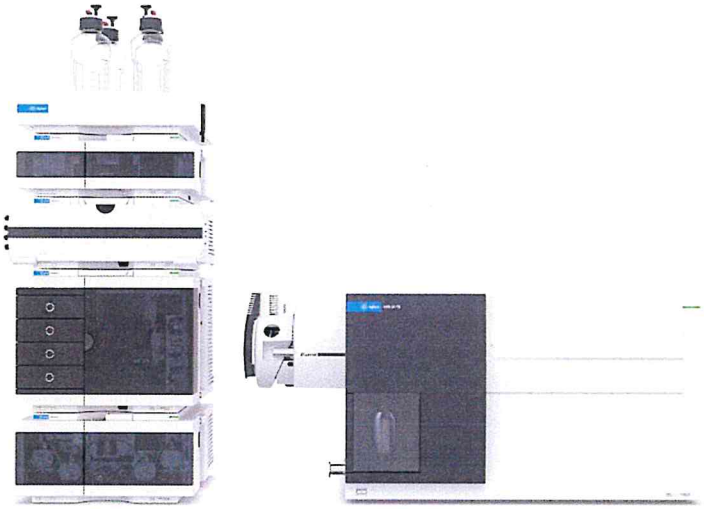
Agilent

Agilent 6400 Series Triple Quadrupole LC/MS

คู่มือการใช้งาน MassHunter Software



Agilent

ขั้นตอนการเปิดเครื่อง

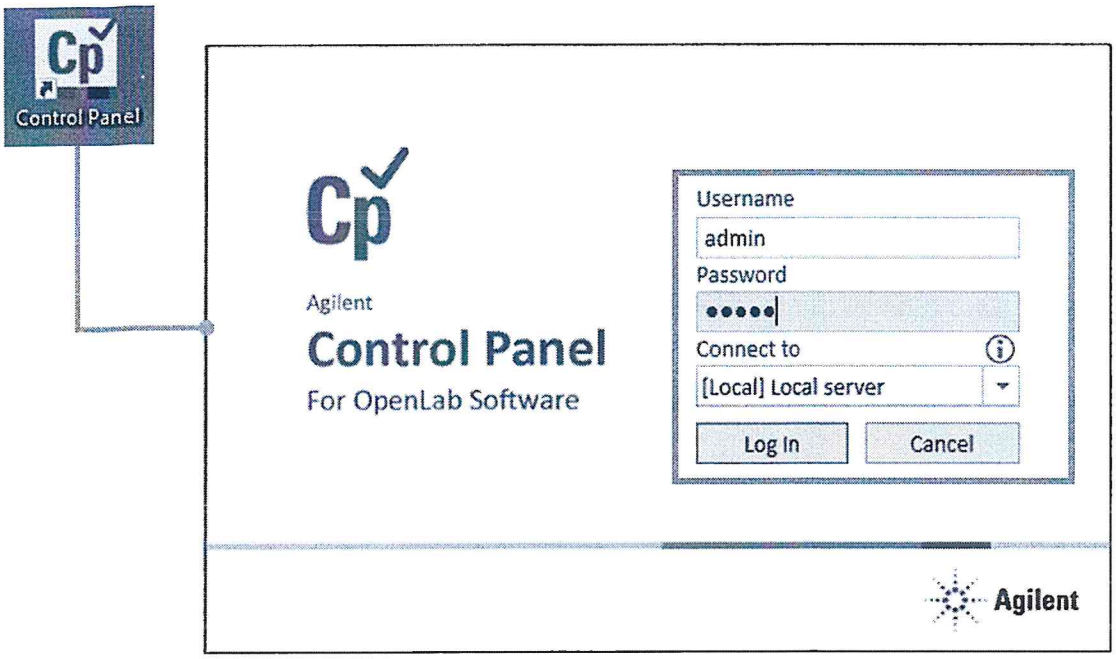
1. เปิดคอมพิวเตอร์ USER NAME: _____

   PASSWORD: 3000hanover

2. เปิดก๊าซไนโตรเจน
   - Nitrogen for Source: Nitrogen generator or Liquid Nitrogen (Flow 30-50 L/min, Pressure 80 – 100 psi)
   - Nitrogen for CID: Nitrogen Tank 99.999% (Pressure 30 psi)
3. เปิดสวิทช์เครื่องมือ LC/MS TQ
4. รอเวลาประมาณ 4 ชม.
5. เปิดสวิทช์เครื่องมือ LC
6. รอเวลาประมาณ 2 นาที

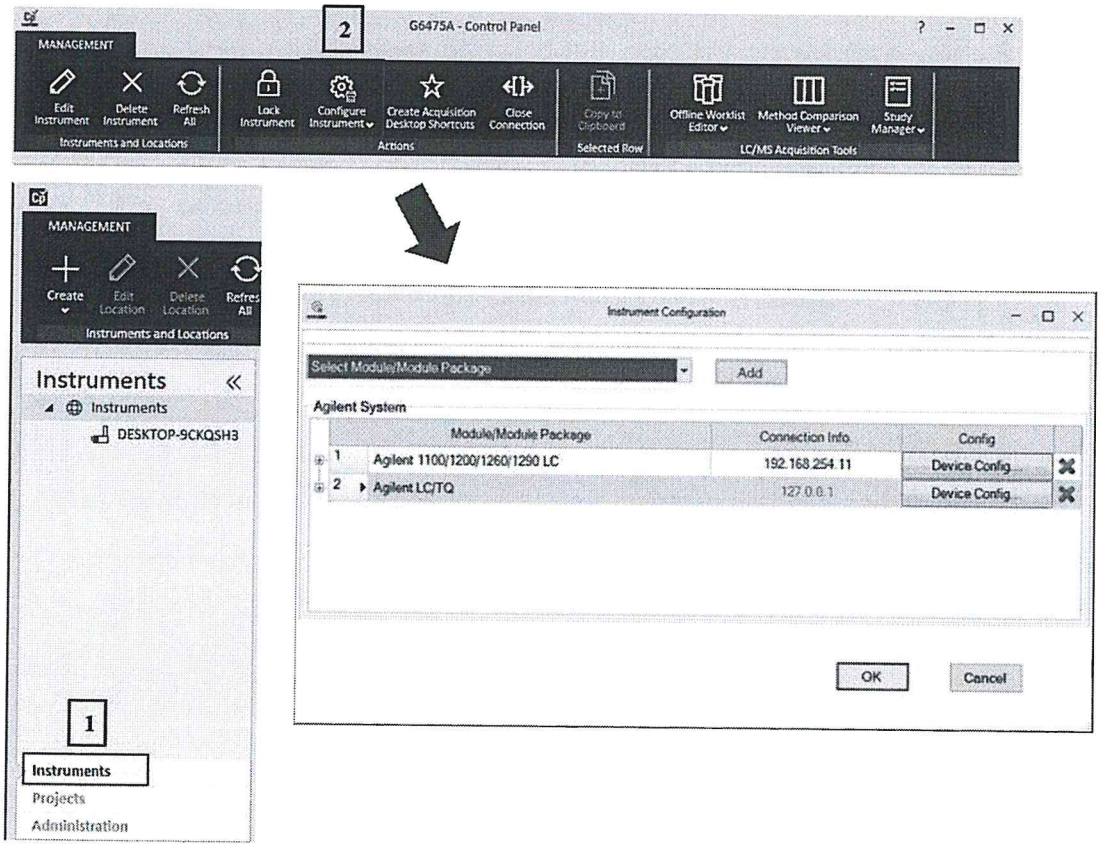
การเข้าถึงโปรแกรม MassHunter

1. Double click ที่ Control Panel icon
2. Login ด้วย user Admin

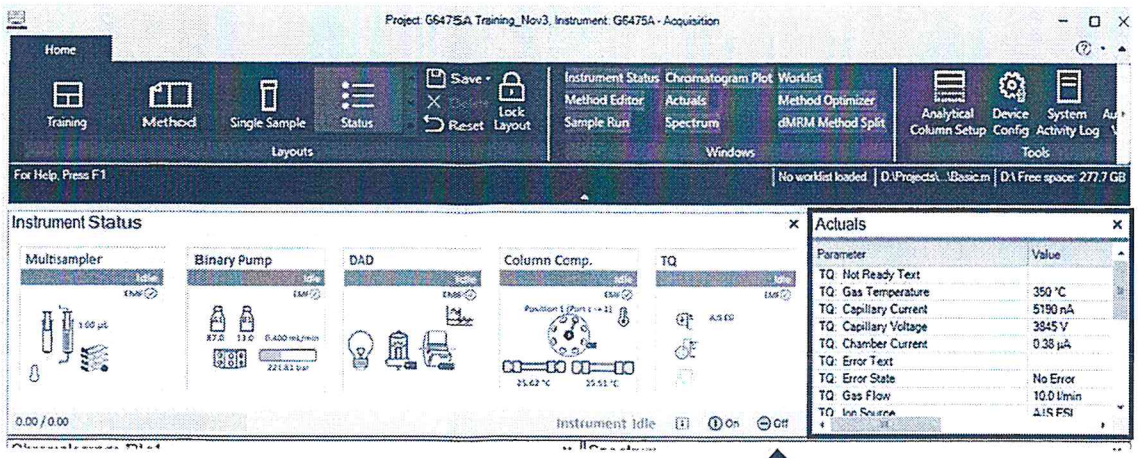


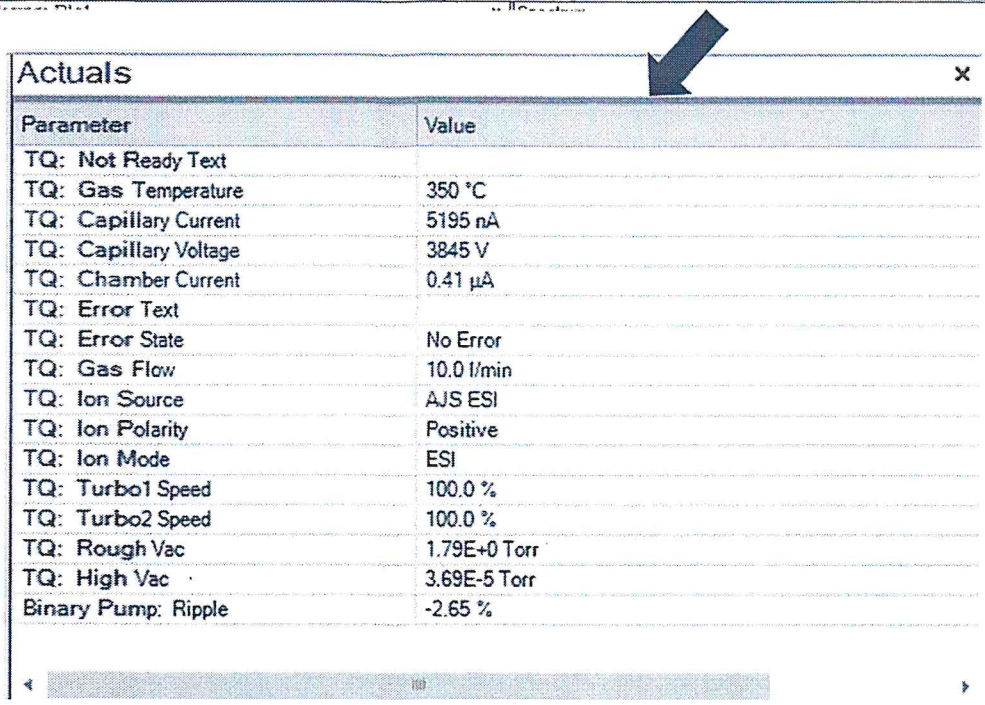
การ Configure เครื่องมือ

1. Click Instrument tab
2. เลือก Configure Instrument และทำการตรวจสอบการ Config ตรงตามเครื่อง HPLC ที่ใช้งาน



Instrument Actuals สำหรับ Mass Spectrometer



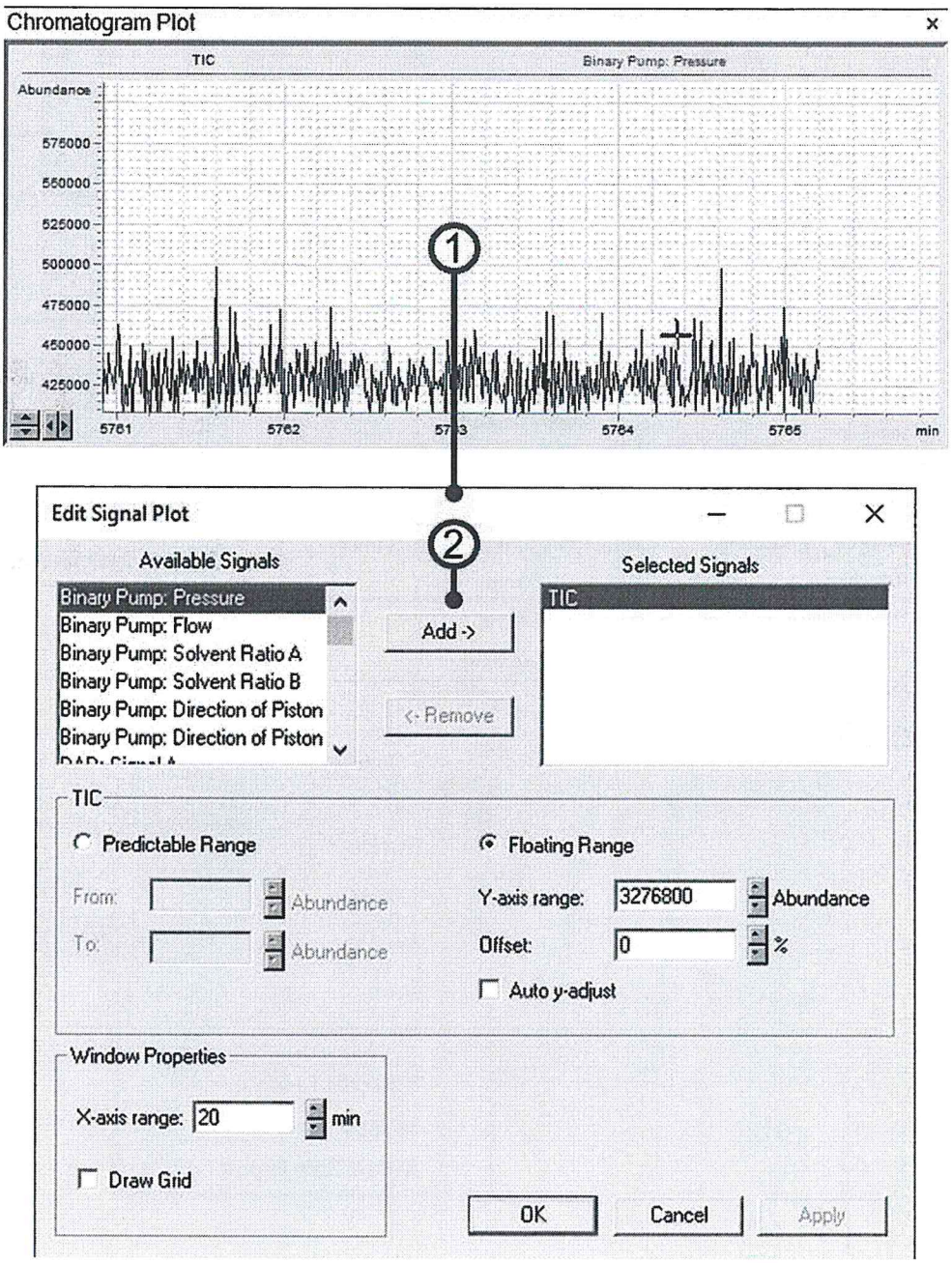


Actuals

Parameter	Value
TQ: Not Ready Text	
TQ: Gas Temperature	350 °C
TQ: Capillary Current	5195 nA
TQ: Capillary Voltage	3845 V
TQ: Chamber Current	0.41 µA
TQ: Error Text	
TQ: Error State	No Error
TQ: Gas Flow	10.0 l/min
TQ: Ion Source	AJS ESI
TQ: Ion Polarity	Positive
TQ: Ion Mode	ESI
TQ: Turbo1 Speed	100.0 %
TQ: Turbo2 Speed	100.0 %
TQ: Rough Vac	1.79E+0 Torr
TQ: High Vac	3.69E-5 Torr
Binary Pump: Ripple	-2.65 %

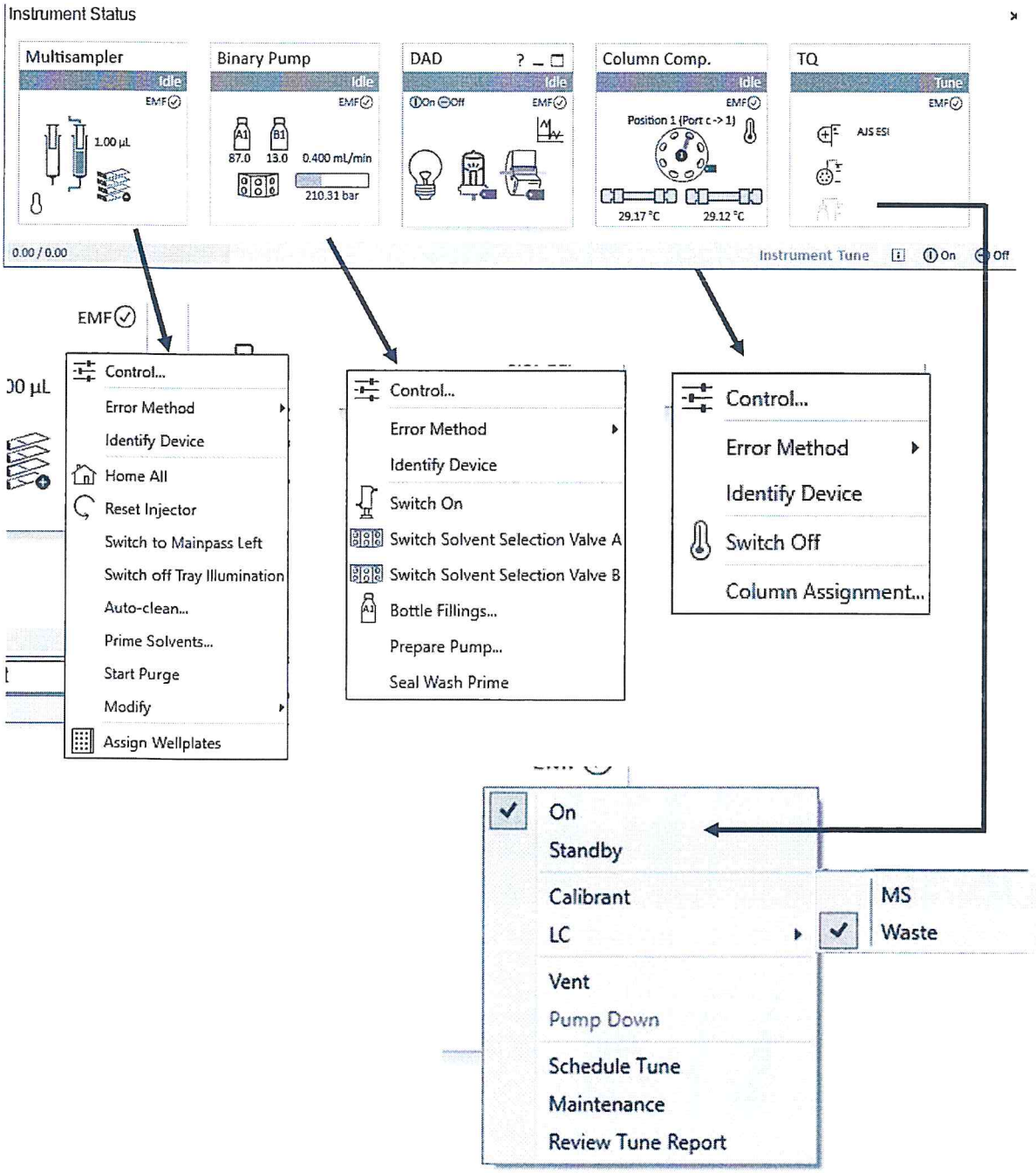
Real-Time Plot

- สามารถเพิ่ม-ลด สัญญาณที่ต้องการแสดงที่หน้า Real-Time Plot ได้ รวมถึงการปรับสเกลของแกนต่างๆ โดยคลิกขวา และเลือก Change จากนั้นทำการแก้ไขที่ Edit Signal Plot



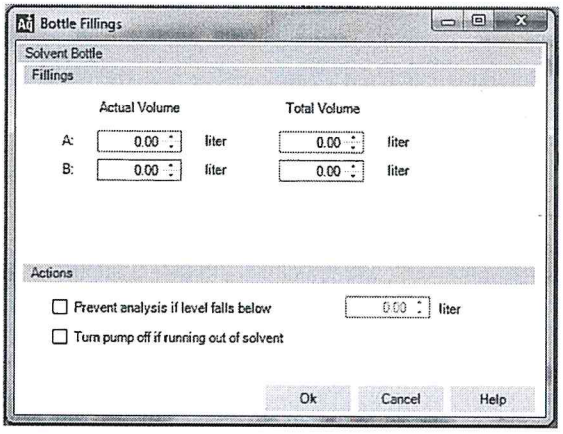
Instrument Control

- คลิกขวาใน module ที่ต้องการ จะแสดง Quick access เพื่อเลือกใช้งานได้

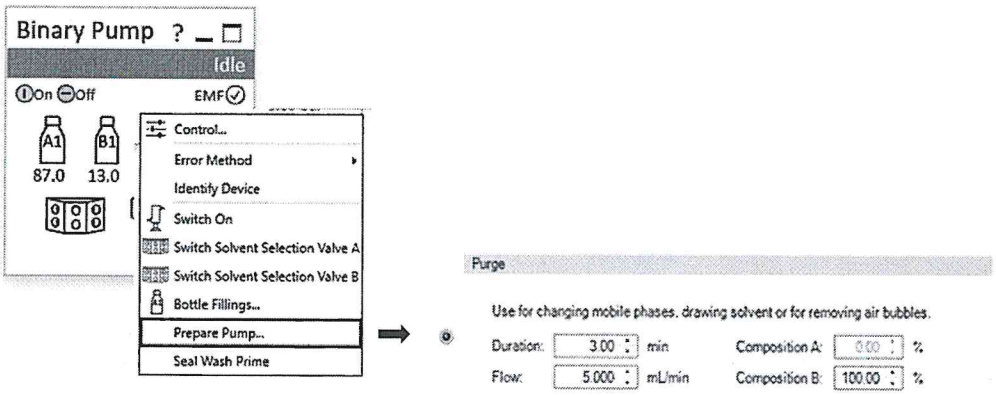


Purge Mobile phase (สำหรับ Auto-purge Valve)

1. เตรียม mobile phase บรรจุลงขวดให้เรียบร้อย
2. ทำการ Purge mobile phase
3. Click ขวา ที่ Pump module และเลือก Bottle Fillings จะได้หน้าต่าง Bottle Fillings ดังรูป



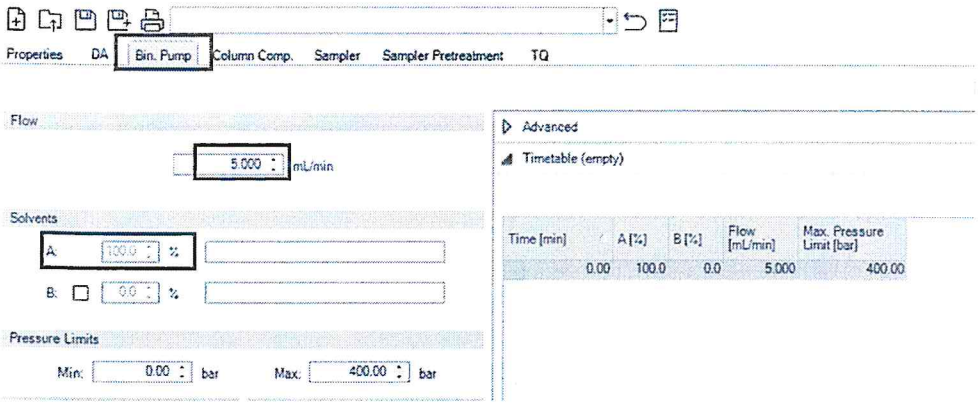
4. ในช่อง Actual Volume ให้เติมปริมาตรของตัวทำละลายที่บรรจุอยู่จริงในขวดนั้น ๆ
5. ในช่อง Total Volume ให้ใส่ตัวเลขความจุของขวดบรรจุตัวทำละลาย
6. ทำเครื่องหมาย / หัวข้อ Prevent analysis If level falls below และกำหนดปริมาตรต่ำสุด ที่ให้ Pump ทำงาน
7. ทำเครื่องหมาย / หัวข้อ Turn pump off if running out of solvent จากนั้น click OK
8. คลิกขวาที่ หน้าต่าง Pump แล้วเลือกหัวข้อ Prepare pump และตั้งค่าดังรูปสำหรับ Purge สาย



9. ทำการ Purge Line A ก่อน โดยพิมพ์ช่อง Line B เป็น 0% จากนั้น Line A จะขึ้น 100%
10. กรอก Duration เป็น 5 นาที และปรับ Flow rate เป็น 5 ml/min แล้วเลือก Ok
11. ทำการ Purge จนแน่ใจว่าไม่มีฟองอากาศ ใน Line A
12. คลิกขวาที่ Pump แล้วเลือกหัวข้อ Switch Solvent Selection Valve เพื่อสลับระหว่าง A1-A2 หรือ B1-B2
13. หลังจากนั้น เปลี่ยนเป็น Composition B = 100 % สำหรับ Purge สาย B
14. ทำซ้ำตามข้อ 10-11 จนครบทุก Line

Purge Mobile phase (สำหรับ Manual-purge Valve)

1. คลายปุ่ม Purge valve ที่ Pump โดยหมุนทวนเข็มนาฬิกา
2. เลือก Pump ที่ Method Editor Tab

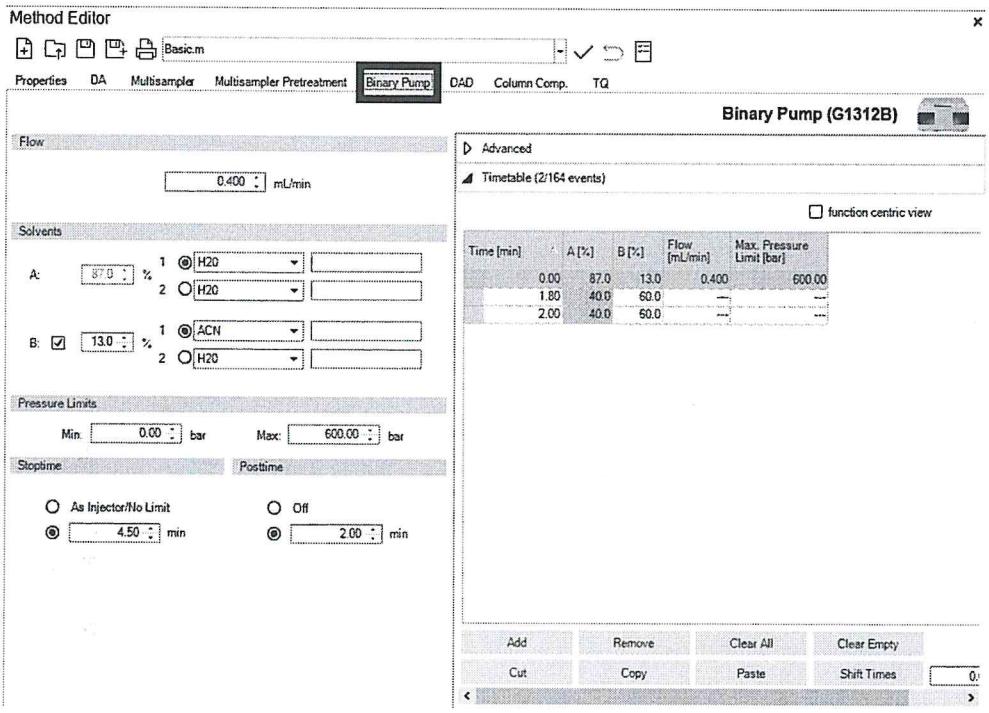


3. เลือก A : 100% , Flow 5 ml/min
4. ใช้ mouse กดปุ่มขวาที่ pump บริเวณ instrument status pane
5. เลือก Switch Pump On
6. ดูจนแน่ใจว่า mobile phase สาย A ไม่มีฟองอากาศ
7. ทำซ้ำ mobile phase สาย B
8. Off Pump

การสร้าง Acquisition Method

1. การตั้งค่า Pump

เลือก Pump ที่ Method Editor pane



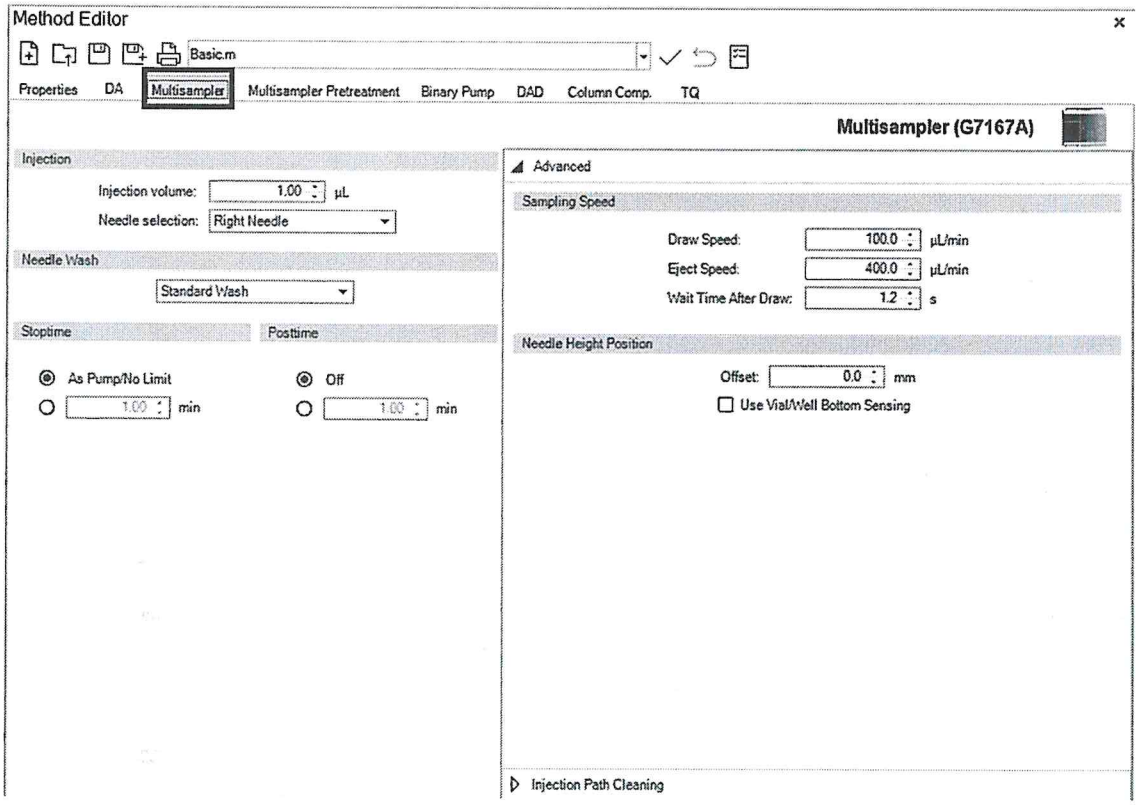
- เลือก Set up Pump แล้วทำการตั้งค่าตัวแปรที่ต้องการให้เหมาะสมกับงานที่วิเคราะห์
- Flow : อัตราการไหลของ Solvent โดยช่วงของ flow rate คือ 0.0 - 5.00 ml/min โดยมีอัตราการเพิ่มทีละ 0.001 และขีดจำกัดความดันสูงสุด (upper pressure limit) ที่ 1300 bar
- Solvents : ใช้กำหนดส่วนประกอบของ Solvent หรือ Mobile Phase สำหรับการวิเคราะห์ ซึ่งอาจจะเป็นแบบ Isocratic Analysis (ส่วนประกอบของ Mobile Phase คงที่) หรือ Gradient Elution Analysis (ส่วนประกอบของ mobile phase มีการเปลี่ยนแปลง) โดยให้ กำหนด % ของsolvent ใน channel B ซึ่งสามารถกำหนดค่าได้ตั้งแต่ 0-100% ส่วน channel A จะเป็น % ที่เหลืออยู่ : 100 - (%B) นอกจากนี้ ยังสามารถสั่ง ON และ OFF channel จาก channel scrollbar และ ใส่ชื่อของ solvent ใน

channel นั้นๆใน text box (ถ้าทำการวิเคราะห์แบบ Reversed Phase ควรใส่ Waterใน channel A ขวดสีชา)

- Stop Time : เป็นการกำหนดเวลาที่ต้องการให้หยุดทำการวิเคราะห์ ซึ่งหลังจากนี้ ระบบจะกลับเข้าสู่สภาวะเริ่มต้น ค่าของ stop time มีตั้งแต่ 0.0 - 99999 นาที หรือ no limit
- Post Time : เป็นการตั้งช่วงเวลารอให้คอลัมน์เข้าสู่สภาวะสมดุลอีกครั้ง ก่อนจะทำการวิเคราะห์ตัวอย่างตัวถัดไป โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อทำการวิเคราะห์แบบ Gradient Elution Analysis
- Pressure Limits: Min (ความดันต่ำสุด) ตั้งไว้ที่ 0 bar

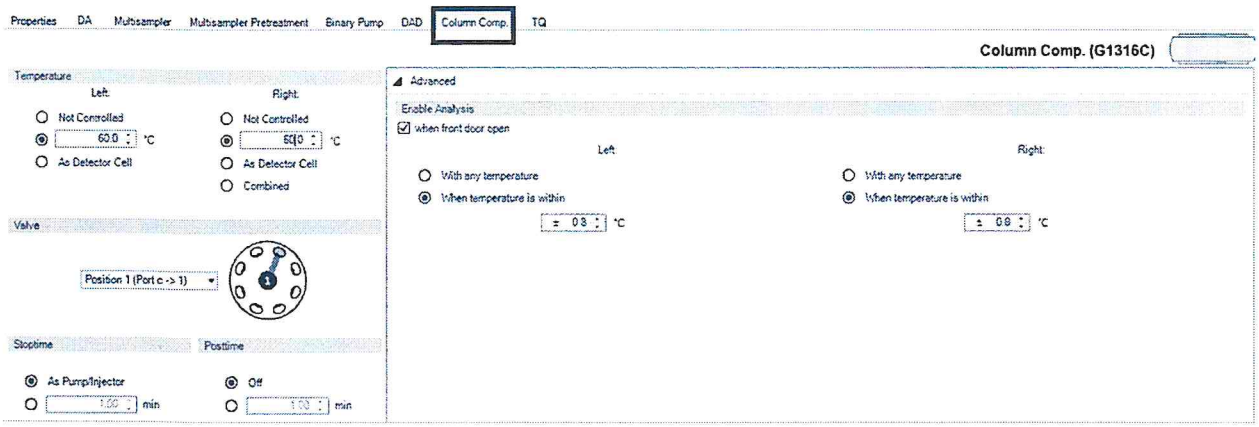
  Max (ความดันสูงสุด) ตั้งค่าไว้ที่แรงดันสูงสุดตามใบรับประกันของคอลัมน์ระบุไว้
- Timetable : ใช้เมื่อต้องการปรับเปลี่ยนค่า Flow rate, Pressure limit และ/หรือ ปรับอัตราส่วนผสมของ Mobile Phase สำหรับการ run แบบ Gradient
- Click ที่ Add เพื่อเพิ่มแถวใน Timetable ที่ Timetable แต่ละแถวนั้น ในช่อง
  - Time : ให้ระบุเวลา (นาที)
  - Function : ให้เลือก Change Solvent Composition, Change Flow, Change Max Pressure Limit
  - Parameter : จะแปรเปลี่ยนตาม Function ที่เลือกไว้ ให้ระบุค่าที่ต้องการได้เลย

2. การตั้งค่า Sampler



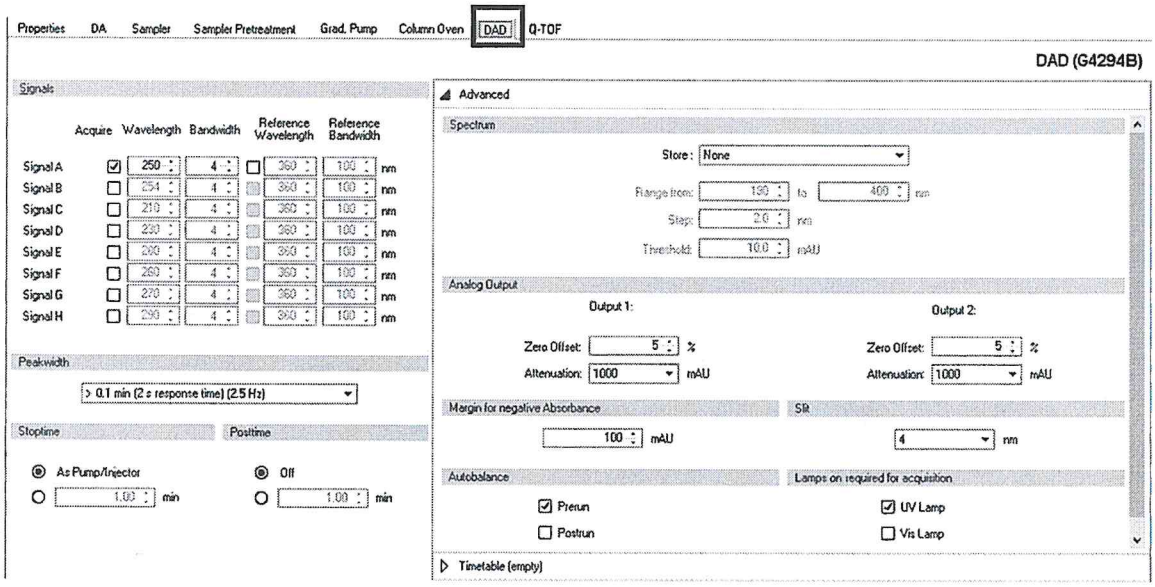
- ระบุปริมาตรสารตัวอย่างที่ต้องการในช่อง Inject volume (µL)
- ทำการเลือกวิธีการฉีดสารตัวอย่างตามความเหมาะสมกับงาน วิธีการฉีดสารตัวอย่างมีให้เลือกดังนี้
  - Standard Injection ใช้สำหรับการ Inject แบบทั่วไป
  - Enable with Needle Wash เป็นการสั่งให้ล้างปลาย Needle หลังจากดูดตัวอย่างเข้าไปไว้ใน Sample loop (ก่อนฉีดตัวอย่างเข้าระบบ) โดยจะต้องกำหนดสามารถเลือกได้ 2 แบบ คือ
    - Wash Vial โดย ระบุตำแหน่งของ Vial ที่มีSolvent สำหรับล้างบรรจุอยู่ ในช่อง Location (Wash Vial ที่ใช้ควรเป็นแบบไม่มี septum)
    - Flush port โดยจะทำการดึง Needle wash solution จากขวดมาล้างเข็ม ที่บริเวณฐานล้างซึ่งสามารถกำหนดเวลาเพื่อชะล้างลง waste

3. การตั้งค่า Column compartment



- Not Control หากไม่ต้องการควบคุมอุณหภูมิคลอลัมน์ให้คงที่
- หากต้องการควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ให้ระบุอุณหภูมิที่ต้องการได้เลยทั้ง Left/Right
- Timetable เพื่อตั้งโปรแกรมการปรับอุณหภูมิ/ช่วงเวลา โดยการ Click ที่ Add เพื่อสร้างโปรแกรม
- ข้อแนะนำ ขณะทำการวิเคราะห์ ควรปิดฝาส่วนเครื่องมือไว้เสมอ เพื่อให้อุณหภูมิของคลอลัมน์คงที่

4. การตั้งค่า DAD



ทำการตั้งค่าตัวแปรที่ต้องการให้เหมาะสมกับงานที่วิเคราะห์

- Use Signal A, B, C,… ทำการเลือกสัญญาณที่ต้องการ
- Wave length…ระบุความยาวคลื่นที่ต้องการ (190 – 950 nm)
- Band width…ระบุความกว้างของสัญญาณที่ต้องการ หากไม่ทราบให้ใส่ค่า 8
- Reference Wavelength และ Reference Bandwidth…สัญญาณอ้างอิงเพื่อชดเชยค่า Baseline ที่อาจเปลี่ยนแปลง (ไม่ควรเลือกใช้ หากไม่ทราบค่า)

Advanced Function

- Spectrum เมื่อต้องการบันทึกข้อมูลสเปกตรัม ควรเลือก Store…All, หากไม่ต้องการให้เลือก None
- Range From…to… กำหนดช่วงความยาวคลื่นที่ต้องการเก็บบันทึกเป็นสเปกตรัม
- Step… กำหนดระยะห่างความยาวคลื่นที่ต้องการเก็บบันทึกเป็นสเปกตรัม

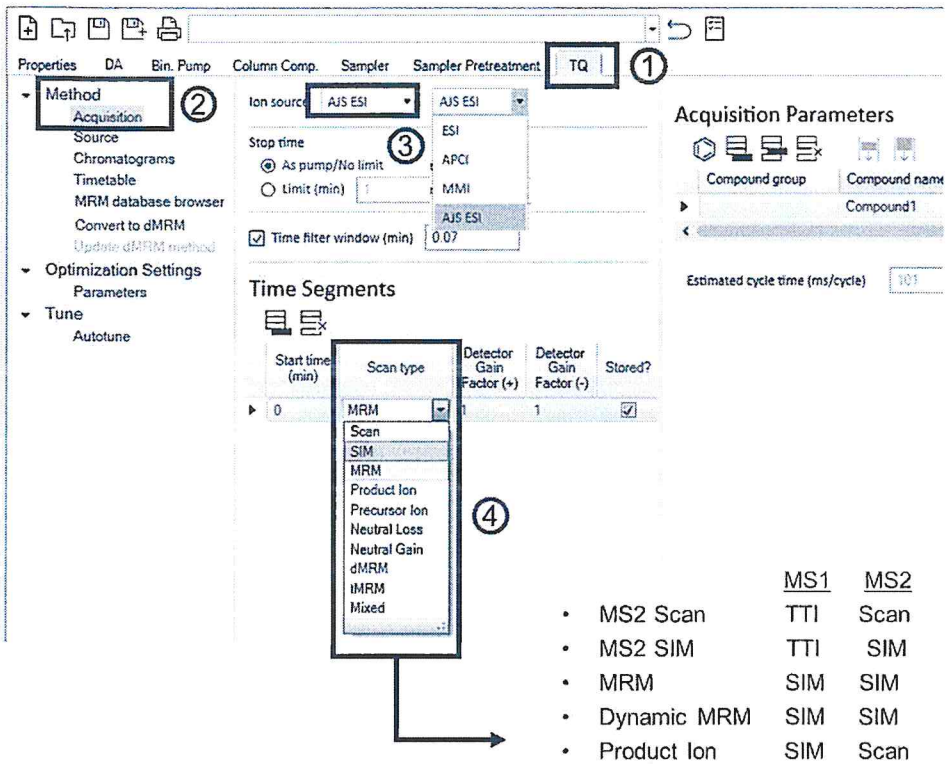
ส่วนค่าอื่นๆ ให้คงเดิมไว้ (ตามที่เห็นในรูปด้านบน) ไม่ต้องเปลี่ยนแปลง

- หากต้องการบันทึกสัญญาณที่ความยาวคลื่นมากกว่า 400 nm ต้องใช้ Vis Lamp ร่วมด้วย

ข้อแนะนำ ควรเปิด lamp เป็นเวลา 20 นาที (Warm up) ก่อนใช้งานจริง

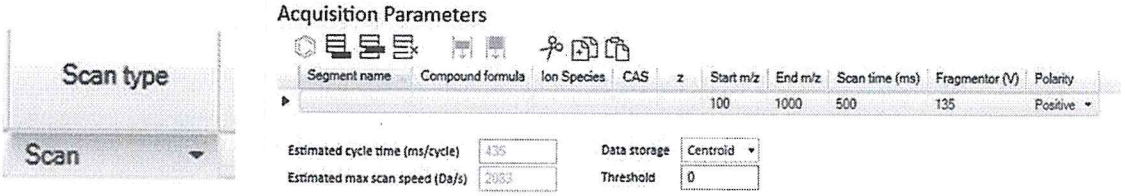
5. การตั้งค่า MS TQ

1. เลือก Tab TQ ที่ Method Editor pane
2. Click ที่ Acquisition
3. เลือก Source ที่ Ion source ให้ถูกต้อง เช่น ESI , APCI,MMI, …
4. ใส่ Stop Time ที่ต้องการ หรือเลือก No Limit/As Pump
5. เลือก Scan Type ที่ต้องการ เช่น Scan , MRM, Product ion ,…

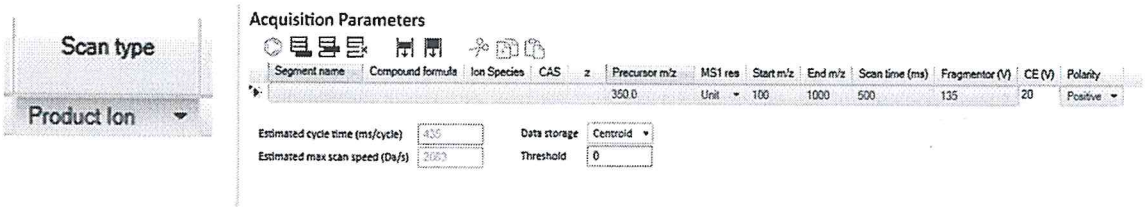


	MS1	MS2
• MS2 Scan	TTI	Scan
• MS2 SIM	TTI	SIM
• MRM	SIM	SIM
• Dynamic MRM	SIM	SIM
• Product Ion	SIM	Scan
• Precursor Ion	Scan	SIM
• Neutral Loss	*m/z*	*m/z* - n
• Neutral Gain	*m/z*	*m/z* + n

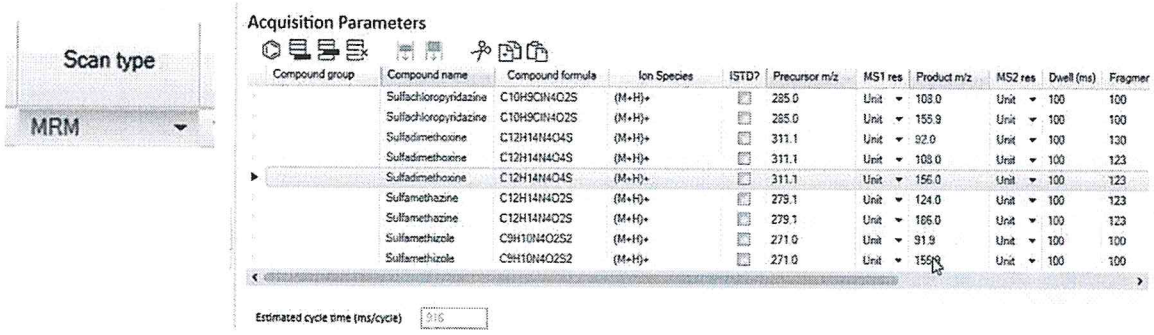
Agilent



กรณี **Scan (MS mode)** ใส่ Start / End Mass และ Polarity ที่ต้องการใน Acquisition Tab

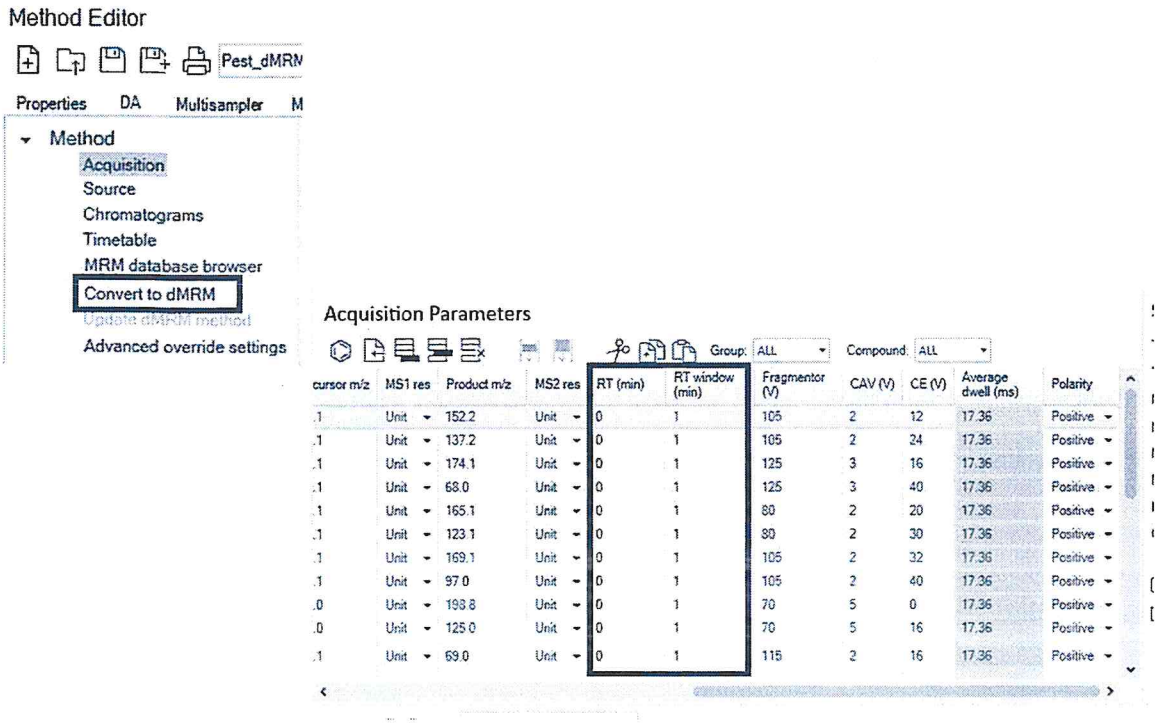


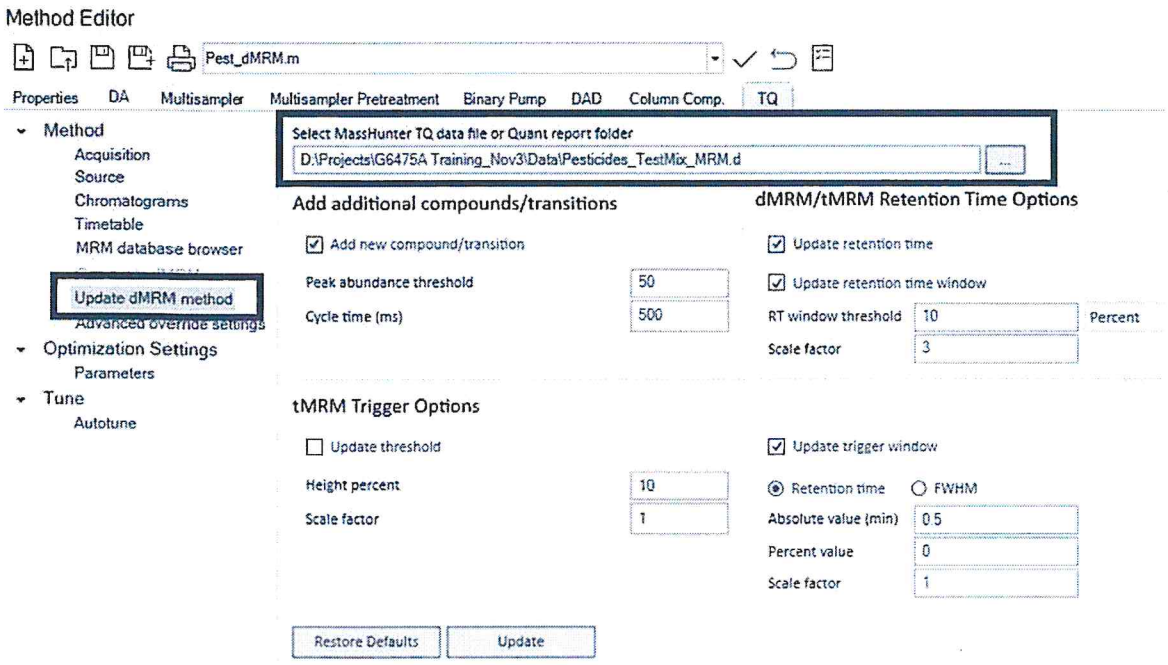
กรณี **Product Ion Scan (MS/MS mode)** ใส่ Precursor Ion , MS2 From/to , Collision Energy และ Polarity ที่ต้องการใน Acquisition Tab



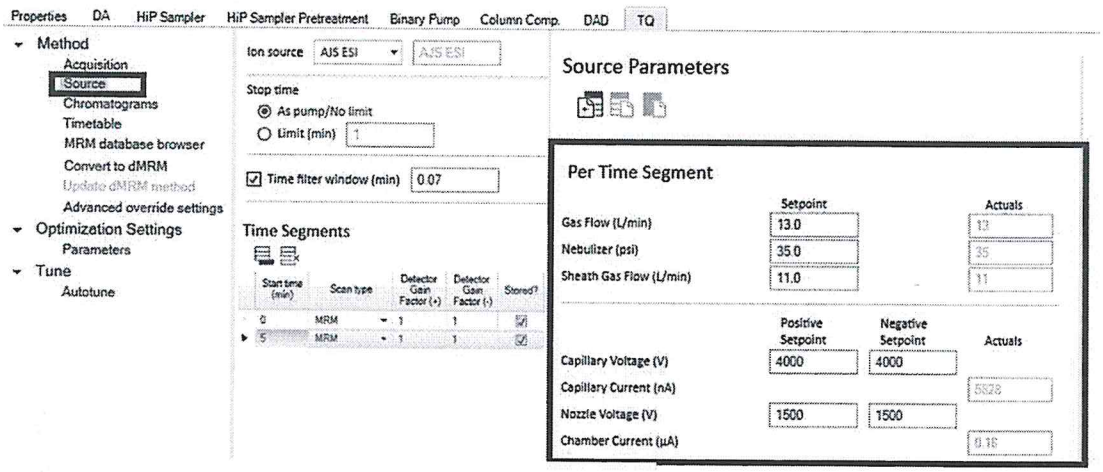
กรณี **MRM (MS/MS mode)** ใส่ Compound name, Precursor Ion ,Product Ion, Collision Energy และ Polarity ที่ต้องการใน Acquisition Tab

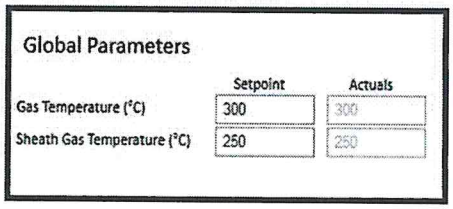
กรณี **dynamic MRM (MS/MS mode)** สามารถใส่ RT เฉพาะของแต่ละสาร เหมาะสำหรับงานวิเคราะห์ที่มีจำนวน MRM มาก ซึ่งสามารถสร้าง Method dMRM จาก MRM โดยทำการคลิกที่ Update DMRM method แล้วทำการเลือก Data file ได้ โดย Software จะทำการสร้าง Method ให้โดยอัตโนมัติ





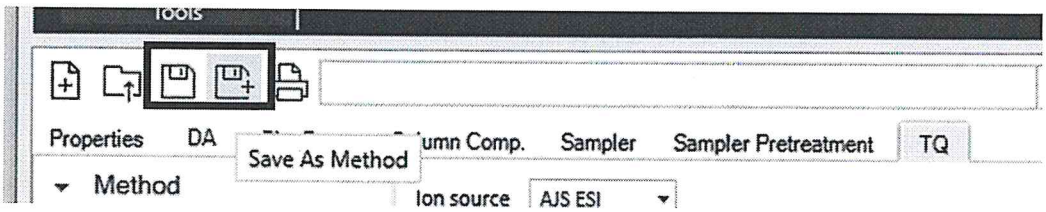
6. ที่ Source Tab : เลือกใส่ Source parameter ที่ต้องการ เช่น Drying gas Temperature, Gas flow, Nebulizer pressure , Capillary Voltage. กรณี Jet Stream source ต้องใส่ Sheath gas temp/flow





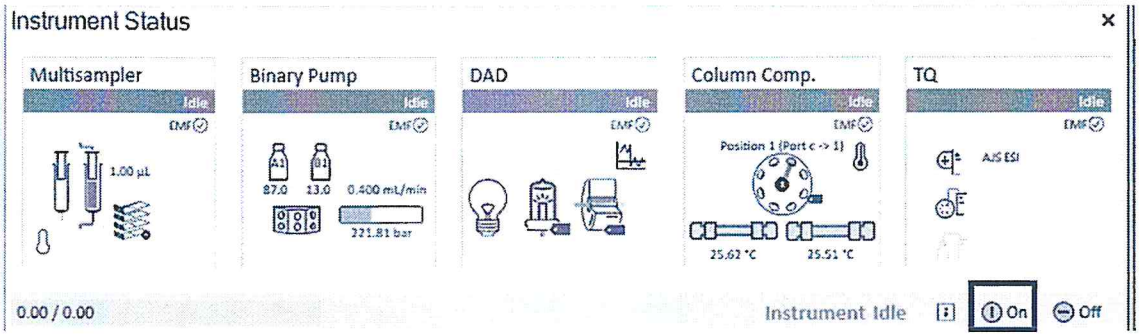
6. Save Method

1. เลือก Method ที่ Menu Bar
2. เลือก Save as เพื่อใส่ชื่อที่ต้องการ หรือ Save เพื่อทับ Method เดิม

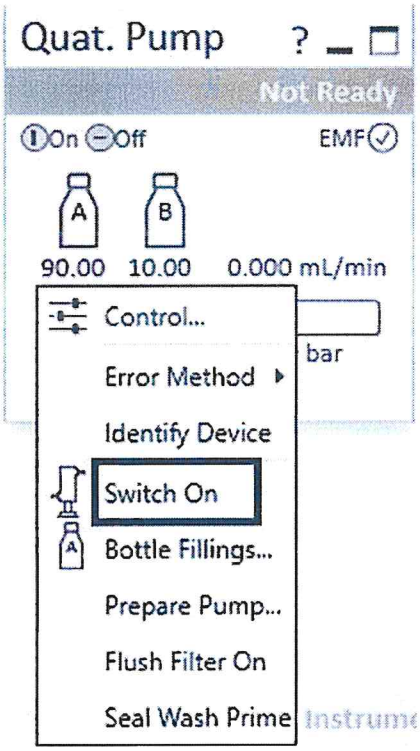


การ On Module

1. ใช้ mouse กด ที่ ON บริเวณ instrument status pane (ด้านขวา)



2. หรือ ใช้ mouse กดปุ่มขวาที่ module บริเวณ instrument status pane เลือก Switch On เช่น



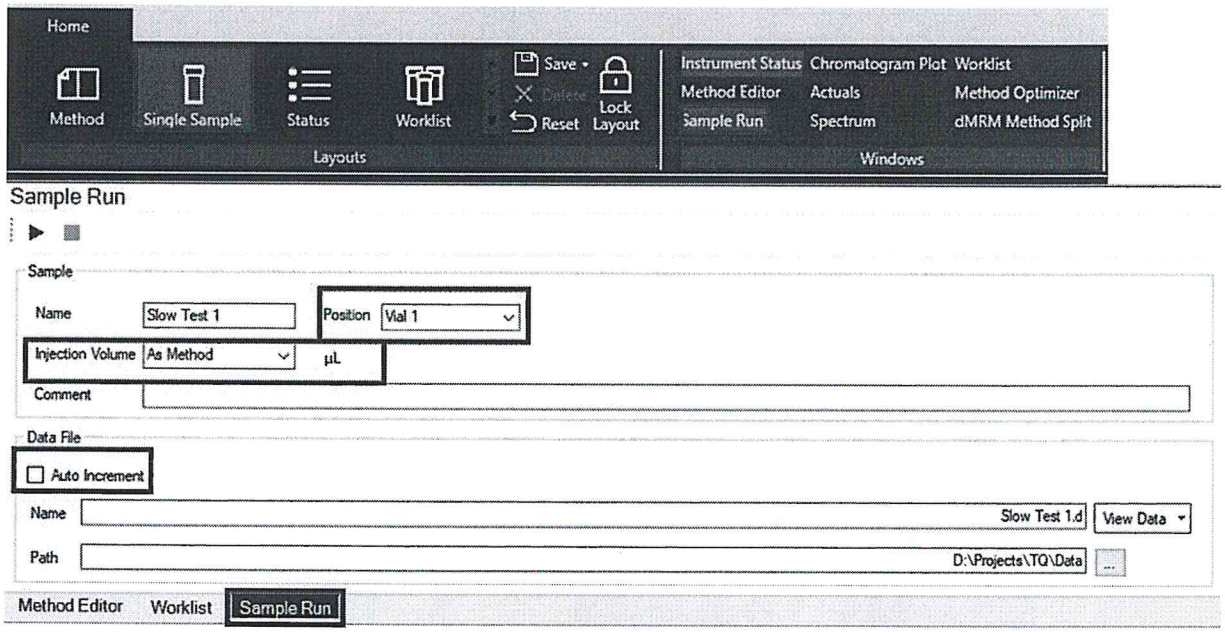
การฉีดสาร

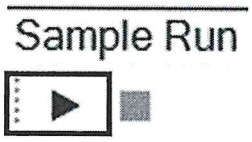
การฉีดสาร(injection) มี 2 วิธี

1. Sample Run (Single Run การฉีดสาร 1 ขวด)
2. Worklist Run (การฉีดสาร ตั้งแต่ 1 ขวด ขึ้นไป)

Sample Run (Single Run การฉีดสาร 1 ขวด)

1. บรรจุ สารในขวด มากกว่า 1/3 ของขวด ใส่ลงในถาดตัวอย่าง
2. เลือก Sample Run Tab
3. ตั้งค่า Sample Name , ตำแหน่งขวดสารที่จะฉีด (Position) , Data file Name และ Path

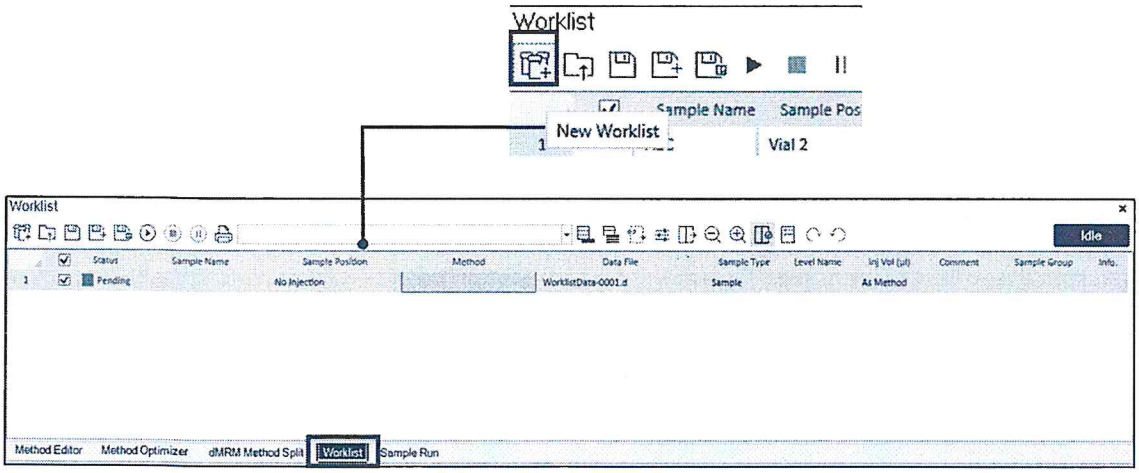


4. กด 

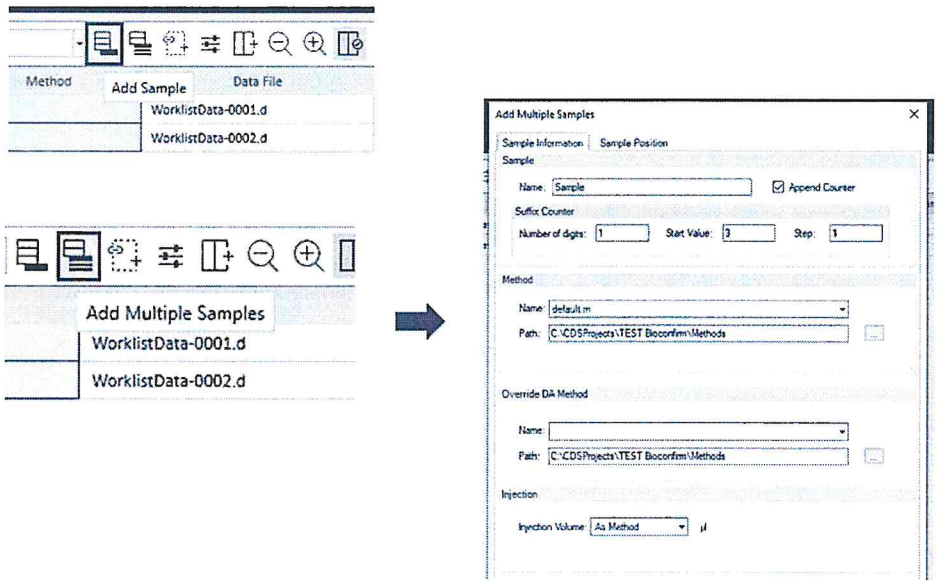
เพื่อฉีดสารที่ต้องการ

Worklist Run (การฉีดสาร ตั้งแต่ 1 ขวด ขึ้นไป)

1. บรรจุ สารในขวด มากกว่า 1/3 ของขวด ใส่ลงในถาดตัวอย่าง
2. เลือก Worklist Tab

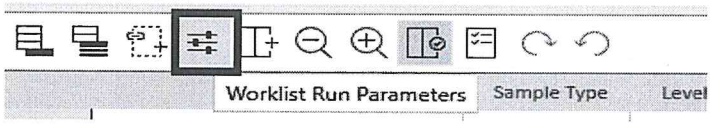


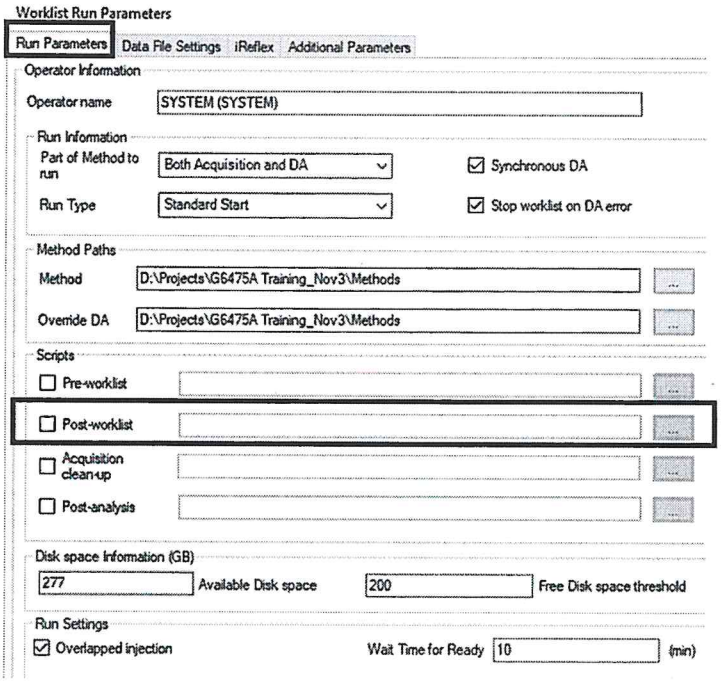
3. ที่ ตาราง worklist ตั้งค่า Sample Name , ตำแหน่งขวดสารที่จะฉีด (Sample Position) ,Method, Data file และ Sample type
4. สามารถเพิ่มบรรทัด กดปุ่มขวาที่ หมายเลข ซ้ายสุด เลือก Add sample หรือ Add Multiple Sample

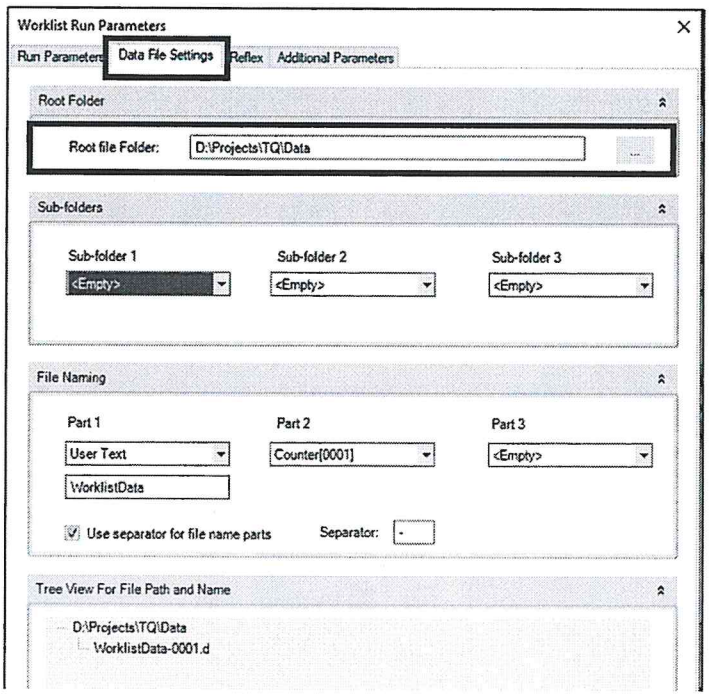


กรณี เลือก Add multiple Sample ต้องใส่ Method Name, Data file และ Sample Position ที่ต้องการ

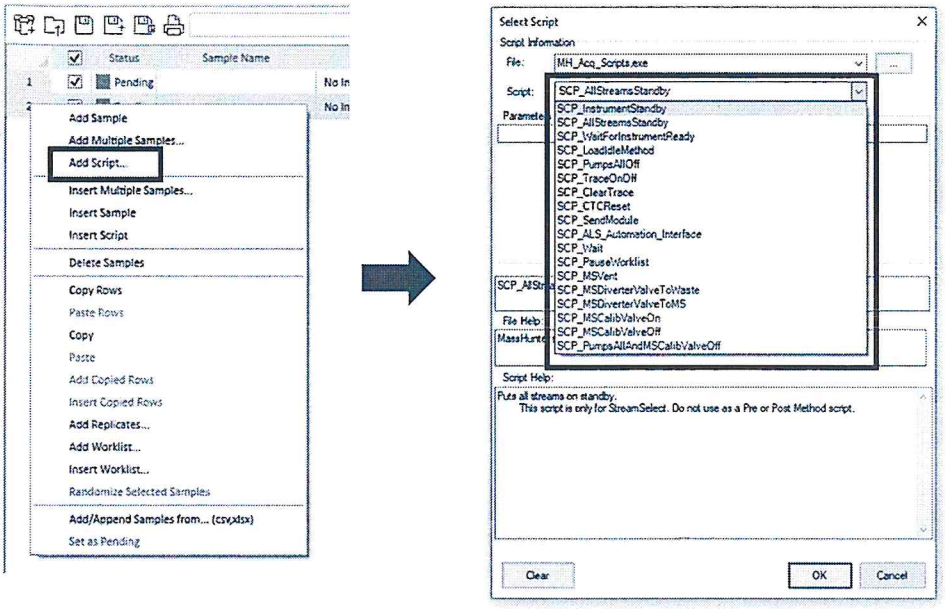
5. การปรับตั้งค่า Worklist Run Parameter สามารถเข้าได้จาก เมนู Worklist ดังภาพต่อไปนี้

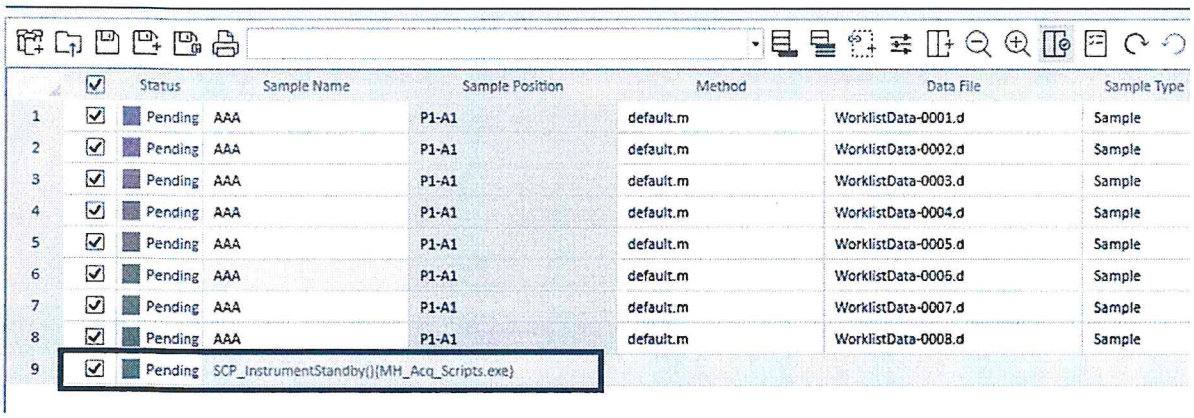






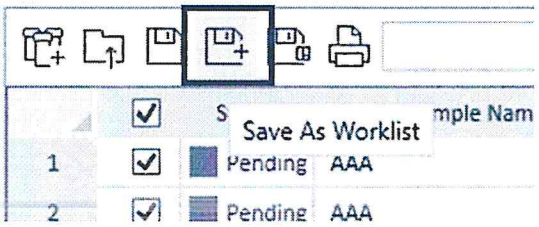
6. การตั้งค่า Post Worklist สามารถตั้งได้โดยคลิกขาวที่ตาราง worklist จากนั้นคลิก Add Script แล้วเลือกคำสั่ง Script ที่ต้องการ เช่น SCP_InstrumentStandby เพื่อให้เครื่องอยู่ในโหมด Standby หลังจากที่ Run worklist เสร็จ เป็นต้น และที่ worklist table จะปรากฏดังภาพด้านล่าง





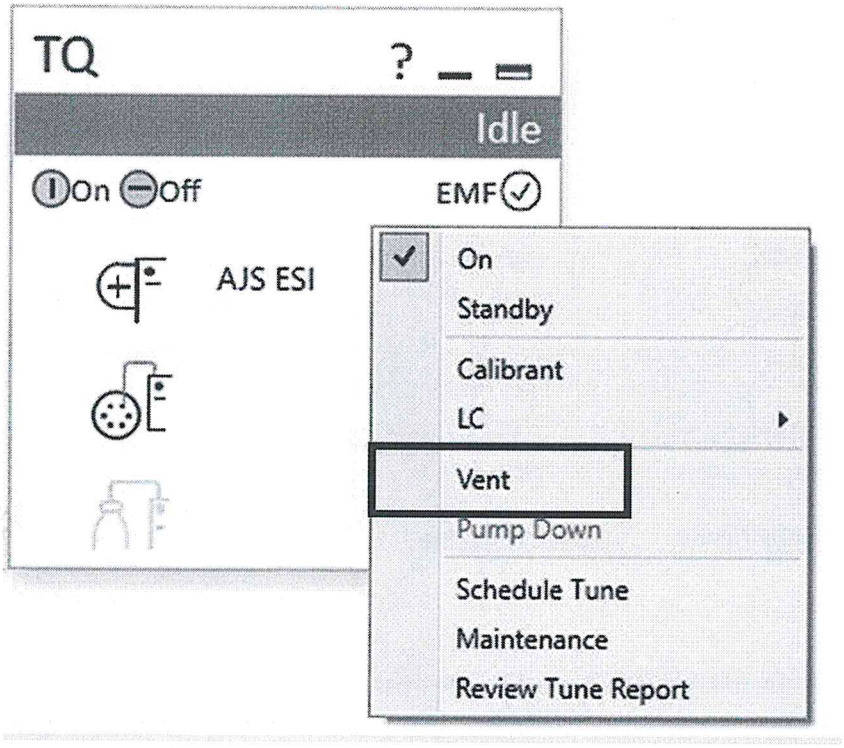
	Status	Sample Name	Sample Position	Method	Data File	Sample Type
1	Pending	AAA	P1-A1	default.m	WorklistData-0001.d	Sample
2	Pending	AAA	P1-A1	default.m	WorklistData-0002.d	Sample
3	Pending	AAA	P1-A1	default.m	WorklistData-0003.d	Sample
4	Pending	AAA	P1-A1	default.m	WorklistData-0004.d	Sample
5	Pending	AAA	P1-A1	default.m	WorklistData-0005.d	Sample
6	Pending	AAA	P1-A1	default.m	WorklistData-0006.d	Sample
7	Pending	AAA	P1-A1	default.m	WorklistData-0007.d	Sample
8	Pending	AAA	P1-A1	default.m	WorklistData-0008.d	Sample
9	Pending	SCP_InstrumentStandby(){MH_Acq_Scripts.exe}				

7. หลังจากทำการตั้งค่า Worklist เสร็จเรียบร้อยแล้ว ให้ทำการบันทึก Worklist ดังภาพต่อไปนี้



ขั้นตอนการปิดเครื่อง

1. ล้าง Column (อย่าเก็บ Column ในน้ำเกิน 50%)
2. ล้าง HPLC tubing (อย่าเก็บน้ำ, กรด หรือ buffer ไว้ใน HPLC tubing และ ขวด Mobile phase)
3. ใช้ mouse กดปุ่มขวาที่ TQ module บริเวณ instrument status pane แล้วเลือก Vent

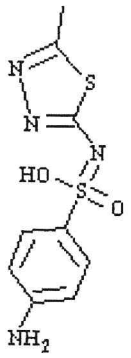


4. รอจน software แสดง vent complete และ ปิดเครื่องได้ ประมาณ 30 นาที
5. ปิดหน้าต่าง Acquisition
6. Click ที่ไอคอน Close Connection  ที่หน้า Control panel จากนั้นปิด software
7. ปิดคอมพิวเตอร์
8. ปิดสวิทช์เครื่องมือ LC และ MSD QQQ
9. ปิดก๊าซไนโตรเจนทั้งสองส่วน

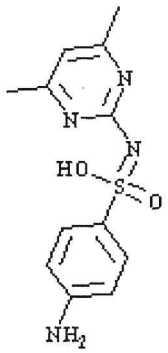
ตัวอย่างการวิเคราะห์ Sulfa Drug Mixture

สิ่งที่ต้องเตรียม

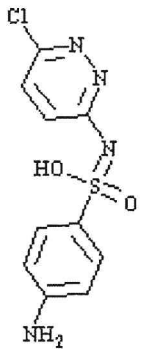
1. Water HPLC Grade
2. Acetonitrile HPLC Grade
3. Formic acid
4. Column: Zorbax SB-C18 2.1 mm x 3.0 mm x 3.5 um (p/n: 873700-902)
5. Electrospray Demo Sample: (p/n: 59987-20033) ประกอบด้วย



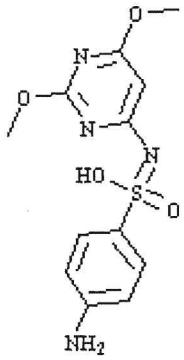
Sulfamethizole



Sulfamethazine



Sulfachloropyridazine



Sulfadimethoxine

Name	Formula	Ion	m/z
sulfamethizole	$C_9H_{10}N_4O_2S_2$	$(M+H)^+$	271.03179
sulfamethazine	$C_{12}H_{14}N_4O_2S$	$(M+H)^+$	279.09102
sulfachloropyridazine	$C_{10}H_9ClN_4O_2S$	$(M+H)^+$	285.02075
sulfadimethoxine	$C_{12}H_{14}N_4O_4S$	$(M+H)^+$	311.08085

Agilent

สร้าง Method โดยมีรายละเอียดดังนี้

Table 1 LC parameters for sulfa drug mix

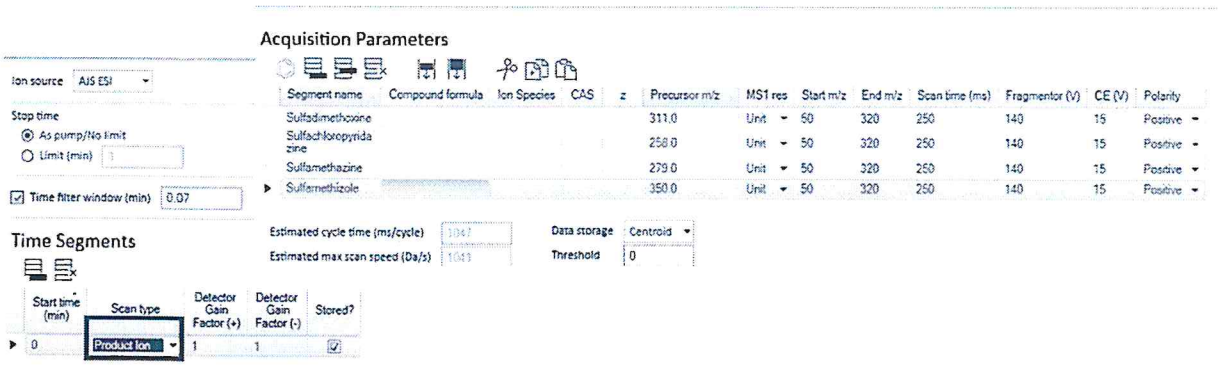
Parameter	Value for all instruments
PUMP	
• Flowrate	600 µL/min
• Solvent A	Water with 0.1% Formic Acid
• Solvent B	Acetonitrile with 0.1% Formic Acid
• Gradient (minutes - %B)	Initial Conditions: 90% Channel A and 10% Channel B 0 minutes - 10% B 5.0 minutes - 90% B
• Stop Time	5 minutes
• Post Time	3 minutes
INJECTOR	
• Inj. Vol.	1 µL
• Injection	Standard
• Draw Position	3.0 mm
UV DETECTOR	
• Ch A	272 nm (100 nm BW on DAD)
• REF A (DAD only)	360 nm (100 nm BW)
COL THERM	
• Temp	40° C

กรณี Scan type = MS2Scan

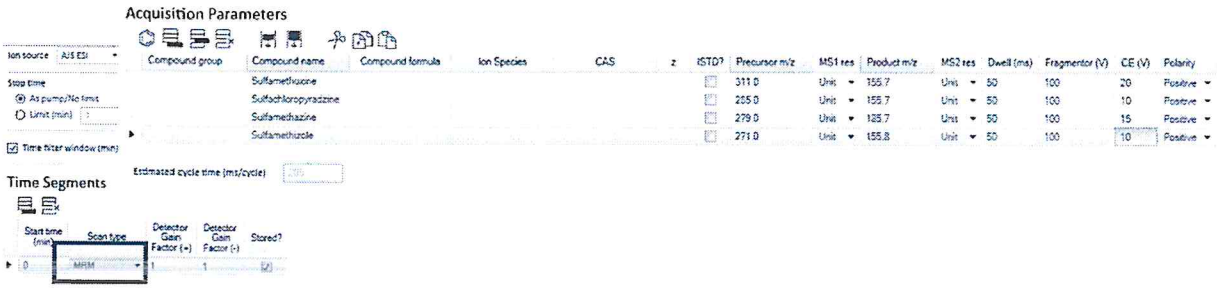
Table 3 MS parameters for sulfa drug mix

Parameter	Value	
• Inlet	ESI (positive polarity)	ESI (positive polarity) with Agilent Jet Stream Technology
• Gas Temp	350 °C	350 °C
• Scan Type	MS2Scan	MS2Scan
• Nebulizer	50 psi	35 psi (nitrogen)
• Dry Gas	12 L/min	10 L/min
• Range	100 to 400	100 to 400
• Sheath Gas Temperature	not applicable	400 °C
• Sheath Gas Flow	not applicable	12 L/min
• Nozzle Voltage	not applicable	0 V
• Capillary voltage positive	4000 V	4000 V
• Delta EMV pos	400 V	200 V

กรณี Scan type = Product Ion Scan

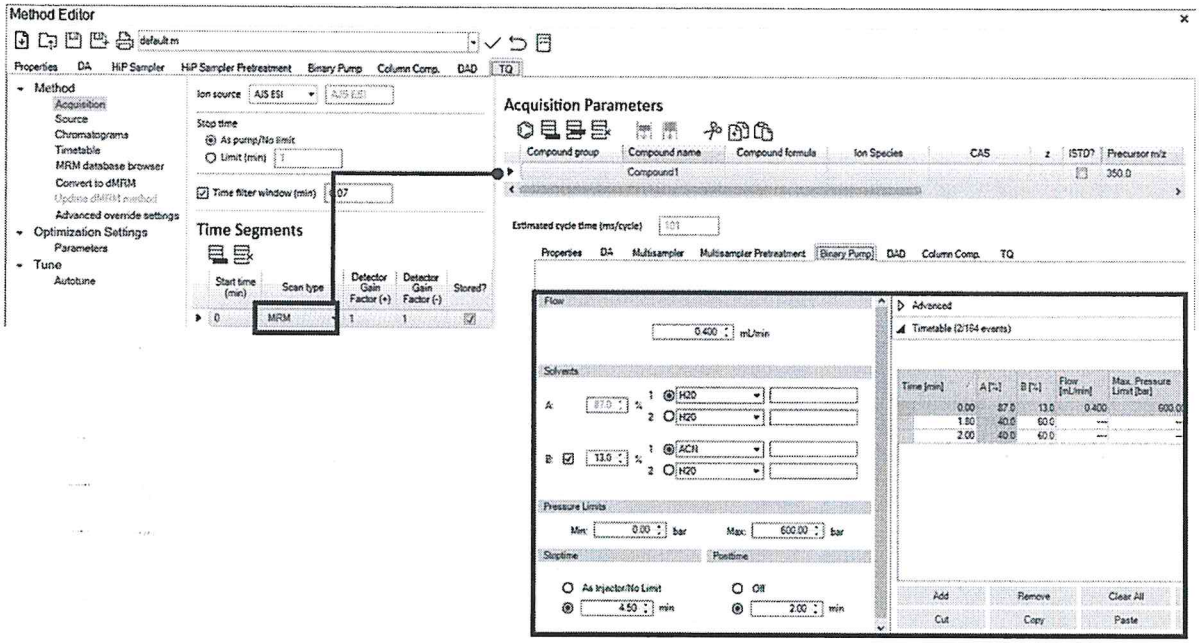


กรณี Scan type = MRM

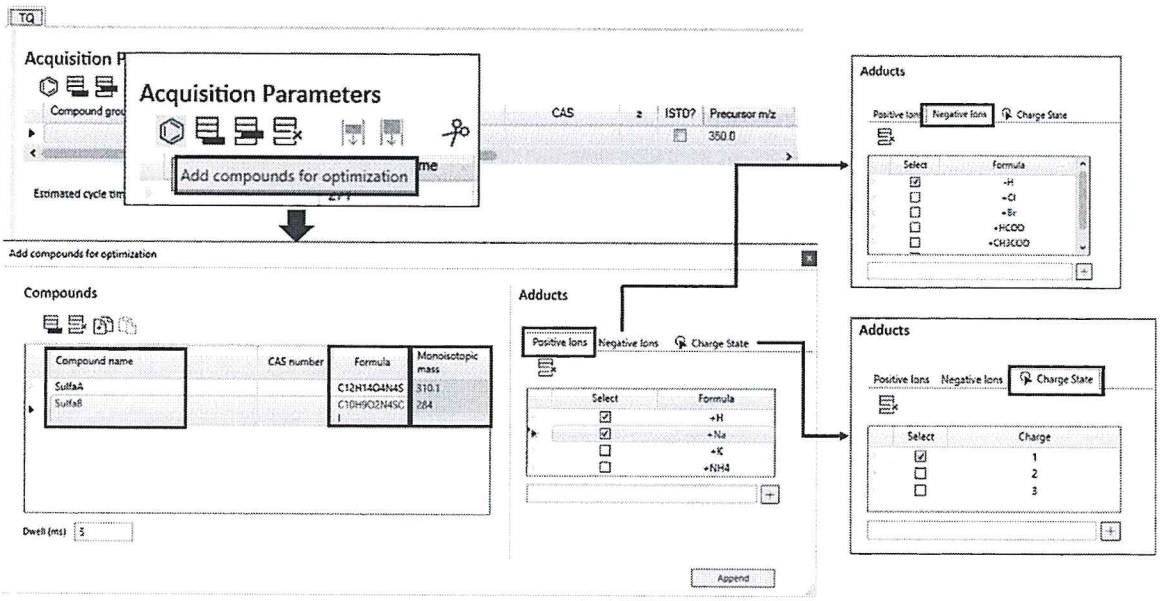


การใช้งาน Method Optimizer

1. ก่อนที่จะเริ่มรัน Method Optimizer ให้ทำการ Set up basic MRM method รวมทั้ง LC condition ก่อน ดังแสดง

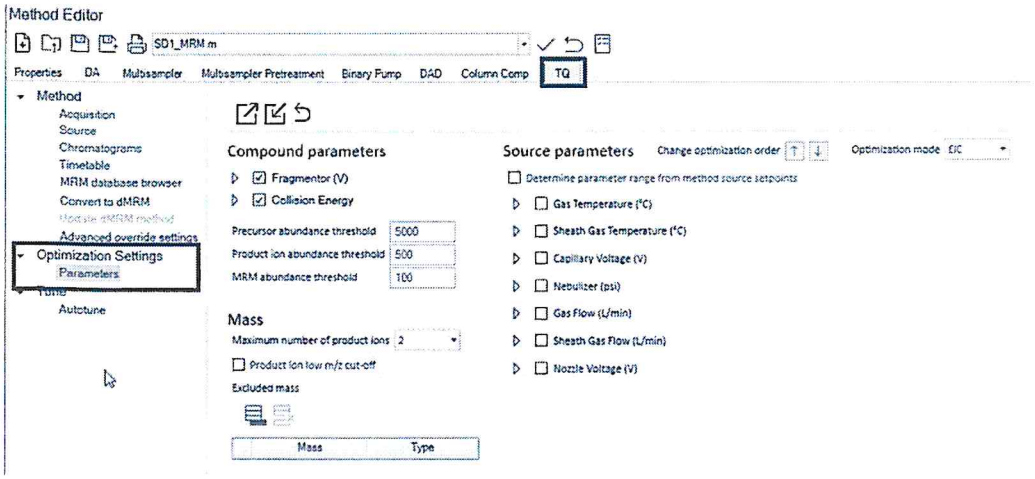


2. เพิ่ม Compound ที่จะทำการ Optimization หา MRM acquisition parameters โดยคลิกที่ไอคอน Add Compound for Optimization จากนั้น กรอกรายละเอียดต่างๆ ได้แก่ Compound name, Formula หรือ Monoisotopic mass, Positive ion หรือ Negative ion, และ Charge State

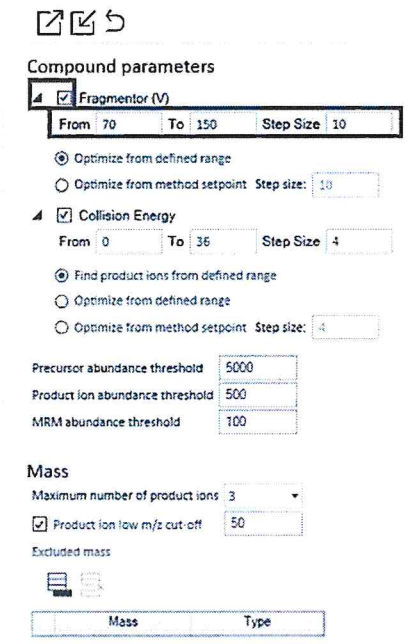


3. Save MRM method

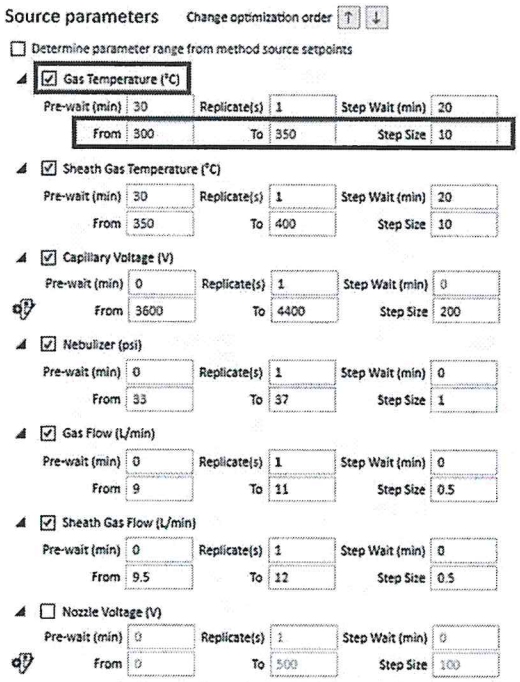
4. ไปที่ Optimization Settings > Parameters บน TQ tab ใน Method Editor เพื่อ Set up parameters ที่ต้องการทำ Optimization



5. กำหนด Compound parameters โดยคลิกเลือกที่หัวข้อ Parameters (Fragmentor และ/หรือ Collision Energy) ที่ต้องการ Optimize รวมทั้งกำหนดช่วงและ Step Size



6. กำหนด Source parameters โดยคลิกเลือกที่หัวข้อ Parameters ที่ต้องการ Optimize เช่น Gas Temperature, Sheath Gas Temperature, Capillary Voltage และ Nebulizer เป็นต้น รวมทั้งกำหนดช่วงและ Step Size

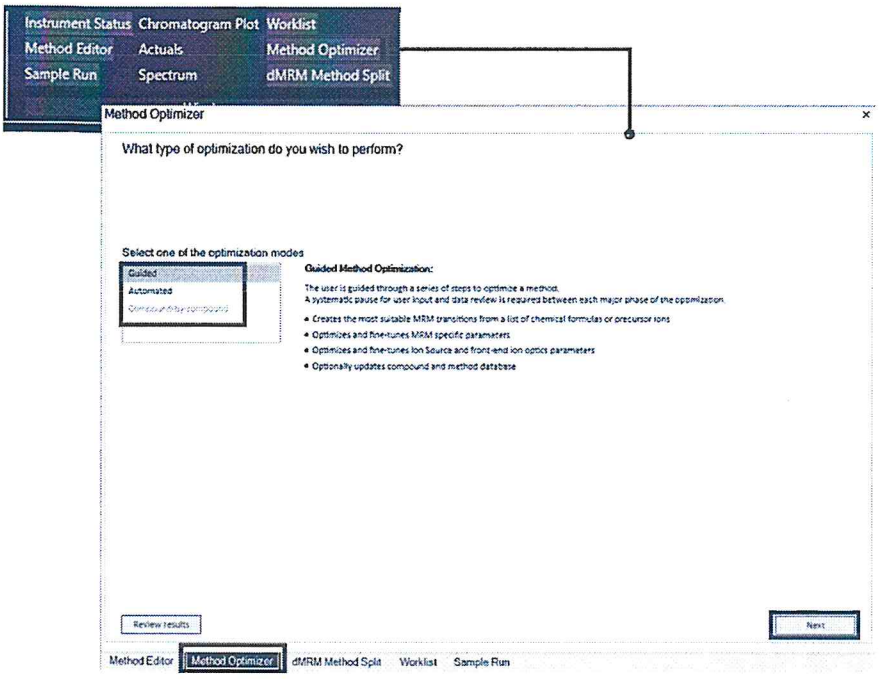


Recommend range สำหรับการทำ Optimization

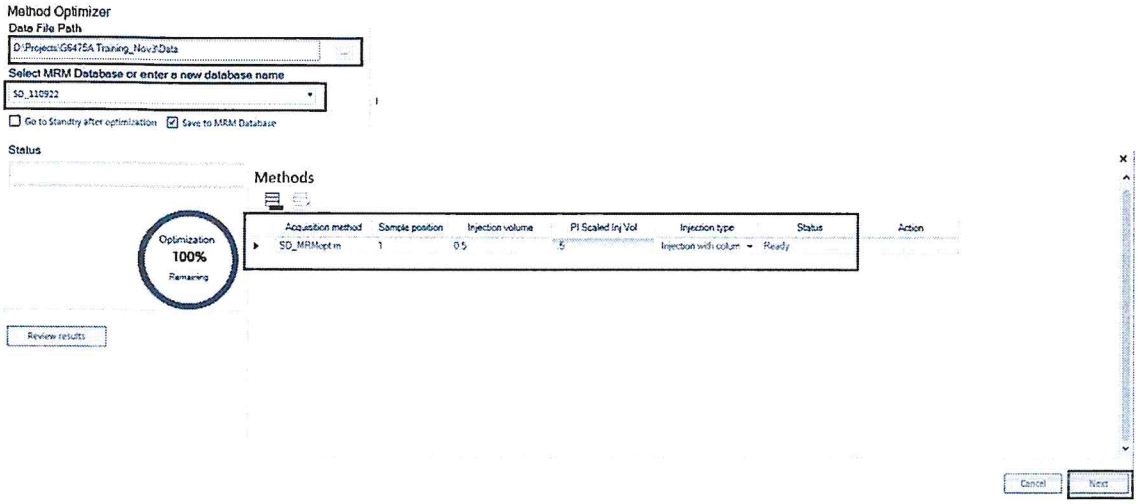
Type	Pre-Wait (min)	Replicates	Step Wait (min)	From	To	Step Size
Capillary	0	1	0	1000	6000	500
Nozzle Voltage	0	1	0	0	2000	500
Drying Gas Temp	20	2	10	150	350	50
Drying Gas Flow	0	1	0	Non-funnel 10	Non-funnel 13	1
				Funnel 17	Funnel 20	
Sheath Gas Temp	20	2	10	150	400	50
Sheath Gas Flow	0	1	0	10	12	1
Nebulizer	0	1	0	25	60	5

7. Click ที่ Method Optimizer tab จากนั้นเลือก optimization modes โดย
   - Automated เป็นการ Run Compound and Source Optimization แบบอัตโนมัติ
   - Guided เป็นการ Run Compound และ/หรือ Source Optimization

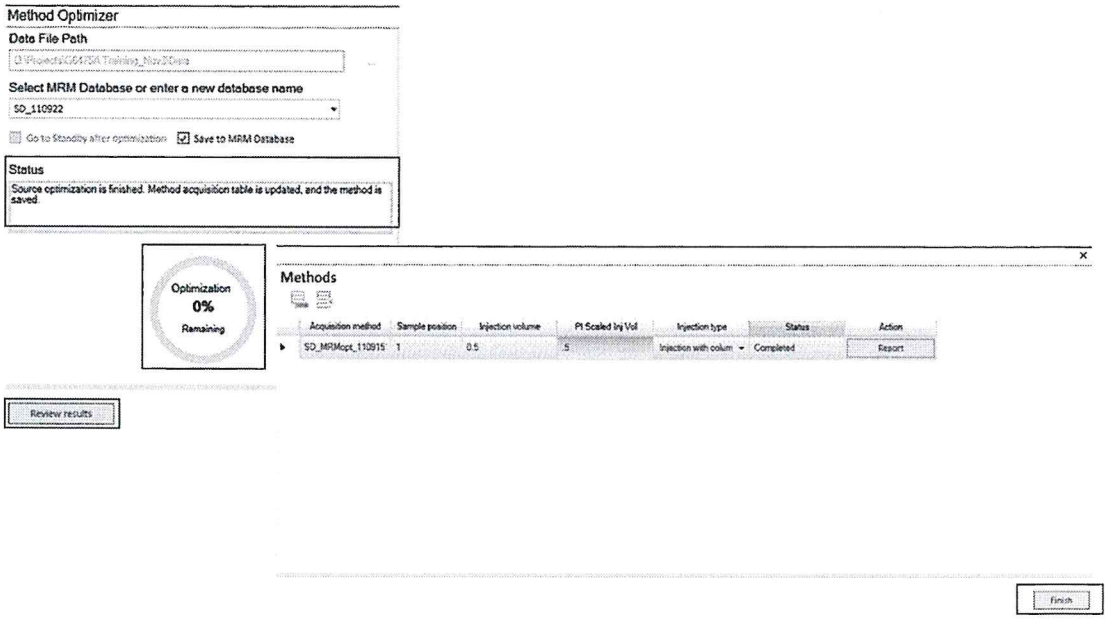
   จากนั้นกด Next



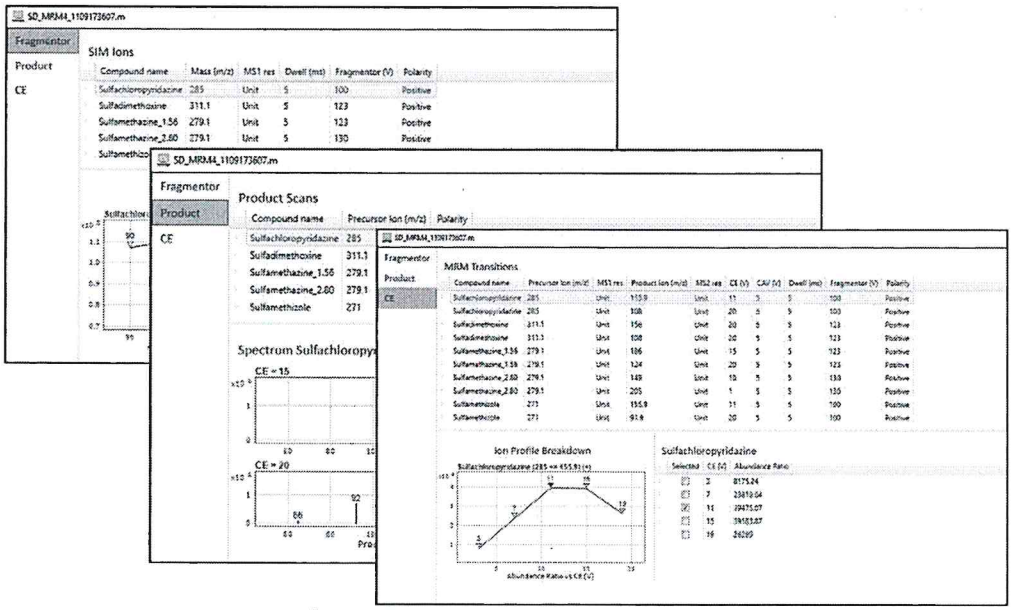
8. ระบุ Data File Path, MRM database name, Acquisition method, Sample position, Injection volume และ Injection type จากนั้นกด Next



9. เมื่อทำการวิเคราะห์เสร็จสิ้น ซึ่งสามารถสังเกตได้จาก Status และ Optimization Remaining = 0% เครื่องจะทำการแสดงผลดังแสดงในรูปด้านล่าง
   - Compound and source parameters ที่ได้จากการ optimized จะถูก save ไปที่ method
   - ในกรณีที่คลิกเลือก Save to MRM Database ค่า Optimized compounds จะถูกอัพเดตที่ database ด้วย

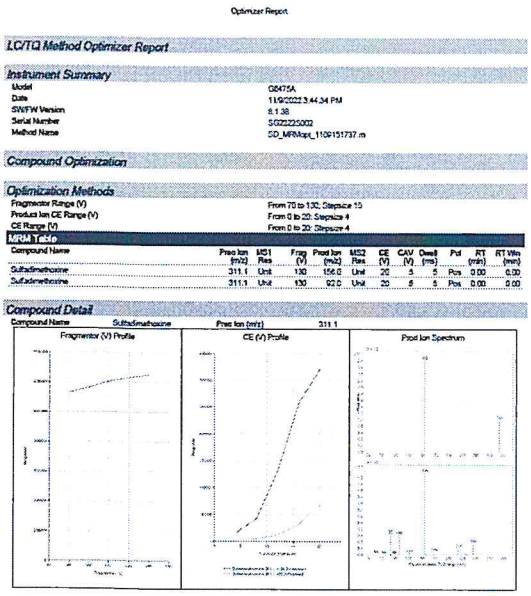


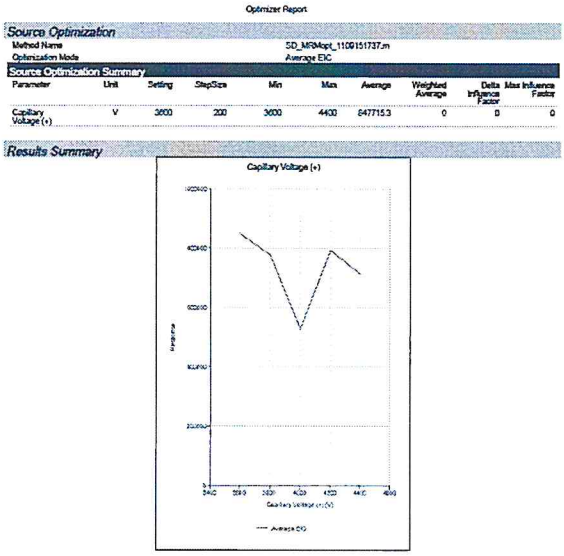
   - Click ที่ Review results เพื่อดูรายละเอียด Compound Optimization



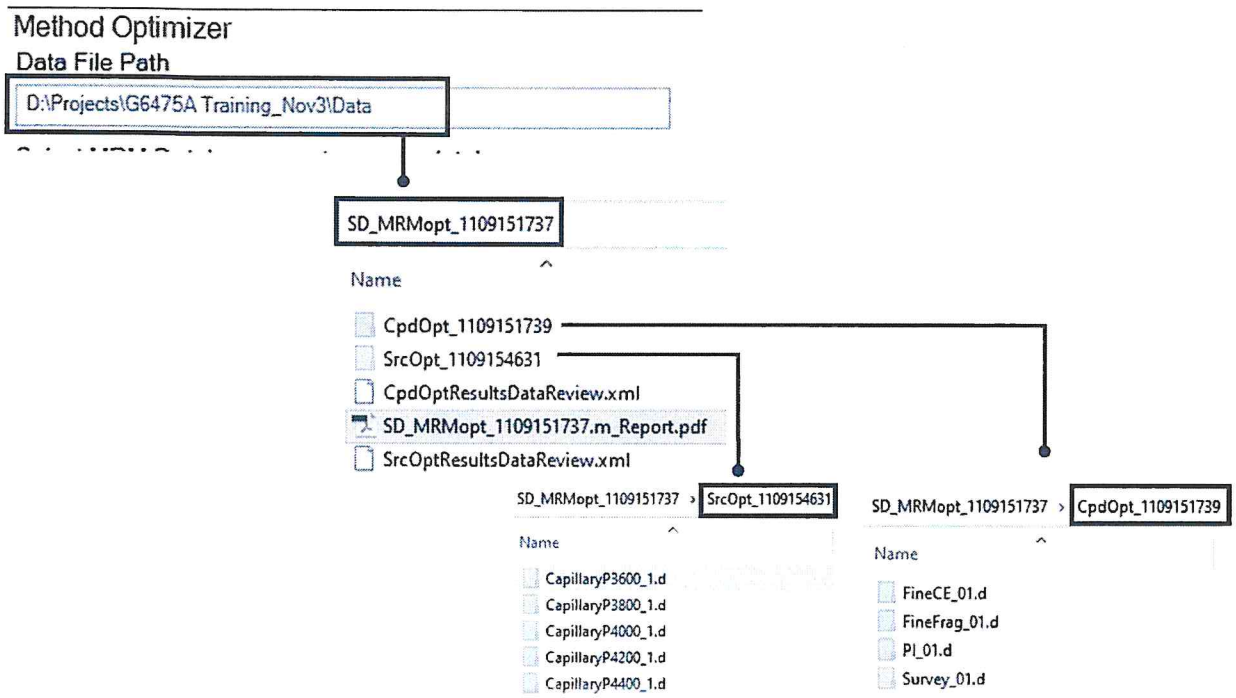
   - Click Finish เพื่อออกจาก Method Optimizer

- ตัวอย่าง Optimizer report

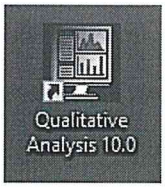


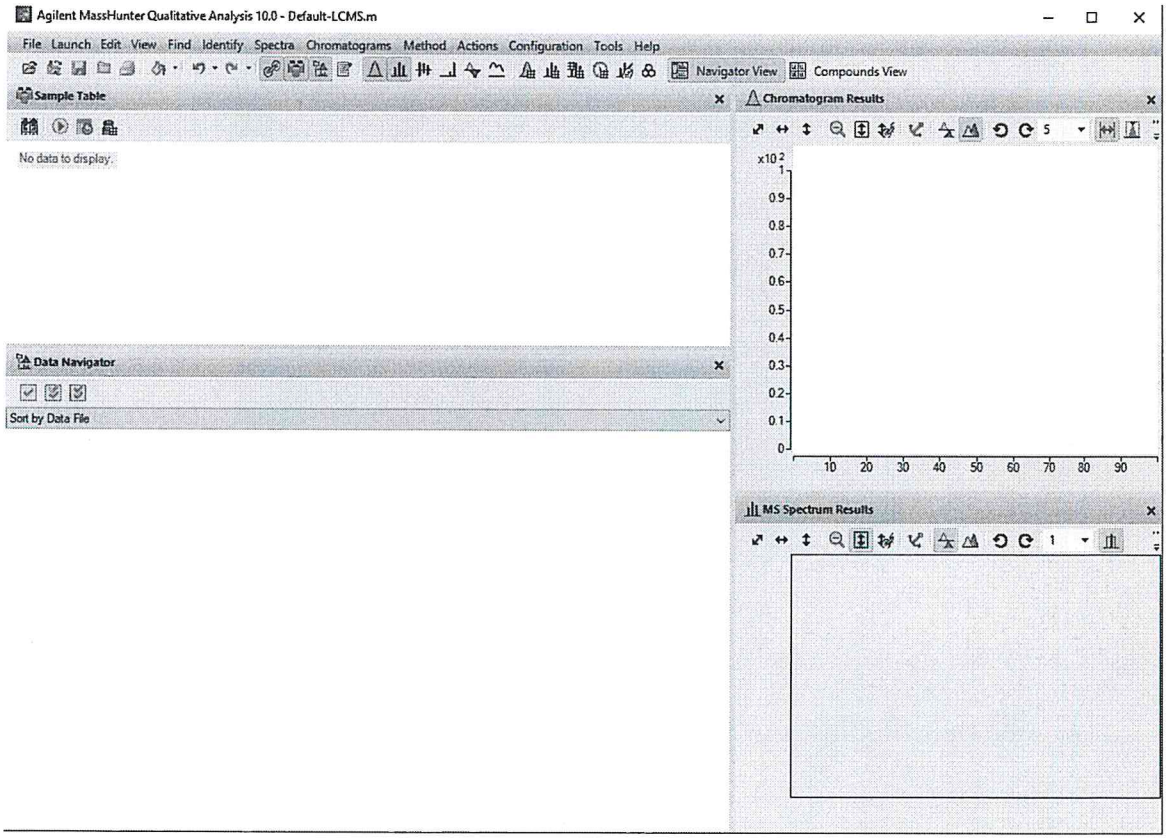


- Method Optimizer จะสร้างโฟลเดอร์ชื่อ *method name_datetime* ใน Data path ที่กำหนดไว้ใน Method Optimizer



Agilent MassHunter Qualitative Analysis software



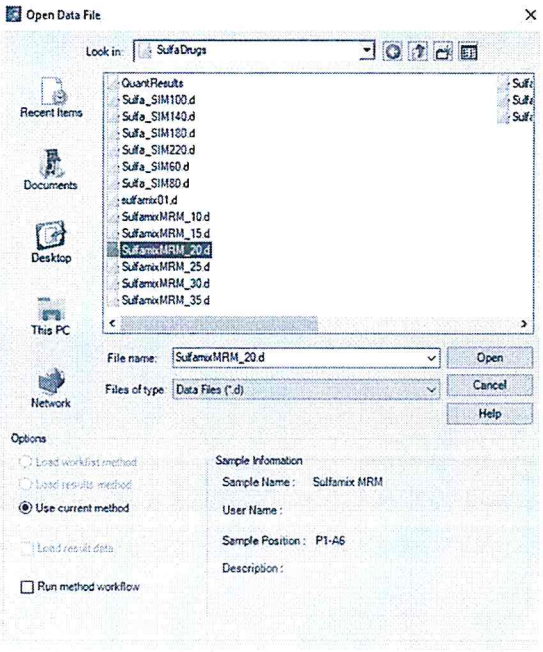


หลังจากติดตั้งซอฟแวร์ Mass Hunter Qualitative แล้ว จะพบไอคอน ที่หน้าจอคอมพิวเตอร์ การเริ่มต้นใช้งาน Mass Hunter Qualitative Analysis ให้เลือกคลิกไอคอนดังกล่าว จะปรากฏหน้าต่างการใช้งานซอฟแวร์

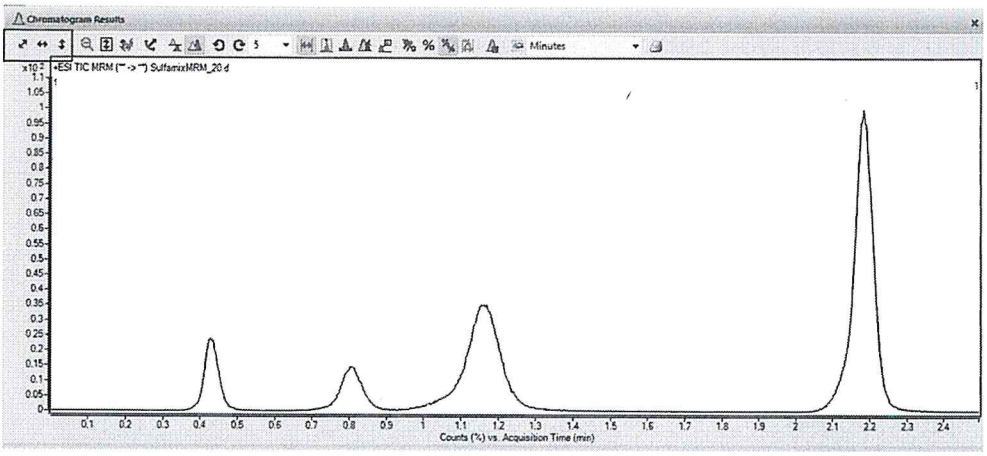
Agilent

ขั้นตอนการเปิดไฟล์ข้อมูลต่างๆ เพื่อใช้งาน

1. คลิก File > Open Data File หรือ คลิกที่ ไอคอน เพื่อเปิดไฟล์
2. เลือก data file(s) ที่ต้องการเปิด
3. คลิกเลือก Load results method หรือใช้ Use current method จาก Options ซึ่ง Use current method จะเป็นค่าเริ่มต้น



4. คลิก Open เพื่อเปิด data file



การขยายขนาดของ chromatograms และ spectra โดยการขยายแนวแกน x และ y

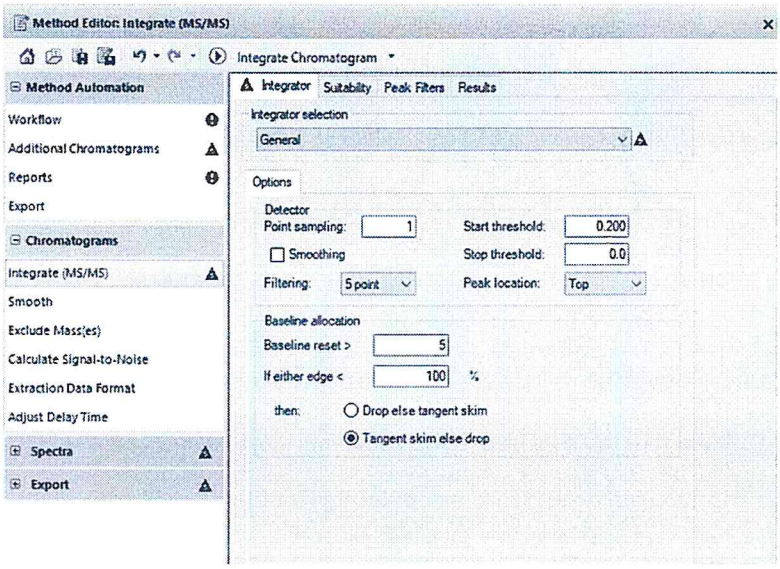
- คลิกและลาก เม้าท์ปุ่มขวา ให้ครอบคลุมพื้นที่ที่ต้องการขยาย จะแสดงผลการเลือกขยายเป็นกรอบสี่เหลี่ยม สามารถทำซ้ำได้ตามต้องการ
- คลิก ↕ บน toolbar เพื่อให้ Chromatogram อยู่ในโหมด Autoscale y-axis หลังจากทำการขยายแล้ว
- คลิกและลาก เม้าท์ปุ่มขวา บนสเกล ของแกน x เพื่อเป็นการขยายสเกลของแกน ให้กว้าง หรือลดลงได้
- คลิกและลาก เม้าท์ปุ่มขวา บนสเกล ของแกน y เพื่อเป็นการขยายสเกลของแกน ให้กว้าง หรือลดลงได้

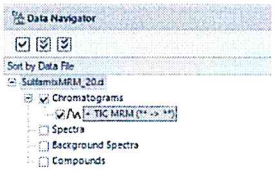
To zoom out

- คลิก ⤢ เพื่อ zoom out ให้รูปกลับมาที่โหมด autoscale ทั้ง x-axis และ y-axis
- คลิก ↔ เพื่อ zoom out ให้รูปกลับมาที่โหมด autoscale ในแกน x
- คลิก ↕ เพื่อ zoom out ให้รูปกลับมาที่โหมด autoscale ในแกน y
- คลิก ↶ เพื่อยกเลิกการขยายครั้งล่าสุด
- Double-click ที่แกน x ให้แกนกลับมาที่โหมด autoscale ในแกน x
- Double-click ที่แกน y ให้แกนกลับมาที่โหมด autoscale ในแกน y

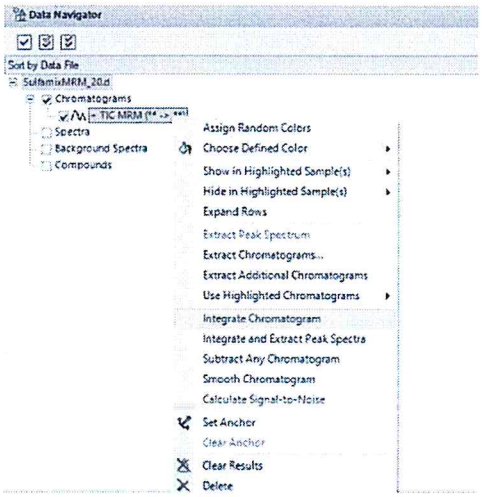
การหาพื้นที่ใต้พีคของ chromatogram

1. เปิดไฟล์ที่ต้องการ
2. ตั้งค่าต่างๆ ที่ใช้ในการ integrate โดยไปที่ Method Editor Explorer ดังรูป จะปรากฏเมนูต่างๆที่ใช้ตั้งค่าการ integrate





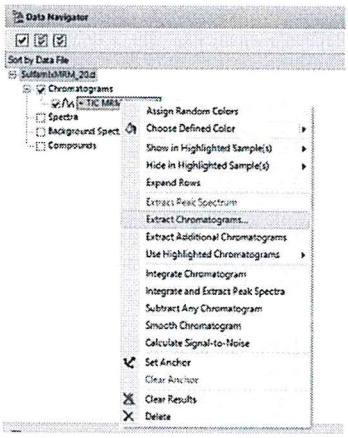
3. เลือก Chromatogram ที่ต้องการ จาก Data Navigator
4. Mass Hunter Qualitative ทำให้สามารถเลือกวิธีการ integrate ได้ตามความต้องการดังนี้
   - เลือกจาก Chromatograms Menu ที่ Chromatogram > Integrate Chromatogram หรือ Integrate and Extract Peak Spectra

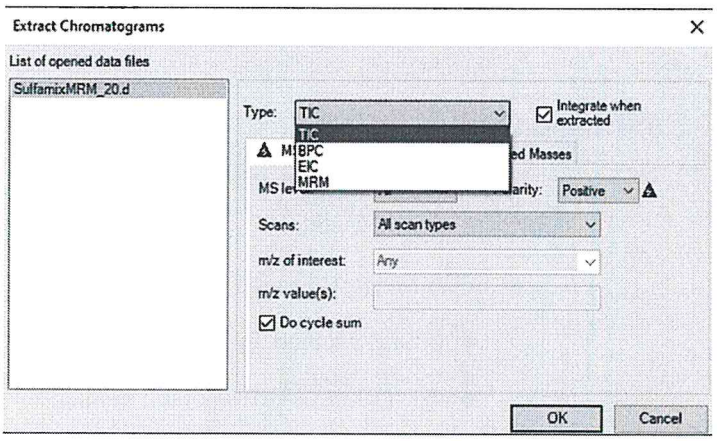


- เลือกจาก Chromatogram Results Shortcut Menu โดย คลิกขวาที่ หน้าต่าง Chromatogram Results > Integrate Chromatogram หรือ Integrate and Extract Peak Spectra
- เลือกจาก Data Navigator User Chromatograms Shortcut Menu โดย คลิกขวาที่ Chromatogram ที่ได้เลือกไว้ > Integrate Chromatogram หรือ Integrate and Extract Peak Spectra
- เลือกจาก Method Editor toolbar โดยคลิก เพื่อ integrate ตามที่ได้ตั้งค่าไว้
  - Chromatogram > Integrate (MS)
  - Chromatogram > Integrate (MS/MS)

Extract a chromatogram

1. คลิก File > Open Data File หรือ คลิกที่ ไอคอน เพื่อเปิดไฟล์
2. เลือก Chromatogram ที่ต้องการ Extract จากนั้น จะพบหน้าต่างการ Extract Chromatogram ขึ้น (หากต้องการ Extract Chromatogram จำนวนมาก สามารถทำได้โดยการ คลิก ctrl แล้วเลือกไฟล ที่เปิดขึ้นใน Data Navigator ซึ่งหากเลือกไฟล์เหล่านั้นแล้ว จะปรากฏอยู่ในช่อง List of opened data files)





3. เลือกชนิดของ Chromatogram ที่ต้องการ Extract ซึ่งจะมี TIC, BPC, EIC, MRM ให้เลือก ขึ้นกับชนิดของ ไฟล์ที่เปิดว่าทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Mass spectrometry แบบใด
4. เลือกให้ทำการ Integrate อย่างอัตโนมัติได้ โดยการเช็คเลือก ที่ ช่องIntegrate when extracted

5. สามารถเลือก mass หรือ m/z ที่ต้องการ extract ได้ โดยเติมในช่อง m/z value
6. คลิก OK เพื่อให้แสดงผลการ Extract

Extract a chromatogram สำหรับไอออนแต่ละไอออน

1. คลิก File > Open Data File หรือ คลิกที่ ไอคอน เพื่อเปิดไฟล์
2. เลือก Chromatogram ที่ต้องการ Extract จากนั้น จะพบหน้าต่างการ Extract Chromatogram ขึ้น
3. เลือกชนิดของ chromatogram เป็น MRM จากนั้นในช่อง MS level จะถูกตั้งค่าเป็น MS/MS อย่างอัตโนมัติ และช่อง Scans จะถูกตั้งค่าเป็น Multiple reaction monitor
4. ในช่อง Transition ให้เลือก All หรือหากไม่ต้องการเลือกทั้งหมด ให้เลือกเฉพาะที่ต้องการได้
5. คลิก OK เพื่อให้แสดงผลการ Extract

การบันทึก method parameters

การบันทึก method parameters สามารถทำได้ใน หน้าต่าง the Method Editor

บันทึกเป็น current method:

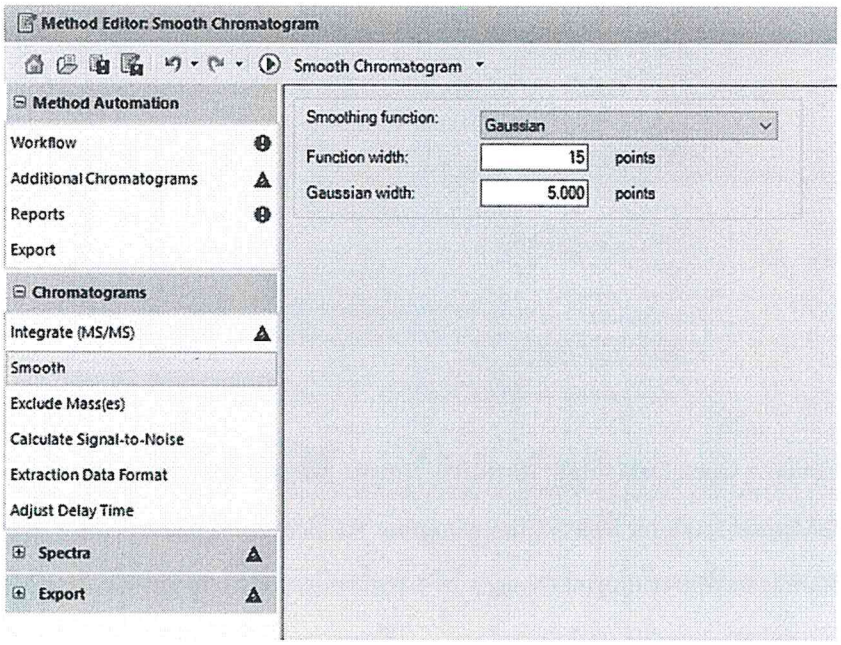
- คลิก Method > Save Method.
- คลิก Save Method ใน Method Editor shortcut menu.
- คลิก Save Method จาก the Method Editor toolbar.

สร้าง method ใหม่:

1. เปิดหน้าต่าง Save Method
   - คลิก Method > Save Method As.
   - คลิก Save Method ใน the Method Editor shortcut menu หาก default method ถูกโหลดขึ้นมา หากไม่ได้โหลด default method ให้บันทึกเป็น current method.
2. ตั้งชื่อ method
3. คลิก Save Qualitative Analysis และ Acquisition Method parameters.
4. คลิก Save เพื่อบันทึก

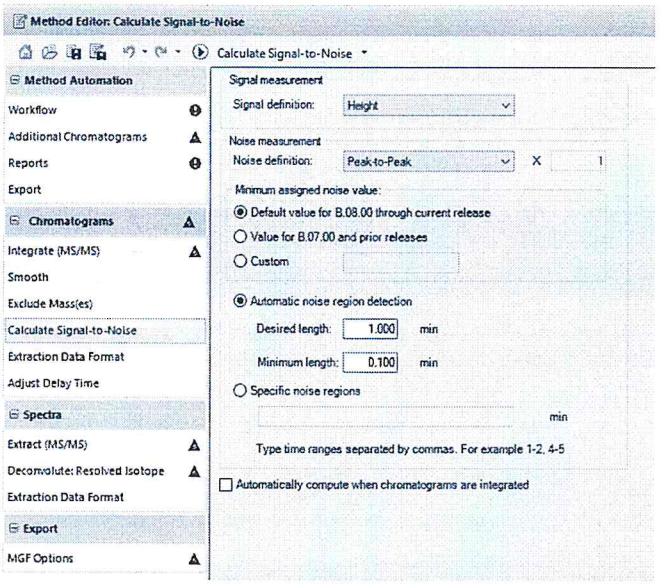
Smooth a chromatogram

1. คลิก File > Open Data File หรือ คลิกที่ ไอคอน เพื่อเปิดไฟล์
2. เลือก Chromatogram > Smooth chromatogram จาก แทปเมนู หรือ หน้าต่าง Method Editor
3. เลือกตั้งค่าการ smoothing ที่ต้องการ จาก Method Editor



4. จากหน้าต่าง Data Navigator ให้ highlight chromatogram ที่ต้องการ smooth.
5. คลิก เพื่อทำการ Smooth chromatogram.
6. หากต้องการบันทึกการตั้งค่าการ smooth ไว้ใน method ให้บันทึก Save method parameters

Calculate signal-to-noise

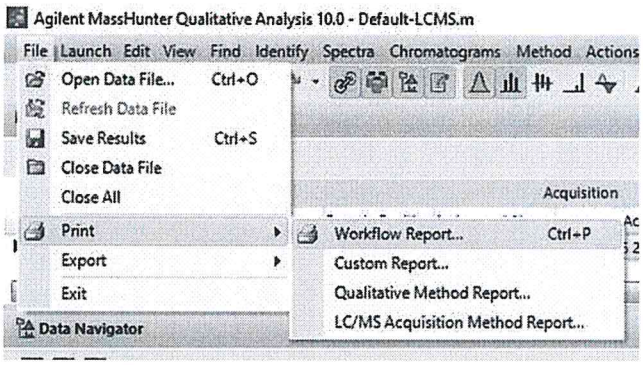


1. คลิก File > Open Data File หรือ คลิกที่ ไอคอน เพื่อเปิดไฟล์
2. จาก Method Explorer Box > Chromatogram > Calculate Signal-to-Noise (ดังรูป). สามารถกำหนดระยะที่ของสัญญาณ (Noise) ได้ รวมถึงชนิดของสัญญาณที่ต้องการได้อีกด้วย
3. สามารถกำหนดระยะของสัญญาณ Noise ได้หลายระยะ โดยอาศัย commas เช่น 1-2, 4-5 เป็นต้น
4. คลิก เพื่อ คำนวณค่า signal to noise
5. หากต้องการบันทึกการกำหนดค่าต่างๆในวิธี ให้ Save method parameters.

การเลือกตัวอย่างพิมพ์รายงาน

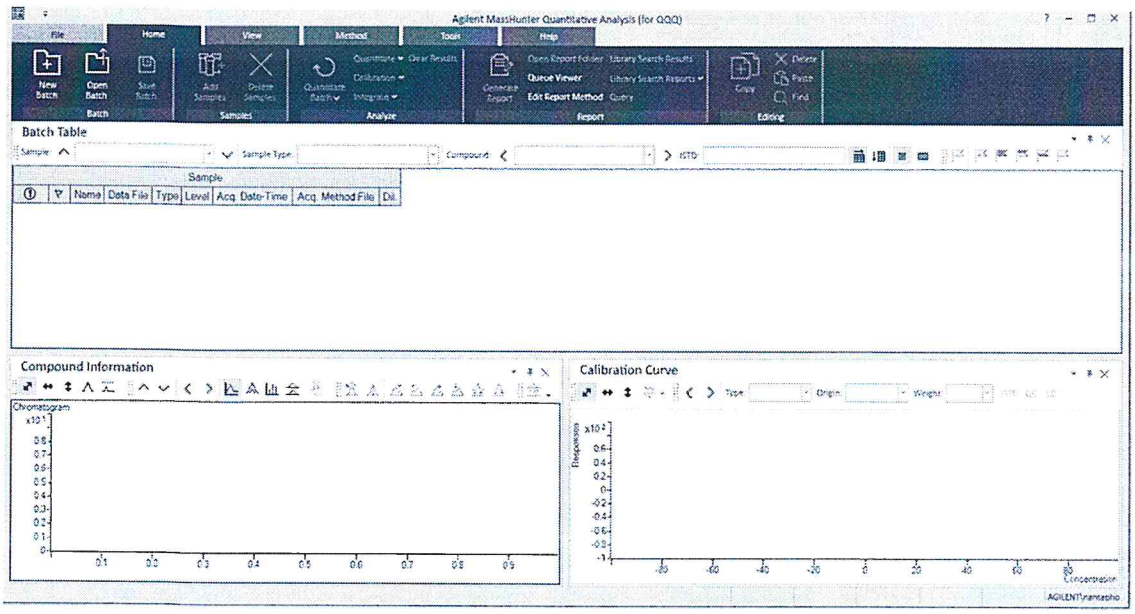
1. คลิก File > Open Data File หรือ คลิกที่ ไอคอน เพื่อเปิดไฟล์
2. เลือก General » Common Reporting Options Overview จาก Method Editor
3. (หากต้องการ) ต้องเปลี่ยน folder หากต้องการใช้ report templates ที่มีขนาดกระดาษของรายงานแตกต่างไปจากเดิม เช่น เดิม MassHunter\Report Templates\Qual\en-US\Letter เป็น folder ที่มีขนาด letter ต้องเปลี่ยนเป็น folder ที่ MassHunter\Report Templates\Qual\en-US\A4 เป็น A4

4. (หากต้องการ) เลือก report template ที่ต้องการ
    1. Analysis Report
    2. Compound Report
    3. Qualitative Method Report
    4. Acquisition Method Report
5. คลิก File > Print เพื่อทำการพิมพ์รายงานตามรูปแบบที่ต้องการ



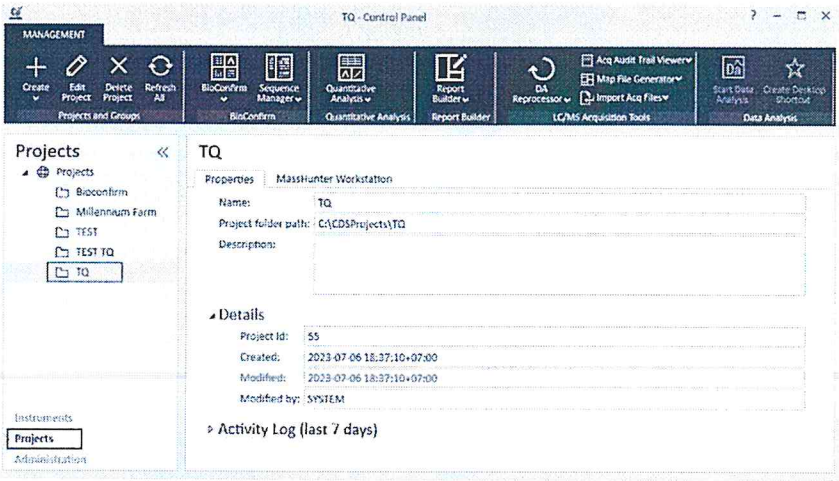
6. หากต้องการบันทึกการกำหนดค่าต่างๆในวิธี ให้ Save method parameters.

Agilent MassHunter Quantitative Analysis software



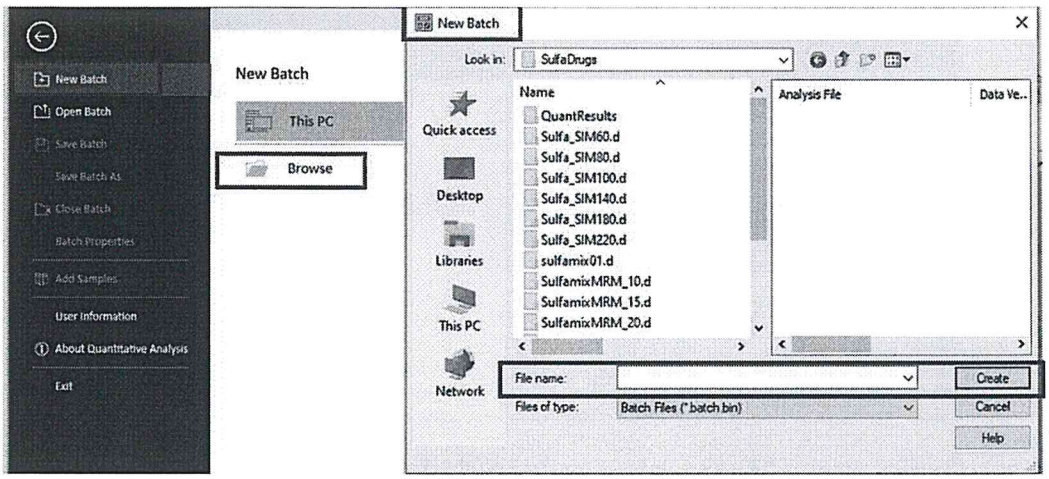
หลังจากติดตั้งซอฟแวร์ Mass Hunter Quantitative Analysis แล้ว จะพบไอคอน ที่หน้าจอคอมพิวเตอร์ การเริ่มต้นใช้งาน Mass Hunter Qualitative Analysis ให้เลือกคลิกไอคอนดังกล่าว จะปรากฏหน้าต่างการใช้งานซอฟแวร์ โดยที่การประมวลผลเชิงปริมาณจะต้องสร้าง Calibration curve และ คำนวณเป็นชุดตัวอย่าง (Batch) แล้วนำไปคำนวณด้วยวิธีการคำนวณผล (Quantitation Method)

อีกวิธีสำหรับการเข้า MassHunter Qualitative Analysis สามารถทำได้โดยไปที่หน้า Control Panel < ไปที่ Project tab < เลือก Project < กดที่ Qualitative Analysis icon

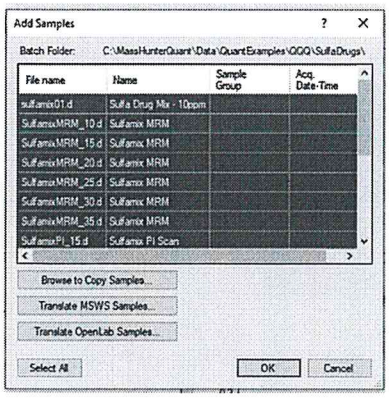


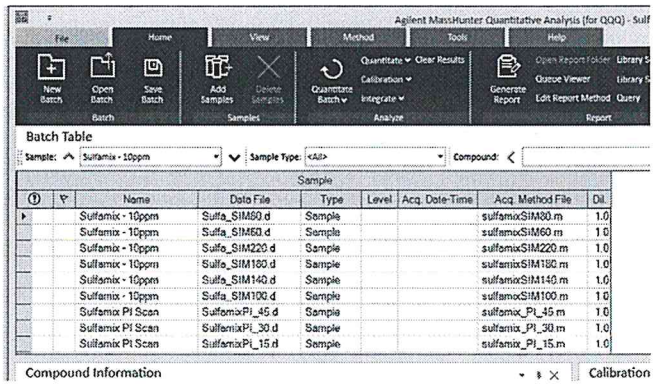
การสร้าง Batch

1. เลือก File > New Batch จะปรากฏหน้าต่าง New Batch ขึ้นมา เพื่อให้สร้าง ชื่อ Batch ใหม่ โดยที่หน้าต่างนี้ ให้ไปที่ช่อง File name แล้วพิมพ์ชื่อ ที่ต้องการ จากนั้น คลิก Create



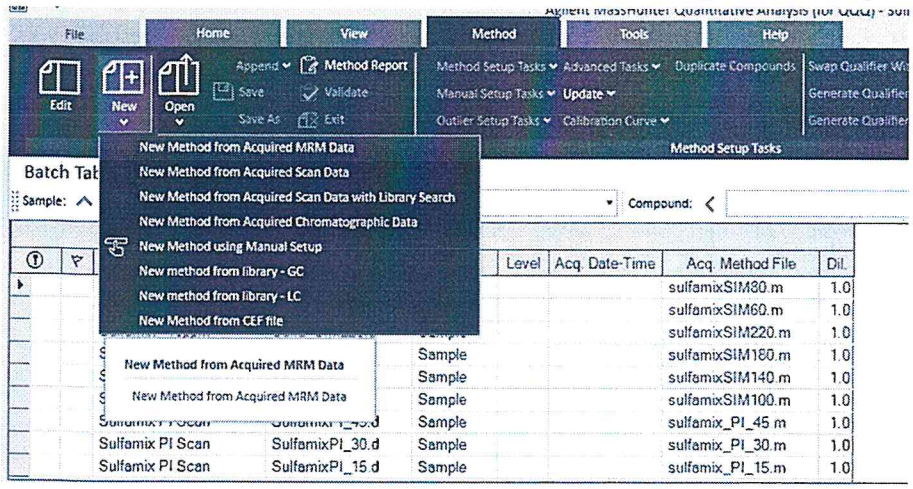
2. จากนั้น จะปรากฏ หน้าต่าง Add Samples ขึ้นมา ให้เลือก Data file ที่ต้องการใช้ใน Batch โดยหากต้องการเลือก หลาย Data File ให้ใช้การกดแป้นพิมพ์ที่ Shift หรือ Ctrl เพื่อช่วยในการเลือก หรือ Select All



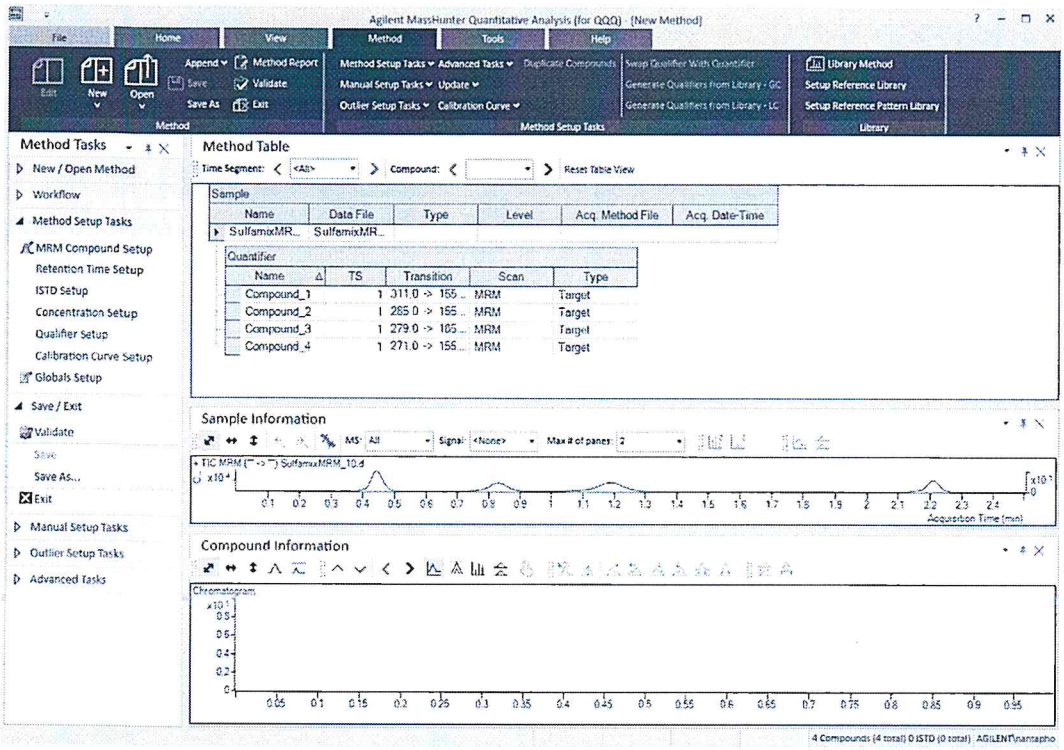


การสร้างวิธีการคำนวณหาปริมาณ (Quantitation Method)

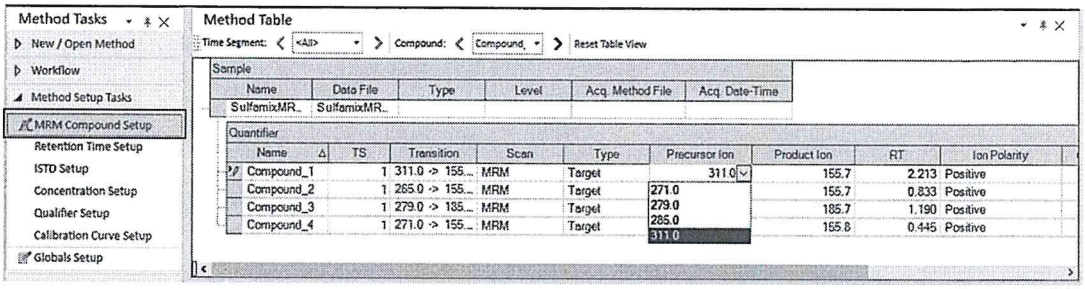
1. เลือกเมนู Method > New > เลือก New method from Acquired MRM Data หรือ เลือก New method from Acquired Scan Data หรือ เลือก New Method using Manual Setup



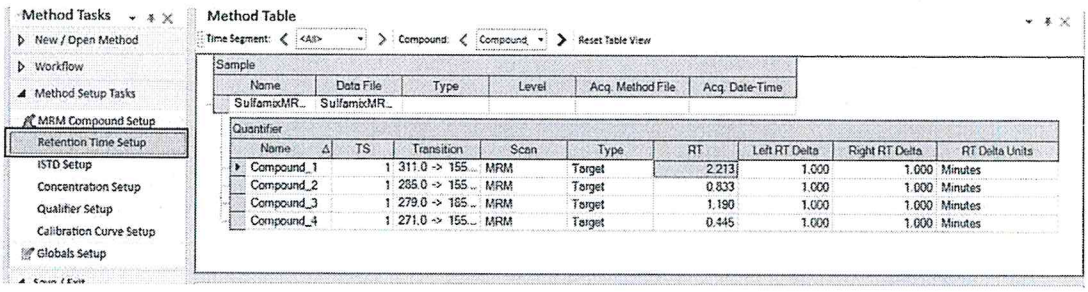
2. เมื่อเลือก Method ได้แล้ว จะปรากฏหน้าต่างเพื่อเลือกไฟล์ที่จะนำมาสร้างวิธีการคำนวณ โดยหลักในการเลือกจะเลือกไฟล์ที่เป็นสารมาตรฐานที่มีความเข้มข้นสูงสุด ทั้งนี้ เพื่อความชัดเจนของข้อมูลที่ใช้ในการกำหนดค่าต่างๆ
3. หลังจากเลือกไฟล์ที่ต้องการแล้วจะปรากฏหน้าต่างในการตั้งค่าต่างๆ ซึ่งจะมีหัวข้อแยกตามลำดับตาม Navigator Menu (Method Tasks)



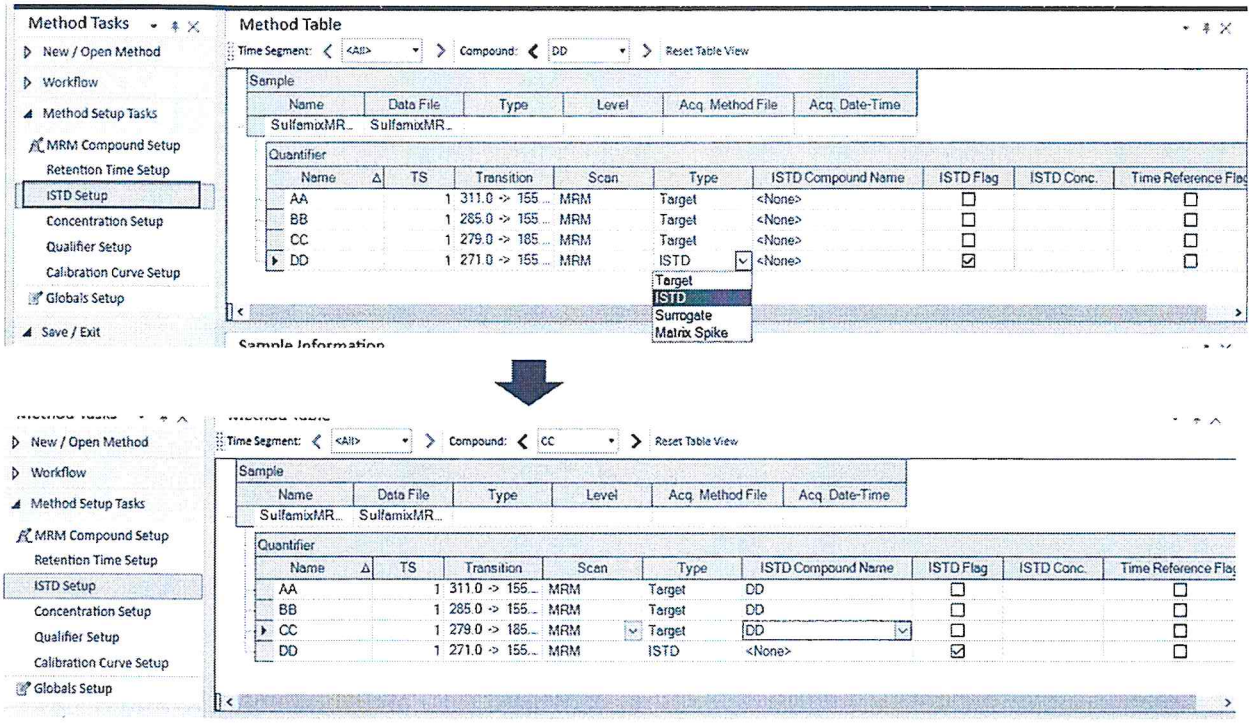
4. คลิกเลือก MRM Compound Setup จาก Method Setup Task เพื่อทำการตั้งค่า MRM โดยโปรแกรมจะเลือก Precursor Ion, Product Ion, ชนิดของ Ion (Type) ให้อัตโนมัติ โดยจะเลือกจากค่าสัญญาณ (Response) ณ เวลา RT นั้นๆ ที่มีค่าสัญญาณสูงสุด แต่หากต้องการเลือก Ion ใหม่ สามารถทำได้ โดยคลิกเลือก จาก List Ion ที่ทำการตรวจวัดทั้งหมดได้



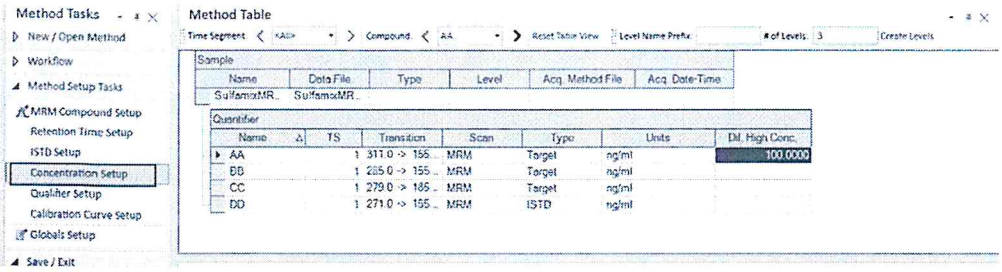
5. คลิกเลือก Retention Time Setup จาก Method Setup Tasks เพื่อทำการตั้งค่า Retention Time โปรแกรมจะทำการเลือกให้โดยอัตโนมัติ ซึ่งหากพบว่า RT ที่โปรแกรมเลือกให้ไม่ถูกต้อง ผู้ใช้สามารถแก้ไขให้ถูกต้องได้ โดยดับเบิ้ลคลิกที่ช่อง RT ของ สารที่ต้องการแก้ไข ซึ่ง Chromatogram จะแสดงภาพ ณ RT ที่ได้เลือกไว้ตามข้อมูลที่ได้จาก Data file นั้นๆ



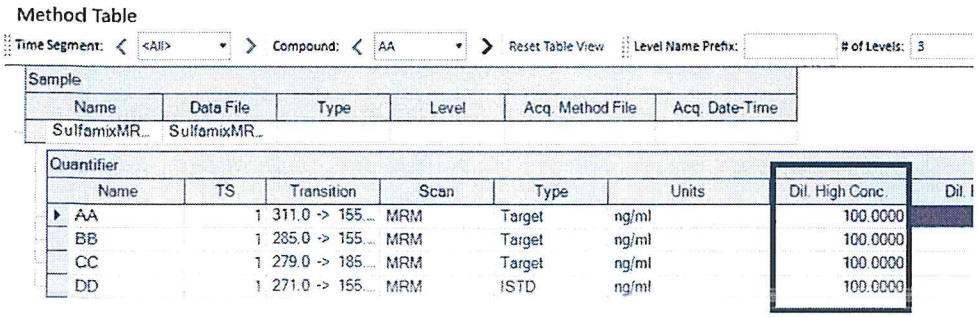
6. ในกรณีคำนวณแบบใช้ ISTD ให้คลิกเลือก ISTD Setup จาก Method Setup Tasks เพื่อทำการตั้งค่า Internal Standard (ISTD) หากยังไม่ได้มีการกำหนดสารที่เป็น ISTD ตั้งแต่การตั้งค่า ใน Acquisition Method สามารถตั้งค่าได้ที่เมนูนี้ โดยเลือกชนิด (Type) ของ Internal Compound เป็น ISTD จากนั้นคลิก Check Box ใน ISTD Flag และ Type ใน Compound อื่นๆ เลือกเป็น Target จากนั้นระบุชื่อสารที่จะใช้เป็น ISTD ที่ต้องการใช้คำนวณด้วย และใส่ความเข้มข้นของ ISTD



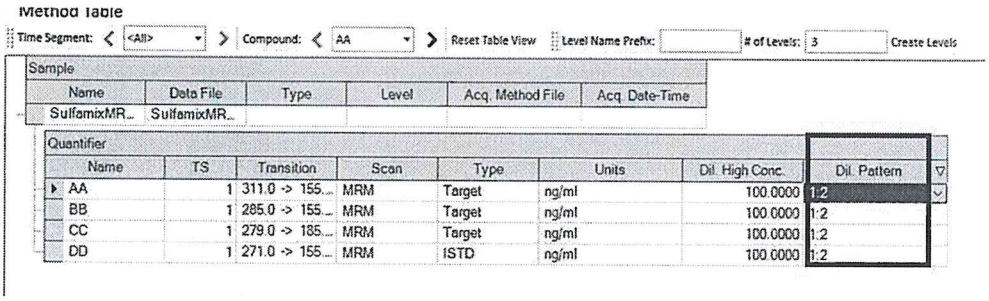
7. คลิกเลือก Concentration Setup จาก Method Setup Tasks เพื่อทำการตั้งค่า ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน (Concentration Setup) เพื่อสร้าง Calibration curve โดย



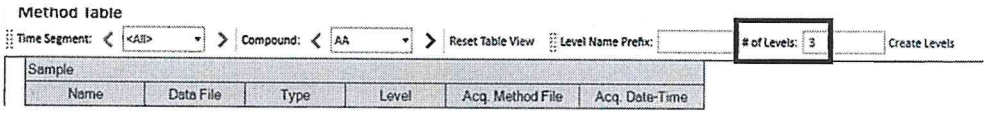
a. ใส่ค่าความเข้มข้นที่สูงที่สุดลงในช่อง Dil. High Conc.



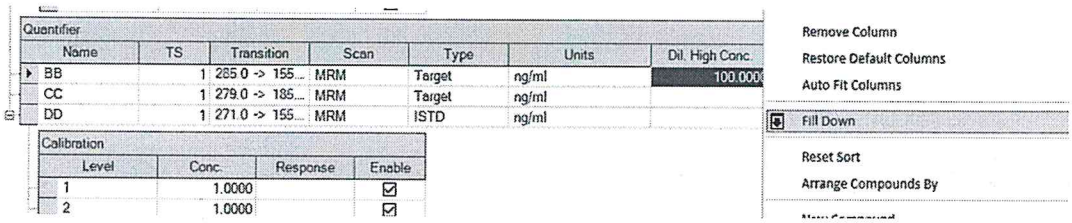
b. ใส่ค่าอัตราส่วนการเจือจางของสารแต่ละลำดับ เช่น ความเข้มข้นลำดับดังนี้ 100, 50, 25 ดังนั้นการกรอกค่าอัตราส่วนการเจือจาง จะเป็น 1:2 เป็นต้น



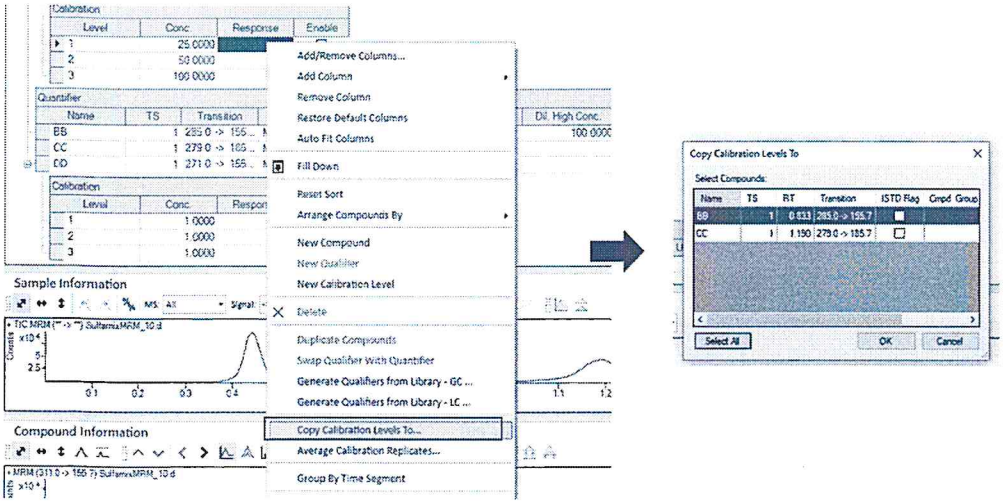
c. ใส่จำนวน Calibration level ที่ ช่อง Create Level และคลิก Create Levels



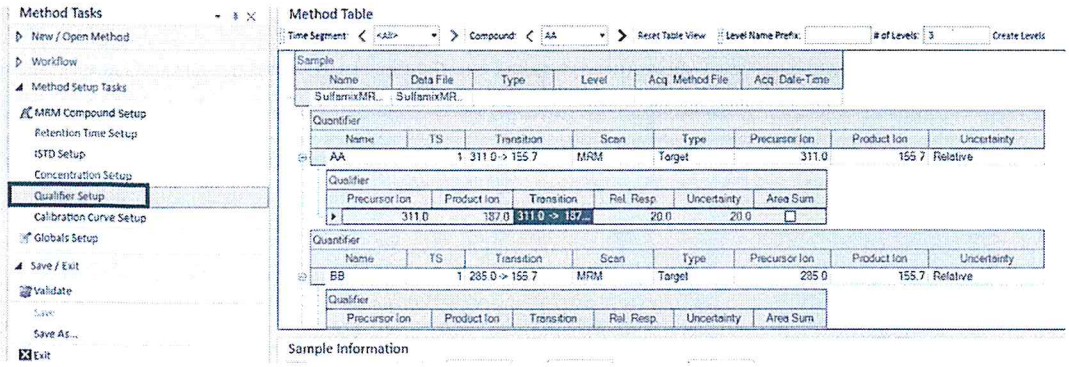
d. หากต้องการกำหนดค่า Dil. High Conc. เหมือนกันทุกๆ Compound หรือ Dil. Pattern สามารถคลิกขวาที่ช่องที่ได้กรอกค่าไว้แล้ว เลือก Fill Down



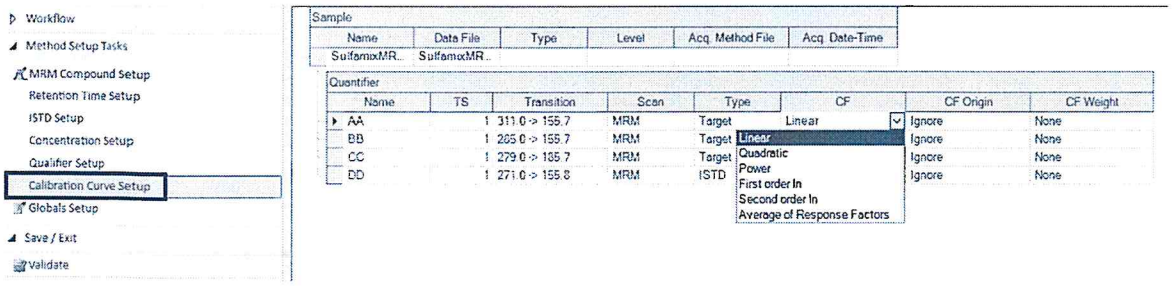
e. หากต้องการกำหนดการตั้ง Concentration Level ให้เหมือนกันทุก Compound หรือ บาง Compound สามารถเลือกทำได้โดยคลิกขวาที่ชื่อ Compound นั้นๆ เลือก Copy Calibration Level to จะปรากฏชื่อ Compound ทั้งหมดขึ้นมา ให้เลือก Compound ที่จะใช้ค่าเดียวกันและมีความเข้มข้น ตรงกับ Compound ที่ได้กำหนดไว้แล้ว



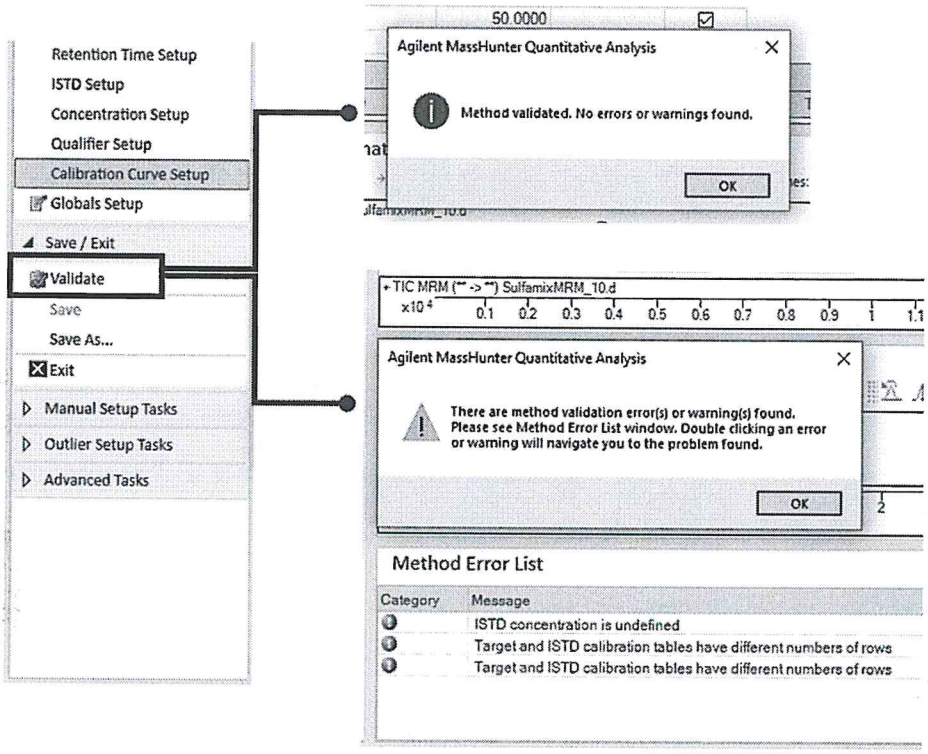
8. คลิกเลือก Qualifier Setup จาก Method Setup Tasks เพื่อทำการตั้งค่า Qualifier Ion โดยค่าต่างๆ ที่ปรากฏเครื่องจะเลือกให้อัตโนมัติ แต่หากต้องการเปลี่ยนสามารถทำได้คลิกที่ช่องที่ต้องการแก้ไข แล้วทำการแก้ไขตามต้องการ



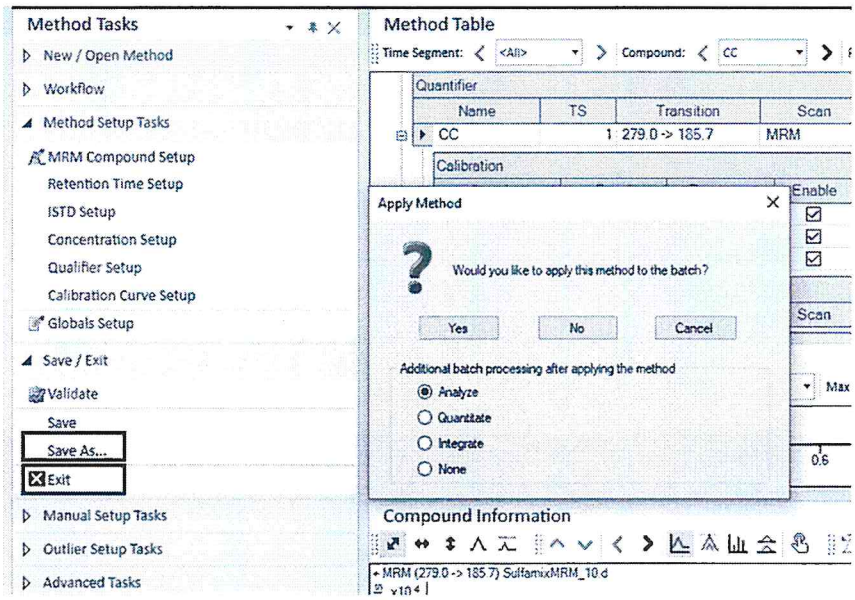
9. คลิกเลือก Calibration Curve Setup จาก Method Setup Tasks เพื่อทำการตั้งค่ากราฟมาตรฐาน (Calibration Curve Setup) เป็นการตั้งค่าชนิดของ Calibration Curve ซึ่งสามารถแก้ไขได้ โดยเลือกจาก Drop down list ที่แสดงในตาราง



10. เมื่อทำการตั้งค่าและตรวจสอบค่าพารามิเตอร์ต่างๆ เรียบร้อยแล้ว ให้ทำการ Validate เพื่อตรวจสอบความถูกต้องในการตั้งค่าได้ ซึ่งจะปรากฏหน้าต่างข้อความ หลังจาก คลิก Validate ดังนี้ หากพบข้อผิดพลาด จะปรากฏตำแหน่งที่เกิดข้อผิดพลาด ใน Method Error List เมื่อคลิกข้อความที่เกิดข้อผิดพลาด จะทำให้กลับไปแก้ไข ณ จุดที่ผิดพลาดได้ทันที

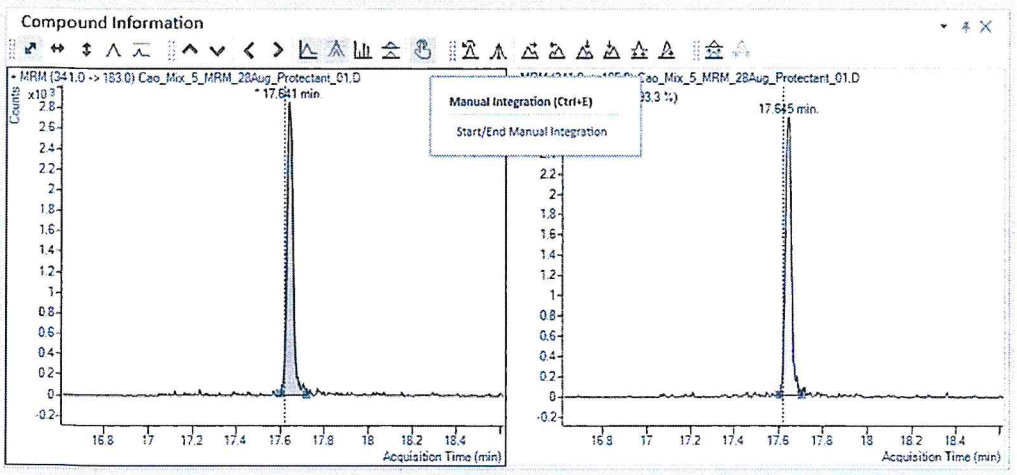


11. เมื่อไม่พบข้อผิดพลาดแล้ว Save As เพื่อบันทึกการตั้งค่าต่างๆใน method จากนั้นคลิก Exit จะปรากฏหน้าต่างขึ้นมา เพื่อถามว่า ต้องการใช้ Method ดังกล่าวนี้ใน Batch ที่ได้สร้างขึ้นมาแล้วหรือไม่ หากต้องการ ให้ คลิก “Yes” หาก ไม่ต้องการ ให้คลิก “No” หากต้องการใช้ method (คลิก “Yes”) คลิกที่ “Analyze” เพื่อให้ได้ผลการคำนวณตามวิธีที่ต้องการ

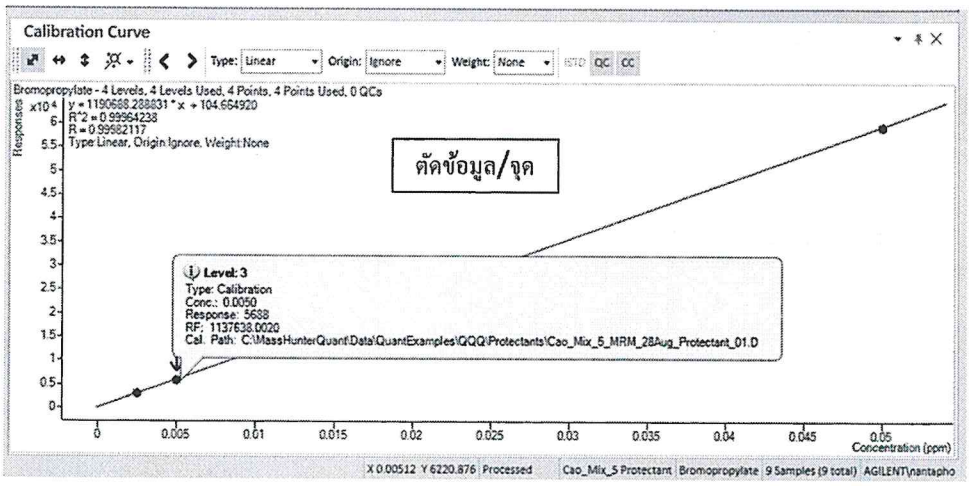


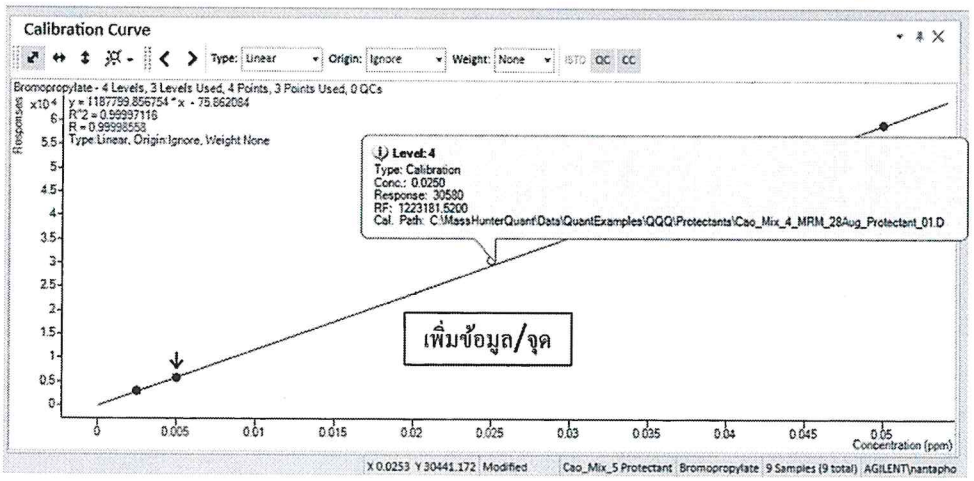
12. เมื่อได้ผลการคำนวณแล้ว หากต้องการแก้ไข แบบ Manual สามารถทำได้ ดังนี้

- Manual Integrate ให้คลิกเลือกไอคอน  เพื่อทำการ Integrate แบบ Manual โดยการลากเส้นเอง หากทำการ Integrate แล้วจะปรากฏเครื่องหมาย ☑ ในคอลัมน์ MI (Manual Integrate)

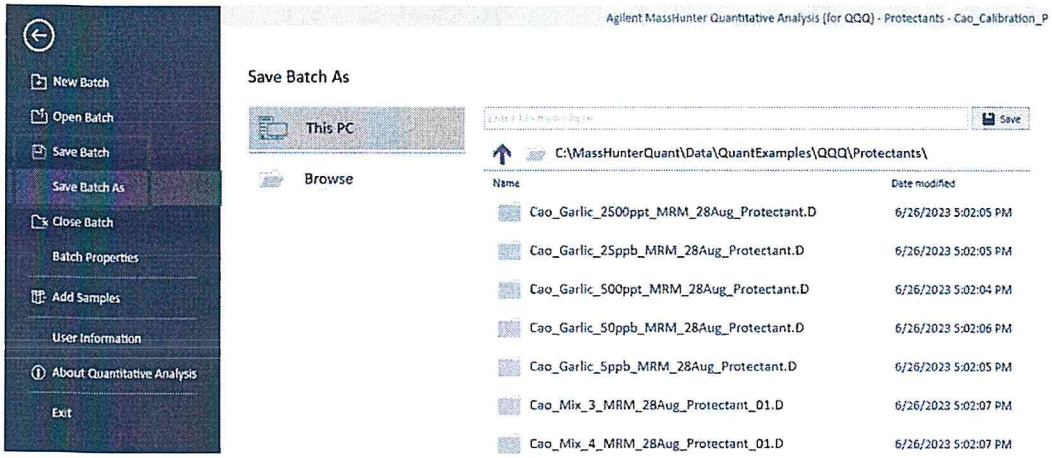


- เลือกตัดข้อมูลที่นำมาใช้สร้าง Calibration Curve หากต้องการตัดข้อมูล หรือ จุดใดบนกราฟ ให้เลื่อนเมาส์ ไปทำจุดนั้น จะปรากฏเครื่องหมาย✕ บริเวณจุดนั้น จากนั้นให้คลิกที่จุด จะพบว่า จากจุดสีทึบ จะกลายเป็นจุดโปร่ง และสมการเส้นตรงก็จะเปลี่ยนไป สามารถเพิ่มข้อมูลที่เคยตัดออกไปแล้ว ให้กลับมาที่กราฟได้อีก โดยทำเช่นเดียว แต่จะปรากฏเครื่องหมาย ✓ บริเวณจุดที่ต้องการ



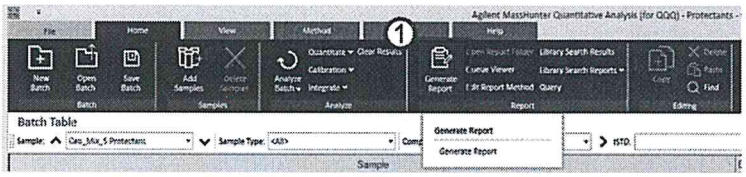


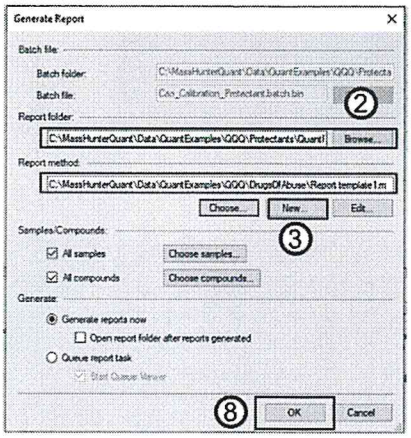
13. เมื่อได้ผลการคำนวณเรียบร้อยแล้วสามารถบันได้โดย เลือก เมนู File > Save Batch หรือ Save Batch As

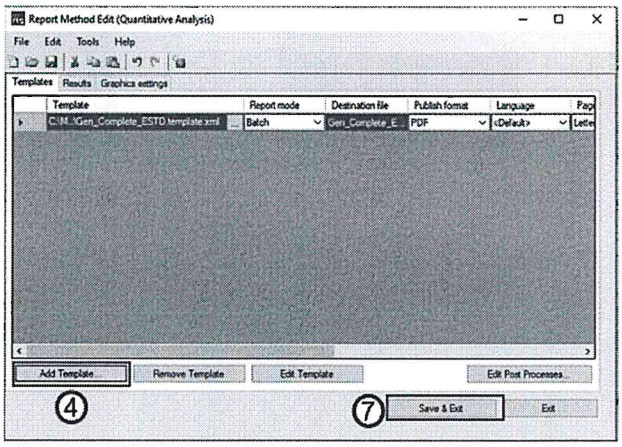


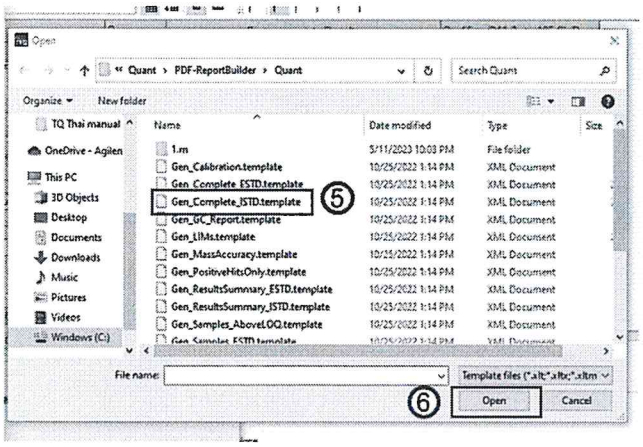
การพิมพ์รายงาน (Report)

1. Click ที่ Generate Report
2. จะปรากฏหน้าต่างเพื่อให้เลือกระบุ Report folder และ Report method
3. ในกรณีที่มี Report method แล้วกด Choose เพื่อเลือก Report method ในกรณีที่ยังไม่มีให้กด New เพื่อสร้าง Report method หรือกด Edit เพื่อแก้ไข
4. ในกรณีที่กด New จะมีหน้าต่างปรากฏขึ้น จากนั้นกด Add Template เพื่อเลือก Report template ที่ต้องการ หลังจากนั้นกด Save & Exit
5. จากนั้นคลิก OK โดย Report จะถูกสร้างขึ้นและเก็บใน folder path ที่ระบุไว้



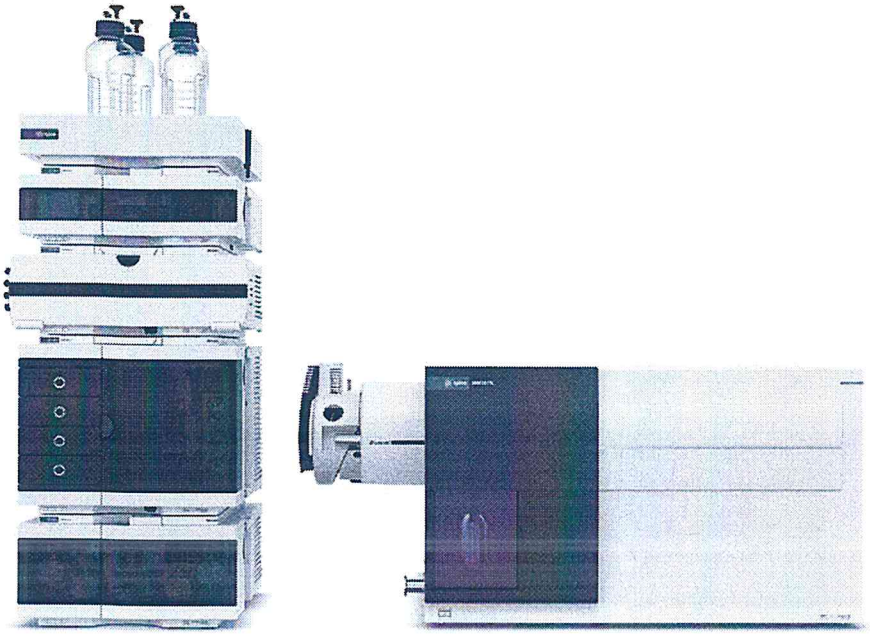






Agilent

คู่มือการบำรุงรักษาและการแก้ไขปัญหา เครื่อง LCMS QQQ G6400 series เบื้องต้น



Overview

Startup and Shutdown

Calibrant Delivery System and Divert Valve

Sources

Nebulizer

Corona Needle

Ion Transfer Capillary

High Pressure Ion Funnel

Desolvation Assembly and Ion Optics

Rough Pump

Tools and Parts

Agilent

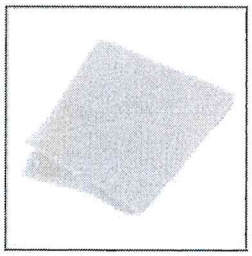
คู่มือนี้ ใช้สำหรับ การบำรุงรักษา และแก้ปัญหาเบื้องต้นสำหรับเครื่อง LC MSD QQQ G6400 Series สุดท้ายแล้ว ถ้าไม่สามารถหาคำตอบของปัญหาได้ กรุณาติดต่อ บริษัทเอจิเลนต์ เทคโนโลยีส์ จำกัด โทร 026376363

อุปกรณ์ที่ต้องใช้

- Screwdriver/ Torx (ไขควง)
- Wrench (ประแจปากตาย)
- Multimeter
- อุปกรณ์ที่มากับเครื่อง เช่น กล้องส่อง Nebulizer
- ผ้า lint-free cloth
- Cotton swab
- กระดาษทรายสีเทา 4000 หรือ 8000 grit
- ถุงมือ (powder free)

Tools needed

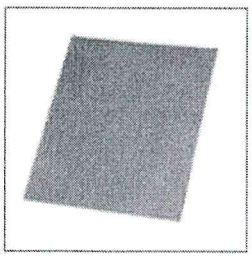
Clean powder-free nitrile gloves



Clean lint-free cloth

Clean wash bottle

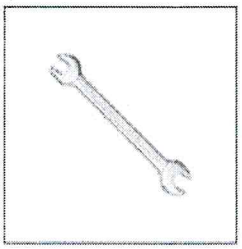
LC/MS-grade water



4000 grit abrasive paper

LC/MS-grade isopropanol

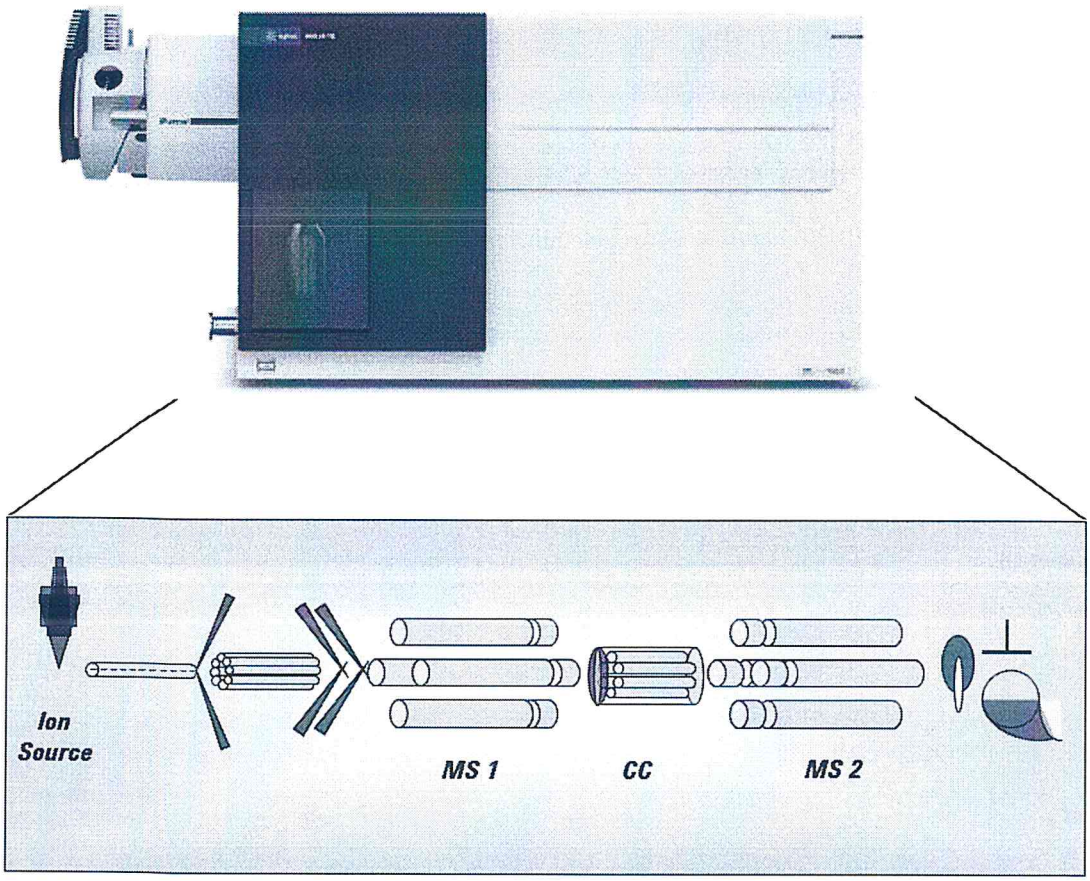
Torx screwdriver



open-end wrench

Agilent

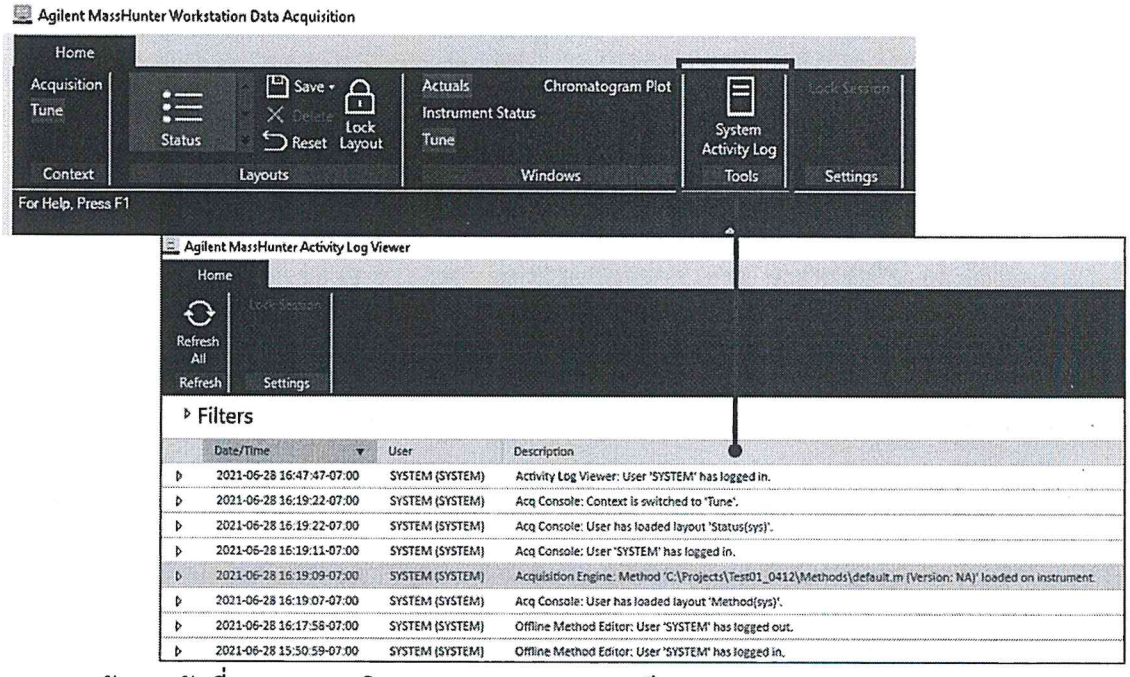
LCMS TQ



Error Message

Mass Hunter Software จะบอกข้อมูล เกี่ยวกับปัญหาของเครื่องอัตโนมัติ เมื่อมีการตรวจพบ การทำงานผิดปกติที่เกิดขึ้นใน Log book และจะแสดงสถานะเป็นสีแดง Error

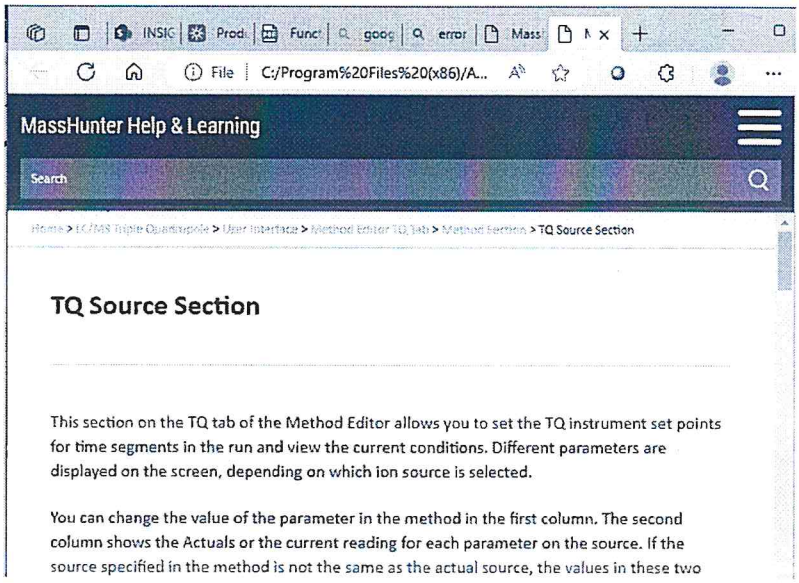
วิธีเปิด Activity Log



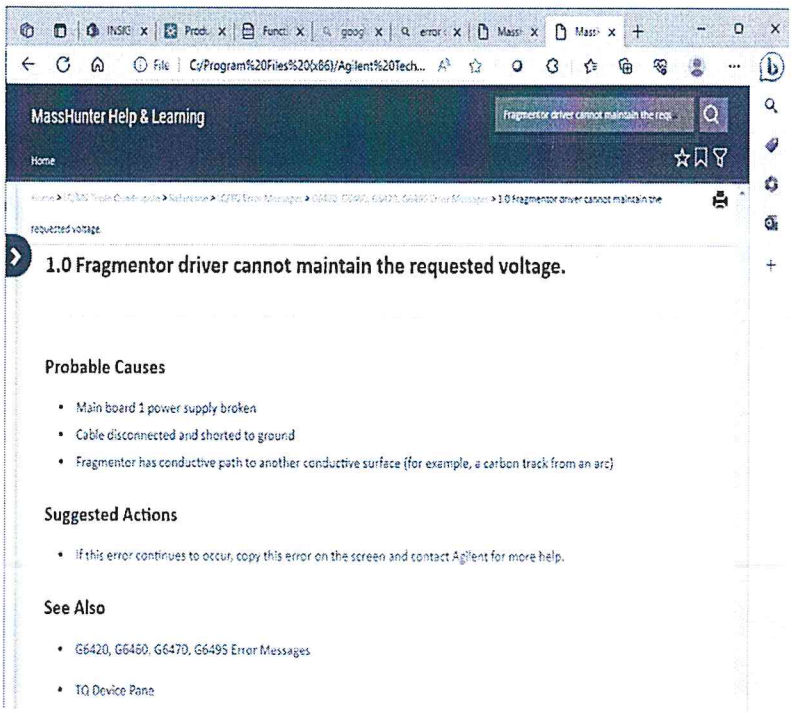
สังเกตุ วันที่ (Time) , ชนิด (Even Type) , รายละเอียด (Description)

ตัวช่วย (Help)

ใน MassHunter software จะมีวิธีแนะนำการใช้เครื่องมือ และ วิธีการแก้ปัญหาเบื้องต้น โดยกด F1 เพื่อแสดงหน้าต่าง MassHunter Help & Learning ดังแสดง



ในกรณีเครื่องเกิดปัญหาและแสดง error ให้พิมพ์ error ที่เกิดขึ้นในแถบ Search ดังตัวอย่างข้างล่าง “Fragmentor driver cannot maintain the requested voltage” software จะแนะนำวิธีแก้ปัญหาเบื้องต้นให้



Agilent

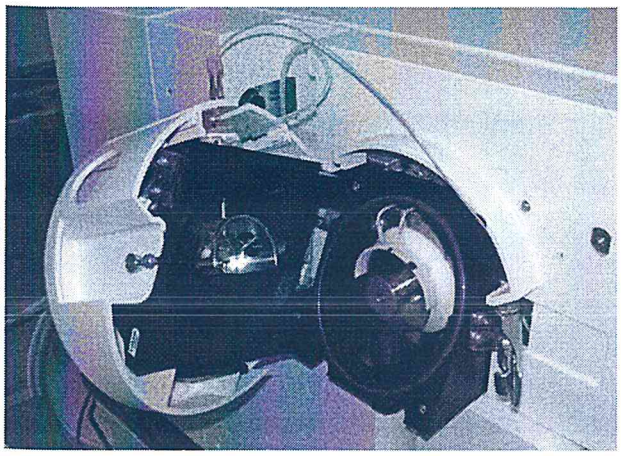
ตารางการบำรุงรักษาเครื่อง LC-MSD

เวลา	รายละเอียด
ทุกวัน	ตรวจสอบ รายละเอียดใน Method
	ตรวจสอบปริมาณ และระดับความดันของแก๊ซ N2
	ตรวจสอบ และ ทำความสะอาด Spray chamber และ nebulizer (Ion source)
	ตรวจสอบ และ ทิ้งสารละลายในขวด waste
ทุกสัปดาห์	ตรวจสอบการรั่วของท่อแก๊ซ
	ตรวจสอบน้ำมันในชุดกรองของ rotary pump
ทุกเดือน	ตรวจสอบ ระดับ น้ำมัน และ สีของน้ำมันใน rotary pump
	เปลี่ยน corona needle
	ตรวจสอบ oil mist filter
ทุกหกเดือนถึงหนึ่งปี	ตรวจสอบ และ ทำความสะอาด capillary
	เปลี่ยนน้ำมันใน rotary pump
	เปลี่ยน N2 gas filter
ทุกหนึ่งปี	เปลี่ยน oil mist filter
	ตรวจสอบ และ ทำความสะอาด skimer
ตามต้องการ	ตรวจสอบ และ ทำความสะอาด HED dinode
	เปลี่ยน electron multiplier

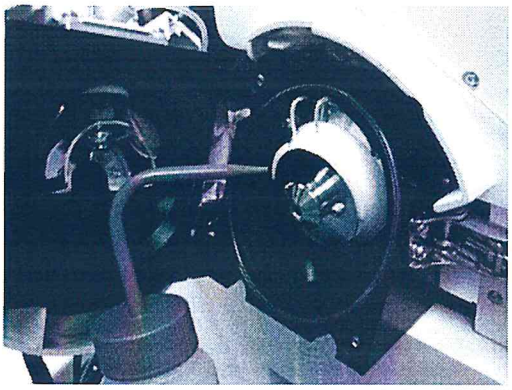
หมายเหตุ: ตารางนี้ออกแบบให้เหมาะสมกับลักษณะงาน ที่เปิดใช้งานเป็นประจำทุกวัน ลูกค้าสามารถที่จะปรับให้สอดคล้องกับงานของตนได้

การทำความสะอาด Spray chamber แบบทุกวัน

1. ให้ เครื่อง LC/MSD QQQ อยู่ในสภาวะ Standby mode
2. เปิด spray chamber



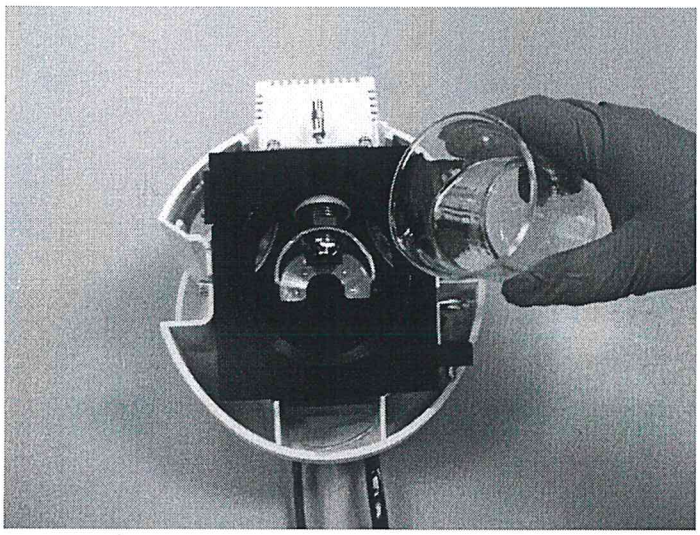
3. ถอด electro spray nebulizer
4. เช็ด spray shield ด้วยผ้า lint-free cloth ชุบ IPA ผสม น้ำ
5. ทำความสะอาด (rinse) ด้วย IPA ผสม น้ำ



6. อย่าฉีด IPA ผสม น้ำ เข้าตรง capillary
7. ใส่ electro spray nebulizer
8. ปิด spray chamber

การทำความสะอาด Spray chamber แบบสัปดาห์

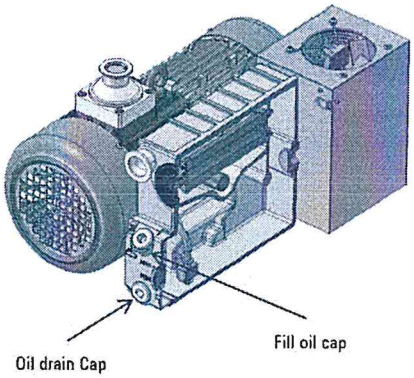
1. ให้ เครื่อง LC/MS QQQ อยู่ในสภาวะ Standby mode
2. ถอด electro spray nebulizer
3. ถอด spray chamber
4. ถอด spray shield และ stainless parts
5. ใส่ spray chamber ด้วย IPA ผสม น้ำ



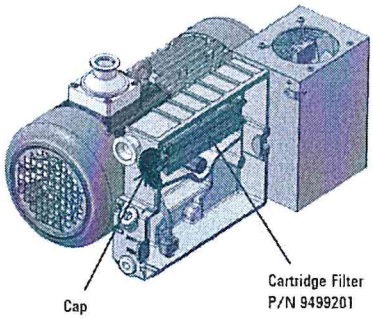
6. เช็ด spray chamber ด้วยผ้า lint-free cloth หรือ cotton swab ชุบ IPA ผสม น้ำ
7. ทำความสะอาด (rinse) ด้วย IPA ผสม น้ำ
8. ใช้กระดาษทรายสีเทา 4000 หรือ 8000 grit ขัด spray shield และ stainless parts
9. ล้างด้วยน้ำสะอาด และ sonicate ด้วย IPA ผสม น้ำ
10. ประกอบ spray shield และ stainless parts
11. ประกอบ spray chamber
12. ปิด spray chamber

การเปลี่ยน น้ำมัน Rough pump (สำหรับรุ่น MS40+)

1. ปิด LCMS-QQQ ดูวิธีปิดในคู่มือการใช้เครื่อง
2. รอจน Rough pump เย็นตัวลง
3. ถอดOil drain Cap และ Fill oil cap ออก ให้น้ำมันไหลออกให้หมด



4. ปิด Oil drain Capและเติม น้ำมัน จนเกือบเต็มระดับ maximum (ห้ามเกิน)
5. ปิดFill oil cap ด้านบน
6. ถอดเปลี่ยน Air filter



7. เปิด LC/MSD QQQ ดูวิธีเปิดในคู่มือการใช้เครื่อง

Agilent