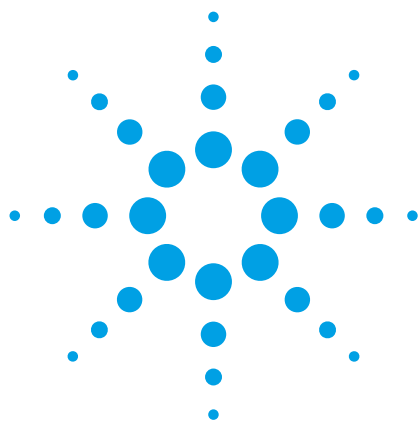




Tecnologia iFunnel para uma sensibilidade melhorada em LC/MS tandem

Agora disponível no novo sistema LC/MS 6490 Triplo Quadrupolo da Agilent

Síntese técnica

Autores

Paul Momoh, Anabel Fandino,
Ed Aisawa, Tim Schlabach, Ken Miller,
e George Stafford
Agilent Technologies, Inc.
Santa Clara, CA USA



O sistema LC 1290 Infinity da Agilent e o novo LC/MS 6490 Triplo Quadrupolo da Agilent com tecnologia iFunnel

Resumo

A ionização *electrospray* (ESI) tem provado ser sólida e amplamente aplicável para a análise de muitos tipos de compostos químicos. Os investigadores têm documentado que tipicamente muito menos do 1% dos íons do analito produzidos pela ESI, ingressam ao espectrômetro de massas e somente um em 10^3 a 10^5 desencadeiam uma resposta ao sinal no detector de MS1. Isto limita fundamentalmente a sensibilidade dos sistemas LC/MS. A nova tecnologia iFunnel da Agilent combinada com a alta geração de íons da fonte ESI, focando na tecnologia JetStream da Agilent com um conjunto hexa-capilar de amostragem, permitindo que uma fração muito maior do cone de íons do ESI entre no sistema ótico do espectrômetro de massas. Um exclusivo funil de íons de estágio duplo permite uma transmissão de íons aumentada, ao mesmo tempo que evacua uma carga de gás muito mais alta. O design inovador reduz a contaminação por elementos neutros melhorando significativamente o sinal em geral, reduzindo o ruído do sistema. Esta síntese técnica demonstra a tecnologia iFunnel no novo sistema LC/MS 6490 Triplo Quadrupolo, permitindo uma sensibilidade zeptomolar (10^{21} mol) pela primeira vez num espectrômetro de massas tandem do tipo quadrupolo a taxas de fluxo convencionais.



Agilent Technologies

Tecnologia Jet Stream da Agilent

No design do novo sistema LC/MS 6490 Triplo Quadrupolo, a Agilent fez uma abordagem holística para melhorar a sensibilidade, prestando especial atenção à formação de íons em fase gasosa e sua transferência subsequente para o espectrômetro de massas, ao mesmo tempo que promove ganhos na eficiência na transferência de íons, e redução de ruído no desempenho de todo o sistema.

Fotografias da região da cone do eletro spray revelam pelo menos duas causas de porque muitos íons do produto analisado se perdem durante o processo ESI de pressão atmosférica: a) o produto analisado é retido nas gotículas nebulizadas do spray devido a uma diluição insuficiente e b) muitas gotículas e íons dissolvidos se movem longe do orifício de entrada MS – devido ao fato de que os íons são ingressados em gás atmosférico, não é possível capturá-los todos usando somente um campo eletrostático.

A tecnologia Agilent Jet Stream (AJS) focando no gradiente térmico ajuda

a superar ambos os dois problemas e melhora a amostragem de ESI a pressão atmosférica. A tecnologia AJS usa calor para dissolver com eficiência as gotinhas criadas durante a nebulização na fonte de íons. Um micro pulverizador precisamente usinado rodeia as gotinhas de uma camada de gás super aquecido que cria uma dinâmica de fluxo que concentra os íons numa área do cone de íons do ESI, obtendo uma amostragem efetiva por parte do sistema MS. Usando gás de fluxo rápido aquecido a temperaturas de até 400 °C, confina a zona rica em íons a uma região de aproximadamente um quinto da cone do spray produzido por uma fonte padrão de ESI. O confinamento do spray se descreve na Figura 1 que compara a cone padrão da ESI com a cone menor da tecnologia AJS. A alta temperatura do gás foca o spray e produz tamanhos de gotículas substancialmente menores.

Comparando os sinais produzidos pela ESI ou AJS se demonstra que as intensidades do sinal são várias vezes mais altas com concentração térmica, como se mostra na **Figura 2**.

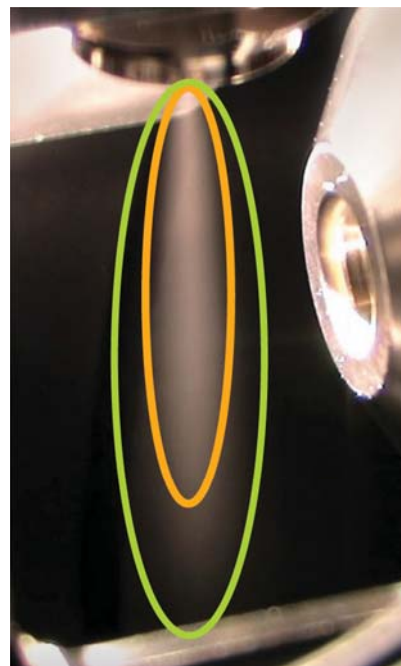
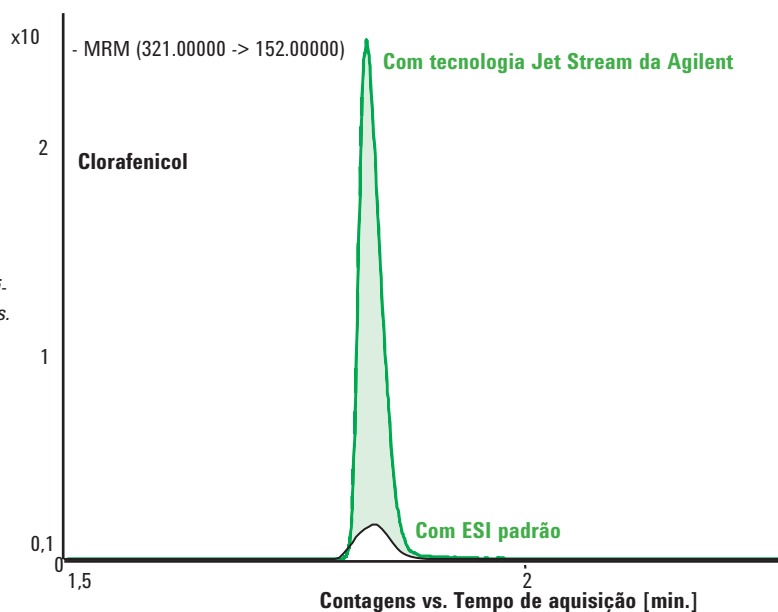


Figura 1. Confinamento do spray Agilent Jet Stream
Verde = ESI padrão
Laranja = Agilent Jet Stream

Figura 2. Comparação da intensidade do MRM do Clorafenicol disparado em água potável analisada em modo de íons negativos. O volume injetado foi de 5 µl de uma solução de 50 ppb.



Capilar de amostragem de seis furos

Além dos ganhos de sensibilidade, ensaios adicionais revelaram que muitos íons formados na cone observada do AJS, não foram capturados pelo espectrômetro de massa. Se realizaram ensaios para variar a posição lateral da cone do AJS na frente do capilar de entrada do espectrômetro de massas. Os dados na **Figura 3** mostram que a área de máxima geração de íons ocorre ao longo de uma região horizontal de 3-5 mm, no centro da cone. Os íons são geralmente capturados por um capilar individual de entrada para o sistema MS. Os capilares padrão da Agilent possuem um diâmetro interno de 600 µm.

Uma amostragem maior de íons deve ser possível aumentando a área de interface da entrada do capilar dentro da zona térmica de confinamento de íons. Sistemas MS anteriores tentaram aumentar a sensibilidade simplesmente aumentando o diâmetro de um capilar individual de entrada. Não chama a atenção que essas abordagens tenham mostrado ganhos limitados por não melhorarem significativamente a eficiência da amostragem de íons – a maior parte deles não são acessíveis de forma espacial e não são transmitidos para o espectrômetro de massas. Em capilares de diâmetro grande, a dinâmica de gás muda de fluxo laminar para fluxo turbulento, produzindo perda de íons. (Além disso, a carga de gás no espectrômetro de massas aumenta proporcionalmente ao diâmetro do capilar à 4ª potência, significando que até mesmo aumentos nominais no diâmetro, criam uma carga aumentada de gás atmosférico, e uma necessidade de novos sistemas extensivos de vácuo).

A aproximação alternativa é o uso de múltiplos capilares espalhados ao longo da parte central, rica em íons, da zona de confinamento térmico do AJS. Múltiplos capilares tem demonstrado

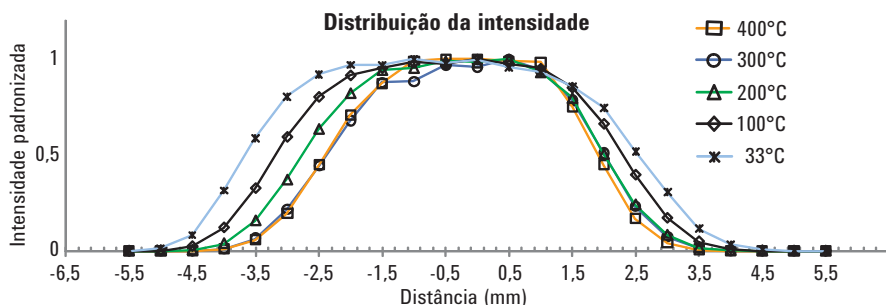


Figura 3. Intensidades padronizadas de íons quando a cone do spray do AJS é descentralizada lateralmente. A intensidade de íons mais alta ocorre numa banda de 3-5 mm de largura na frente do capilar de amostragem.

aumento da eficiência de amostragem de íons, e manutenção de um bom desempenho de diluição. Um conjunto circular de seis capilares, como se mostra na **Figura 4**, foi escolhido para o 6490 Triplo Quadrupolo. Os capilares se espalham numa distância horizontal de 3 mm, e fornecem uma interface de amostragem de alta eficiência, para os íons de fase de gás na zona de confinamento térmico do AJS. Também irão se obter benefícios com a ESI padrão, embora os ganhos são muito mais importantes com a zona de íons concentrados criados pelo AJS.

Além de incrementar o número de capilares, o comprimento do capilar foi diminuído em 50%, para diminuir

a resistência do fluxo de gás do capilar, minimizar a alta perda de mobilidade de íons, e assim melhorar ainda mais a amostragem a pressão atmosférica

Aumentar o número de capilares aumenta a carga de gás no espectrômetro de massas em proporção linear ao número de capilares. O capilar único no 6460 Triplo Quadrupolo conduz aproximadamente 2 L/min de gás atmosférico. O conjunto de amostragem com 6 capilares de amostragem conduz aproximadamente 23 L/min. Muito mais íons são amostrados a partir da zona de confinamento térmico do AJS, porém existe agora a necessidade de separá-los de um grande volume de gás.



Figura 4. Conjunto de amostragem de capilar de seis furos e placa de orifícios. O capilar de seis furos espalha a zona de confinamento térmico do AJS permitindo uma amostragem de íons muito maior.

Funil de íons duplo

A solução para este desafio tem sido alcançada adicionando um sistema de funil de íons – um elemento de óptica de íons que pode ser usado para capturar e confinar com eficiência íons muito dispersos, bem como direcionar o fluxo de íons através das etapas iniciais do sistema MS, que se encontram sob cargas de gás mais altas.

Foi escolhido uma montagem de funil de íons duplo que remove o gás em duas etapas, como mostrado na **Figura 5**. O funil inicial opera a alta pressão e é bombeado por um sistema de vácuo dedicado, enquanto a voltagem e RF do funil empurra os íons, e foca suas trajetórias para se alinhar com a entrada ao segundo funil, de baixa pressão. (Note que o primeiro funil está descentralizado do capilar e

da entrada do segundo funil, para evitar que elementos neutros ingressem em direção à óptica de íons). O processo se repete com um segundo funil de íons de baixa pressão. Uma quantidade reduzida de gás emerge do segundo funil, comparada com uma montagem padrão de óptica *Skimmer/Q0*, e reduz a carga na bomba turbo, melhorando a vida de serviço.

A capacidade de foco térmico do AJS colima a cone de spray da ESI, e assim mais íons podem ser capturados pela montagem do capilar. O conjunto de amostragem do hexacapilar de seis furos captura um ângulo sólido maior que cone do spray, e trabalha junto com o funil de íons duplo, que separa o gás e elementos neutros dos íons. O resultado combinado de todos os três elementos da tecnologia iFunnel é um ganho drástico na sensibilidade.

A tecnologia iFunnel da Agilent combina a exclusiva **tecnologia Agilent Jet Stream** com um **conjunto de amostragem de capilar de seis furos** e montagem de **funil de íons de etapa dupla**, aumentando a amostragem de íons e transmissão da cone do spray do AJS para a óptica focada em íons do 6490.

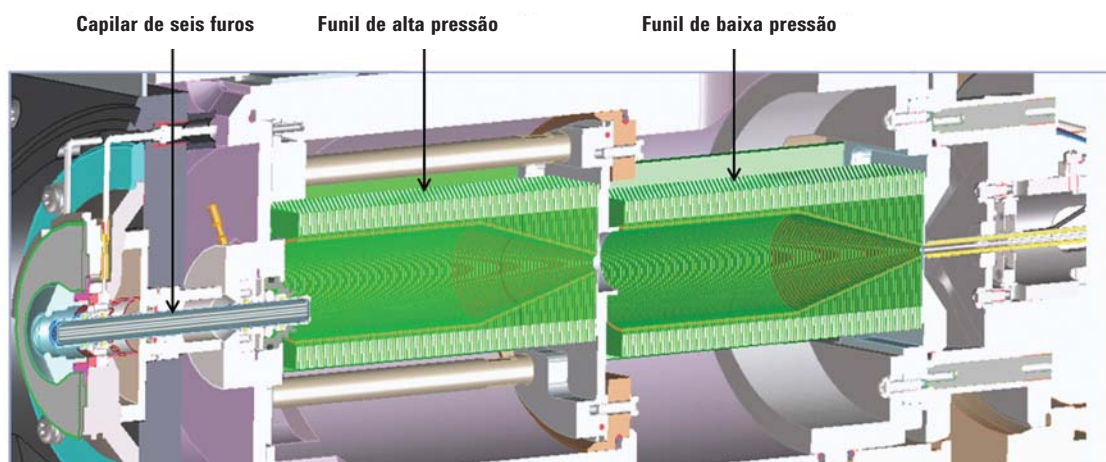


Figura 5. A montagem do funil de íons duplo iFunnel remove gás atmosférico e elementos neutros, e foca e dirige íons para a óptica de baixa pressão do LC/MS 6490 Triplo Quadrupolo da Agilent.

Ganhos de sensibilidade com tecnologia iFunnel no 6490 Triplo Quadrupolo

O novo 6490 Triplo Quadrupolo com tecnologia iFunnel mostra um ganho de dez vezes no sinal-ruído do alprazolam, em relação ao 6460 Triplo Quadrupolo com AJS e um capilar de amostragem simples (**Figura 6**). Ganhos significativos tem sido observados na sensibilidade de muitos compostos nos modos de íon positivo e íon negativo, com o novo 6490 Triplo Quadrupolo.

Ganhos de sensibilidade com a tecnologia de iFunnel ocorrem ao longo do espectro de massas como se mostra na **Figura 7**. O ganho médio na intensidade do sinal é

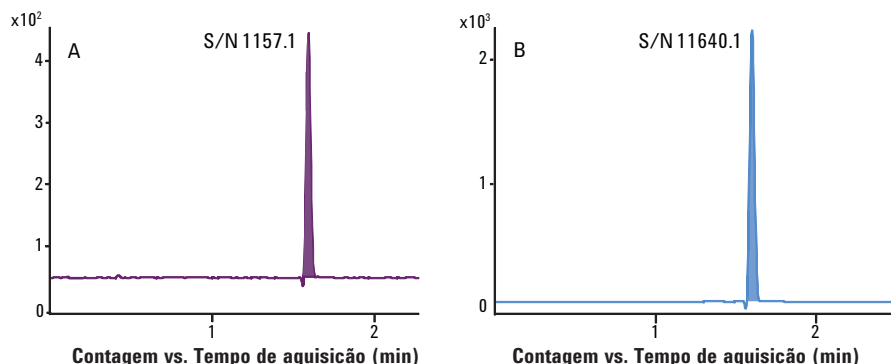


Figura 6. Alprazolam, 1 pg em coluna A. 6460 padrão com Agilent Jet Stream: **S/N = 1.157:1**
B. Novo 6490 com tecnologia iFunnel: **S/N = 11.640:1**

de aproximadamente 6 vezes para o modo ESI positivo. Esses ganhos são tipicamente consistentes ao longo de toda a faixa de massa do 6490 Triplo Quadrupolo.

Os aumentos na intensidade de íons são ainda mais pronunciados para íons negativos como se mostra na **Figura 8**. O ganho médio na intensidade do sinal foi de 10 vezes ao longo da variação de massa do 6490 Triplo Quadrupolo.

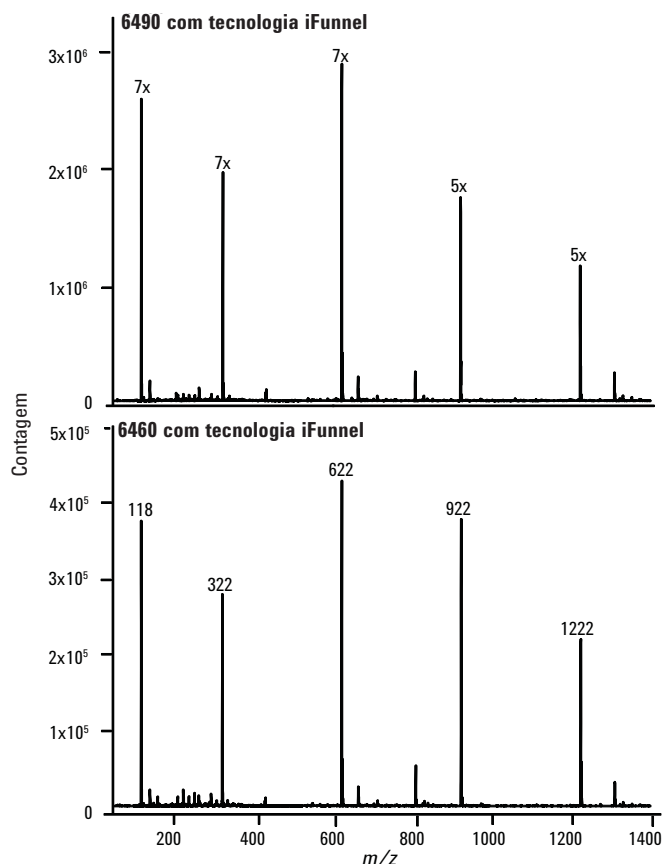


Figura 7. Intensidade de sinal dos padrões de calibração no modo ESI positivo do 6490 Triplo Quadrupolo (topo), e 6460 Triplo Quadrupolo (abaixo), mostram incrementos ao longo de uma ampla faixa de massa.

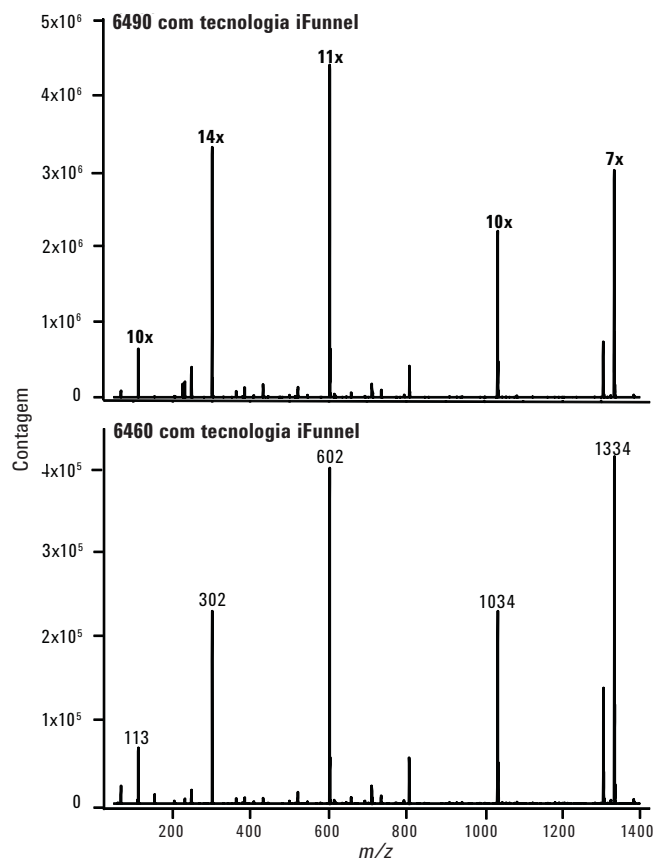


Figura 8. Intensidade de sinal dos padrões de calibração no modo ESI negativo do 6490 Triplo Quadrupolo (topo) e 6460 Triplo Quadrupolo (abaixo), mostram incrementos ao longo de uma ampla faixa de massa.

Ganhos drásticos na intensidade do sinal alcançados com a tecnologia **iFunnel refletem** em limites de detecção melhorados significativamente. Injetando somente 100 atogramas de verapamil “on column” produz um resposta que é claramente distinguível do ruído (**Figura 9**). O limite de detecção neste caso é aproximadamente **100 zeptomoles** de verapamil.

Amostras de matrizes complexas tais como plasma e urina representam um desafio analítico maior. Uma solução para aumentar a especificidade em bioanálise é diminuir a janela de isolamento do íon precursor para eliminar interferências químicas potenciais. Isto se mostra na **Figura 10** para a análise de 2,5 fg de propionato de fluticasona em plasma. O limite de detecção (LOD) com janela de massa estreita (0,4 m/z) é duas vezes mais alto que a uma resolução menor (0,7 m/z), devido a uma diminuição substancial no ruído químico. O LOD a 0,4 m/z é aproximadamente 1 fg.

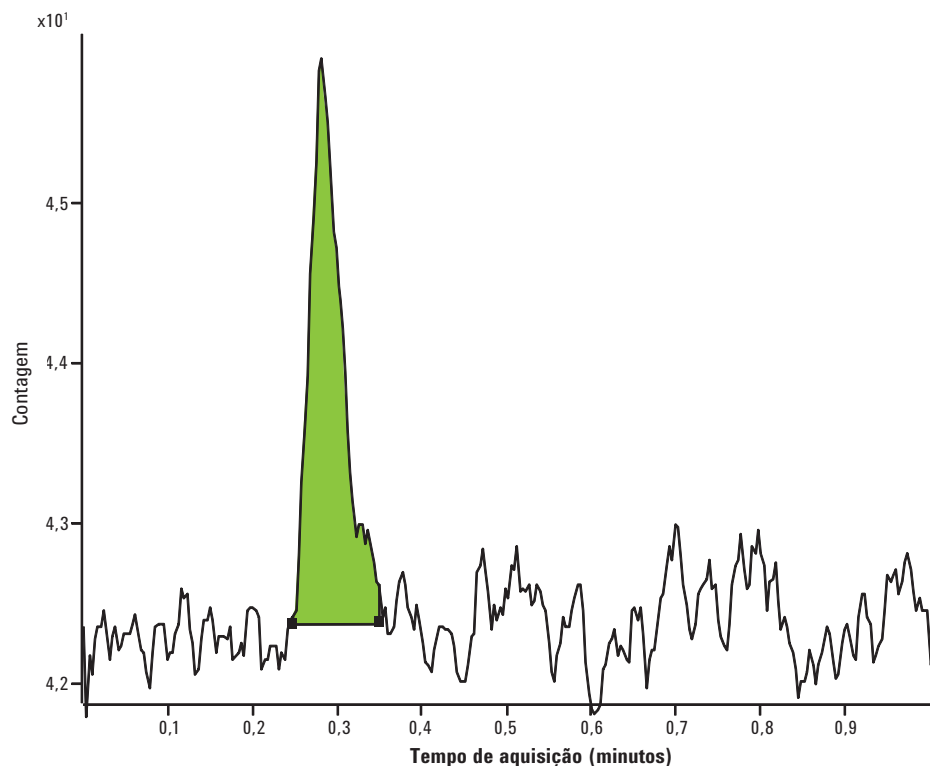


Figura 9. 100 atogramas de verapamil, “on-column”, analisadas com o novo 6490 Triplo Quadrupolo.

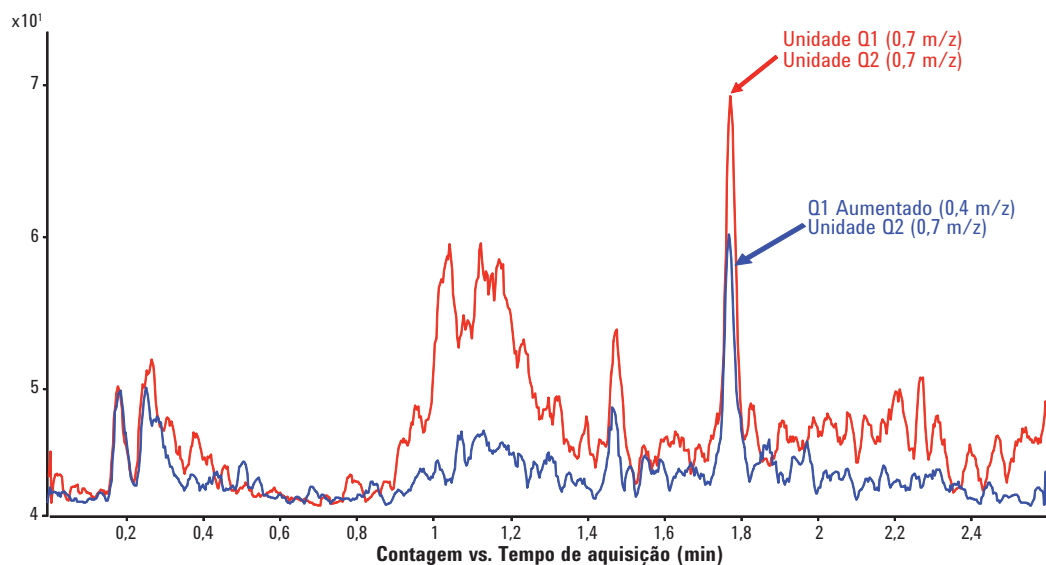


Figura 10. 2,5 fg de propionato de fluticasona de uma amostra de plasma. Dados MRM usando uma resolução de isolamento de precursor de 0,7 m/z (vermelho) e 0,4 m/z (azul). O isolamento estreito reduz o sinal não específico e melhora os limites de detecção

Resumo

Novo 6490 Triplo Quadrupolo com tecnologia iFunnel

- Ganhos estáveis, significativos em sensibilidade LC/MS tandem.
- Melhoria drástica na sensibilidade tanto no modo positivo quanto no modo negativo.
- Design robusto e resistente à contaminação
- Faixa dinâmica linear de até 6 ordens de magnitude
- Resolução Q1 0,4 m/z para um melhor isolamento do precursor
- Limites de detecção zeptomolar para alguns compostos
- Limites de detecção de atograma para compostos em matriz

Referências

1. J. S. Page, R. T. Kelly, K. Tang, R. D. Smith, "Ionization and transmission efficiency in an electrospray ionization-mass spectrometry interface," J. Am. Soc. Mass Spectrom., 18:1582-1590, **2007**.

www.agilent.com/chem/qqq

Esse material foi projetado para fins de investigação, e não para o uso em procedimentos de diagnóstico.

A Agilent Technologies não será responsável pelos erros contidos neste documento ou por danos incidentais ou consequenciais em relação com o fornecimento, desempenho ou uso deste material.

© Agilent Technologies, Inc. 2010
Impresso nos EUA - 21 de maio, 2010
5990-5891PTBR



Agilent Technologies