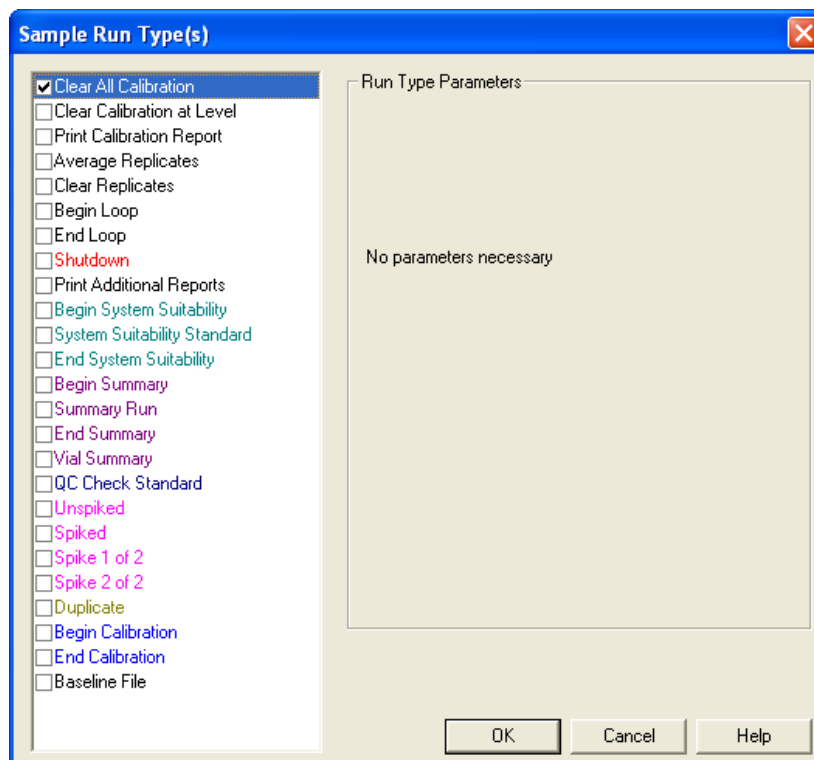
Generazione della curva di calibrazione

Per generare le curve, rielaborare i dati mediante una sequenza. In un esercizio precedente, è stata utilizzata una sequenza per più esecuzioni. Le sequenze possono anche essere utilizzate per la rielaborazione dei dati in lotti.

- 1 Per aprire la procedura guidata Sequence, fare clic su **File > Sequence > Sequence Wizard**.
- 2 Fare clic sull'icona **File** e selezionare il file del metodo modificato.
- 3 Nel campo Data File Type, selezionare il pulsante di opzione **From existing data files**.
- 4 Fare clic su **Next**. La finestra di dialogo successiva consente di selezionare più file di dati.
- 5 Fare clic sull'icona **File**. Viene visualizzata una finestra di dialogo che consente di aprire più file contemporaneamente.
- 6 Individuare il file **CE Level 1.dat**.
- 7 Fare clic sul nome del file. Il nome del file viene aggiunto all'elenco nella parte inferiore della finestra di dialogo.
Ripetere i passaggi per **CE Level 2**, **CE Level 3**, **CE Level 4** e **CE Level 5**, in modo che tutti i cinque file vengano visualizzati nell'elenco.
- 8 Al termine, fare clic su **Open**.
- 9 Verificare che i cinque file siano elencati nella finestra, quindi fare clic su **Finish**.
In questo modo viene aperta una tabella delle sequenze contenente il metodo e i cinque file di dati.
- 10 Scorrere verso destra fino alla colonna **Filename**. I cinque file dovrebbero essere elencati in ordine.

- 11 Scorrere di nuovo verso sinistra fino alla colonna **Level**. Modificare il livello della riga 1 da **0** in **1**.
- 12 Usare la freccia rivolta verso il basso per spostarsi nella stessa colonna nella riga 2 e modificare **0** in **2**. Il livello inserito in questa colonna della tabella delle sequenze corrisponde alla colonna Level della tabella Peak/Group.
- 13 Proseguire lungo la colonna cambiando gli zeri rimanenti rispettivamente in 3, 4 e 5. Quando si modifica il livello in un valore diverso da zero, il tipo di campione cambia automaticamente in Calibration.
- 14 Fare clic sulla colonna **Run Type** della riga 1. Viene aperta la finestra di dialogo della [Figura 9.3](#). Gli elementi di questa finestra sono i tipi di esecuzione disponibili.
- 15 Fare clic su **Clear All Calibration** e su **OK**. Il tipo di esecuzione della riga 1 cambia in **CAL CCA**.
Se si seleziona questo tipo, le calibrazioni precedenti di questo set di dati vengono cancellate prima della nuova calibrazione.

Figura 9.3 Finestra di dialogo Sample Run Types



- 16 Salvare la sequenza con il nome CE Calibrate.seq. I lati destro e sinistro della finestra devono avere l'aspetto della Figura 9.4.

Figura 9.4 Tabella delle sequenze

Sequence: CE Calibrate.seq						
Run #	Status	Run Type	Level	Sample ID	Method	Filename
1		CAL CCA	1	CALIBRATEr2	CE Calibrate copy.met	ce level 1.dat
2		Calibration	2	CALIBRATEr1	CE Calibrate copy.met	ce level 2.dat
3		Calibration	3	CALIBRATEr3	CE Calibrate copy.met	ce level 3.dat
4		Calibration	4	CALIBRATEr1	CE Calibrate copy.met	ce level 4.dat
5		Calibration	5	CALIBRATEr1	CE Calibrate copy.met	CE Level 5.dat
6						

Ora è possibile elaborare la sequenza e generare la calibrazione.

- 1 Fare clic su **Process** nel menu Sequence. Viene aperta la finestra di dialogo riportata nella Figura 9.5.

- 2 L'intervallo di esecuzione deve essere **All**.

- 3 La modalità di elaborazione deve essere impostata su **Reintegrate**.

- 4 Fare clic su **Start**.

Il completamento dell'elaborazione richiede alcuni secondi. Durante l'analisi di ciascun file di dati, la colonna di stato nella tabella delle sequenze cambia in **Complete**.

Figura 9.5 Finestra di dialogo Process Sequence

Process Sequence

Sequence information

Sequence name: C:\32Karat\Sequence\CE Calibrate.seq

Run range

☒ All

☐ Selection

☐ Range

Mode

Tower: N/A

Processing mode: Reintegrate

Bracketing: None

Printing

☐ Print method reports

☐ Print sequence reports

Review

☐ Results review (pause after each run)

☐ Calibration review (pause after each calibration set)

Start

Cancel

Help

-
- 5** Nella barra dei menu, fare clic su **Method > Review Calibration**.
- Viene visualizzata una finestra con i risultati della calibrazione per il primo componente (Alpha). I dati sembrano sensati, ma l'adattamento della linea potrebbe essere migliore.
-
- 6** Fare clic su **Beta** nell'angolo superiore destro della finestra.
- L'adattamento della curva qui non è assolutamente accettabile. L'angolo inferiore destro della finestra indica che l'adattamento è stato realizzato per punti. Forse un altro tipo di adattamento sarebbe migliore.
-
- 7** Riaprire la tabella **Peaks/Groups**.
-
- 8** Scorrere verso sinistra fino alla colonna con l'intestazione **Fit Type**.
-
- 9** Per la riga 1 (Alpha), fare clic su **Quadratic**.
-
- 10** Per la riga 2 (Beta), selezionare **Linear**.
-
- 11** Nella riga 1, selezionare la casella della colonna **Zero** per forzare il passaggio della linea attraverso l'origine.
-
- 12** Non fare clic su Zero nella riga 2.
-
- 13** Salvare il metodo e controllare nuovamente i risultati della calibrazione.
- Questa volta l'adattamento della curva dovrebbe essere migliore, sia per Alpha che per Beta. In pratica, è possibile selezionare e variare i parametri di adattamento della curva per determinare l'adattamento più appropriato per il set di dati.
- Il salvataggio del metodo consente di salvare la calibrazione. Non è necessario rielaborare la sequenza.
-

Analisi dei campioni sconosciuti

La creazione di una curva standard è utile solo se consente di determinare la quantità di materiale in un campione sconosciuto. I campioni sconosciuti possono essere aggiunti alla tabella delle sequenze dopo le righe di calibrazione. Quando vengono elaborati, i picchi sconosciuti vengono confrontati con la curva standard e i valori calcolati.

-
- 1 Aprire la finestra **Sequence**.

 - 2 Nella riga 6, fare clic sulla colonna **Method** e su **CE Calibrate.met** (il metodo usato).

 - 3 In **Filename** fare clic su **CE Unknown1.dat**.

 - 4 Salvare la sequenza.

 - 5 Anziché rielaborare l'intera sequenza, fare clic su **Range** nella finestra di dialogo **Process Sequence** (Figura 9.5) e digitare **6** come riga da eseguire.

 - 6 Fare clic su **Start**.
-

Per visualizzare i risultati dell'analisi, visualizzare l'elettroferogramma per **CE Unknown1.dat** o un report.

Per usare un report predefinito, fare clic su **Reports > View > External Standard**. Per stampare il report con la stampante predefinita del sistema, fare clic con il pulsante destro del mouse sulla finestra Report e fare clic su **Print**.

Per maggiori informazioni, fare riferimento al [CAPITOLO 12, Creazione di un report di metodo personalizzato](#).

In questo esercizio sono stati descritti solo i principi fondamentali dell'analisi quantitativa. Per ulteriori dettagli e altre opzioni, fare riferimento alle risorse dell'[APPENDICE A, Risorse aggiuntive](#).

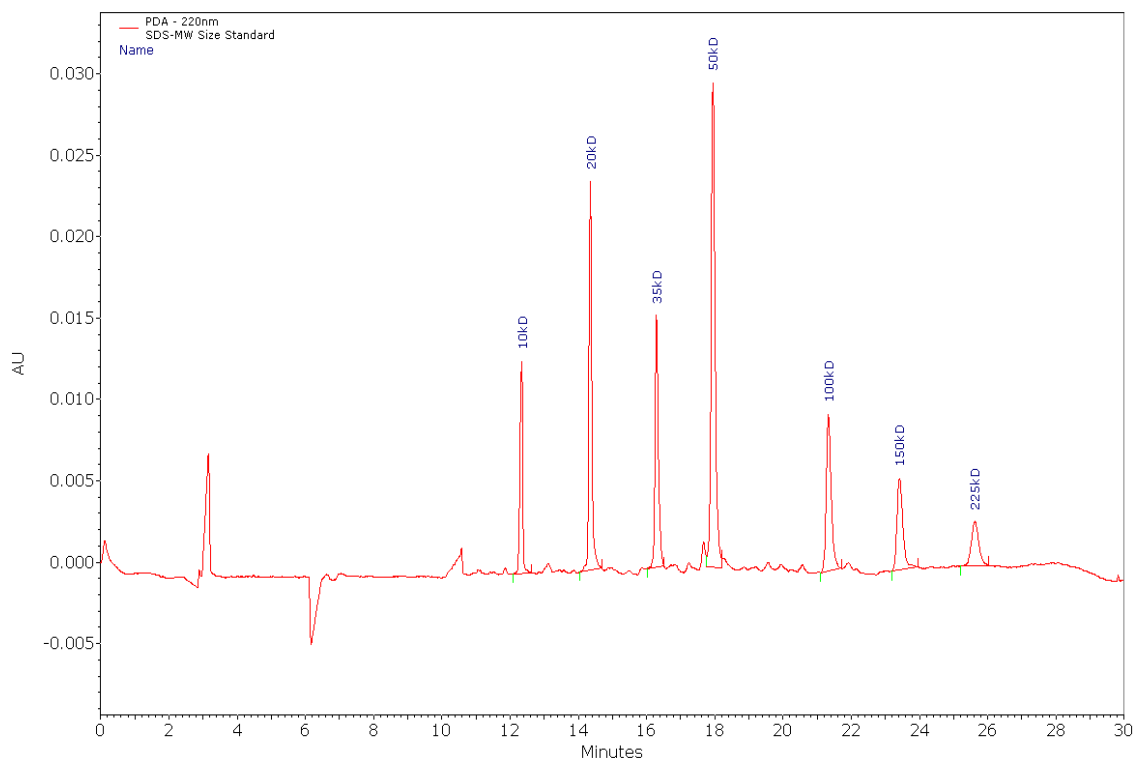
Analisi qualitativa

Analisi dei dati e creazione di report

In alcune modalità di separazione CE, l'ordine di migrazione è determinato da una qualità molecolare. Le applicazioni più comuni sono la separazione di proteine in base al peso molecolare e la separazione di acidi nucleici per numero di coppie di basi. Il software 32 Karat consente di costruire una curva standard basata su parametri come questi. Nel caso di CE-SDS per la determinazione del peso molecolare delle proteine, per esempio, una serie di frammenti di lunghezza nota vengono separati in un capillare riempito di gel. Viene costruito un tracciato del tempo di migrazione rispetto al peso molecolare che viene usato per determinare la dimensione di una proteina sconosciuta.

In questo esercizio, verrà creata una curva standard basata sulla miscela di test contenente diversi standard di dimensioni di peso molecolare che variano da 10 kDa a 225 kDa. La miscela di test viene iniettata in un capillare contenente una rete polimerica. Le molecole più piccole si sposteranno più velocemente attraverso i filamenti di polimero rispetto alle molecole più grandi, determinando una separazione basata sulla dimensione. La mobilità dei picchi di dimensioni standard note viene utilizzata per creare una curva standard che può essere usata per stimare la dimensione di un frammento sconosciuto.

Figura 10.1 Elettroferogramma di DNA a filamento singolo



- 1 Aprire lo strumento SDS MW in modalità offline. Il software 32 Karat richiede di immettere un nome utente, una password e un progetto. Per accedere scegliere il progetto SDS MW.
- 2 Nella cartella del progetto SDS MW aprire i file **SDS20SizeStandard.dat** e **SDS MW Separation - PA800 Plus Size Stds.met**.
- 3 Analizzare i dati.
- 4 Fare clic con il pulsante destro del mouse sull'elettroferogramma e selezionare **Annotations**.
- 5 Aggiungere **Name** e **Mobility** all'elenco delle annotazioni da visualizzare, quindi fare clic su **OK**.
- 6 Nel menu **Method**, fare clic su **Qualitative analysis** per aprire la finestra seguente. Digitare nel metodo il peso molecolare (Y) e la mobilità (X).

Figura 10.2 Finestra Qualitative Analysis

Qualitative Analysis

X Axis
 Units: Scale:
 Minimum Value: Maximum Value:

Y Axis
 Units: Scale:

Goodness of Fit: N/A

	Molecular Weight	Mobility
1		
2		
3		
4		
5		
6		

Fit type:

☐ Reference Peak Time (min):

Reference Window %:

Plot area: -41666.6, 1/Mobility

È possibile selezionare il tipo di dati per l'asse X. In questo esercizio viene usata la mobilità, ma è anche possibile utilizzare un altro parametro, ad esempio il tempo di migrazione. Per questo asse è possibile selezionare una scala lineare o logaritmica. Minimo e massimo si riferiscono ai limiti dell'asse X oltre i quali si desidera che vengano interpretati i dati qualitativi. Questo limita la misura dell'estrapolazione, oltre le estremità del set di dati, usata per trovare la qualità di una proteina sconosciuta.

Per l'asse Y, è possibile utilizzare qualsiasi nome. Poiché la qualità in esame è il peso molecolare, digitare il peso molecolare. Per l'asse Y è appropriata una scala lineare.

In questa finestra è presente un foglio di calcolo con due colonne (Figura 10.2). La colonna di sinistra contiene i dati per l'asse Y. L'intestazione di questa colonna contiene il testo immesso per l'etichetta dell'asse Y, in questo caso il peso molecolare. La colonna di destra contiene i dati per l'asse X. L'intestazione è quella selezionata per l'asse X. In questo caso, usare la mobilità.

1 È necessario digitare manualmente i valori X e Y nel foglio di calcolo.

Per comodità, ridimensionare l'elettroferogramma e le finestre di analisi qualitativa.

- 2 Per ciascun picco, digitare i pesi molecolari (dalla tabella con gli ID di picco) e la corrispondente mobilità visualizzata nella finestra dell'elettroferogramma. Non dimenticare di digitare il segno meno (-) prima della mobilità. Durante la digitazione, i dati vengono visualizzati graficamente nell'angolo inferiore destro della finestra. Assicurarsi che le scale per l'asse X e l'asse Y siano rispettivamente 1/X e logaritmica.
- 3 Dopo aver immesso tutti i dati, fare clic su **Fit Type** per determinare l'adattamento migliore della curva per il set di dati. In questo esempio, i migliori valori per **Goodness of Fit** si ottengono con un adattamento quadratico.
- 4 Al termine, fare clic su **Save As**; ridenominare il metodo **Quality 1.met**.
- 5 Analizzare nuovamente il file di dati.
- 6 Fare clic con il pulsante destro del mouse sull'elettroferogramma e selezionare **Annotations**.
- 7 Aggiungere **Quality** nella colonna di destra. Il nome dovrebbe essere già presente.
- 8 Fare clic sul termine **Quality** per evidenziarlo, quindi impostare il numero dei decimali su **2**.
- 9 Fare clic su **OK**.

L'elettroferogramma apre il peso molecolare assegnato (come Name) e la dimensione calcolata mediante la curva standard (come Quality). Il numero di base è un numero intero. Poiché **Goodness of Fit** non è un valore esatto, esiste un piccolo scostamento tra il valore assegnato e quello calcolato.

Ora è possibile usare questo metodo per stimare il peso molecolare di una proteina sconosciuta. A tale scopo, analizzare la proteina sconosciuta utilizzando lo stesso metodo utilizzato per analizzare gli standard.

Funzioni della mobilità

La mobilità è un parametro che quantifica il modo in cui una particella carica migra in un campo elettrico. Le equazioni per il calcolo della mobilità sono definite in [APPENDICE B, Mobilità](#). In breve, un componente con una mobilità maggiore si muove più rapidamente nel mezzo di separazione rispetto a un componente con una mobilità inferiore. Poiché le particelle possono essere attratte dal catodo o dall'anodo, la mobilità ha una componente vettoriale che può essere positiva o negativa. La mobilità verso il catodo (elettrodo caricato negativamente) è definita positiva, mentre quella verso l'anodo (elettrodo caricato positivamente) è definita negativa.

La mobilità non è una costante come il peso molecolare, perché può variare a seconda delle condizioni di separazione. Come esempio, si consideri l'amminoacido glicina. In pH alcalino, questa molecola ha una carica negativa netta ($\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-COO}^-$) e mobilità negativa. In pH acido, ha una carica positiva netta ($\text{NH}_3^+\text{-CH}_2\text{-COOH}$) e mobilità positiva. Vicino a $\text{pH} = 7$, non ha carica netta ($\text{NH}_3^+\text{-CH}_2\text{-COO}^-$) e ha mobilità pari a zero.

In pratica, la mobilità viene definita per una determinata molecola in un dato insieme di condizioni. Variazioni nelle condizioni di separazione che interessano tutte le specie in modo uguale (come variazioni nel flusso elettroosmotico o nella tensione erogata dall'alimentatore) e variazioni che hanno effetti simili su gruppi di composti strettamente correlati (come l'effetto di piccole variazioni di pH su una serie di sostanze di base), possono essere prese in considerazione includendo nella corsa analitica uno standard di mobilità definita.

I valori di mobilità da considerare sono due: la mobilità elettroforetica (μ) che rappresenta il movimento delle molecole nel campo elettrico e la mobilità apparente (μ_{app}) che è la somma algebrica della mobilità elettroforetica e di tutte le altre forze che conducono il campione attraverso il capillare. La forza aggiuntiva più comune è il flusso elettroosmotico (EOF), a volte indicato come μ_{eof} , sebbene sia possibile considerare in questo caso anche altri fattori quali la migrazione da pressione. Ai fini di questa discussione, la mobilità apparente viene limitata alla somma di mobilità elettroforetica ed EOF:

$$\mu = \mu_{app} - \mu_{eof}$$

Il software 32 Karat è in grado di utilizzare la mobilità come alternativa al tempo di migrazione per l'identificazione del picco. Utilizzata in questo modo, la mobilità offre maggiore coerenza al metodo elettroforetico capillare correggendo le piccole variazioni eventualmente presenti tra un'esecuzione e l'altra. Il software è inoltre in grado di visualizzare elettroferogrammi in cui l'asse X rappresenta la mobilità anziché il tempo. In questo esercizio, verranno esaminate queste funzioni del software.

Marcatori di mobilità

Ogni esecuzione che comprenda calcoli di mobilità deve includere un marcatore di mobilità. Si tratta di un componente per il quale è stata definita la mobilità in una determinata serie di condizioni di esecuzione. La riproduzione di queste condizioni di esecuzione in esecuzioni successive è fondamentale quando si utilizza la mobilità come parametro per l'identificazione dei picchi. Anche i fattori del tampone, quali forza ionica e pH, sono particolarmente importanti. Per maggiori informazioni sull'argomento fare riferimento alle risorse nell'[APPENDICE A, Risorse aggiuntive](#).

Assegnazione dei valori di mobilità

L'assegnazione di un valore di mobilità al marcatore comporta una serie di passaggi.

NOTA Di seguito si considererà già completato il lavoro di sviluppo del metodo per creare una tecnica di separazione efficace dei campioni.

-
- 1 Creare un campione contenente il marcatore proposto e un marcatore di flusso elettroosmotico (EOF).

La matrice del campione deve rappresentare una buona approssimazione dei campioni sconosciuti da analizzare. Il marcatore EOF è una molecola piccola senza carica, rilevabile anche in basse concentrazioni. Viene utilizzata per calcolare il contributo del flusso elettroosmotico (μ_{eof}) alla mobilità di picco apparente. Se si opera in condizioni in cui il flusso EOF è minimo (come un capillare con rivestimento neutro), il marcatore EOF può essere omesso poiché in queste condizioni il valore μ_{eof} è approssimativamente uguale a zero. Nell'esecuzione dovrebbero essere inclusi gli standard per gli altri picchi attesi nei campioni sconosciuti.

Figura 11.1 Finestra Advanced Method Options

Advanced Method Options -- PDA - 220nm

Data Export | Graphics Export | Custom Parameters | **Capillary/Performance** | Files | Advanced Reports

Capillary Information:

Capillary length: ☒ meters ☐ cm

Capillary length to detector: ☐ meters ☒ cm

Capillary lot number:

Capillary installation date:

Capillary description:

☒ Calculate performance parameters for this channel

Calculation method(s):

- ☒ USP
- ☐ EMG
- ☐ DAB, BP, EP, ASTM
- ☐ ADH
- ☐ JP

2 Eseguire la separazione e integrare i risultati.

3 Adattare tutti i parametri di integrazione alla forma finale.

4 Aggiungere il picco del marcatore di mobilità e il picco del marcatore EOF (se utilizzato) alla tabella **Peaks/Groups**.

Il metodo deve contenere le dimensioni corrette per la lunghezza del capillare. Questi valori vengono inseriti nella scheda Capillary/Performance della finestra di dialogo Advanced Methods Options (accessibile dal menu Method). Sono necessarie la lunghezza del capillare e la lunghezza al rilevatore.

5 Prendere nota dell'elettroferogramma con la mobilità e la mobilità apparente.

6 Analizzare nuovamente i dati.

Vengono visualizzati i valori Apparent Mobility e Mobility. A questo punto, i valori di mobilità devono essere tutti pari a zero.

- 7 Calcolare la mobilità elettroforetica del marcatore di mobilità utilizzando la formula seguente:

$$\mu = \mu_{app} - \mu_{eof}$$

in cui μ_{app} è la mobilità apparente del picco di riferimento e μ_{eof} è la mobilità apparente del marcatore EOF.

- 8 Scorrere verso destra la tabella **Peaks/Groups** fino alla colonna **Mobility**.

- 9 Nella riga contenente il marcatore di mobilità, digitare il valore di μ determinato nel passaggio 4.

- 10 Selezionarlo nella colonna delle opzioni **Mobility Marker** della stessa riga.

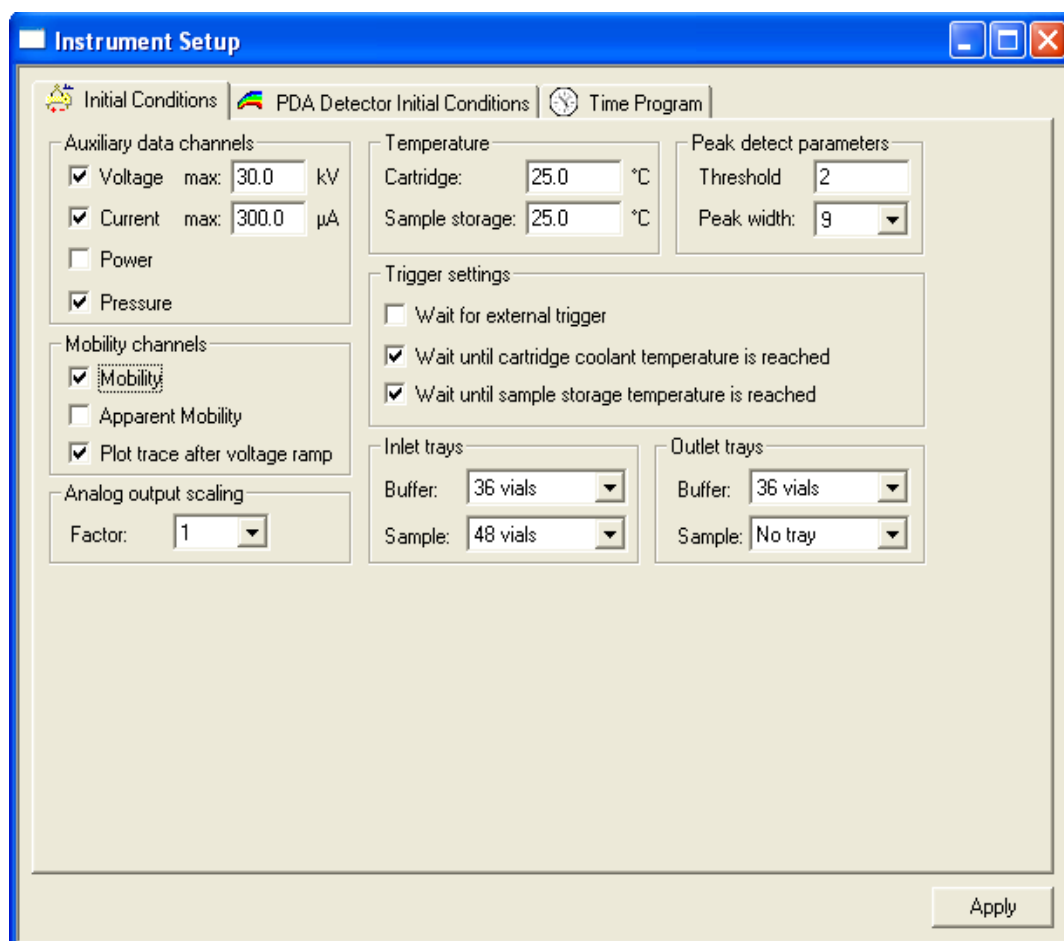
- 11 Salvare il metodo.

- 12 Analizzare nuovamente il campione ed esaminare l'elettroferogramma.

Il valore della mobilità del marcatore dovrebbe ora essere diverso da zero, come i valori della mobilità per tutti gli altri picchi dell'elettroferogramma ad eccezione del marcatore EOF. Il marcatore EOF dovrebbe avere un valore prossimo allo zero. Lo scostamento dallo zero, in questa fase, è il risultato di errori di arrotondamento.

Se i risultati sono accettabili, il metodo può ora essere modificato per consentire la generazione di un elettroferogramma in cui l'asse X rappresenta la mobilità anziché il tempo. Questa opzione è stata selezionata nella scheda **Initial Conditions** della finestra di dialogo **Instrument Setup**.

Figura 11.2 Opzioni relative alla mobilità nella finestra di dialogo Instrument Setup



Tracciato della mobilità

Se si seleziona l'opzione Mobility o Apparent Mobility, dopo l'analisi dei dati viene creato un tracciato aggiuntivo. Questo tracciato mostra l'elettroferogramma ridimensionato in modo che l'asse X venga visualizzato in termini di mobilità o di mobilità apparente, anziché di tempo.

L'opzione **Plot trace after voltage ramp** deve essere selezionata, a meno che non si rilevino picchi durante la fase di aumento della tensione nella separazione. La disattivazione di questa opzione può comportare un'eccessiva accentuazione dell'intervallo della rampa di tensione nel tracciato di mobilità risultante.

NOTA Non è possibile generare canali di mobilità per i file di dati creati con questa opzione disattivata.

È necessario selezionare questa opzione durante l'acquisizione dati. Quando si utilizza questa opzione, è necessario che nella tabella Peaks/Groups del metodo sia presente almeno un marcatore di mobilità.

Dopo aver selezionato le opzioni appropriate del canale di mobilità, salvare il metodo.

Eseguire nuovamente il campione.

Al termine dell'esecuzione, viene generata la traccia di mobilità.

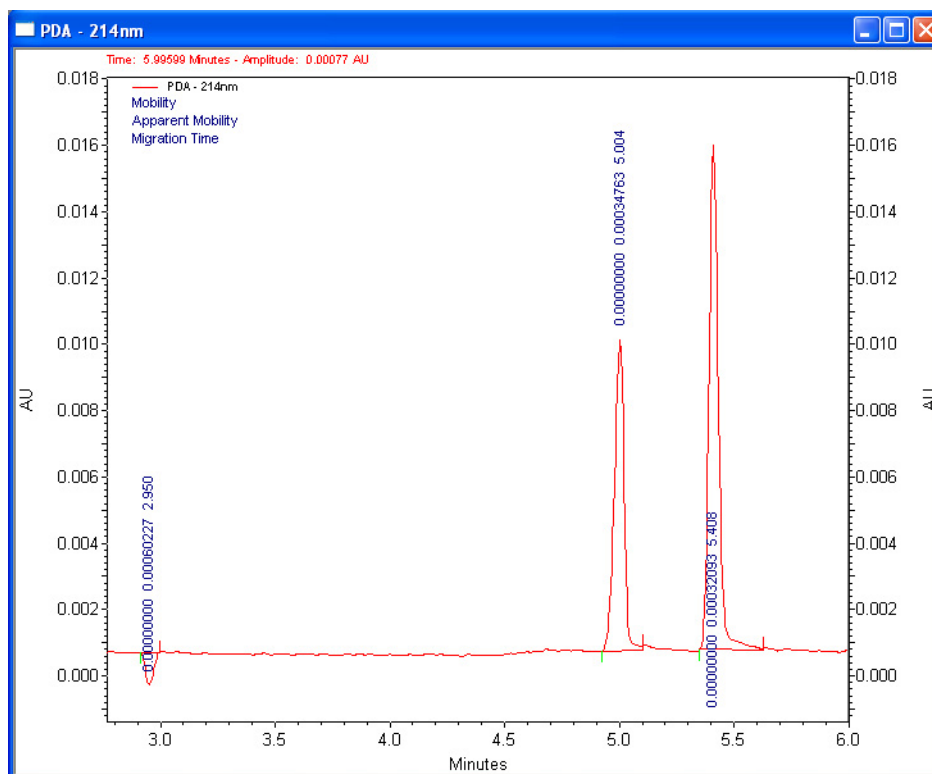
Dimostrazione: utilizzo delle funzioni di mobilità

NOTA Quello che segue non intende essere un esercizio pratico, ma un esempio dettagliato del processo descritto sopra. In questo esempio vengono utilizzati un rilevatore UV e la miscela di test B di SCIEX.

In precedenza sono state determinate le condizioni ottimali per la separazione di una miscela di due componenti, ALPHA e BETA. Alpha è stato scelto come marcatore di mobilità. Il metodo presenta un considerevole EOF, quindi è necessario utilizzare un marcatore EOF.

Per questo esercizio, utilizzare etanolo; è facilmente solubile nel campione, crea un picco rilevabile e non interferisce con l'analisi. Questi fattori sono stati determinati in precedenza. Nella pratica, tuttavia, è necessario determinare questi fattori in via sperimentale. È stata scelta una concentrazione finale di etanolo del 5%. Il campione viene preparato ed eseguito. Dopo il precedente passaggio 6, l'elettroferogramma risultante appare come segue:

Figura 11.3 Dimostrazione dell'elettroferogramma per le funzioni di mobilità



Il marcatore di etanolo dà un piccolo picco negativo, correttamente rilevato dal software. I valori ottenuti sono elencati nella [Tabella 11.1](#):

Tabella 11.1 Valori della tabella per Peak Name, Apparent Mobility e Mobility

Peak Name	Apparent Mobility	Mobility
EOF	0,00060227	0,00000000
ALPHA (marcatore)	0,00034763	0,00000000
BETA	0,00032093	0,00000000

Come previsto, il marcatore EOF con movimento più veloce ha una mobilità apparente più elevata. Le unità di mobilità sono:

cm²Vsec

È possibile calcolare la mobilità elettroforetica di ALPHA in base a:

$$\mu = \mu_{app} - \mu_{eof}$$

rendimenti sostitutivi $\mu = 0,00034763 - 0,00060227 = -0,00025464$, mobilità di ALPHA in queste condizioni di separazione. Il valore di mobilità è un numero negativo, quindi la migrazione elettroforetica di ALPHA è diretta verso l'anodo ed è opposta alla direzione del flusso elettroosmotico.

NOTA In pratica, l'esecuzione precedente dovrebbe essere ripetuta più volte per verificare che il sistema fornisca risultati coerenti prima di definire il valore del marcatore di mobilità.

Riaprire la tabella **Peak/Group** e inserire il valore del marcatore di mobilità come descritto nei passaggi 9 e 10. La tabella ora è simile alla seguente:

Figura 11.4 Tabelle Peak/Group -- PDA - 214 nm

#	Name	ID	Mobility Marker	Mobility (1.0e-004)	Mobility Window
1	EOF Marker	1	<input type="checkbox"/>	0.000000	0.000000
2	Alpha	2	<input checked="" type="checkbox"/>	-2.546400	0.000000
3	Beta	3	<input type="checkbox"/>	0.000000	0.000000
4			<input type="checkbox"/>		

Salvare il metodo e analizzare nuovamente il file di dati. I risultati ora sono:

Tabella 11.2 Valori di Peak Name, Apparent Mobility e Mobility dopo la correzione per EOF

Peak Name	Apparent Mobility	Mobility
EOF	0,00060227	-0,00000000
ALPHA (marcatore)	0,00034763	-0,00025464
BETA	0,00032093	-0,00028134

La mobilità elettroforetica del marcatore EOF è prossima allo zero. La mobilità di ALPHA è il valore scelto. La mobilità di BETA ora è calcolata in relazione alla mobilità di ALPHA.

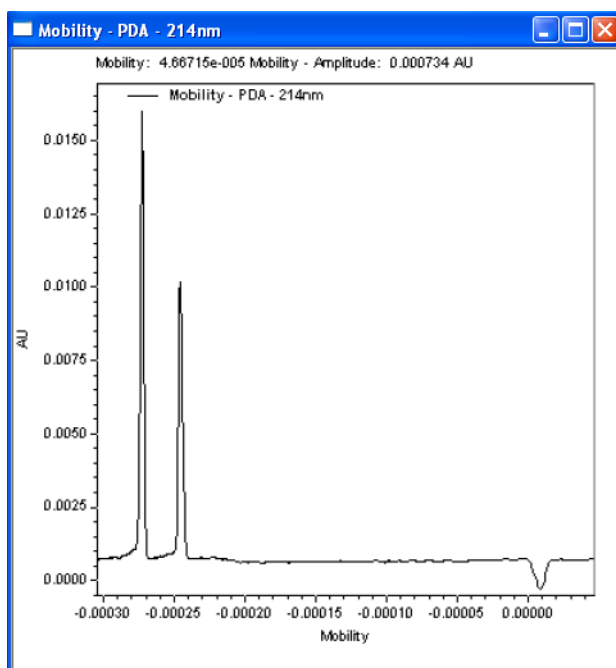
È possibile impostare la raccolta dati per un tracciato di mobilità.

1 Aprire la finestra di dialogo **Instrument Setup** e fare clic sulla scheda **Initial Conditions**.

2 Fare clic su **Mobility**.

Dopo aver salvato il metodo ed eseguito nuovamente il campione, si hanno due elettroferogrammi. Uno è l'elettroferogramma UV, molto simile all'esecuzione impiegata per misurare la mobilità del marcatore. Il secondo si apre in modo diverso, come illustrato.

Figura 11.5 Elettroferogramma basato sulla mobilità



L'ordine dei picchi è stato invertito perché gli ultimi picchi di eluizione hanno la mobilità più negativa. Anche la distanza relativa tra i picchi è cambiata.

Identificazione del picco in base alla mobilità

Nell'esercizio sulla mobilità, il tempo di migrazione e la finestra temporale di migrazione sono stati utilizzati per stabilire l'identità dei picchi in un file di dati. Analogamente, è possibile utilizzare la mobilità e la finestra di mobilità per identificare i picchi in base alla mobilità degli standard. La scelta del tempo o della mobilità di migrazione si applica all'intero elettroferogramma; non è possibile utilizzare il tempo di migrazione per alcuni picchi e la mobilità per altri.

- 1 L'opzione che consente di utilizzare la mobilità per l'identificazione dei picchi deve essere selezionata nella scheda **Options** della finestra di dialogo Method Properties (nel menu Method).
- 2 Fare clic su **Mobility based**, quindi su **OK**.
- 3 I picchi vengono aggiunti alla tabella **Peaks/Groups**, qualora non fossero già presenti. Utilizzare la funzione **Add Peaks** del menu Graphical Programming come descritto in precedenza nel capitolo sull'integrazione.
- 4 Aprire la tabella **Peaks/Groups** e scorrere fino alle colonne Mobility.

L'assegnazione della mobilità di un marcatore di mobilità è già stata descritta. Per identificare altri picchi in base alla mobilità, inserire manualmente il valore e la finestra di mobilità.

Per il picco BETA dell'esempio, il valore di mobilità determinato è -0,00028134, pertanto nella tabella viene immesso questo valore per la riga di definizione di BETA. La finestra di mobilità predefinita è zero, il che significa che il picco viene rilevato solo se ha esattamente il valore di mobilità definito. Ci si può aspettare qualche scostamento. Il valore appropriato viene determinato eseguendo prove e valutando gli errori. Una finestra compresa tra il 5% e il 10% è un buon punto di partenza. Per BETA, una finestra del 5% corrisponde al valore 0,0001407. La finestra è sempre un numero senza segno (non positivo o negativo). A questo punto, la tabella Peaks/Groups ha l'aspetto seguente:

Figura 11.6 Tabelle Peak/Group -- 214 nm

#	Name	ID	Mobility Marker	Mobility (1.0e-004)	Mobility Window (1.0e-004)	Analysis Ch
1	EOF Marker	1		0.000000	0.000000	PDA - 214nm
2	Alpha	2		-2.546400	0.000000	PDA - 214nm
3	Beta	3		-2.831400	0.140700	PDA - 214nm
4						

Quando si fa clic su **Analyze**, l'identificazione del picco viene visualizzata in base alla mobilità. Per verificarlo, modificare la voce Mobility di BETA in un valore diverso, ad esempio -0,00025227 e ripetere **Analyze**.

Poiché la mobilità del picco è ora al di fuori della finestra, è integrata, ma non associata all'ID BETA.



Creazione di report

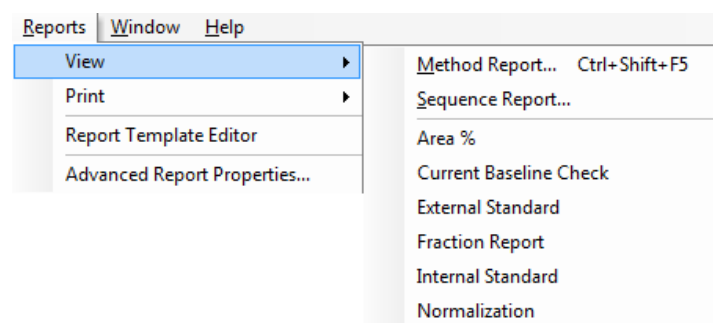
Introduzione

Lo scopo di qualsiasi sistema, tra cui un sistema di elettroforesi capillare, è quello di rispondere a un'esigenza. E la risposta è utile solo se può essere comunicata. Il software 32 Karat include una potente suite di programmi di utilità per la creazione di report stampati. Consente inoltre di esportare dati e risultati in altri pacchetti software. La completa integrazione con l'ambiente del sistema operativo Windows consente di copiare e incollare elettroferogrammi ed altre informazioni direttamente da software 32 Karat in una vasta gamma di altri pacchetti software quali i word processor. In questa sezione del capitolo viene descritto come utilizzare le funzioni per la creazione di report incorporate nel software. Per informazioni sulle modalità di spostamento dei dati in altre applicazioni, consultare le risorse elencate nell'[APPENDICE A, Risorse aggiuntive](#).

In altri capitoli di questa guida, sono state introdotte alcune delle opzioni predefinite dei report. Qui viene illustrato come personalizzare un report predefinito in modo che includa le informazioni desiderate. Si continua a considerare come prototipo uno strumento UV. I report LIF sono sostanzialmente identici ai report UV. I report con i dati PDA possono avere gli stessi formati di quelli con i dati UV. Sono disponibili altri tipi di report specifici per i dati PDA, ad esempio i report della libreria di spettro PDA.

Un approccio semplice alla creazione di report consiste nell'utilizzare report predefiniti. Questi sono stati utilizzati nei capitoli precedenti di questa guida. Nella barra dei menu, fare clic su **Reports > View** per visualizzare il menu seguente, che riporta l'elenco dei report predefiniti.

Figura 12.1 Reports > View Selection



In questo esercizio, verranno utilizzati il file di dati e il metodo dell'esercizio sull'analisi qualitativa. L'esame del menu dei report indica che non esiste un report predefinito per i dati qualitativi, quindi è necessario crearne uno. È necessario creare un report di metodo personalizzato che diventi parte integrante di quest'ultimo. Salvare il report come modello standard aggiunto all'elenco dei report.

Creazione di un report di metodo personalizzato

- 1 Aprire lo strumento Virtual UV nella finestra principale del software 32 Karat.
- 2 Dalla cartella di lavoro, aprire i dati e il metodo utilizzati durante l'esercizio sull'analisi qualitativa. Si desidera creare un report in base ai risultati dell'analisi generati durante l'attività.
- 3 Nel menu **Method**, fare clic su **Custom Report**.
- 4 Viene aperta una finestra vuota. Se in precedenza è già stato sviluppato un report personalizzato per il metodo in uso, questo viene aperto automaticamente.

Modifica di un modello di report

Invece di sviluppare un report ex novo, è possibile modificare un modello di report esistente per semplificare questa attività. Un modello di report è un insieme predefinito di istruzioni per la creazione di un report. Il software offre diversi modelli. È possibile aggiungere modelli creandone di nuovi o modificando quelli esistenti e salvandoli con un nuovo nome. Come base per il report di analisi qualitativa utilizzare il modello Area%. Nel menu File, fare clic su **Report Template > Open** e selezionare Area%.srp. Il modello si apre visualizzando i risultati del file di dati aperto. Quando si apre un modello, le informazioni dell'intestazione vengono evidenziate, i bordi della tabella vengono punteggiati e nella parte superiore del report viene visualizzato un righello.

Come primo passo, modificare il titolo del report. Il funzionamento dell'editor di report è molto simile a quello di un word processor.

- 1 Con il mouse, evidenziare l'intestazione **Area% Report**.
- 2 Digitare **Qualitative Analysis Report**.

-
- 3** Evidenziare il nuovo titolo e fare clic su **Italic** nella barra degli strumenti.
Le informazioni sotto il titolo, evidenziate in grigio, rappresentano i campi. I campi consentono di inserire blocchi di informazioni senza scrivere noiosi codici. I campi e il testo possono essere utilizzati congiuntamente. In questo modello, ogni campo è preceduto da un descrittore di testo. Tali campi possono essere facilmente riposizionati.

 - 4** Fare clic dopo il campo Acquired e premere il tasto **Canc**. In tal modo, il campo Print Time viene spostato sulla stessa riga del campo Acquired.

 - 5** Premere due volte il tasto **Tab** per interporre uno spazio tra i due campi.

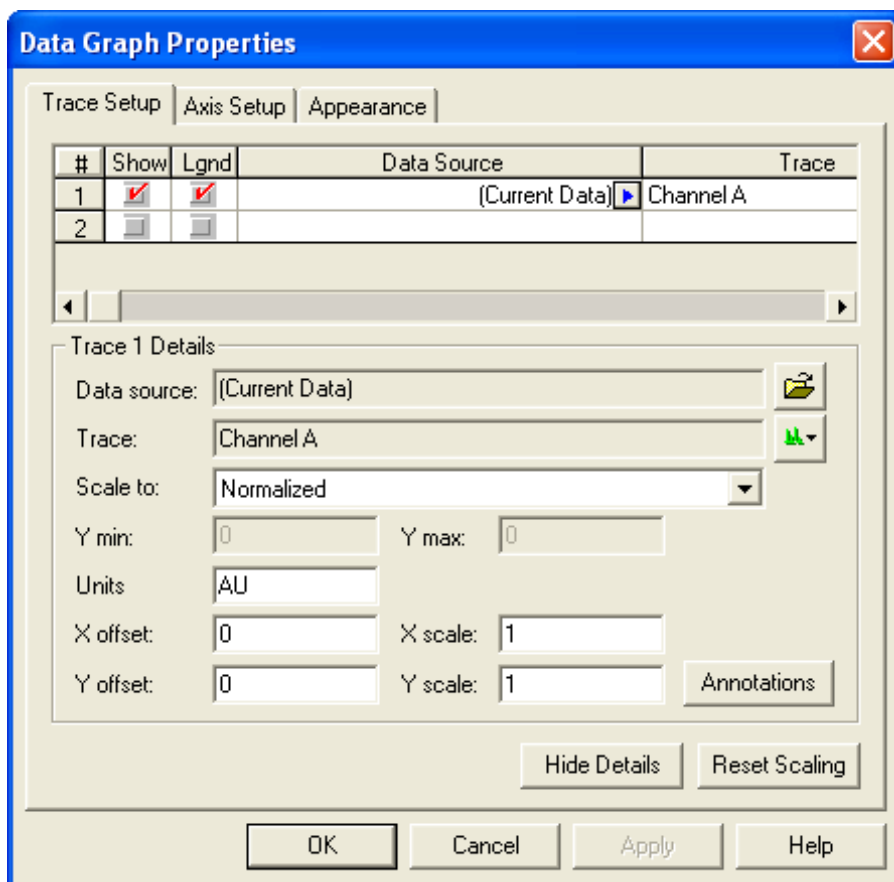
 - 6** Fare clic sulla riga vuota al di sotto dei campi e digitare **User ID**, quindi premere il tasto **Tab**.

 - 7** Fare clic con il pulsante destro del mouse e fare clic sul campo **Insert**, quindi su **User reporting the data**. Viene aperto un nuovo campo con il nome utente corrente. Se non si è indicato alcun nome utente, viene visualizzato **PA800**.

 - 8** Utilizzare la tastiera come se si trattasse di un word processor per allineare il campo e il testo nel modo desiderato.
Sotto le informazioni di intestazione è presente un grafico con l'elettroferogramma. Per impostazione predefinita, il grafico viene dimensionato in modo da visualizzare l'intero intervallo di dati. Nel caso di CE Data Sample 3, l'area di interesse è localizzata nell'estremità destra dell'elettroferogramma.
Come fase successiva, regolare la visualizzazione dell'elettroferogramma in modo che la regione di picco sia chiara.

 - 9** Fare doppio clic sul grafico per visualizzare la finestra di dialogo **Data Graph Properties**.

Figura 12.2 Data Graph Properties



La scheda **Trace Setup** consente di selezionare i dati da visualizzare. Selezionare i dati correnti (file attualmente aperto nella finestra Instrument) oppure uno o più file di dati memorizzati nel computer.

Ad esempio, è possibile visualizzare i risultati dell'analisi di uno standard insieme ai risultati dell'analisi di un campione sconosciuto. È possibile visualizzare più canali di un file di dati comune selezionando la stessa origine dati e, al contempo, canali diversi nella colonna Trace. Ad esempio, possibile visualizzare contemporaneamente le tracce relative a luce UV e a corrente elettrica. È possibile utilizzare le funzioni di spostamento e di ridimensionamento X e Y per posizionare le tracce in modo da visualizzare i dettagli pertinenti. Queste funzioni sono descritte nelle risorse elencate in [APPENDICE A, Risorse aggiuntive](#). Le unità sono etichette regolabili in base ai dati visualizzati. Per un rivelatore LIF la modifica può essere eseguita in **Fluorescence** selezionando l'opzione **Units** e inserendo il testo.

10 Fare clic su **Annotations**.

11 Poiché si tratta di un report qualitativo, rimuovere tutte le annotazioni esistenti dal pannello laterale destro.

12 Aggiungere **Quality** e impostare il numero di cifre decimali su zero.

13 Fare clic su **OK** per tornare alla finestra di dialogo principale.

Ora è possibile modificare l'asse X in modo che l'area di picco occupi la finestra del grafico.

14 Fare clic sulla scheda **Axis Setup**.

15 Con l'asse X selezionato, fare clic su **Use this range**.

16 Digitare un minimo di **24** e un massimo di **30** per indicare un range orario compreso tra 24 e 30 minuti.

17 Al termine, fare clic su **OK**.

La parte dell'elettroferogramma contenente i 21 picchi deve riempire il grafico e ciascun picco deve essere etichettato correttamente con il valore Quality.

È ora possibile ridimensionare il grafico trascinando i quadratini lungo i bordi destro e inferiore dell'immagine. Lo spostamento del grafico richiede che venga trattato come un oggetto di testo.

18 Per centrarlo sulla pagina, fare clic sul grafico per selezionarlo (viene visualizzato un bordo punteggiato stretto) e utilizzare l'icona di centratura sulla barra degli strumenti. È possibile aumentare lo spazio al di sopra e al di sotto del grafico inserendo righe vuote con il tasto **Enter**.

È possibile aggiungere altri grafici facendo clic con il pulsante destro del mouse su una riga vuota e facendo clic su **Insert Graph**. Ad esempio, è possibile desiderare un secondo grafico che mostri l'intero intervallo del set di dati. Il nuovo grafico può essere formattato come descritto sopra.

Sotto il grafico è riportata una tabella con una varietà di parametri di picco. Alcuni devono essere modificati per il nuovo report.

1 Fare clic con il pulsante destro del mouse sull'intestazione della colonna **Area%** e selezionare **Change Parameter**.

2 Fare clic su **Quality** come nuovo parametro e modificare i decimali su **zero**.

3 Nel campo Column Header, digitare **Bases**.

4 Fare clic su **OK**.

La colonna ora contiene il numero di basi calcolate dal software per ciascun picco.

5 Fare clic con il pulsante destro del mouse nella tabella e selezionare **Report Properties**.**6** Utilizzare la freccia rossa per rimuovere Height o Height%, poiché non si è interessati a tali informazioni.**7** Fare clic su **OK**.

La tabella è ora troppo larga per le restanti tre colonne. Facendo clic sui divisori verticali tra le colonne, è possibile trascinare le larghezze delle colonne. In qualsiasi momento durante la modifica, fare clic sull'icona **Print Preview** per visualizzare l'aspetto dei report sulla stampante predefinita.

Salvare il metodo. Il nuovo report ora fa parte del metodo Quality ed è disponibile ogniqualvolta si utilizzi tale metodo selezionando **Method Custom Report**.

Salvataggio di un report come modello

Per utilizzare il report con un altro metodo, è possibile salvarlo come modello.

1 Nel menu File, fare clic su **Report Template > Save As**.**2** Digitare **Quality** come nome del file e fare clic.

Per impostazione predefinita, i modelli vengono salvati con l'estensione *.rep.

3 Fare clic su **File > New Method**.**4** Aprire **Method Custom Report** selezionandolo nel menu Method (qualora non sia già aperto).

Il report è vuoto, poiché nel nuovo metodo non sono stati definiti report personalizzati.

5 Nel menu **File**, fare clic su **Report Template > Open** e aprire il modello Quality.rep creato.

Il metodo appena salvato contiene il file Quality.rep come report personalizzato predefinito per il metodo. Il report personalizzato salvato nel metodo può essere modificato in qualsiasi momento.

Salvataggio di un report come report predefinito

È inoltre possibile salvare il report come predefinito nel menu **Reports**.

- 1 Fare nuovamente clic su **Report Templates > Save As** nel menu File.
- 2 Questa volta salvare il modello con il nome **Quality.srp**.
- 3 Fare clic su **Save**.

Il modello salvato con l'estensione *.srp è un nuovo modello predefinito. Alla successiva apertura di una finestra Instrument, il nuovo tipo di report è disponibile nel menu Reports. È un modo pratico per gestire i report utilizzati di frequente.

Modelli di report

I report personalizzati sono modelli per la visualizzazione e la stampa di dati e oggetti. Il software 32 Karat viene fornito con una suite di modelli di report standard per offrire numerosi tipi di report. Questi possono essere utilizzati così come sono o possono essere modificati utilizzando l'editor Method Custom Report o Sequence Custom Report e quindi salvati come nuovi modelli.

Modelli di report di metodo personalizzati

Un modello di report di metodo personalizzato viene creato e salvato come parte di un metodo, ma può anche essere salvato come file di modello e può essere aperto e utilizzato o modificato da qualsiasi altro metodo.

Modelli di report di sequenza personalizzati

I modelli di report di sequenza personalizzati vengono utilizzati per creare report dei dati generati durante le operazioni con sequenze in lotti.

Ad esempio, per alcuni tipi di esecuzione è necessario un modello di report. Quando si designa un'esecuzione come Begin Summary, ad esempio, è necessario indicare il nome di un modello per il report di riepilogo.

Altri tipi di esecuzione che richiedono modelli sono Suitability, QC Check Standards, Duplicates e Sequence Vial Report. Fare riferimento alla sezione [APPENDICE F, Report Sequence Vial](#). I modelli di report di sequenza personalizzati vengono creati e modificati mediante il relativo editor.

Modelli di report standard

Il software 32 Karat offre modelli standard per numerosi tipi di report. È inoltre possibile personalizzare o modificare i modelli forniti.

I modelli di report standard (Area%, External Standard, Internal Standard e Normalization) si trovano nella directory del programma C:\32Karat\Template e hanno l'estensione SRP. È possibile creare nuovi modelli di report standard salvando il modello di report con l'estensione SRP.

Report di sequenza

I report di sequenza si possono creare e salvare solo utilizzando l'editor dei report di sequenza personalizzati. A differenza dei report di metodo personalizzati, i modelli di report di sequenza personalizzati non vengono salvati come parte del file della sequenza e devono essere salvati come file modello, se si desidera generare un report utilizzando un modello di report di sequenza.

Con il software 32 Karat sono forniti i seguenti modelli di report di sequenza:

- Calibration
- Summary
- Duplicate
- QCCheckStd
- Spike
- SysSuit

Si trovano nella directory 32 Karat Software/Sequence e hanno l'estensione BRP.

Risorse aggiuntive

Help online del software 32 Karat

L'Help online del software 32 Karat è il riferimento software principale per il software 32 Karat. Descrive tutte le funzioni usate in questa guida. Descrive inoltre le funzioni avanzate, non trattate in questo documento. Per accedere alla guida, fare clic su **Help > Contents** nella barra dei menu della finestra Instrument. La guida sensibile al contesto è disponibile facendo clic sul pulsante Help presente nelle finestre di dialogo o premendo il tasto F1.

Guida all'installazione e alla manutenzione

Il primo luogo in cui cercare risposte alle domande sull'hardware e la manutenzione è la *Guida alla manutenzione del sistema*. Questo documento include descrizioni dettagliate delle operazioni di routine, ad esempio la ricostruzione di una cartuccia capillare. Una copia elettronica è disponibile sul CD-ROM fornito con il software 32 Karat.

Assistenza SCIEX

Se si è verificato un problema con lo strumento che non può essere risolto seguendo le procedure descritte nella *Guida alla manutenzione del sistema*, rivolgersi al responsabile dell'assistenza tecnica SCIEX di zona. Il servizio potrebbe essere a pagamento.

Altri riferimenti

Esistono molte pubblicazioni che trattano le applicazioni di elettroforesi capillare, la metodologia, le operazioni di routine e le tecniche correlate. La biblioteca di ricerca locale è il posto migliore in cui iniziare.

Sito Web SCIEX, sciex.com: la fonte delle informazioni più aggiornate sull'elettroforesi capillare fornite da SCIEX.

Il responsabile dell'assistenza tecnica SCIEX di zona: la migliore fonte di informazioni.
Per informazioni sui prodotti più recenti o per effettuare un ordine, rivolgersi al rappresentante di zona.

Calcoli del sistema PA 800 Plus

Calcoli di elettroforesi capillare

L'elaborazione dei dati elettroforetici è simile all'elaborazione dei dati cromatografici con alcune differenze. Alcuni calcoli specifici sono integrati nel software 32 Karat. In questa appendice vengono descritti questi calcoli, unitamente ad altri che potrebbero rivelarsi utili.

Legge di Ohm

$$V = I \times R$$

La relazione più importante da conoscere nell'elettroforesi capillare è la legge di Ohm. Questa semplice relazione definisce l'interazione tra tensione (V), corrente (I) e resistenza (R). Ad esempio, se la tensione rimane costante, qualsiasi variazione di corrente deve essere dovuta a una variazione di resistenza. Le informazioni di questo tipo sono inestimabili nello sviluppo e nella risoluzione dei problemi dei metodi di elettroforesi capillare.

Tempo di migrazione corretto

$$t_{corr} = t \times \left(\frac{t'_{ref}}{t_{ref}} \right)$$

t = tempo di migrazione del picco di interesse (secondi)

t'_{ref} = tempo di migrazione del picco di riferimento previsto (dalla tabella degli ID dei picchi; secondi)

t_{ref} = tempo di migrazione del picco di riferimento effettivo (secondi)

NOTA Per ottenere il valore visualizzato nel software 32 Karat, dividere per 60 il valore ottenuto dall'equazione.

Area corretta

$$A_{corr} = v \times A = \left(\frac{L_d}{t} \right) \times A$$

v = velocità

A = area del picco non corretta

L_d = lunghezza del capillare fino al rilevatore

t = tempo di migrazione (secondi)

Nell'elettroforesi capillare, i primi picchi migrano attraverso la finestra del rilevatore più velocemente rispetto ai picchi successivi. Ciò crea una polarizzazione dell'area del picco che viene eliminata utilizzando l'area di picco corretta.

Mobilità

La mobilità (μ) viene calcolata sottraendo dalla mobilità apparente il contributo alla mobilità del flusso elettroosmotico (EOF).

$$\mu = \mu_{app} - \mu_{eof}$$

Una volta determinata la mobilità di un analita di riferimento, è possibile calcolare la mobilità degli analiti correlati.

$$\mu = L_d \times L_t \times \left(\frac{1}{V \times t} - \frac{1}{V_{ref} \times t_{ref}} \right) \times \mu_{ref}$$

L_d = lunghezza del capillare fino al rilevatore

L_t = lunghezza totale del capillare

V = tensione media applicata fino al tempo di migrazione del picco di interesse

t = tempo di migrazione del picco di interesse (secondi)

V_{ref} = tensione media applicata fino al tempo di migrazione del picco di riferimento

t_{ref} = tempo di migrazione del picco di riferimento nell'esecuzione corrente

μ_{ref} = mobilità definita per il picco di riferimento

Mobilità apparente

La mobilità apparente è la somma della mobilità effettiva e della mobilità causata dal flusso elettroosmotico. La mobilità apparente può essere calcolata direttamente per qualsiasi picco. La mobilità apparente di un marcatore neutro (che abbia una mobilità effettiva pari a zero) è chiamata μ_{eof} , mobilità elettroosmotica.

$$\mu_{app} = \frac{v}{E} = \frac{L_d \times L_t}{V \times t}$$

v = velocità

E = intensità di campo

L_d = lunghezza del capillare fino al rilevatore

L_t = lunghezza totale del capillare

V = tensione media fino al tempo di migrazione del picco

t = tempo di migrazione del picco (secondi)

Tensione media applicata

I calcoli di mobilità dipendono da una misurazione accurata della tensione media applicata fino al punto in cui il componente passa il rilevatore. L'output del monitor della tensione di sistema PA 800 Plus viene utilizzato per calcolare la tensione media applicata come segue:

$$V = \frac{1}{n} \times \sum_{i=1}^n V_i$$

n = numero del punto dati al tempo di migrazione del picco

V_i = valore della tensione al punto dati i



Informazioni sui dati PDA

Panoramica

Nella maggior parte degli esercizi della guida sono stati usati dati di esempio tratti da un sistema di rilevamento ultravioletto. I file di dati LIF vengono visualizzati quasi nello stesso modo dei file di dati UV. Dal punto di vista dell'analisi dei dati, la differenza principale tra i dati UV e i dati LIF è costituita dalla scala dell'asse Y.

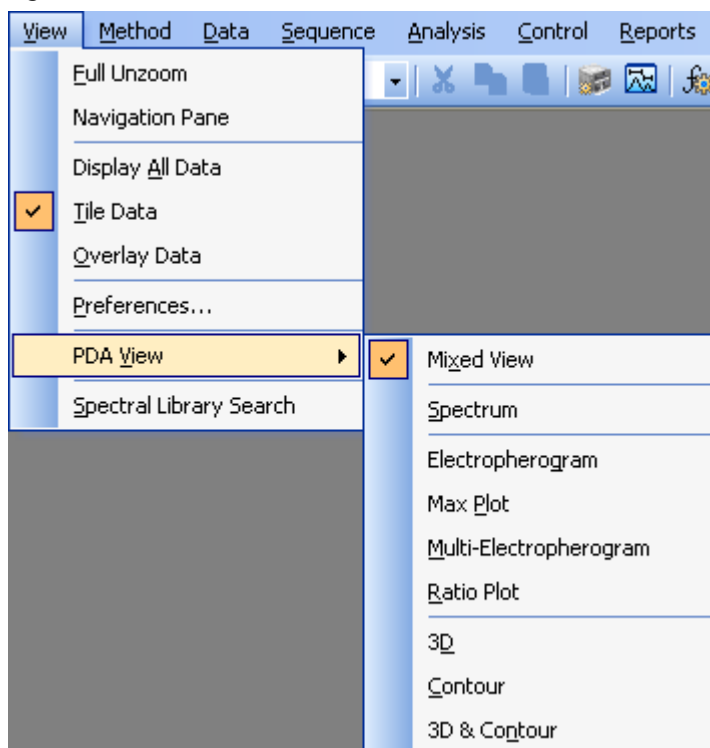
I dati PDA sono costituiti da più componenti. Questi sono:

- **Dati dei canali:** ciascun canale equivale a una traccia UV. È possibile raccogliere i dati di un massimo di tre canali contemporaneamente.
- **Dati spettrali 3D:** i tre assi di questa serie di dati indicano il tempo, la lunghezza d'onda e l'assorbanza.
- **Dati dell'elettroferogramma multiplo:** simile ai dati del canale, questa è una traccia di assorbanza rispetto al tempo estratto dai dati spettrali 3D. È possibile creare un numero illimitato di set di dati.

I dati dei canali e dell'elettroferogramma multiplo vengono elaborati analogamente a quanto avviene con i dati UV; sono valide tutte le procedure descritte in questa guida.

Nel proseguimento di questa appendice vengono descritte alcune delle caratteristiche dei dati PDA. Per ricreare queste visualizzazioni, è necessario aprire uno strumento configurato per un rilevatore PDA (la modalità offline è sufficiente). Da una copia della directory Data Samples, aprire il file di dati CE PDA Data Sample.dat.

I componenti multipli del set di dati PDA sono disponibili selezionando **View > PDA View** nella barra dei menu.

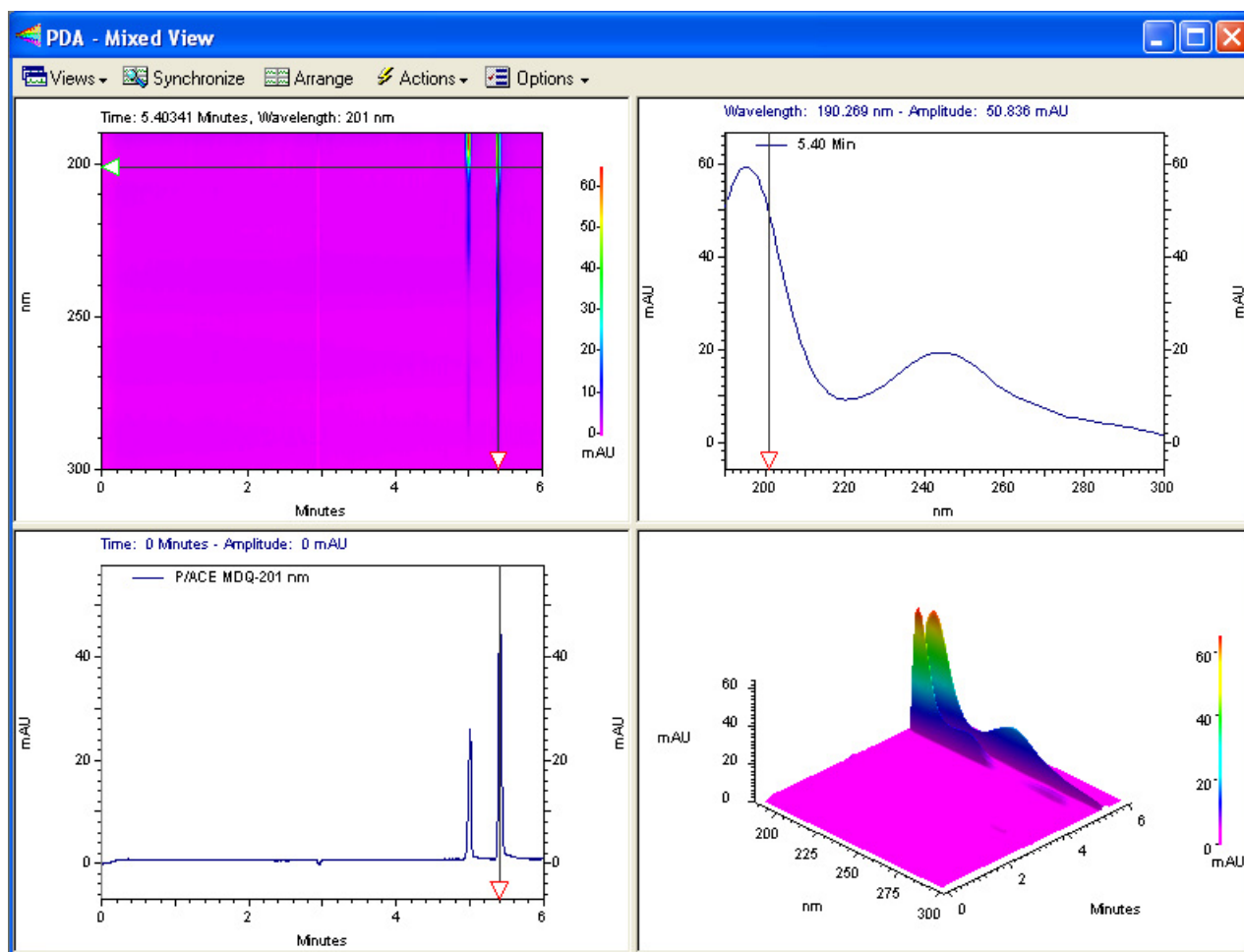
Figura C.1 View > PDA View

Ogni voce di menu rappresenta un modo diverso di presentare i dati nella finestra. È possibile effettuare una sola selezione alla volta.

Mixed View

Questa opzione è illustrata di seguito. In questa figura vengono illustrate anche molte delle altre opzioni.

Figura C.2 Componenti multipli del set di dati PDA



Questa finestra mostra quattro viste diverse dello stesso set di dati. Il campione è la stessa miscela di Alpha e Beta usata in questa guida. La finestra è suddivisa in quattro riquadri. Facendo clic e trascinando le barre che separano i riquadri, è possibile modificare le aree assegnate a ciascun riquadro. Le viste disponibili sono:

Tabella C.1 Viste dei set di dati PDA

Nome del picco	Sinistra	Destra
Superiore	Contour Plot	Spettro
Inferiore	Elettroferogramma	Tracciato 3D

Contour Plot

Il contour plot è una vista panoramica di un set di dati tridimensionale. Gli assi X e Y indicano rispettivamente il tempo e la lunghezza d'onda. L'assorbanza a una determinata lunghezza d'onda e in qualsiasi punto temporale è indicata dal colore o dalla tonalità di grigio. Il tracciato può essere ingrandito utilizzando il mouse per selezionare l'area desiderata. Fare clic con il pulsante destro del mouse e fare clic su **Full Unzoom** per ripristinare la visualizzazione.

Spettro

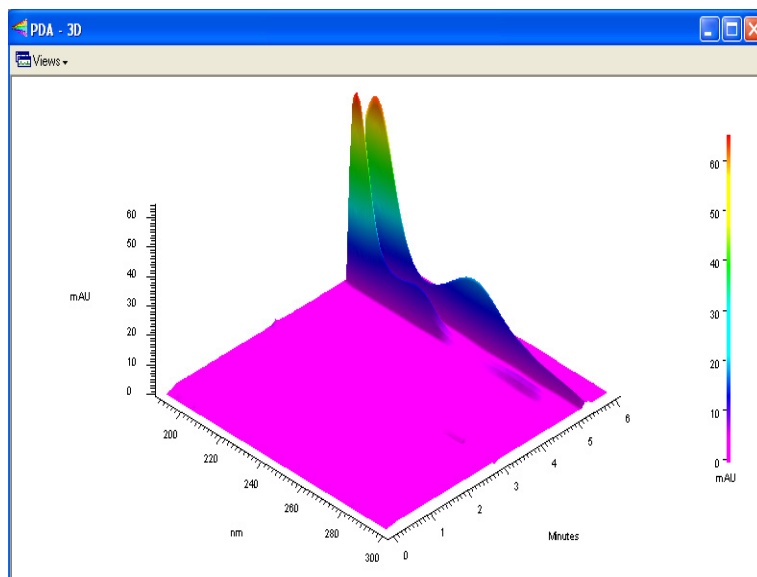
Spettro rilevato in un determinato momento. Questa opzione viene selezionata spostando il cursore orizzontale nel tracciato Contour plot o dell'elettroferogramma fino al punto temporale desiderato. Rappresenta una sezione dei dati 3D. Il tracciato può essere ingrandito utilizzando il mouse per selezionare l'area desiderata. Fare clic con il pulsante destro del mouse e fare clic su **Full Unzoom** per ripristinare la visualizzazione.

Elettroferogramma

Elettroferogramma per la lunghezza d'onda specificata. Questa opzione viene selezionata spostando il cursore verticale nel tracciato Contour plot o il cursore orizzontale nella vista Spectrum fino alla lunghezza d'onda desiderata. Rappresenta una sezione dei dati 3D in direzione perpendicolare alla vista dello spettro. Il tracciato può essere ingrandito utilizzando il mouse per selezionare l'area desiderata. Fare clic con il pulsante destro del mouse e fare clic su **Full Unzoom** per ripristinare la visualizzazione.

Tracciato 3D

Rappresentazione tridimensionale dei dati. La presentazione di questa finestra non è legata alla vista Contour. Per regolare la visualizzazione, fare clic con il pulsante destro del mouse sulla stampa 3D e fare clic su **properties** per aprire la finestra delle proprietà del grafico 3D dei dati.

Figura C.3 Finestra delle proprietà del grafico 3D dei dati

Il tracciato può essere visualizzato come superficie monocromatica oppure è possibile utilizzare il colore per specificare gli intervalli di assorbanza. I colori sono selezionabili dall'utente. L'immagine può essere ruotata intorno agli assi X e Y selezionando il comando nel menu di scelta rapida e manipolando il tracciato 3D con il mouse o digitando i parametri di elevazione e rotazione nella finestra delle proprietà del grafico 3D dei dati. Lo zoom viene eseguito impostando limiti di tempo, lunghezza d'onda e assorbanza. Il pulsante Apply consente di apportare le modifiche al tracciato 3D senza chiudere la finestra delle proprietà. In tal modo è possibile testare le modifiche senza dover chiudere e riaprire la finestra.

3D e Contour Plot mostrano solo questi due tracciati in una finestra con due riquadri.

I tracciati **3D**, **Contour**, **Elettroferogramma** e **Spettro** mostrano ciascun riquadro come un'intera finestra. I limiti dei tracciati dell'elettroferogramma e dello spettro sono quelli impostati nella finestra Contour anche se la finestra Contour non viene visualizzata. Le scelte rimanenti nel menu PDA View non sono correlate a queste quattro voci.

La vista **Max Plot** è un elettroferogramma che non rappresenta una particolare lunghezza d'onda. Viene creato a partire dall'assorbanza massima rilevata nel range di scansione della lunghezza d'onda in ogni punto temporale. Questo tracciato è utile per trovare picchi che altrimenti potrebbero non essere rilevati. È possibile analizzare questi dati e creare dei report con i risultati.

La vista **Multi-Electropherogram** è disponibile solo se nel componente di configurazione dello strumento del metodo siano stati definiti elettroferogrammi multipli. Analogamente a Max Plot, questi tracciati vengono sintetizzati a partire dal set di dati 3D. Per impostare questi canali, aprire la finestra PDA Options nel menu Method e fare clic sulla scheda **Multi-Electropherogram**. Per ciascun canale è necessario specificare tre voci. Il canale può essere selezionato o deselezionato. I canali deselezionati non vengono visualizzati e non possono essere analizzati. La lunghezza d'onda si riferisce alla lunghezza d'onda centrale dei dati da incorporare nel canale dell'elettroferogramma multiplo. La larghezza di banda specifica quante bande di lunghezza d'onda adiacenti verranno combinate per formare il nuovo set di dati. Queste bande sono pesate in modo che le bande più distanti dalla lunghezza d'onda centrale contribuiscano meno al risultato finale rispetto a quelle più vicine al punto centrale. L'uso di una larghezza di banda troppo stretta determina un file di dati con rumore. L'uso di una larghezza di banda troppo ampia causa una perdita di sensibilità dello spettro nel set di dati.

È possibile analizzare questi dati e creare dei report con i risultati. Se sono stati definiti molti canali dell'elettroferogramma multiplo, ciascuno occupa una piccola area della visualizzazione. La cornice attorno a ciascun canale può essere spostata facendo clic e trascinandola con il mouse. È inoltre possibile deselezionare temporaneamente i canali disabilitandoli nella scheda **Multi-Electropherogram** della finestra PDA Options.

Con **Ratio** viene aperta una finestra con tre riquadri. Due finestre mostrano gli elettroferogrammi con la lunghezza d'onda specificata. La terza mostra un elettroferogramma che indica il rapporto aritmetico dei due precedenti (valore assoluto n.1/valore assoluto n.2, punto per punto). I parametri per questa finestra vengono impostati nella scheda X:Y della finestra PDA Options (disponibile nel menu Method).

Quando si selezionano i dati PDA, il campo a discesa nella barra degli strumenti contiene un elenco dei canali dati disponibili. Prima di integrare o analizzare i dati, è necessario selezionare il canale desiderato nell'elenco. Ogni canale dati dispone di una tabella Peaks\Groups e di una tabella Integration Events uniche, disponibili nel menu Method solo dopo aver selezionato il canale dati.

Per maggiori informazioni sull'uso dei dati PDA, consultare le risorse elencate nell'[APPENDICE A, Risorse aggiuntive](#).

Amministrazione del sistema

Panoramica

Le funzioni di amministrazione del sistema comprendono l'aggiunta e la configurazione di strumenti, già descritte in questa guida. Includono inoltre funzioni per la definizione di utenti e progetti. La definizione dei progetti comprende: la definizione di cartelle predefinite per memorizzare dati e metodi; la specifica degli strumenti che possono essere utilizzati per un progetto; la definizione degli utenti che possono lavorare su un progetto e del livello di privilegi di cui dispone ciascun utente. Queste funzioni amministrative vengono gestite dal software mediante procedure guidate. Non è necessario implementare questa funzione per usare il sistema.

L'amministrazione di sistema viene gestita dalla finestra principale del software 32 Karat.

- 1 Nel menu **Tools**, fare clic su **Options**.
- 2 Fare clic sulla scheda **Enterprise**.
- 3 Selezionando **Enable user login and project management** si attiva la funzione di amministrazione del sistema. La funzione ha effetto al successivo avvio del programma.



AVVERTENZA

Se si attiva la funzione System Administration, è necessario definire subito l'amministratore di sistema. In mancanza di amministratore di sistema, nessun utente avrà la possibilità di disabilitare la funzione System Administration. A seconda dei livelli di privilegi assegnati agli utenti, l'assenza di un amministratore di sistema può rendere inaccessibili alcune o tutte le funzioni software.

Quando si seleziona l'opzione **Enable**, è possibile accedere a un elenco di utenti. Selezionando **Add User** si apre una finestra di dialogo in cui immettere il nome utente e la password. La password non è obbligatoria. Se si utilizza una password, è necessario prenderne nota. Non è presente alcuna funzione nel software per la creazione di un elenco di password utente.

Quando vengono inseriti tutti i nomi o, perlomeno, quello dell'amministratore, è necessario assegnare i privilegi utente. I nuovi utenti non dispongono di privilegi se non di quelli che vengono espressamente assegnati.

IMPORTANTE Un utente senza privilegi non può usare il software.

Per chiudere la finestra di dialogo Options fare clic su **OK**. Nel menu **Tools**, fare clic su **System Administration Wizard**. La procedura guidata è disponibile solo se la modalità System Administration è stata selezionata (abilitata). Viene visualizzata una finestra con tre opzioni: Users, Instruments e Projects. Se sono presenti amministratori secondari, è possibile concedere loro l'accesso solo ad alcune procedure guidate.

La procedura guidata Users consente l'assegnazione dei privilegi. Seguire la procedura guidata passo a passo. Ogni utente può accedere a specifiche aree del software e a determinati strumenti. La scelta dipende dai privilegi assegnati e dal grado di sicurezza richiesto. Ad esempio, i laboratori omologati di controllo della qualità attuano generalmente controlli più stringenti sull'accesso ai dati e agli strumenti rispetto ai laboratori impegnati nella ricerca di base.

La procedura guidata Instruments consente all'amministratore di assegnare a determinati strumenti gli utenti, ma non specifici privilegi.

La procedura guidata Projects consente all'amministratore di creare progetti. Un progetto è una combinazione di utenti, strumenti e cartelle. I progetti sono molto utili quando i sistemi vengono usati da più operatori o gruppi che non hanno bisogno di accedere ai metodi e ai dati dell'uno o dell'altro. La creazione di un progetto consente di compartimentare le operazioni sullo strumento.

Il software viene fornito con un progetto, denominato Default. Si tratta di un progetto speciale in quanto non può essere protetto. Non deve essere utilizzato per metodi e dati che non devono essere condivisi.

Per maggiori informazioni sull'amministrazione del sistema, consultare la *Guida per l'amministrazione del sistema*.

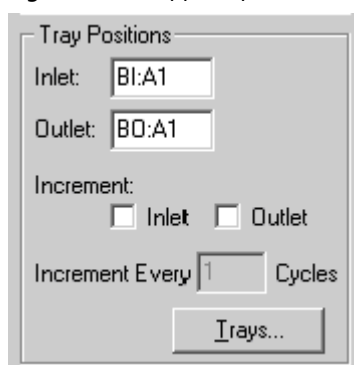
Incremento delle fiale

Introduzione

L'incremento delle fiale è un processo di automazione in cui le fiale di ingresso o di uscita possono essere programmate per avanzare dopo un numero predeterminato di cicli. Lo spostamento delle fiale in posizioni adiacenti si verifica quando lo strumento ha eseguito un determinato numero di cicli di un metodo. L'incremento delle fiale elimina la necessità di ideare nuovi metodi ogni volta che si desiderano posizioni diverse della fiala durante il corso di un set di esecuzioni dello strumento. È possibile usare un metodo per consentire al sistema di strumenti di passare automaticamente alle nuove posizioni delle fiale. È possibile integrare l'incremento delle fiale nelle applicazioni per disporre di un potente strumento. Ad esempio, l'incremento delle fiale può essere usato per effettuare una separazione efficiente di composti biologici o chimici senza sostituire o rifornire costantemente le soluzioni di separazione durante le esecuzioni.

L'incremento delle fiale è controllato dal metodo e dalla sequenza software. È possibile selezionare l'incremento per una o entrambe le fiale di ingresso/uscita nella finestra di dialogo Tray Positions per ciascuno dei seguenti eventi del programma orario del metodo: risciacquo, iniezione, separazione e attesa.

Figura E.1 Gruppo di posizioni del vassoio

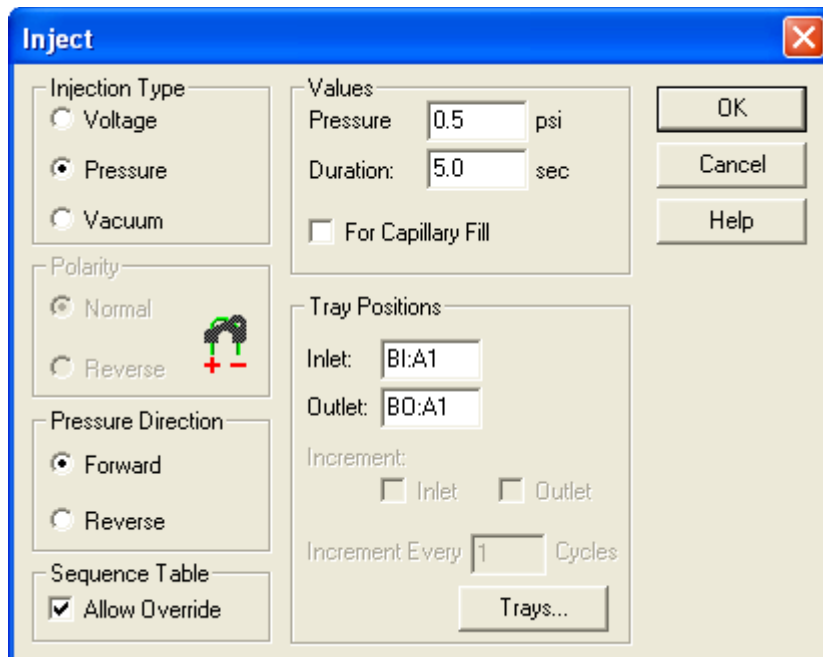


I **cicli** costituiscono il numero di ripetizioni di un metodo prima che si verifichi un incremento delle fiale. Se si fa clic su **Increment Every 2 Cycles**, il sistema esegue il metodo due volte prima di cambiare posizione alle fiale per l'evento del programma orario specificato (ad esempio, risciacquo o separazione).

D'altra parte, se si fa clic su **Increment Every 5 Cycles**, lo strumento esegue il metodo cinque volte prima di cambiare la posizione delle fiale per l'evento del programma orario specificato.

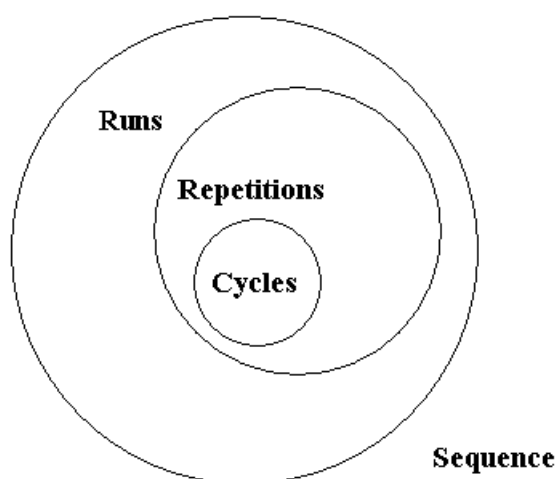
L'evento Inject, a differenza degli eventi Rinse, Separate e Wait, si può programmare mediante il metodo o la tabella delle sequenze. L'evento Inject consente l'introduzione di campioni dalle posizioni della fiala indicate nel programma orario del metodo o nella tabella delle sequenze. L'incremento delle fiale viene attivato se si sceglie l'evento Inject dal metodo. Se si sceglie l'evento Inject dalla tabella delle sequenze, l'incremento delle fiale è disabilitato, con l'assegnazione della priorità alla tabella delle sequenze tramite la casella di controllo Allow Override.

Figura E.2 Finestra di dialogo Inject



Dopo aver impostato l'incremento delle fiale nel metodo, questo può essere eseguito come esecuzione singola mediante il comando Single Run. In alternativa, il metodo può essere integrato nella tabella delle sequenze con il comando Sequence Run. È inoltre possibile dirigere lo strumento in modo che esegua più cicli di uno o più metodi mediante un set di esecuzioni. L'esecuzione di più cicli nel sistema è denominata ripetizione.

Anche se i termini sono simili, le ripetizioni non devono essere confuse con i cicli. Il termine cicli viene usato nell'IMPOSTAZIONE dell'incremento delle fiale mediante il metodo. Il termine ripetizioni viene usato per descrivere l'ESECUZIONE dei cicli. Ad esempio, con 5 ripetizioni di un singolo metodo si indica che lo strumento esegue 5 cicli dello stesso metodo. Un set di ripetizioni costituisce un'esecuzione. Un set di esecuzioni costituisce una sequenza.

Figura E.3 Cicli, ripetizioni ed esecuzioni compongono una sequenza

Quando si seleziona Single Run (per l'esecuzione di un singolo metodo), viene usato il termine ripetizioni. I termini esecuzioni e ripetizioni vengono usati nella tabella delle sequenze e nella procedura guidata Sequence.

Riassumendo, il metodo guida l'incremento delle fiale. La tabella delle sequenze pianifica e organizza le attività di incremento delle fiale per l'utente.

Esempi di uso

Esempio 1

Figura E.4 Programma orario del metodo B

Initial Conditions PDA Detector Initial Conditions Time Program							
	Time (min)	Event	Value	Duration	Inlet vial	Outlet vial	Summary
1		Rinse - Pressure	20.0 psi	0.15 min	BI:A1	BO:A1	forward, In / Out vial inc 1
2		Rinse - Pressure	20.0 psi	0.15 min	BI:B1	BO:A1	forward, In / Out vial inc 1
3		Inject - Pressure	0.5 psi	15.0 sec	SI:A1	BO:A1	No override, forward, In / Out vial inc 1
4		Wait		0.15 min	BI:C1	BO:C1	In / Out vial inc 1
5	0.00	Separate - Voltage	1.0 KV	0.50 min	BI:C1	BO:C1	0.17 Min ramp, normal polarity, In / Out vial inc 1
6							

Nella [Figura E.4](#), le seguenti righe spiegano lo schema di incremento per il programma orario del metodo B:

1. Risciacquo 1: incrementa le fiale di ingresso e di uscita dopo ogni ciclo del metodo.
2. Risciacquo 2: incrementa le fiale di ingresso e di uscita dopo ogni ciclo del metodo.
3. Iniezione del campione dal metodo: incrementa le fiale di ingresso e di uscita dopo ogni ciclo del metodo.

4. Attesa: incrementa le fiale di ingresso e di uscita dopo ogni ciclo del metodo.
5. Separazione: incrementa le fiale di ingresso e di uscita dopo ogni ciclo del metodo.

Dopo aver impostato il programma orario del metodo B, è possibile generare la seguente tabella della sequenze (tabella della sequenze B1) con 4 sole ripetizioni del metodo B su una singola riga di esecuzione.

I risultati dell'esecuzione della sequenza strumentale della tabella E1 sono i seguenti:

Figura E.5 Risultati dell'esecuzione della sequenza della tabella delle sequenze E1

Run #	Run Type	Reps	Sample Inject Inlet	Sample Inject Outlet	Sample Inject Duration	Method
1	Unknown	4				Method B.met
2						

Tabella E.1 Tabella delle sequenze - Risultati esecuzione

Esecuzione n.	Ripetizione n.	Evento	Fiale effettive usate in ingresso	Fiale effettive usate in uscita
1	1	Rinse 1	BI:A1	BO:A1
1	1	Rinse 2	BI:B1	BO:A1
1	1	Inject	SI:A1	BO:A1
1	1	Wait	BI:C1	BO:C1
1	1	Separate	BI:C1	BO:C1
1	2	Rinse 1	BI:A2	BO:A2
1	2	Rinse 2	BI:B2	BO:A2
1	2	Inject	SI:A2	BO:A2
1	2	Wait	BI:C2	BO:C2
1	2	Separate	BI:C2	BO:C2
1	3	Rinse 1	BI:A3	BO:A3
1	3	Rinse 2	BI:B3	BO:A3
1	3	Inject	SI:A3	BO:A3
1	3	Wait	BI:C3	BO:C3
1	3	Separate	BI:C3	BO:C3
1	4	Rinse 1	BI:A4	BO:A4
1	4	Rinse 2	BI:B4	BO:A4
1	4	Inject	SI:A4	BO:A4
1	4	Wait	BI:C4	BO:C4
1	4	Separate	BI:C4	BO:C4

Come illustrato nella [Tabella E.1, Tabella delle sequenze - Risultati esecuzione](#), quando un evento con programma orario del metodo richiede l'incremento per ogni ciclo del metodo, le posizioni delle fiale vengono spostate di una fiala dopo ciascuna ripetizione (ad esempio da BI:A1 a BI:A2, da BI:A2 a BI:A3 e così via per l'evento Rinse 1).

La posizione della fiala viene incrementata, nella stessa colonna, alla posizione della fiala adiacente nella riga successiva. L'incremento viene effettuato anche dalla posizione della fiala della riga più alta di una colonna alla riga più bassa della colonna successiva.

Ad esempio, A1, A2, A3, A4, A5, A6, B1, B2 e così via.

In alternativa, è possibile generare gli stessi risultati di esecuzione della tabella delle sequenze B1 con un'esecuzione singola del metodo B usando 4 ripetizioni:

Figura E.6 Esecuzione singola del metodo B

È quindi possibile generare un'altra tabella delle sequenze (tabella delle sequenze B2) con 4 esecuzioni distinte, ciascuna delle quali costituita da una sola ripetizione dello stesso metodo B:

Figura E.7 Tabella delle sequenze

Sequence: untitled.seq						
Run #	Run Type	Reps	Sample Inject Inlet	Sample Inject Outlet	Sample Inject Duration	Method
1	Unknown	1				Method B.met
2	Unknown	1				Method B.met
3	Unknown	1				Method B.met
4	Unknown	1				Method B.met
5						
6						

I risultati dell'esecuzione della sequenza strumentale della tabella E2 sono i seguenti:

Tabella E.2 Tabella delle sequenze - Risultati esecuzione

Esecuzione n.	Ripetizione n.	Evento	Fiale effettive usate per l'ingresso	Fiale effettive usate per l'uscita
1	1	Rinse 1	BI:A1	BO:A1
1	1	Rinse 2	BI:B1	BO:A1
1	1	Inject	SI:A1	BO:A1
1	1	Wait	BI:C1	BO:C1
1	1	Separate	BI:C1	BO:C1
2	1	Rinse 1	BI:A2	BO:A2
2	1	Rinse 2	BI:B2	BO:A2
2	1	Inject	SI:A2	BO:A2
2	1	Wait	BI:C2	BO:C2
2	1	Separate	BI:C2	BO:C2
3	1	Rinse 1	BI:A3	BO:A3
3	1	Rinse 2	BI:B3	BO:A3
3	1	Inject	SI:A3	BO:A3
3	1	Wait	BI:C3	BO:C3
3	1	Separate	BI:C3	BO:C3
4	1	Rinse 1	BI:A4	BO:A4
4	1	Rinse 2	BI:B4	BO:A4
4	1	Inject	SI:A4	BO:A4
4	1	Wait	BI:C4	BO:C4
4	1	Separate	BI:C4	BO:C4

È possibile vedere che risultati dell'esecuzione della tabella delle sequenze E2 sono identici ai risultati dell'esecuzione della tabella delle sequenze E1. Indipendentemente dalla modalità di organizzazione della tabella delle sequenze (più ripetizioni di un metodo in un'esecuzione o in esecuzioni distinte, in cui ogni esecuzione rappresenta una ripetizione dello stesso metodo), i risultati dell'incremento delle fiale sono gli stessi.

Esempio 2

L'incremento delle fiale funziona anche quando esistono diversi metodi che si alternano nella tabella delle sequenze. Si considerino 2 metodi, A e B, che si alternano nella tabella delle sequenze.

Figura E.8 Programma orario del metodo A

Initial Conditions PDA Detector Initial Conditions Time Program							
	Time (min)	Event	Value	Duration	Inlet vial	Outlet vial	Summary
1	0.00	Separate - Voltage	1.0 KV	1.00 min	BI:D1	BO:D1	0.17 Min ramp, normal polarity, In / Out vial inc 2
2							

Nel programma orario del metodo A, la riga 1 indica una fase di separazione che incrementa le fiale di ingresso e di uscita cui è applicata ogni secondo ciclo del metodo.

Combinando il programma orario del metodo A (Figura E.8 dell'Esempio 2) e il programma orario del metodo B (Figura E.4 dell'Esempio 1), è possibile generare la seguente tabella delle sequenze (Figura E.9):

Figura E.9 Tabella delle sequenze AB

Sequence: untitled.seq						
Run #	Run Type	Reps	Sample Inject Inlet	Sample Inject Outlet	Sample Inject Duration	Method
1	Unknown	1				Method A.met
2	Unknown	1				Method B.met
3	Unknown	1				Method A.met
4	Unknown	1				Method B.met
5	Unknown	1				Method A.met
6	Unknown	1				Method B.met
7	Unknown	1				Method A.met
8	Unknown	1				Method B.met
9						

I risultati dell'esecuzione della sequenza strumentale della tabella delle sequenze AB sono illustrati di seguito. Per semplicità, viene preso in considerazione solo l'evento di separazione.

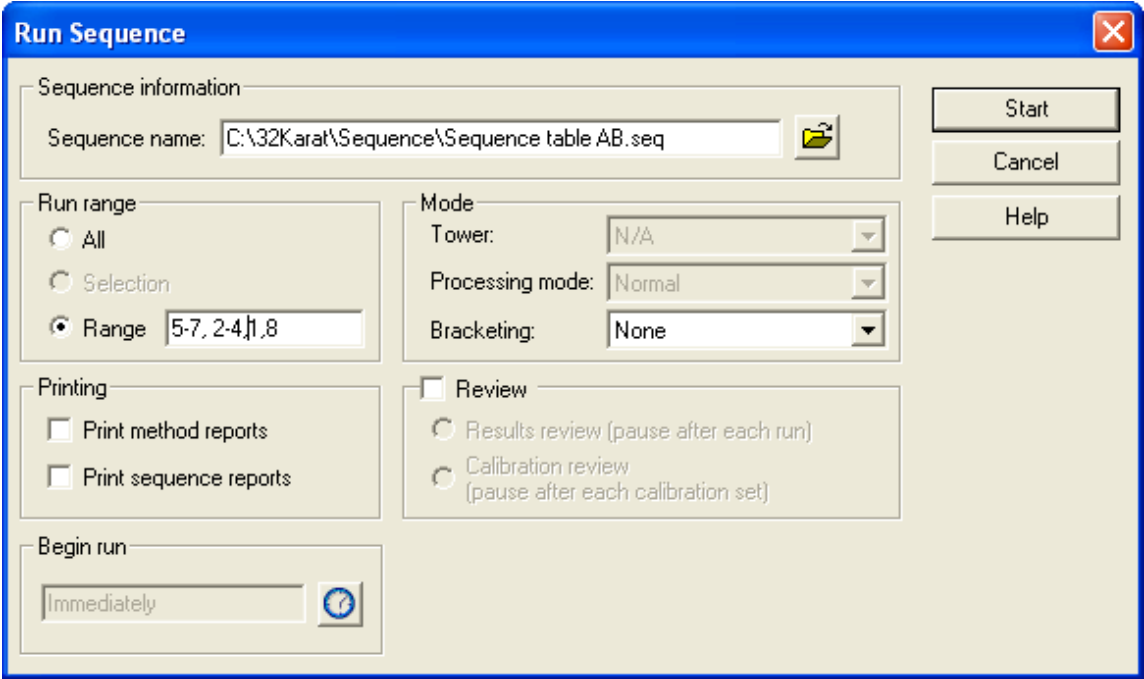
Tabella E.3 Tabella delle sequenze AB

Esecuzione n.	Ripetizione n.	Metodo usato	Evento	Fiale effettive usate in ingresso	Fiale effettive usate in uscita	Ciclo N. usate
1	1	A	Separate	BI:D1	BO:D1	1
2	1	B	Separate	BI:C1	BO:C1	1
3	1	A	Separate	BI:D1	BO:D1	2
4	1	B	Separate	BI:C2	BO:C2	2
5	1	A	Separate	BI:D2	BO:D2	3
6	1	B	Separate	BI:C3	BO:C3	3
7	1	A	Separate	BI:D2	BO:D2	4
8	1	B	Separate	BI:C4	BO:C4	4

I risultati dell'esecuzione della tabella delle sequenze AB mostrano che l'incremento delle fiale è proseguito per ciascun metodo anche in presenza di altri metodi che si alternano nella tabella delle sequenze.

Nei casi in cui non debbano essere eseguite tutte le righe di esecuzione della tabella delle sequenze, l'incremento delle fiale segue il numero dei cicli del metodo eseguiti al momento dell'esecuzione della sequenza. La finestra di dialogo Run Range del comando Sequence Run consente di impostare l'esecuzione solo di alcune righe della tabella delle sequenze:

Figura E.10 Finestra di dialogo Run Range del comando Sequence Run



Nell'intervallo di esecuzione delle righe 5-7, 2-4, 1, 8 della tabella delle sequenze AB, l'esecuzione della sequenza della tabella delle sequenze AB ha inizio alla riga di esecuzione 5, prosegue fino alla 7, torna alla 2, continua fino alla 4, torna alla 1 e, infine, si conclude con la riga di esecuzione 8.

I risultati dell'esecuzione della sequenza strumentale della tabella delle sequenze AB sono illustrati di seguito. I risultati sono ottenuti sequenzialmente nell'ordine qui illustrato. Anche in questo caso, per semplicità, viene preso in considerazione solo l'evento di separazione.

Tabella E.4 Intervallo della tabella delle sequenze AB

Esecuzione n.	Ripetizione n.	Metodo usato	Evento	Fiale effettive usate in ingresso	Fiale effettive usate in uscita	N. di cicli usati
5	1	A	Separate	Bl:D1	Bo:D1	1
6	1	B	Separate	Bl:C1	Bo:C1	1
7	1	A	Separate	Bl:D1	Bo:D1	2
2	1	B	Separate	Bl:C2	Bo:C2	2
3	1	A	Separate	Bl:D2	Bo:D2	3
4	1	B	Separate	Bl:C3	Bo:C3	3
1	1	A	Separate	Bl:D2	Bo:D2	4
8	1	B	Separate	Bl:C4	Bo:C4	4

Dai risultati precedenti dell'esecuzione dell'intervallo di esecuzioni selezionato si evince che l'incremento delle fiale viene reimpostato quando l'esecuzione della sequenza è iniziata sulla riga 5 della sequenza della tabella delle sequenze AB. Le posizioni delle fiale usate nei risultati dell'intervallo di esecuzioni selezionato sono le stesse di quelle dell'esecuzione della sequenza quando tutte le righe della tabella delle sequenze vengono eseguite in successione dalla riga 1 alla 8 ([Tabella E.3](#), [Tabella delle sequenze AB](#) dell'Esempio 2). Tuttavia, l'intervallo di esecuzioni selezionato ora mostra che ogni numero di riga di esecuzione corrisponde a un set di posizioni delle fiale diverso da quello della sequenza precedente ([Tabella E.4](#), [Intervallo della tabella delle sequenze AB](#) dell'Esempio 2).

IMPORTANTE Quando nel metodo è presente un evento Injection e si sceglie di eseguirlo dal metodo, l'incremento delle fiale viene attivato. Le posizioni delle fiale per l'incremento nell'intervallo di esecuzioni sono indicate nello stesso modo del precedente evento Separate.

IMPORTANTE Se si sceglie l'evento Inject dalla tabella delle sequenze (abilitando l'opzione Allow Override nel programma orario del metodo), l'incremento delle fiale viene disattivato. In questo caso, durante l'esecuzione lo strumento usa i valori delle posizioni delle fiale immessi nelle colonne Sample Inject Inlet/Outlet della tabella delle sequenze con ogni riga di esecuzione che abbia fiale di iniezione specifiche.

Riepilogo

Gli esempi mostrano che il metodo guida l'incremento delle fiale che viene pianificato e organizzato nella tabella delle sequenze.

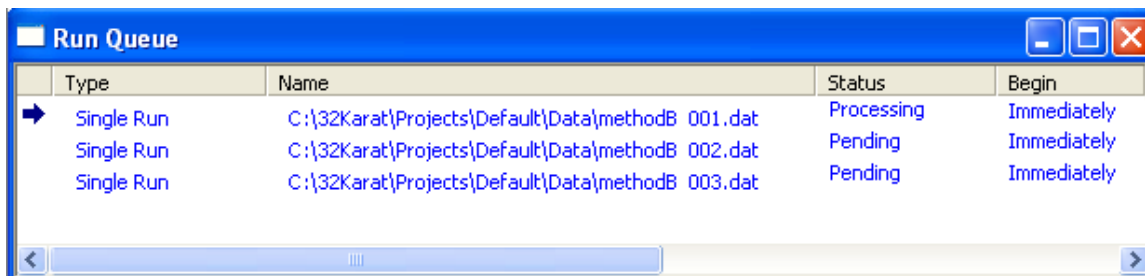
L'incremento delle fiale viene reimpostato ogni volta che si aggiungono nuove esecuzioni (singole o in sequenza) alla coda.

Nel caso di singole esecuzioni di un metodo, le posizioni delle fiale vengono incrementate nelle ripetizioni di ogni singola esecuzione. L'incremento non viene riportato alla singola esecuzione successiva dello stesso metodo inviato alla coda di esecuzione.

Nelle esecuzioni in sequenza, le posizioni delle fiale vengono incrementate in ogni singola esecuzione di sequenze. L'incremento non viene riportato alla successiva esecuzione in sequenza della stessa sequenza inviata alla coda di esecuzione.

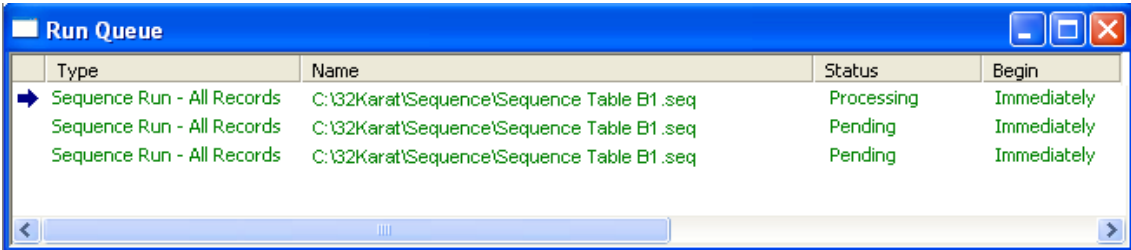
Gli esempi seguenti illustrano questo aspetto.

Figura E.11 Esecuzione singola



Type	Name	Status	Begin
Single Run	C:\32Karat\Projects\Default\Data\methodB_001.dat	Processing	Immediately
Single Run	C:\32Karat\Projects\Default\Data\methodB_002.dat	Pending	Immediately
Single Run	C:\32Karat\Projects\Default\Data\methodB_003.dat	Pending	Immediately

Figura E.12 Esecuzione in sequenza



The screenshot shows a window titled 'Run Queue' with a table containing four columns: Type, Name, Status, and Begin. The first row is highlighted with a blue arrow in the Type column. The first row has a status of 'Processing', while the second and third rows have a status of 'Pending'.

Type	Name	Status	Begin
Sequence Run - All Records	C:\32Karat\Sequence\Sequence Table B1.seq	Processing	Immediately
Sequence Run - All Records	C:\32Karat\Sequence\Sequence Table B1.seq	Pending	Immediately
Sequence Run - All Records	C:\32Karat\Sequence\Sequence Table B1.seq	Pending	Immediately

Nel primo esempio della coda di esecuzione che comprende singole esecuzioni del programma orario del metodo B, la prima, seconda e terza esecuzione individuale sono indipendenti l'una dall'altra. L'incremento delle fiale non viene riportato dalla prima singola esecuzione alla seconda e alla terza. Nel secondo esempio di coda di esecuzione che comprende esecuzioni in sequenza della tabella delle sequenze B1, la prima, seconda e terza esecuzione in sequenza sono indipendenti l'una dall'altra. L'incremento delle fiale non viene riportato dalla prima esecuzione in sequenza alla seconda e terza esecuzione in sequenza.

Report Sequence Vial

Panoramica

Il report Sequence Vial è un report predefinito di riepilogo delle sequenze che indica le fiale usate dal sistema per gli eventi di risciacquo, separazione e iniezione presenti nel programma orario del metodo. Il report Sequence Vial è una descrizione di ciò che avviene precedentemente o successivamente all'esecuzione. Esistono due formati del report: Report Sequence Vial Increment Preview e Sequence Vial - Confirmed. È possibile visualizzare e stampare entrambi i tipi di report.

Report Sequence Vial Increment Preview

Il report Sequence Vial Increment Preview è un'anteprima delle fiale usate dal sistema in base ai metodi e ad altre informazioni presenti nella tabella delle sequenze. Per visualizzare il report di anteprima prima di iniziare una sequenza, fare clic su **Sequence > Sequence Vials Preview**.

Figura F.1 Sequence > Sequence Vials Preview

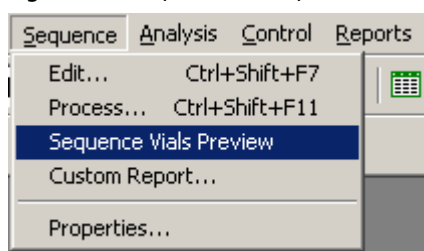


Figura F.2 Report Sequence Vial Increment Preview

Sequence Table: C:\32Karat\projects\SDS MVASequence\SDS20.seq

Sequence Vial Report - Projected

Data Path: C:\32Karat\Projects\SDS MVAData

Method Path: C:\32Karat\Projects\SDS MVA\Method

User: PA800

Report Time: 3/22/2009 3:24:42 PM

**:- indicates that Vial Collision will occur.

Cycle #	Method	Filename	Rep #	Inject In	Inject Out	Inject Time	Other Inject In	Other Inject Out	Rinse Vials In	Rinse Vials Out	Separate Vials In	Separate Vials Out
1	SDS20cmPreConditioning.nq.met		1 of 2						BI:D1, BI:E1, BI:F1, BI:C1	BO:D1, BO:E1, BO:F1, BO:B1	BI:C1	BO:C1
2	SDS20cmPreConditioning.nq.met		2 of 2						BI:D1, BI:E1, BI:F1, BI:C1	BO:D1, BO:E1, BO:F1, BO:B1	BI:C1	BO:C1
3	SDS20cmPreConditioning.nq.met		1 of 2						BI:D2, BI:E2, BI:F2, BI:C2	BO:D2, BO:E2, BO:F2, BO:B2	BI:C2	BO:C2
4	SDS20cmPreConditioning.nq.met		2 of 2						BI:D2, BI:E2, BI:F2, BI:C2	BO:D2, BO:E2, BO:F2, BO:B2	BI:C2	BO:C2
5	SDS20cmPreConditioning.nq.met		1 of 2						BI:D3, BI:E3, BI:F3, BI:C3	BO:D3, BO:E3, BO:F3, BO:B3	BI:C3	BO:C3
6	SDS20cmPreConditioning.nq.met		2 of 2						BI:D3, BI:E3, BI:F3, BI:C3	BO:D3, BO:E3, BO:F3, BO:B3	BI:C3	BO:C3
7	SDS20cmPreConditioning.nq.met		1 of 2						BI:D4, BI:E4, BI:F4, BI:C4	BO:D4, BO:E4, BO:F4, BO:B4	BI:C4	BO:C4
8	SDS20cmPreConditioning.nq.met		2 of 2						BI:D4, BI:E4, BI:F4, BI:C4	BO:D4, BO:E4, BO:F4, BO:B4	BI:C4	BO:C4

Nell'angolo superiore sinistro del report, il report viene etichettato come Sequence Vial Report - Projected per indicare che si tratta dell'anteprima del report Sequence Vial Increment Preview.

Il report Sequence Vial Increment Preview indica i cicli (colonna Cycle #) e le ripetizioni (colonna Rep #) da eseguire per ciascun metodo in base alla tabella delle sequenze.

La colonna Filename è vuota perché il report è solo l'anteprima dell'esecuzione della sequenza.

Le colonne Inject In/Out contengono gli stessi valori delle posizioni di ingresso/uscita delle fiale immessi dall'utente nelle colonne Sample Inject Inlet/Outlet della tabella delle sequenze. Questi valori sono applicabili quando l'utente sceglie di eseguire l'iniezione in base alla tabella delle sequenze.

La colonna Inject Time contiene gli stessi valori di durata dell'iniezione, espressi in secondi, di quelli presenti nella colonna Sample Inject Duration della tabella delle sequenze. Questi valori sono applicabili quando l'utente sceglie di eseguire l'iniezione in base alla tabella delle sequenze.

Le colonne Inject In/Out e Inject Time contengono, per impostazione predefinita, i valori del programma orario dell'iniezione nel metodo se l'utente non ha immesso i valori nelle colonne Sample Inject Inlet/Outlet e Sample Inject Duration della tabella delle sequenze. Si tratta del caso in cui gli utenti scelgono di eseguire l'iniezione in base alla tabella delle sequenze. Tuttavia, la sequenza non viene eseguita poiché non sono stati immessi valori nelle colonne Sample Inject Inlet/Outlet e Sample Inject Duration della tabella delle sequenze.

Le colonne Other Inject In/Out contengono le posizioni di ingresso/di uscita delle fiale per l'evento di iniezione, quando l'utente scelga di eseguire l'iniezione in base al metodo. Questi valori non vengono visualizzati nella tabella delle sequenze. Le colonne Rinse Vials In/Out e Separate Vials In/Out contengono le posizioni di ingresso/uscita delle fiale per gli eventi di risciacquo e di separazione programmati nel metodo. Questi valori non vengono visualizzati nella tabella delle sequenze. Tutti i valori delle posizioni delle fiale presentati nel report, ad eccezione di quelli delle colonne Inject In/Out, corrispondono al programma orario dei singoli metodi, comprese le fiale incrementate da usare nell'esecuzione della sequenza se nel metodo è stato abilitato l'incremento delle fiale.

Eventuali collisioni dei vassoi (o delle fiale) tra il vassoio di ingresso e quello di uscita, causato da combinazioni non valide di fiale in ingresso e in uscita, sono indicate nel report da un asterisco rosso accanto alla specifica posizione della fiala (Figura F.3).

Figura F.3 Combinazioni non valide di fiale indicate da un asterisco rosso

Rinse Vials In	Rinse Vials Out	Separate Vials In	Separate Vials Out
----------------	-----------------	-------------------	--------------------

BI:A1, BI:B1	BO:C6, BO:D6	BI:B5	BO:D6
*BI:A2, *BI:B2	*BO:D1, *BO:E1	*BI:B6	*BO:E1
*BI:A3, *BI:B3	*BO:D2, *BO:E2	BI:C1	BO:E2
*BI:A4, *BI:B4	*BO:D3, *BO:E3	BI:C2	BO:E3
*BI:A5, *BI:B5	*BO:D4, *BO:E4	BI:C3	BO:E4

IMPORTANTE Gli utenti possono non essere consapevoli delle possibili collisioni di fiale dopo l'impostazione della tabella delle sequenze con uno o più metodi. Il sistema rileva le combinazioni non valide che portano a collisioni delle fiale durante l'esecuzione della sequenza. Nell'esecuzione di una sequenza, il sistema rileva combinazioni non valide di fiale e interrompe l'esecuzione delle ripetizioni dei metodi che possano determinare collisioni. Le altre ripetizioni dello stesso metodo che abbiano combinazioni di fiale valide vengono eseguite con successo dal sistema. Prima di eseguire qualsiasi sequenza, si consiglia di visualizzare il report Sequence Vial Increment Preview.

Report Sequence Vial - Confirmed

Il report Sequence Vial - Confirmed viene generato dopo l'esecuzione di una sequenza. Si tratta di un report di conferma delle specifiche fiale usate con successo dal sistema nella sequenza eseguita. Questo report è identico al report Sequence Vial Increment Preview, ad eccezione dei seguenti fattori:

- I nomi dei file per l'esecuzione della sequenza ora sono inclusi nella colonna Filename.
- Vengono visualizzate solo le combinazioni di fiale usate con successo nel corso della sequenza eseguita dal sistema.

Figura F.4 Report Sequence Vial - Confirmed

Sequence Table: C:\32Karat\Projects\DefaultSequence\Sequence TableA.seq
 Data Path: C:\32Karat\Projects\Default\Data
 Method Path: C:\32Karat\Projects\Default\Method
 User: System
 Report Time: 05/08/2003 09:17:57 PM

Sequence Vial Report - Confirmed

** indicates that Vial Collision will occur.

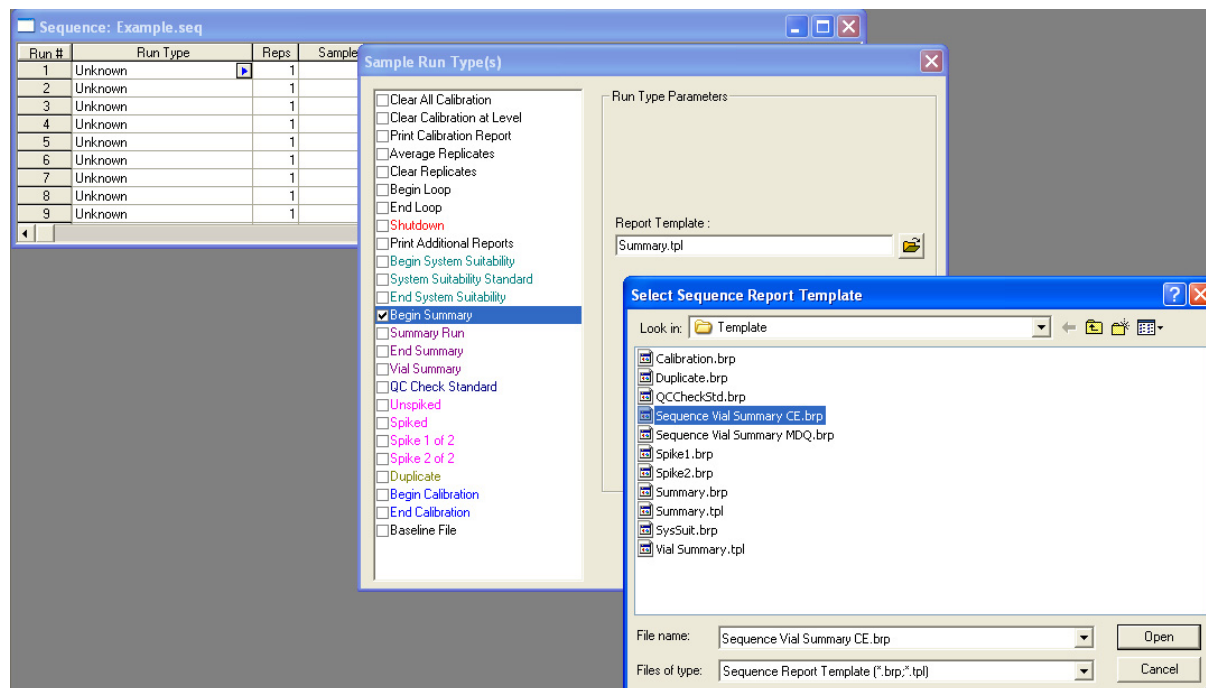
Cycle #	Method	Filename	Rep #	Inject In	Inject Out	Inject Time	Other Inject In	Other Inject Out	Rinse Vials In	Rinse Vials Out	Separate Vials In	Separate Vials Out
---------	--------	----------	-------	-----------	------------	-------------	-----------------	------------------	----------------	-----------------	-------------------	--------------------

Per generare il report Sequence Vial - Confirmed, è necessario modificare da Unknown a Summary il Run Type di tutti i set di righe da eseguire nella tabella delle sequenze. Possono essere utili i passaggi indicati di seguito.

- 1 Fare clic sulla freccia blu nel campo **Run Type** della riga iniziale di esecuzione della tabella delle sequenze, dalla quale ha inizio l'esecuzione della sequenza. Non deve necessariamente corrispondere all'esecuzione numero 1. Viene visualizzata la finestra di dialogo Sample Run Types.
- 2 Fare clic su **Begin Summary** come tipo di esecuzione.

IMPORTANTE Non selezionare il tipo di esecuzione Vial Summary. Questo tipo di esecuzione non viene utilizzato per generare il report Sequence Vial - Confirmed.

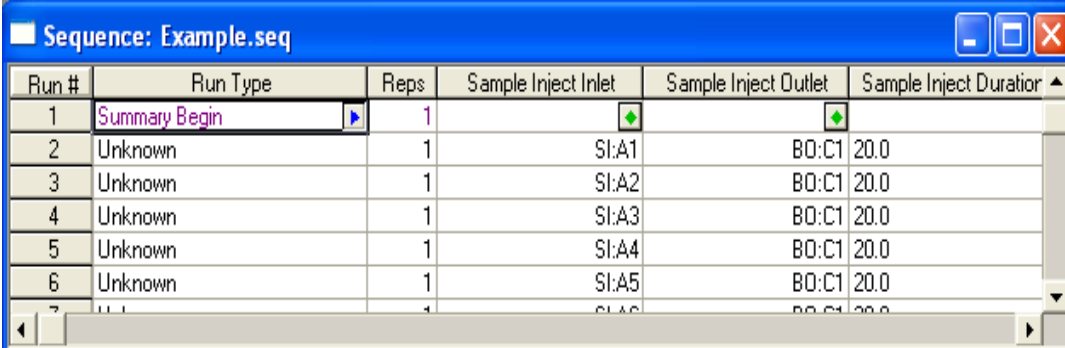
Figura F.5 Impostazione dei parametri del tipo di esecuzione in una tabella delle sequenze



- 3 Fare clic sull'icona della cartella nell'area **Run Type Parameters** per aprire un modello di report.

- 4 Selezionare il modello di report **Sequence Vial Summary CE.brp** e fare clic su **Open**. Dopo l'apertura, il nome del modello di report deve trovarsi nel campo Report Template.
- 5 Fare clic su **OK** per chiudere la finestra di dialogo Sample Run Types e tornare alla tabella delle sequenze.
- 6 Nella tabella delle sequenze viene visualizzato il tipo di esecuzione Summary Begin per la riga iniziale di esecuzione della sequenza che indica il punto di inizio dell'esecuzione della sequenza.

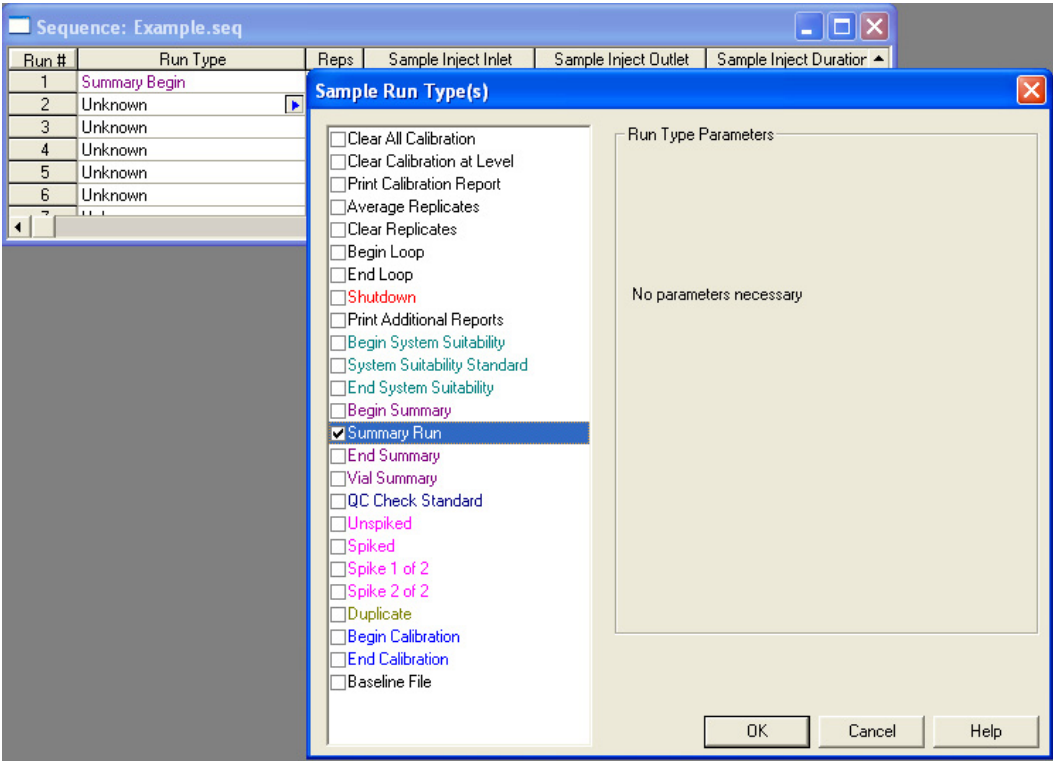
Figura F.6 Sequenza: Example.seq



Run #	Run Type	Reps	Sample Inject Inlet	Sample Inject Outlet	Sample Inject Duration
1	Summary Begin	1			
2	Unknown	1	SI:A1	BO:C1	20.0
3	Unknown	1	SI:A2	BO:C1	20.0
4	Unknown	1	SI:A3	BO:C1	20.0
5	Unknown	1	SI:A4	BO:C1	20.0
6	Unknown	1	SI:A5	BO:C1	20.0

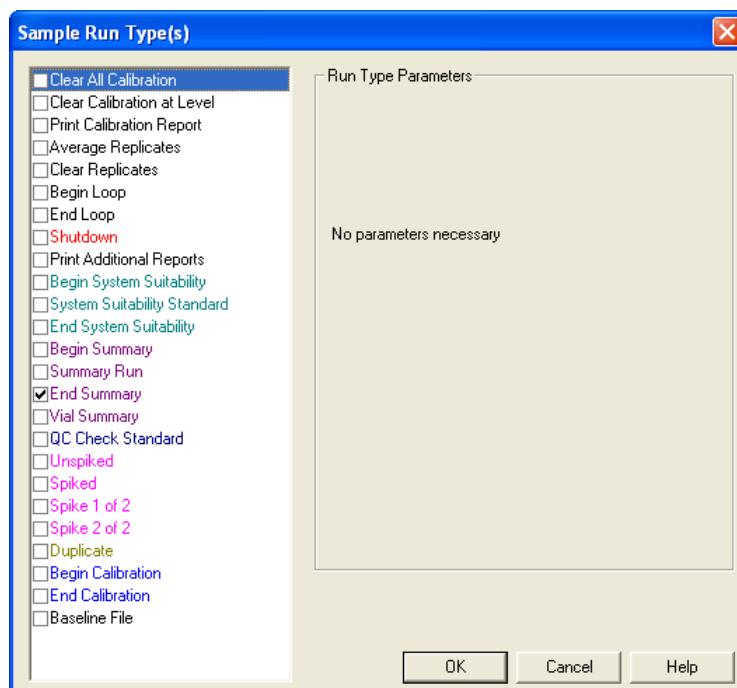
- 7 Per le righe di esecuzione della sequenza successive (porzione mediana dell'esecuzione della sequenza), ripetere il passaggio 1 per queste righe, ma selezionare il tipo di esecuzione Summary Run. Non è necessario aprire un modello di report.

Figura F.7 Sample Run Types



- 8 Fare clic su **OK** per tornare alla tabella delle sequenze.
- 9 Nella tabella delle sequenze viene visualizzato Summary Run come tipo di esecuzione per le righe successive di esecuzione della sequenza (porzione mediana dell'esecuzione della sequenza).
- 10 Per eseguire l'ultima riga di esecuzione della sequenza (fine dell'esecuzione della sequenza), ripetere il passaggio 1, ma selezionare il tipo di esecuzione **End Summary**. Non è necessario aprire un modello di report.

Figura F.8 Tornare alla tabella delle sequenze



11 Fare clic su **OK** per tornare alla tabella delle sequenze.

12 Nella tabella delle sequenze viene visualizzato Summary End come tipo di esecuzione per l'ultima riga di esecuzione della sequenza (fine dell'esecuzione della sequenza).

Figura F.9 Run Type Summary End

Sequence: Example.seq					
Run #	Run Type	Reps	Sample Inject Inlet	Sample Inject Outlet	Sample Inject Duration
1	Summary Begin	1			
2	Summary Run	1	SI:A1	BO:C1	20.0
3	Summary End	1	SI:A2	BO:C1	20.0
4	Unknown	1	SI:A3	BO:C1	20.0

Per gli utenti che desiderino generare il report Sequence Vial Report - Confirmed per una qualsiasi singola riga di esecuzione della tabella delle sequenze costituita da una o più ripetizioni, il processo è simile:

13 Fare clic sulla freccia blu nel campo **Run Type** della riga iniziale di esecuzione della tabella delle sequenze, dalla quale ha inizio l'esecuzione della sequenza. Non deve necessariamente corrispondere all'esecuzione numero 1. Viene visualizzata la finestra di dialogo Sample Run Types.

14 Fare clic su **Begin Summary** come tipo di esecuzione.

IMPORTANTE Non selezionare il tipo di esecuzione Vial Summary. Questo tipo di esecuzione non viene utilizzato per generare il report Sequence Vial - Confirmed.

15 Fare clic sull'icona della cartella nell'area **Run Type Parameters** per aprire un modello di report.

16 Scegliere il modello di report **Sequence Vial Summary CE.brp** e fare clic su **Open**. Dopo l'apertura, il nome del modello di report deve trovarsi nel campo Report Template. Non chiudere ancora la finestra di dialogo Sample Run Type(s).

17 Nella finestra di dialogo Sample Run Type(s) scegliere il tipo di esecuzione **End Summary**. Per End Summary non è necessario aprire alcun modello di report.

A questo punto dovrebbero essere selezionati due tipi di esecuzione: Begin Summary ed End Summary.

18 Evidenziare **Begin Summary** per assicurarsi che venga aperto il modello di report corretto.

19 Fare clic su **OK** per chiudere la finestra di dialogo Sample Run Type(s) e tornare alla tabella delle sequenze.

La tabella delle sequenze dovrebbe indicare SMB SME (notazioni relative a Summary Begin e Summary End) come tipo di esecuzione per la singola riga di esecuzione della tabella delle sequenze costituita da una o più ripetizioni. L'utente può ripetere i passaggi da 1 a 3 per le altre righe di esecuzione della tabella delle sequenze, se per ciascuna delle altre righe desidera un report Sequence Vial Report - Confirmed. Le righe di esecuzione della tabella delle sequenze con tipo di esecuzione Unknown o altro tipo di esecuzione non generano il report Sequence Vial Report - Confirmed.

Figura F.10 Notazioni Summary Begin, Summary End

Run #	Status	Run Type	Level	Conc Override	Custom Parameters	Rep
1		Unknown	0	n/a	Unconfigured	
2		SMB SME	0	n/a	Unconfigured	
3		SMB SME	0	n/a	Unconfigured	
4		SMB SME	0	n/a	Unconfigured	

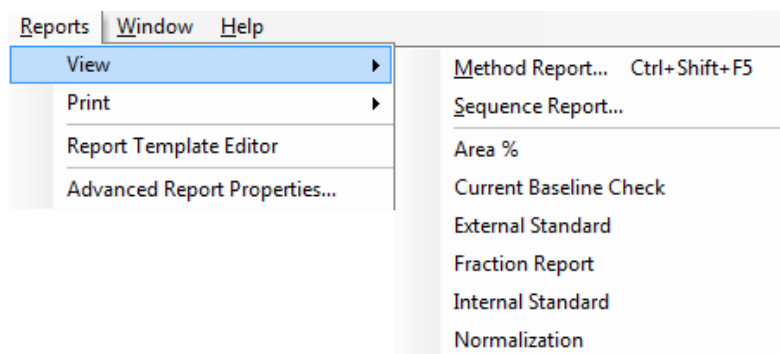
Dopo aver modificato da Unknown a Summary il tipo di esecuzione di qualsiasi set di righe di esecuzione della tabella delle sequenze, è possibile iniziare l'esecuzione della sequenza e far sì che il software raccolga i dati per il report Sequence Vial Report - Confirmed. Il messaggio Complete nella colonna Status della tabella delle sequenze conferma la conclusione dell'esecuzione della sequenza.

Figura F.11 Messaggio Complete nella colonna Status

Run #	Status	Run Type	Level	Conc Override	Custom Parameters	Rep
1		Unknown	0	n/a	Unconfigured	
2	Complete	SMB SME	0	n/a	Unconfigured	
3	Complete	SMB SME	0	n/a	Unconfigured	
4	Complete	SMB SME	0	n/a	Unconfigured	

Dopo aver completato o terminato l'esecuzione della sequenza, è possibile attivare il report Sequence Vial Report - Confirmed selezionando Sequence Custom Report in View del menu Report:

Figura F.12 Reports > View > Sequence Report

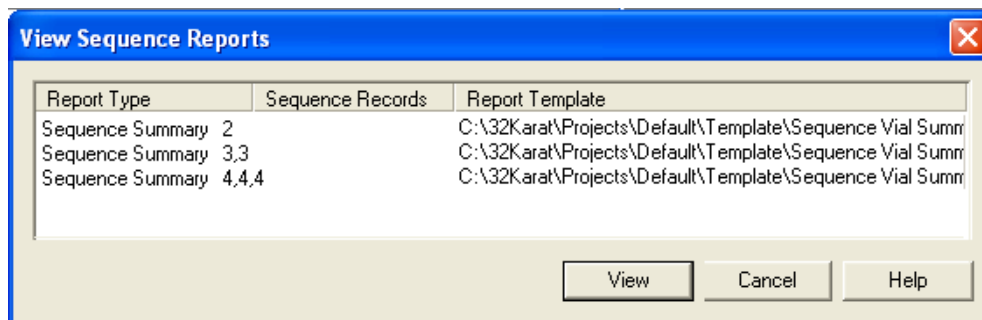


Viene visualizzata la finestra di dialogo View Sequence Reports. Nella colonna Report Type sono presenti i report Sequence Vial Reports - Confirmed per ciascuna riga della tabella delle sequenze. Nella finestra di dialogo vengono etichettati come report Sequence Summary. Il modello di report utilizzato è indicato nell'ultima colonna.

I numeri nella colonna Sequence Records sono i numeri di riga di esecuzione della tabella delle sequenze da cui ha avuto origine il report Sequence Vial Reports - Confirmed. Il numero di ripetizioni o iterazioni (ad esempio 3,3 o 4,4) delle righe di esecuzione della tabella delle sequenze in Sequence Records indica il numero di ripetizioni eseguite con successo per quelle righe di esecuzione.

Ad esempio, nella riga 4 dell'esecuzione della tabella delle sequenze A precedente è stato creato un report Sequence Vial Report - Confirmed per ciascuna delle tre ripetizioni.

Figura F.13 Finestra di dialogo View Sequence Reports

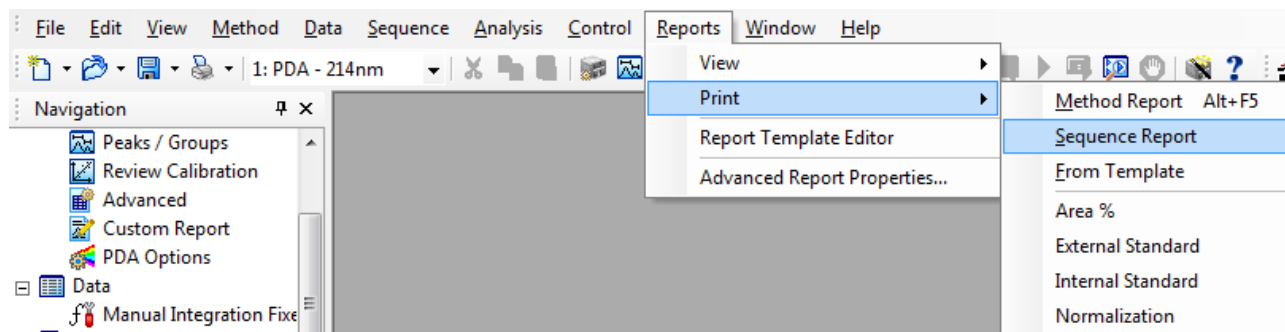


È possibile evidenziare qualsiasi report dell'elenco e fare clic su **View** per aprirlo.

Per stampare un report Sequence Vial Report - Confirmed, fare clic con il pulsante destro del mouse sul report e, quindi, su **Print**.

In alternativa, è possibile fare clic su **Sequence Custom Report** in **Print** nel menu **Reports**:

Figura F.14 Reports > Print > Sequence Report



Viene visualizzata la finestra di dialogo Print Sequence Report, identica alla finestra di dialogo View Sequence Report. Selezionare il report Sequence Vial Report - Confirmed desiderato e fare clic su **Print**.

Cronologia delle revisioni

Pubblicazione iniziale, A51965AA, aprile 2009

Software 32 Karat versione 9.1

Software PA 800 *plus* versione 1.1

Firmware PA 800 *plus* versione 9.0

Prima revisione, A51965AB, febbraio 2010

Indirizzo aziendale rivisto

Seconda revisione, A51965AC, febbraio 2011

Patch del software 32 Karat versione 9.1

Patch del software PA 800 *plus* versione 1.1

Firmware PA 800 *plus* versione 9.2

Numerose modifiche sintattiche e grammaticali

Terza revisione, A51965AD, ottobre 2011

Modifica del codice della miscela di test per rilevatore LIF

Software PA 800 *plus* versione 10.1 (comprende il software 32 Karat)

Firmware PA 800 *plus* versione 10.1 (incompatibile con 9.x)

Quarta revisione, A51965AE, gennaio 2014

Aggiornamento della formattazione.

Quinta revisione, A51965AF, gennaio 2018

Software PA 800 Plus versione 10.2

Software 32 Karat versione 10.2

Ridefinito il marchio. Applicato un nuovo modello. Aggiornati i contenuti legali. Eliminazione del contenuto di sicurezza e aggiunta di un riferimento al contenuto di sicurezza contenuto nella *Guida descrittiva del sistema*.

Sesta revisione, A51965AG, febbraio 2019

Software PA 800 Plus versione 10.3

Software 32 Karat versione 10.3

Correzioni nell'Appendice B, "Calcoli del sistema PA 800 Plus": aggiunte unità al tempo di migrazione, aggiunto simbolo mancante nell'equazione della tensione media applicata. Equazioni riformattate per maggiore leggibilità. Aggiunto il capitolo dei contatti. Aggiornamento di alcuni testi e della formattazione.

Questa guida si applica al software e al firmware più recenti elencati sopra e a qualsiasi versione successiva più recente. Quando una versione successiva del software o del firmware interessi le informazioni contenute in questa guida, sul sito Web SCIEX sarà disponibile una nuova edizione. Per aggiornamenti, visitare l'indirizzo www.sciex.com e scaricare la versione più aggiornata della guida.



Formazione clienti

- In Nord America: NA.CustomerTraining@sciex.com
- In Europa: Europe.CustomerTraining@sciex.com
- Al di fuori dell'Unione Europea e del Nord America, per informazioni sui contatti visitare l'indirizzo sciex.com/education.

Centro di formazione online

- [SCIEXUniversity](#)

Assistenza SCIEX

SCIEX e i suoi rappresentanti si affidano a uno staff di tecnici di manutenzione e assistenza formati e qualificati, presenti in tutto il mondo. Saranno felici di rispondere a domande sul sistema o su eventuali problemi tecnici che potrebbero sorgere. Per maggiori informazioni, visitare il sito web SCIEX all'indirizzo sciex.com oppure contattare SCIEX con uno dei collegamenti seguenti.

- sciex.com/contact-us
- sciex.com/request-support

Sicurezza informatica

Per le indicazioni più recenti sulla sicurezza informatica per i prodotti SCIEX, visitare il sito sciex.com/productsecurity.

Documentazione

Questa versione del documento sostituisce tutte le precedenti.

Per visualizzare questo documento in formato elettronico è necessario Adobe Acrobat Reader. Per scaricare la versione più recente, andare all'indirizzo <https://get.adobe.com/reader>.

Per reperire la documentazione del software del prodotto, fare riferimento alle note di rilascio o alla guida all'installazione del software fornita con il software. La documentazione per i prodotti hardware può essere reperita sul DVD Customer Reference fornito con il sistema o il componente.

Per le versioni più recenti della documentazione, visitare il sito Web SCIEX all'indirizzo sciex.com.

NOTA Per richiedere una versione stampata gratuita di questo documento, rivolgersi a sciex.com/contact-us.