

**Sistema LC/MS Agilent
serie 6400 triplo
quadrupolo**

Guida ai concetti

Quadro d'insieme



Agilent Technologies

Informazioni sul documento

© Agilent Technologies, Inc. 2012

Nessuna sezione del presente manuale può essere riprodotta in qualsiasi forma o con qualsiasi mezzo (inclusa la memorizzazione in un sistema elettronico di reperimento delle informazioni o la traduzione in un'altra lingua) senza previo consenso scritto di Agilent Technologies, Inc. secondo quanto stabilito dalle leggi sul diritto d'autore in vigore negli Stati Uniti d'America e in altri Paesi.

Codice del manuale

G3335-94127

Edizione

Revisione A, marzo 2012

Stampato in USA

Agilent Technologies, Inc.
5301 Stevens Creek Blvd.
Santa Clara, CA 95051

Microsoft® e Windows® sono marchi di Microsoft Corporation registrati negli Stati Uniti.

Revisione del software

La presente guida si applica al software MassHunter di Agilent, il programma di acquisizione dati per la serie 6400 triplo quadrupolo, versione B.05.00 o superiore.

Per eventuali commenti in merito alla presente guida, inviare un'e-mail a feedback_lcms@agilent.com.

Garanzia

Le informazioni contenute in questo documento sono fornite allo stato corrente e sono soggette a modifiche senza preavviso nelle edizioni future. Nei limiti consentiti dalla legge, Agilent non concede alcuna garanzia, esplicita o implicita, relativamente a questo manuale e a qualsiasi informazione in esso contenuta, incluse tra l'altro le garanzie implicite di commerciabilità e di idoneità per uno scopo specifico. Agilent non sarà responsabile di eventuali errori presenti in questo manuale o di danni incidentali o conseguenti connessi alla fornitura, alle prestazioni o all'uso o di questo documento o di qualsiasi informazione in esso contenuta. In caso di separato accordo scritto fra Agilent e l'utente con diverse condizioni di garanzia relativamente al contenuto di questo documento in conflitto con le condizioni qui riportate, prevarranno le condizioni dell'accordo separato.

Licenze sulla tecnologia

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

Legenda dei diritti limitati

Diritti limitati del governo degli Stati Uniti. I diritti relativi al software e ai dati tecnici concessi al governo federale includono esclusivamente quei diritti forniti di norma ai clienti degli utenti finali. Agilent fornisce la presente licenza commerciale di uso comune relativa al software e ai dati tecnici ai sensi di FAR 12.211 (Dati tecnici) e 12.212 (Software per computer) e, per il Dipartimento della Difesa, DFARS 252.227-7015 (Dati tecnici - Articoli commerciali) e DFARS 227.7202-3

(Diritti relativi al software per computer ad uso commerciale o alla documentazione software per computer) Informazioni sulla sicurezza

ATTENZIONE

La dicitura **ATTENZIONE** indica la presenza di condizioni di rischio. L'avviso richiama l'attenzione su una procedura operativa o una prassi che, se non eseguite in modo corretto o osservate attentamente, possono comportare danni al prodotto o la perdita di dati importanti. In presenza della dicitura **ATTENZIONE** interrompere l'attività finché le condizioni indicate non siano state perfettamente comprese e soddisfatte.

AVVERTENZA

La dicitura **AVVERTENZA** indica la presenza di condizioni di rischio. L'avviso richiama l'attenzione su una procedura operativa o una prassi che, se non eseguita correttamente o attenendosi scrupolosamente alle istruzioni, potrebbe causare gravi lesioni personali o la perdita della vita. In presenza della dicitura **AVVERTENZA** interrompere l'attività finché le condizioni indicate non siano state perfettamente comprese e soddisfatte.

In questa guida...

La Guida ai concetti presenta il "Quadro d'insieme" del sistema LC/MS Agilent serie 6400 triplo quadrupolo che aiuterà a comprendere il funzionamento dell'hardware e del software.

1 Introduzione

Informazioni generali sul sistema Agilent serie 6400 triplo quadrupolo.

2 Funzionamento interno - MS triplo quadrupolo e MS quadrupolo singolo a confronto

Concetti alla base del funzionamento dello spettrometro di massa Agilent a triplo quadrupolo

3 Sensibilità del sistema MS Agilent triplo quadrupolo

Come lo spettrometro di massa Agilent a triplo quadrupolo raggiunge un'elevata sensibilità.

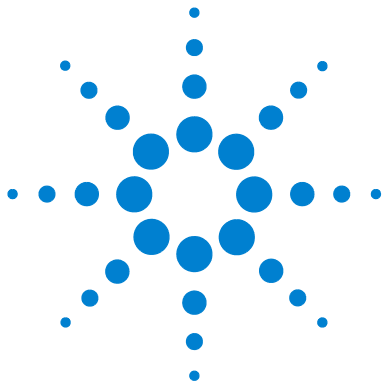
4 Software MassHunter di Agilent - Acquisizione dati per la serie 6400 triplo quadrupolo

Concetti alla base della progettazione del software MassHunter di Agilent, il programma di acquisizione dati per triplo quadrupolo.

Contents

1	Introduzione	7
	Il sistema Agilent	8
	Aiuto per le applicazioni	9
	Aiuto per l'acquisizione	10
	Aiuto per l'analisi dei dati	11
2	Funzionamento interno - MS triplo quadrupolo e MS quadrupolo singolo a confronto	13
	Funzionamento MS quadrupolo singolo	14
	Progettazione di uno spettrometro di massa a quadrupolo singolo	14
	Funzionamento di uno spettrometro di massa a quadrupolo singolo	15
	Funzionamento MS triplo quadrupolo	22
	Progettazione di un sistema MS Agilent triplo quadrupolo	22
	Miglioramenti innovativi del modello 6490 triplo quadrupolo	24
	Miglioramenti innovativi del modello 6460 triplo quadrupolo	26
	Miglioramenti del modello 6430 triplo quadrupolo	28
	Miglioramenti del modello 6420 triplo quadrupolo	28
	Funzionamento di uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo	29
	Funzionamento dell'MRM dinamico	31
	Funzionamento di un MRM dinamico attivato	34

3	Sensibilità del sistema MS Agilent triplo quadrupolo	37
	Migliore sensibilità con MS Agilent triplo quadrupolo	38
	Riduzione del rumore	38
	Esempio di riduzione del rumore chimico	41
	Linearità del sistema MS Agilent serie 6400 triplo quadrupolo	43
	Funzionamento dei componenti per il miglioramento della sensibilità	44
	La tecnologia iFunnel di Agilent	44
	La tecnologia Agilent Jet Stream	45
	Sorgenti ioniche LC/MS	47
	Ottica ionica anteriore	53
	Cella di collisione	55
	Rivelatore	60
	Sistema di pompaggio	61
4	Software MassHunter di Agilent - Acquisizione dati per la serie 6400 triplo quadrupolo	63
	Calibrazione	65
	Acquisizione	67



1 Introduzione

Il sistema Agilent	8
Aiuto per le applicazioni	9
Aiuto per l'acquisizione	10
Aiuto per l'analisi dei dati	11

Il presente capitolo offre una panoramica dei componenti LC/MS Agilent serie 6400 triplo quadrupolo e del funzionamento del sistema.



Il sistema Agilent

ESI - Ionizzazione per
elettronebulizzazione
IAPCI - Ionizzazione chimica a
pressione atmosferica
APPI - Fotoionizzazione a
pressione atmosferica
HPLC-Chip/MS - Cromatografia
liquida a elevate prestazioni su chip
MMI - Ionizzazione multimodale

È possibile configurare un sistema LC/MS Agilent serie 6400 triplo quadrupolo in numerose configurazioni:

- Per LC/MS a flussi normali e pompa binaria, pompa quaternaria, campionatore con piastra a pozzetti (o autocampionatore o autocampionatore CTC PAL). Le sorgenti ioniche supportate sono ESI, APCI, APPI e MMI.
- Per LC/MS a microflussi e pompa capillare, campionatore con micro piastra a pozzetti (o autocampionatore a micro piastra CTC PAL) e sorgenti ioniche ESI, APCI o MMI.
- Per LC/MS a nanoflussi e nanopompa, campionatore con micro piastra a pozzetti e interfaccia HPLC-Chip/MS (usato in luogo di una sorgente standard o sorgente nanospray doppia) per aumentare l'affidabilità e le prestazioni con dispersione di picco minima e volumi morti più bassi.

Ogni combinazione Agilent offre vantaggi per applicazioni di vario tipo. Ciascuna utilizza lo stesso programma di acquisizione dati, programma di analisi quantitativa e programma di analisi qualitativa per realizzare questi vantaggi.

I sistemi LC/MS Agilent 6460 e 6490 triplo quadrupolo sono gli unici sistemi a triplo quadrupolo in grado di utilizzare la tecnologia Agilent Jet Stream. Questa tecnologia sfrutta un gas di profilamento super riscaldato per collimare il nebulizzatore spray, con un notevole aumento del numero degli ioni in ingresso nello spettrometro di massa.

Il sistema LC/MS Agilent 6490 triplo quadrupolo sfrutta inoltre la tecnologia iFunnel comprendente la tecnologia Jet Stream di Agilent, un gruppo di desolvatazione più piccolo con capillare a più canali, e Dual Offset Ion Funnel.

Aiuto per le applicazioni

È possibile usare una o più combinazioni LC/MS Agilent 6400 triplo quadrupolo per quantificare i composti organici in tracce di matrici complesse:

- Studi sulla sicurezza alimentare
- Studi ambientali
- Scoperte farmaceutiche
- Tossicologia
- Chimica forense
- Bioanalisi

Associato ai sistemi LC Agilent serie Infinity 1260 e 1290, il sistema MS serie 6400 triplo quadrupolo offre analisi sensibili e riproducibili di composti target in matrici complesse.

- Limiti di rilevazione e quantificazione a livello di femtogrammi per i modelli 6430 e 6460
- Limiti di rilevazione e quantificazione a livello di zeptomoli per il modello 6490
- Effetti memoria minimi anche in tempi di residenza molto brevi
- Funzionamento semplificato con il nuovo software Agilent per l'analisi dei dati

Il *tempo di residenza* è la quantità di tempo attribuita per l'analisi di ciascuno ione durante una scansione.

Aiuto per l'acquisizione

Per informazioni sull'installazione del sistema LC/MS Agilent triplo quadrupolo, consultare la Guida all'installazione.

Per informazioni su come iniziare a usare il sistema LC/MS Agilent triplo quadrupolo, consultare la Guida introduttiva.

Per informazioni sull'utilizzo del sistema LC/MS Agilent triplo quadrupolo con campioni e dati reali, consultare la Guida alla familiarizzazione.

Per informazioni sull'esecuzione di singole attività con il sistema LC/MS, consultare la Guida in linea.

Per maggiori informazioni sul modulo LC Agilent 1260 o 1290 Infinity, consultare il Manuale dell'utente per LC Agilent 1260 o 1290 Infinity per il modulo.

Per assistere l'utente nell'utilizzo del sistema LC/MS Agilent triplo quadrupolo per le suddette applicazioni, il software permette di eseguire le attività in una finestra singola mediante il programma di acquisizione dati:

Preparazione dello strumento

- Avviare e arrestare gli strumenti dal software
- Scaricare le impostazioni del sistema LC Agilent 1260 o 1290 Infinity e dello spettrometro di massa Agilent serie 6400 triplo quadrupolo in tempo reale per controllare lo strumento
- Valutare se i parametri MS rientrano nei limiti di accuratezza e risoluzione di massa specificati nel rapporto Checktune
- Ottimizzare i parametri MS in maniera automatica (Autotune) o manuale mediante i programmi di calibrazione Agilent e stampare il rapporto Autotune
- Monitorare le condizioni effettive dello strumento
- Visualizzare il tracciato in tempo reale dei cromatogrammi e dei parametri dello strumento (UV/Vis e MS) e stampare il rapporto del tracciato in tempo reale
- Visualizzare lo spettro della riga di baricentro di un picco o lo spettro del profilo dell'intervallo di massa di un picco in tempo reale

Configurazione dei metodi di acquisizione

- Inserire e salvare i valori dei parametri di tutti i moduli LC e MS in un metodo di acquisizione
- Selezionare ed etichettare i cromatogrammi totali degli ioni o i cromatogrammi degli ioni estratti da visualizzare nel tracciato in tempo reale
- Configurare i segmenti temporali per ciascun tipo di scansione e di analisi i cui parametri variano in funzione del segmento temporale o delle scansioni all'interno di un segmento temporale
- Stampare il rapporto del metodo di acquisizione

Acquisizione dei dati

Una *lista di lavoro* è un elenco di singoli campioni e batch (sequenze) inseriti ed eseguiti automaticamente con il programma di acquisizione dati.

- Inserire le informazioni sul campione e i programmi di pre- o postanalisi (script) ed eseguire i singoli campioni in maniera interattiva
- Inserire ed eseguire automaticamente i singoli campioni e i campioni organizzati in una *lista di lavoro* (sequenza di campioni)
- Configurare gli script pre- e postanalisi da eseguire tra i campioni in una lista di lavoro
- Configurare ed eseguire una lista di lavoro per ottimizzare i parametri di acquisizione MS
- Stampare il report della lista di lavoro
- Visualizzare gli eventi di sistema, incluso il tempo di inizio e di fine, eseguire gli eventi e gli errori e stampare il rapporto del log eventi

Aiuto per l'analisi dei dati

Programma di analisi quantitativa

Agilent ha progettato il programma di analisi quantitativa per assistere nella quantificazione di quantità molto basse di materiale con le seguenti eccezionali funzionalità:

- Importazione delle informazioni direttamente dal metodo di acquisizione
- Assistente di adattamento della curva per testare tutti gli adattamenti e le statistiche di qualità della curva
- Integrazione con integratore automatico non parametrizzato, che utilizza un originale algoritmo ottimizzato per i dati del triplo quadrupolo
- Presentazione della finestra dei risultati Batch-at-a-Glance per rivedere e operare contemporaneamente su un intero batch di dati
- Rilevazione automatica degli outlier
- Modelli preconfigurati per il reporting di base e capacità di creazione di rapporti personalizzati in Microsoft Excel

Consultare *Software MassHunter di Agilent - Guida alla familiarizzazione per l'analisi quantitativa* o la Guida in linea del programma di analisi quantitativa

Programma di analisi qualitativa

Per lo sviluppo rapido dei metodi, il software è utilizzato per riesaminare facilmente gli aspetti qualitativi dei dati, come ad esempio il precursore ottimale per la produzione delle transizioni di ioni.

Agilent ha progettato il programma di analisi qualitativa per presentare grandi quantità di dati da rivedere in una posizione centrale. Il programma permette di eseguire le seguenti operazioni per qualsiasi tipo di dati elaborabili di uno spettrometro di massa:

- Estrazione di cromatogrammi
- Visualizzazione ed estrazione di spettri di picco
- Sottrazione del rumore di fondo
- Integrazione del cromatogramma
- Reperimento dei composti
- Identificazione dei composti
- Esportazione dei risultati

È possibile inoltre configurare metodi per eseguire, al momento dell'apertura dei file di dati, le attività presenti in elenco nonché altre attività, in maniera automatica.

Consultare *Software MassHunter di Agilent - Guida alla familiarizzazione per l'analisi qualitativa* o la Guida in linea del programma di analisi qualitativa.



2 Funzionamento interno - MS triplo quadrupolo e MS quadrupolo singolo a confronto

Funzionamento MS quadrupolo singolo	14
Progettazione di uno spettrometro di massa a quadrupolo singolo	14
Funzionamento di uno spettrometro di massa a quadrupolo singolo	15
Funzionamento MS triplo quadrupolo	22
Progettazione di un sistema MS Agilent triplo quadrupolo	22
Funzionamento di uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo	29
Miglioramenti innovativi del modello 6490 triplo quadrupolo	24
Miglioramenti innovativi del modello 6460 triplo quadrupolo	26
Miglioramenti del modello 6430 triplo quadrupolo	28
Funzionamento dell'MRM dinamico	31
Funzionamento di un MRM dinamico attivato	34

Nel presente capitolo sono illustrati i concetti che aiuteranno a comprendere il funzionamento interno del sistema LC/MS Agilent serie 6400 triplo quadrupolo.

Per comprendere il funzionamento di uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo, bisogna partire dal funzionamento di uno spettrometro di massa a quadrupolo singolo. Di conseguenza, si procederà a spiegare per primo il funzionamento di uno spettrometro di massa a quadrupolo singolo.



Funzionamento MS quadrupolo singolo

Per comprendere meglio le specifiche funzionalità hardware dello spettrometro di massa Agilent serie 6400 quadrupolo triplo, nella presente sezione sono descritti innanzi tutto gli aspetti fondamentali di uno spettrometro di massa a quadrupolo singolo.

Progettazione di uno spettrometro di massa a quadrupolo singolo

La spettrometria di massa si basa sull'analisi degli ioni che si muovono all'interno di un vuoto.

La ionizzazione di un campione ha luogo all'interno della sorgente ionica (illustrata schematicamente a sinistra). Gli ioni sono analizzati da un analizzatore di massa (filtro di massa), che controlla il moto degli ioni mentre viaggiano verso il rivelatore per essere convertiti in segnali effettivi.

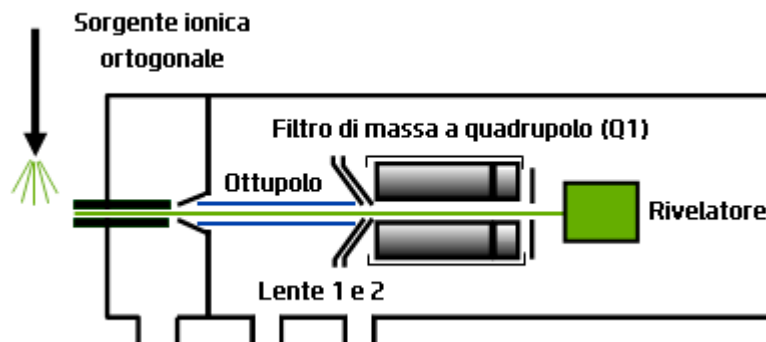


Figura 1 Schema di uno spettrometro di massa a quadrupolo singolo

m/z – rapporto massa/carica

L'analizzatore di massa a quadrupolo è costituito da quattro barre parallele alle quali vengono applicate specifiche tensioni continue e in radiofrequenza. Le barre filtrano tutti gli ioni ad eccezione di quelli corrispondenti a uno o più particolari valori di m/z , come stabilito in funzione delle tensioni applicate.

La tensione RF viene applicata a tutte e quattro le barre, ma le barre negative (-) sono fuori fase di 180 gradi rispetto alle barre positive (+). Le barre sono etichettate con i segni + e - in riferimento alle tensioni continue ad esse applicate.

Tutti gli ioni comprendenti il campione sono generati alla sorgente. Tuttavia, quando viene applicato un insieme specifico di tensioni, solo gli ioni del corrispondente valore m/z attraverseranno il quadrupolo per raggiungere il rivelatore. Se le tensioni vengono aumentate ad altri valori, gli ioni con altri valori di m/z potranno attraversare il rivelatore. Una scansione MS completa è ottenuta incrementando le tensioni continue e in radiofrequenza applicate alle quattro barre in un intervallo di valori ampliato.

Funzionamento di uno spettrometro di massa a quadrupolo singolo

Per illustrare il funzionamento di uno strumento a quadrupolo singolo, è possibile utilizzare un modello diagrammatico. Vedere [Figura 2](#).

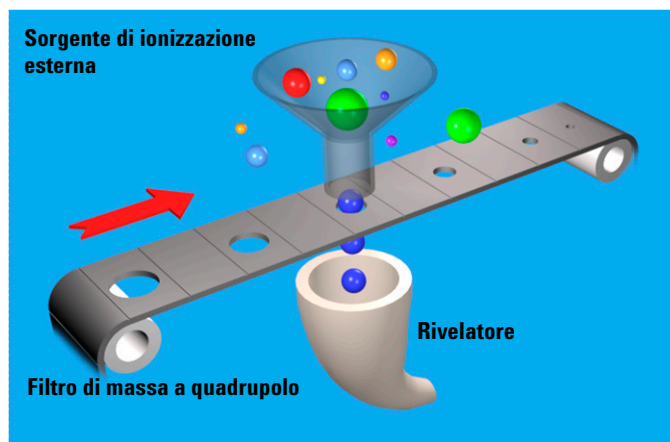


Figura 2 Modello concettuale di uno spettrometro di massa a quadrupolo singolo

2 Funzionamento interno - MS triplo quadrupolo e MS quadrupolo singolo a confronto

Funzionamento di uno spettrometro di massa a quadrupolo singolo

All'interno del modello,

- Tutti gli ioni contenuti in un campione si formano in una sorgente di ionizzazione esterna e vengono raccolti in un imbuto. Le palline di vario colore e dimensioni rappresentano i diversi ioni con i diversi valori di m/z .
- L'analizzatore di massa a quadrupolo è rappresentato da un nastro mobile che filtra gli ioni mentre questi attraversano i fori di varie dimensioni. Gli ioni passano dall'imbuto al rivelatore attraverso il filtro.
- Il rivelatore è rappresentato dall'imbuto di raccolta sotto il nastro di filtraggio.

Mano a mano che il nastro (l'analizzatore) si muove, o che si modificano le tensioni applicate alle barre, gli ioni con differenti valori di m/z vengono filtrati attraverso lo spettrometro di massa.

Mentre l'analizzatore si sposta da un basso valore di m/z a valori sempre più grandi, viene realizzata una scansione MS completa.

SIM – Scansione di ioni selezionati

Se il nastro non si muove, il rivelatore continua a monitorare lo stesso singolo valore di m/z nell'arco di un intero periodo di scansione. Questo tipo di analisi è conosciuta come SIM (Selected Ion Monitoring). Si tratta della modalità di funzionamento più sensibile di uno spettrometro di massa a quadrupolo singolo.

Il periodo di scansione è selezionato (stabilito) dall'utente. L'utente può impostare un tempo di residenza per eseguire la scansione di uno specifico intervallo di massa (ad es., un valore di m/z da 50 a 1000), oppure rimanere su uno ione selezionato (SIM) o spostarsi su più ioni selezionati durante il periodo di scansione. Il filtro di massa a quadrupolo non è sottoposto a scansione in questa modalità. Le tensioni RF/continue richieste sono spesso impostate in modo da filtrare una massa singola contemporaneamente.

Per un confronto, consultare "[Funzionamento di uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo](#)" a pagina 29.

Quadrupolo singolo: SIM

Per ottenere la migliore sensibilità o quantificazione, il quadrupolo singolo viene utilizzato in modalità SIM (Figura 3). Il ciclo di lavoro è la misura del tempo effettivamente impiegato dallo strumento per misurare i segnali. In modalità SIM, il quadrupolo singolo analizza il segnale di uno ione con un valore di m/z specifico in maniera quasi continuativa. Questo implica un'acquisizione di quasi il 100% durante il ciclo di lavoro.

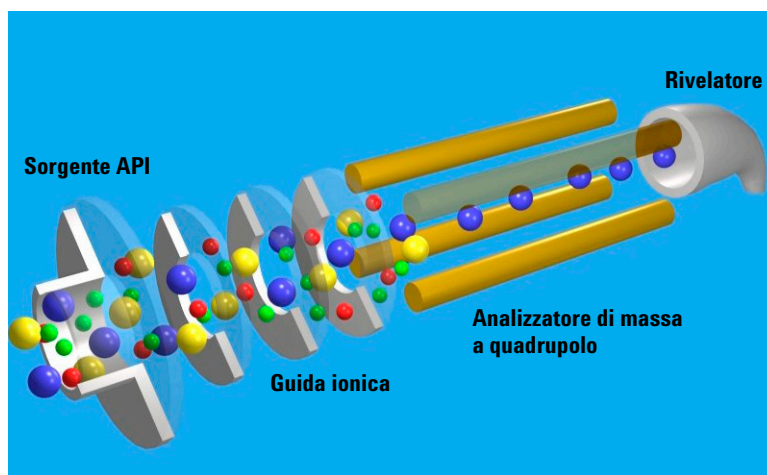


Figura 3 Quadrupolo singolo: SIM

In questo esempio,

- 1 Tutti gli ioni (positivi, negativi e i frammenti neutri) si formano all'interno della sorgente sorgente API.
- 2 L'ottica ionica guida gli ioni verso l'analizzatore di massa a quadrupolo.

La guida ionica Agilent è un filtro a ottapolo costituito da otto barre equamente distanziate.

- 3 All'interno dell'analizzatore, solo gli ioni aventi un particolare valore di m/z (rappresentati dalle palline blu) possono attraversare il rivelatore.
- 4 Il rivelatore porta a termine l'analisi.

2 Funzionamento interno - MS triplo quadrupolo e MS quadrupolo singolo a confronto

Funzionamento di uno spettrometro di massa a quadrupolo singolo

Questo sistema conferisce numerosi vantaggi:

- fornisce la migliore sensibilità ai fini della quantificazione
- aumenta la selettività
- migliora la specificità cromatografica
- non fornisce informazioni strutturali

Quadrupolo singolo: MS a scansione completa

In una scansione MS completa, il quadrupolo funge da filtro di massa nel tempo e la scansione viene eseguita selezionando tensioni continue e RF sempre maggiori. Questo fornisce il filtraggio degli ioni con valori di m/z corrispondenti attraverso uno spettro di massa. Vedere [Figura 4](#).

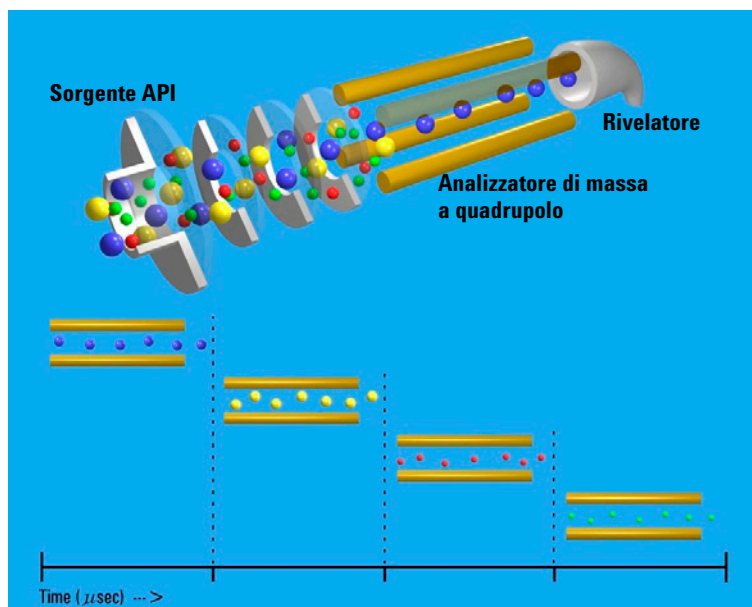


Figura 4 Quadrupolo singolo: MS a scansione completa

La scansione MS completa è una modalità che risulta meno sensibile, in quanto il ciclo di lavoro per ciascun valore di m/z è notevolmente inferiore a 100%. L'analizzatore di massa a quadrupolo esegue la scansione in maniera sequenziale, inviando al rivelatore ciascun valore di m/z che rientri nell'intervallo di massa selezionato.

La scansione MS completa rimane comunque un'utile modalità di funzionamento, poiché mostra tutti gli ioni che si formano all'interno della sorgente ionica. Questo è utile per sviluppare acquisizioni SIM, ma avvisa inoltre l'analista che altri composti sono in fase di co-eluzione con i composti di interesse.

Cosa accade ai frammenti ionici?

Le scansioni complete con uno strumento a quadrupolo singolo possono inoltre essere utilizzate per studiare i frammenti ionici. Vedere [Figura 5](#).

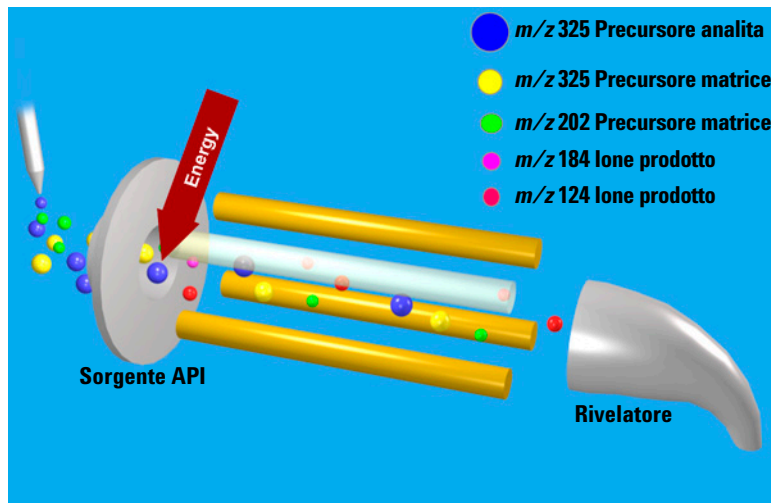


Figura 5 Frammenti ionici con MS a quadrupolo singolo

2 Funzionamento interno - MS triplo quadrupolo e MS quadrupolo singolo a confronto

Funzionamento di uno spettrometro di massa a quadrupolo singolo

Il diagramma illustra che i frammenti ionici, anche conosciuti come ioni prodotto, si formano per frammentazione o rottura degli ioni precursore. Gli ioni precursore formati all'interno della sorgente ionica percorrono l'analizzatore di massa senza variazione, a meno che un'energia supplementare non venga applicata al loro moto in una regione in cui è possibile che si verifichi la frammentazione.

Tale frammentazione o dissociazione indotta da collisione (CID) possono essere eseguite in una regione a bassa pressione tra la sorgente ionica e l'analizzatore di massa. La sorgente ionica è in condizioni di pressione atmosferica, mentre l'analizzatore di massa registra una pressione molto inferiore poiché è stato svuotato dei gas per mezzo di una pompa a vuoto.

Sullo spettrometro di massa Agilent a quadrupolo singolo, questa regione è compresa tra l'uscita del capillare e lo skimmer, dove la pressione del gas è di circa 2 Torr, o di circa tre ordini di grandezza inferiore alla pressione atmosferica (760 Torr). In condizioni di funzionamento normale, si applica una tensione a questa regione per far sì che gli ioni presenti all'interno continuino il loro viaggio verso l'analizzatore di massa. Anche se questi ioni entrano in collisione con le molecole di gas in questa regione, di solito non hanno energia sufficiente per frammentarsi.

CID – Dissociazione indotta da collisione

Man mano che la tensione aumenta, tuttavia, gli ioni avranno sempre maggiore energia di traslazione. Di conseguenza, nel momento in cui gli ioni si scontrano con le molecole di gas, le loro collisioni convertiranno l'energia di traslazione in vibrazioni molecolari in grado di causare la frammentazione degli ioni (Figura 6). Questo fenomeno viene definito come "dissociazione indotta da collisione" (CID). Nonostante questa frammentazione non si verifichi nel luogo in cui si formano gli ioni a pressione atmosferica, questo tipo di frammentazione viene tradizionalmente definita "CID interna alla sorgente".

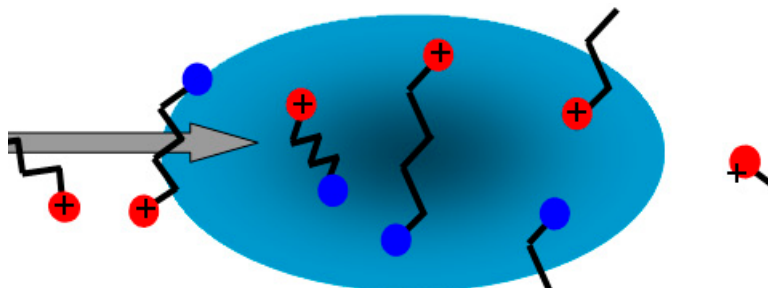


Figura 6 Frammentazione ionica causata da dissociazione indotta da collisione

Per eseguire un'analisi MS/MS non è possibile utilizzare uno spettrometro di massa a quadrupolo singolo poiché tutti gli ioni che si formano nella sorgente ionica sono trasferiti al quadrupolo in forma frammentata o meno. Al termine dell'operazione infatti, quando l'analizzatore di massa filtra gli ioni, non sarà possibile identificare gli ioni prodotto derivati dagli ioni precursore.

Uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo può eseguire un'analisi MS/MS con frammentazione all'interno della cella di collisione, come descritto nella sezione successiva.

Funzionamento MS triplo quadrupolo

È importante aver letto i concetti esposti nella precedente sezione circa il funzionamento di uno spettrometro di massa a quadrupolo singolo. La comprensione di questi concetti aiuterà, infatti, a comprendere il funzionamento di uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo.

Progettazione di un sistema MS Agilent triplo quadrupolo

Uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo è costituito da una sorgente ionica, una tecnologia di desolvatazione avanzata, seguito da un'ottica ionica che trasferisce gli ioni al primo quadrupolo posizionato a destra di esso. Un diagramma di alcuni degli attuali prodotti LC/MS a triplo quadrupolo è illustrato in [Figura 7](#) a pagina 23. Il sistema Agilent 6430 è illustrato in [Figura 11](#) a pagina 28.

Sistema Agilent serie 6400 triplo quadrupolo	Caratteristiche principali
6420	<ul style="list-style-type: none">• Include una turbopompa e una pompa rotativa• Include un capillare resistivo• Può essere aggiornato al modello 6430
6430	<ul style="list-style-type: none">• Dispone di una turbopompa aggiuntiva• Il pompaggio nella fase di vuoto 2 è stato migliorato• Le lenti delle celle di collisione sono state aggiornate• Può essere aggiornato al modello 6460
6460	<ul style="list-style-type: none">• Include la tecnologia Agilent Jet Stream• Include quadrupoli Q1 e Q2 con valore m/z di 3.000
6490	<ul style="list-style-type: none">• Include la tecnologia iFunnel (Agilent Jet Stream, capillare a più canali, ion-funnel ad alta/bassa pressione)• Dispone di una pompa rotativa aggiuntiva per ion-funnel• Include elettronica di trasmissione del quadrupolo a elevata capacità• L'impronta è ridotta

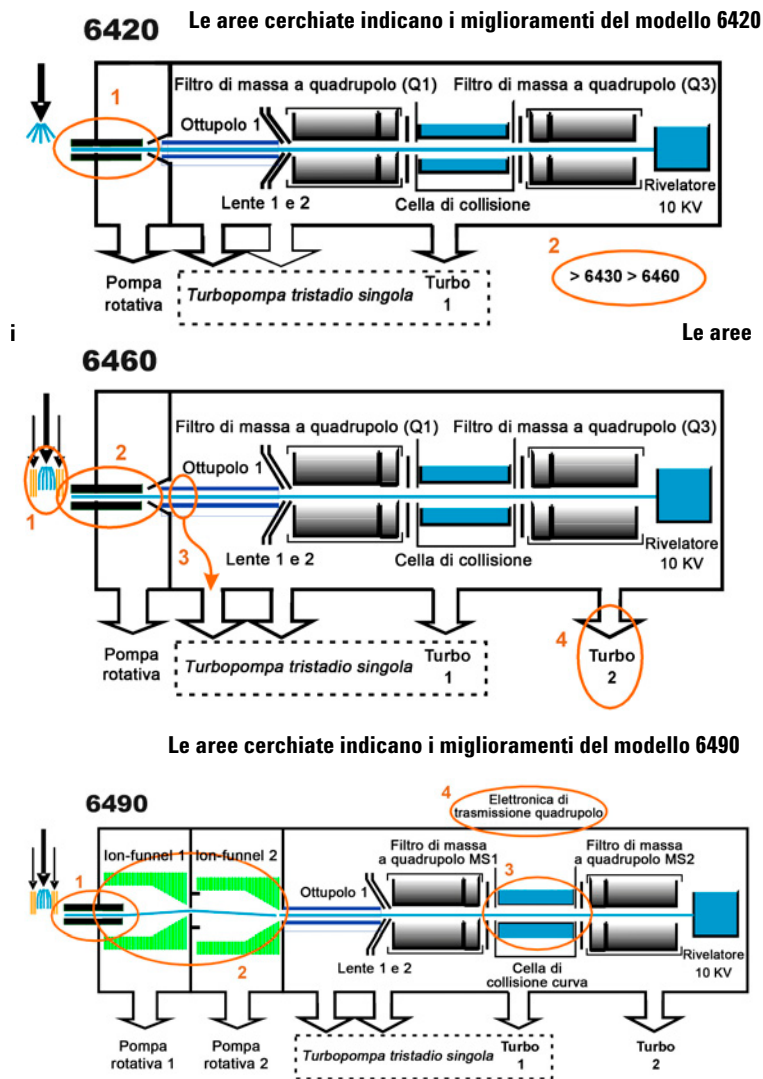


Figura 7 Miglioramenti innovativi dei modelli 6460 e 6490

Il quadrupolo è costituito da quattro barre parallele iperboliche attraverso cui vengono filtrati gli ioni selezionati, prima di raggiungere una cella di collisione in cui gli ioni sono frammentati. Di norma, la cella di collisione è identificata con il

2 Funzionamento interno - MS triplo quadrupolo e MS quadrupolo singolo a confronto

Miglioramenti innovativi del modello 6490 triplo quadrupolo

secondo quadrupolo ma, nel caso del 6460, dal punto di vista geometrico è, in effetti, un esapolo contenente azoto, lo stesso gas usato nella sorgente ionica. Nel 6490, la cella di collisione è una cella di collisione curva con focalizzazione assiale di campo dell'esapolo.

I frammenti ionici che si formano nella cella di collisione sono quindi inviati al terzo quadrupolo per una seconda fase di filtraggio, in modo da consentire all'utente di isolare ed esaminare più precursori per le transizioni di ioni prodotto (MRM).

Miglioramenti innovativi del modello 6490 triplo quadrupolo

La tecnologia iFunnel raggruppa i primi tre miglioramenti del 6490: capillare a più canali, tecnologia ion-funnel a doppio stadio e cella di collisione curva. Il quarto miglioramento è l'elettronica di trasmissione del quadrupolo migliorata.



Figura 8 La tecnologia iFunnel

Gli ioni sono generati attraverso una sorgente ionica elettrospray in cui l'analita viene contemporaneamente ionizzato e desolvato a partire dalla matrice liquida. La tecnologia iFunnel include l'applicazione della tecnologia

Agilent Jet Stream (inizialmente introdotta con il modello 6460), che migliora la sensibilità grazie alla focalizzazione del gradiente termico e a un'estesa desolvatazione.

Il primo miglioramento innovativo è l'utilizzo di un piccolo capillare a più canali. Il sistema è dotato di 6 iniettori capillari ed è in grado di campionare una quantità fino a dieci volte maggiore di ioni carichi in fase gas provenienti dalla sorgente. Cattura la maggior parte del gas dalla regione della sorgente. Vedere [Figura 9](#) a pagina 25. Il capillare a più canali trasmette un elevato volume di gas/ioni all'interno del sistema a ottica ionica.

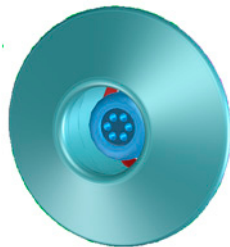


Figura 9 Capillare a più canali

La tecnologia ion-funnel a doppio stadio (DIF) rappresenta il secondo miglioramento. Questa tecnologia rimuove il gas e il rumore dei frammenti neutri, ma cattura gli ioni. Aumenta inoltre la durata di vita della turbopompa. La tecnologia ion-funnel a doppio stadio è in grado di trasmettere efficientemente gli ioni alla pressione più elevata possibile. Il primo ion-funnel ha una pressione compresa tra 7 e 14 torr. Il secondo ion-funnel è un imbuto ionico a bassa pressione (1-3 torr). L'imbuto ionico funziona con la tensione RF che focalizza gli ioni verso il centro, e la tensione continua che accelera gli ioni verso l'uscita. Vedere [Figura 10](#).

2 Funzionamento interno - MS triplo quadrupolo e MS quadrupolo singolo a confronto

Miglioramenti innovativi del modello 6460 triplo quadrupolo

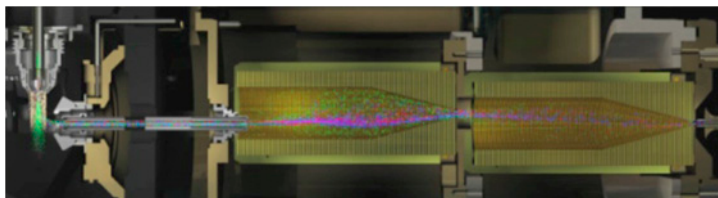


Figura 10 La tecnologia DIF

La cella di collisione curva con focalizzazione assiale di campo dell'esapolo è il terzo miglioramento. Include una struttura cellulare rastremata per una maggiore ammissione degli ioni all'ingresso. La sua struttura riduce il rumore generato dallo ionizzatore.

Il quarto miglioramento è l'elettronica di trasmissione del quadrupolo migliorata. La maggiore frequenza di trasmissione produce più cicli di moto ionico all'interno del filtro di massa a quadrupolo. Il maggior numero di cicli di moto ionico produce una risoluzione di massa più elevata. È possibile calibrare un sistema 6490 a 0,4 m/z . La maggiore frequenza di trasmissione riduce l'intervallo di massa a 1400 m/z .

Miglioramenti innovativi del modello 6460 triplo quadrupolo

Gli ioni sono generati attraverso una sorgente ionica elettrospray in cui l'analita viene contemporaneamente ionizzato e desolvato a partire dalla matrice liquida. Il primo dei cinque (5) miglioramenti innovativi di Agilent è riscontrabile nell'applicazione della tecnologia Agilent Jet Stream (identificata come 1 in [Figura 7](#)), che migliora la sensibilità grazie alla focalizzazione del gradiente termico e a un'estesa desolvatazione.

Gli ioni desolvati entrano quindi nello spettrometro di massa attraverso un innovativo tubo di trasferimento del capillare resistivo e fortemente inerte (identificato come 2 in [Figura 7](#)), che migliora la trasmissione degli ioni e permette uno scambio di polarità quasi istantaneo.

Oltre a una migliore sensibilità, è stato migliorato il pompaggio nella fase di vuoto 2, consentendo una maggiore velocità di pompaggio dietro lo skimmer e una migliore cattura degli ioni a carico del primo ottupolo (identificato come 3 in [Figura 7](#)). Gli ioni attraversano quindi l'ottica e l'analizzatore del primo quadrupolo. L'analizzatore a quadrupolo è costituito da quattro barre parallele iperboliche attraverso cui vengono filtrati gli ioni selezionati in funzione del loro rapporto massa/carica.

Gli ioni che attraversano l'analizzatore del primo quadrupolo vengono quindi convogliati verso una cella di collisione migliorata, dove vengono frammentati. Di norma, la cella di collisione è identificata con il secondo quadrupolo ma, in questo caso, dal punto di vista geometrico è, in effetti, un esapolo contenente azoto, lo stesso gas usato come gas essiccante. L'innovazione di Agilent ha portato alla progettazione di una cella di collisione dotata di accelerazione assiale per analisi MS/MS ad alta velocità (identificata come 4 in [Figura 7](#)). I frammenti ionici che si formano all'interno della cella di collisione sono quindi inviati al terzo quadrupolo per una seconda fase di filtraggio, in modo da consentire all'utente di isolare ed esaminare gli ioni prodotti in relazione agli ioni precursore.

Gli ioni che attraversano il terzo quadrupolo sono infine rilevati mediante un rivelatore ad alta energia. L'aggiunta di una seconda turbopompa (identificata come 5 in [Figura 7](#)) ha aumentato la velocità di pompaggio e migliorato il vuoto, con conseguente miglioramento del rapporto segnale/rumore e aumento del limite di rilevazione del triplo quadrupolo.

Miglioramenti del modello 6430 triplo quadrupolo

Il modello 6430 triplo quadrupolo offre molti degli innovativi miglioramenti già presenti nel modello 6460 Agilent triplo quadrupolo.

- Stesso tubo di trasferimento del capillare resistivo (identificato come 1 in [Figura 11](#))
- Miglioramento del pompaggio nella fase di vuoto (identificato come 2 in [Figura 11](#))
- Aggiunta di una seconda turbopompa (identificata come 3 in [Figura 11](#))

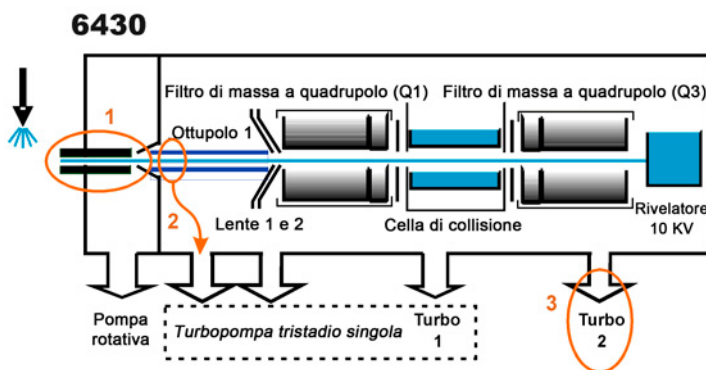


Figura 11 Miglioramenti del modello 6430

Miglioramenti del modello 6420 triplo quadrupolo

Il modello 6420 triplo quadrupolo offre alcuni degli innovativi miglioramenti già presenti nel modello Agilent 6430 triplo quadrupolo.

- Stesso tubo di trasferimento del capillare resistivo (identificato come 1 nel 6420 in [Figura 7](#) a pagina 23)
- Il modello 6420 triplo quadrupolo può essere aggiornato al modello 6430 o al 6460 triplo quadrupolo (identificato come 2 nel 6420 in [Figura 7](#) a pagina 23).

Funzionamento di uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo

I quadrupoli permettono di eseguire analisi MS/MS in diversi modi (vedere Figura 12).

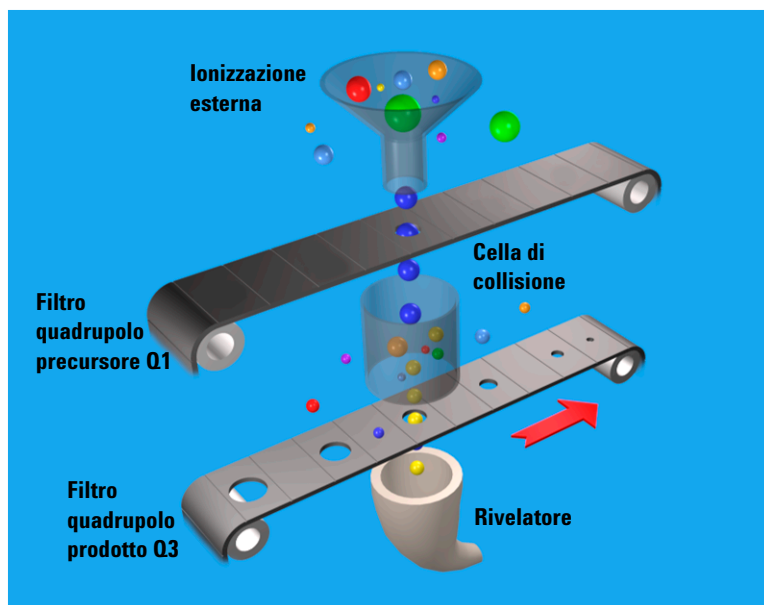


Figura 12 Modello concettuale di uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo:
Con SIM, MS1 (Q1) e MS2 (Q3) sono impostati a un unico valore di m/z , mentre con MS/MS a scansione completa, MS1 (Q1) viene impostato su un singolo valore di m/z e MS2 (Q3) viene sottoposto a scansione.

Volendo rappresentare gli analizzatori di massa a quadrupolo come nastri mobili, una cella di collisione può essere posizionata tra i nastri per frammentare gli ioni. Il primo nastro può essere fissato per selezionare lo ione precursore che dovrà viaggiare verso la cella di collisione. È possibile utilizzare tipi di celle di collisione differenti.

2 Funzionamento interno - MS triplo quadrupolo e MS quadrupolo singolo a confronto

Funzionamento di uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo

La cella può essere un altro quadrupolo, un esapolo (sei barre come quelle utilizzate nel sistema LC/MS Agilent serie 6400 triplo quadrupolo), un ottupolo (otto barre), o addirittura una guida d'onda obliqua.

Indipendentemente dalla geometria utilizzata, è richiesto un gas di collisione, ossia un gas inerte, non reattivo (come l'azoto o l'argon). In questo caso è stato utilizzato l'azoto. Inoltre, le tensioni applicate alla cella di collisione devono differire da quelle applicate ai quadrupoli per aumentare il moto di tutti gli ioni prodotto verso il terzo quadrupolo.

In questo esempio, viene selezionato uno ione precursore utilizzando il primo quadrupolo, e viene inviato alla cella di collisione per la frammentazione. I frammenti sono sottoposti a scansione attraverso il terzo quadrupolo, generando un'analisi MS/MS con scansione degli ioni prodotto. Dal momento che i frammenti ionici sono pezzi del precursore, rappresentano porzioni della struttura generale della molecola precursore. Uno strumento a triplo quadrupolo può essere utilizzato in questo modo per identificare l'impronta di un composto.

Un sistema MS/MS a scansione completa mediante MS a triplo quadrupolo non è la modalità più sensibile per lo stesso motivo che un sistema MS a scansione completa mediante quadrupolo singolo non è la modalità di funzionamento più sensibile possibile (il primo nastro rimane fermo; il secondo si muove). La modalità di funzionamento più sensibile per uno strumento MS a triplo quadrupolo è fissare entrambi i nastri e monitorare solo uno specifico ione precursore e uno specifico ione prodotto. Questa modalità viene definita *monitoraggio di reazione selezionata o SRM*.

Durante il normale funzionamento, uno strumento MS a triplo quadrupolo prevede l'esecuzione di più SRM per gli stessi ioni precursore. Questa operazione viene definita *monitoraggio di reazione multipla o MRM*.

Funzionamento dell'MRM dinamico

L'MRM dinamico è un tipo di scansione dotata di un unico segmento temporale continuo, e può arrivare fino a 4000 transizioni nella tabella di scansione dei segmenti.

Durante la fase di esecuzione, queste transizioni vengono separate automaticamente in più "tabelle MRM" in base alla finestra del tempo di ritenzione di ciascuna transizione. Le tabelle MRM sono costituite dalle transizioni che si sovrappongono durante il tempo di ritenzione, e possono contenere fino a 200 transizioni ciascuna. Queste tabelle non sono visibili nell'interfaccia utente.

L'MRM dinamico include le colonne Ret (Retention) Time (min) e Delta Ret Time. Ret Time è il tempo di ritenzione della transizione. Ogni transizione è acquisita a partire da Ret Time - 1/2*(Delta Ret Time) per Ret Time + 1/2 * (Delta Ret Time).

I dati di abbondanza sono acquisiti a partire dal tempo "t" per la durata "delta t". La prima tabella MRM nell'esempio in basso acquisisce le transizioni "abcdef". La seconda tabella MRM acquisisce le transizioni a partire da "defghi", e così via.

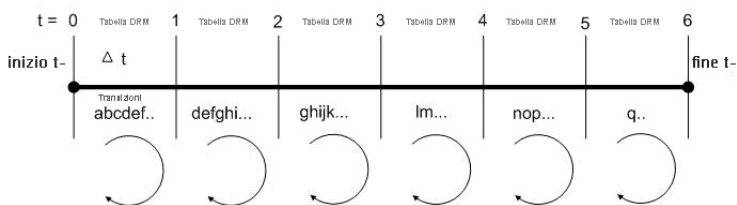


Figura 13 Determinazione automatica delle tabelle dell'MRM dinamico

Il vantaggio dell'MRM dinamico sta nel consentire tempi di residenza maggiori eseguendo transizioni MRM più o meno durante il tempo di eluizione del composto, anziché che in maniera continuativa in tutto il cromatogramma.

Il software di acquisizione dati MassHunter, il firmware SmartCard 4, il processore di segnale digitale e l'hardware MS partecipano tutti all'algoritmo dell'MRM dinamico.

1 Software di acquisizione dati MassHunter

L'utente inserisce un elenco di transizioni/parametri (fino a 4000). In base al tempo di ritenzione delta, al tempo di ritenzione, al tempo di residenza e al tempo di ciclo, il software di acquisizione dati crea una ricetta di ricerca che raggrupperà le transizioni registrate dal processore del segnale digitale in piccole tabelle MRM (fino a 1000+ tabelle). Ogni tabella avrà lo stesso tempo di ciclo. Le tabelle MRM sono simili ai "segmenti temporali" ma hanno transizioni minori, permettendo così al file di dati di avere più punti di dati per picco.

Un picco di transizione può contenere punti di dati di una o più tabelle MRM. Un picco assomiglierà a un picco poiché il valore di abbondanza a ciascun punto di dati è normalizzato dal tempo di "residenza".

2 Firmware SmartCard 4

Il firmware SmartCard 4 invia l'elenco delle transizioni alla memoria del processore del segnale digitale (DSP). Invia anche la ricetta di ricerca alla memoria DSP.

I dati relativi all'abbondanza di picco restituiti dal DSP sono Burst/Time filtrati nel firmware SmartCard 4. I dati sono rinviati al software di acquisizione dati, il quale archivia i dati in un file di dati MRM in grado di essere aperto sia dal programma di analisi qualitativa che da quello di analisi quantitativa.

3 Processore del segnale digitale (DSP)

L'esecuzione di un MRM dinamico è controllata interamente dal firmware del DSP.

Quando ha inizio l'esecuzione di un MRM dinamico, la ricetta di ricerca inizia a creare le tabelle MRM selezionando le transizioni dall'elenco e avviandone l'esecuzione. Quando si raggiunge il tempo di fine della tabella MRM, viene creata e avviata la tabella successiva. Esiste un ritardo minimo tra la variazione delle tabelle MRM nel DSP, per fortuna senza

perdita di dati. Il processo continua fino a quando non saranno state eseguite tutte le tabelle MRM. Al termine dell'esecuzione, la scansione in background continuerà in modalità MRM.

Per ogni singola transizione, il DSP invia i parametri MS all'hardware sotto forma di coppie di dati/indirizzo.

4 Hardware MS

Per ogni transizione, la coppia di dati/indirizzo del DSP definisce i quadrupoli dell'hardware e gli altri parametri.

Dopo aver impostato i parametri hardware per l'MS per ciascuna transizione, l'MS effettua una misura di abbondanza integrata dello ione selezionato e rinvia i dati di abbondanza non filtrati al firmware SmartCard 4 sotto forma di struttura contenente una testata e le informazioni di abbondanza.

Funzionamento di un MRM dinamico attivato

Un MRM dinamico attivato ha luogo quando un MRM primario avvia gli MRM (secondari) di conferma per un composto. Se l'abbondanza dell'MRM primario attivato è più elevata della soglia stabilita, vengono acquisiti gli MRM di conferma (o secondari). È possibile avere più MRM primari per ciascun composto, ma è possibile specificare solo un MRM attivato per ognuno di essi. Inoltre, è possibile avere più transizioni secondarie per ciascun composto. Tutte le transizioni con lo stesso Compound Name appartengono allo stesso composto.

Nella tabella Scan Segments, è possibile specificare quali transizioni saranno quelle primarie. Queste transizioni sono monitorate all'interno della finestra temporale dell'MRM dinamico. È necessario inoltre specificare l'avvio della transizione primaria. Qualsiasi transizione recante lo stesso nome di composto di una transizione primaria sarà una transizione secondaria per la transizione primaria.

Se l'abbondanza per l'avvio della transizione primaria è maggiore della soglia stabilita, verranno acquisite le transizioni secondarie. Queste transizioni secondarie sono acquisite per il valore **Number of Repeats** specificato. Se la transizione attivata scende al di sotto della soglia, e poi aumenta di nuovo oltre la soglia nella finestra del tempo di ritenzione, gli ioni secondari verranno nuovamente attivati.

Esempio di MRM attivato con tre composti

- Il tipo di scansione viene impostato su Dynamic MRM e la casella di controllo Enabled è selezionata. Questo metodo è un metodo Triggered MRM.
- La tabella Scan segments ha tre diversi composti: **Compound 1**, **Compound 2** e **Compound 3**
- Ciascuno di questi composti ha una transizione primaria, che è la transizione Trigger. Non occorre specificare una transizione Trigger per ciascun composto. Così facendo, nessuna transizione secondaria verrà attivata.
- È possibile avere più transizioni primarie per un composto (ad esempio, Compound 3). Tuttavia, solo una di queste transizioni primarie sarà la transizione Trigger.
- Non occorre avere transizioni secondarie per ogni composto.
- Per ciascuna transizione Trigger viene impostato il valore Threshold.
- Tutti questi composti hanno una transizione secondaria. È possibile avere più transizioni secondarie.
 - La transizione secondaria per Compound 1 è 185 -> 93.
 - La transizione secondaria per Compound 2 è 110 -> 64.
 - La transizione secondaria per Compound 3 è 306 -> 110.
- Se la transizione primaria per Compound 2 (110 -> 63) ha un'abbondanza superiore a 100, allora verrà acquisita la transizione secondaria (185 -> 93) per 3 cicli. Il numero di ripetizioni è impostato a 3.

Acquisition													
Source Chromatogram Instrument Diagnostics													
Scan segments													
Compound Name	ISTD?	Precursor Ion	MS1 Res	Product Ion	MS2 Res	Primary	Trigger	Threshold	Fragmentor	Collision Energy	Cell Accelerator Voltage	Ret T (min)	
Compound 1	<input type="checkbox"/>	185 Unit		63 Unit		<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	100	135	0		7	
Compound 1	<input type="checkbox"/>	185 Unit		93 Unit		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		130	30.9		4	
Compound 2	<input type="checkbox"/>	110 Unit		63 Unit		<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	100	140	34.9		4	
Compound 2	<input type="checkbox"/>	110 Unit		64 Unit		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		140	30.9		4	
Compound 3	<input type="checkbox"/>	306 Unit		264 Unit		<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	350	120	30.9		4	
Compound 3	<input type="checkbox"/>	306 Unit		276 Unit		<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		120	30.9		4	
Compound 3	<input type="checkbox"/>	306 Unit		110 Unit		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		120	30.9		4	

Dynamic MRM Parameters		Triggered MRM	
Cycle Time	500 ms	<input checked="" type="checkbox"/> Enabled	Number of Repeats 3

Figura 14 MRM attivato nella tabella Scan Segments

2 Funzionamento interno - MS triplo quadrupolo e MS quadrupolo singolo a confronto

Funzionamento di un MRM dinamico attivato



3

Sensibilità del sistema MS Agilent triplo quadrupolo

Migliore sensibilità con MS Agilent triplo quadrupolo	38
Riduzione del rumore	38
Esempio di riduzione del rumore chimico	41
Linearità del sistema MS Agilent serie 6400 triplo quadrupolo	43
Funzionamento dei componenti per il miglioramento della sensibilità	44
Sorgenti ioniche LC/MS	47
Ottica ionica anteriore	53
Cella di collisione	55
Rivelatore	60
Sistema di pompaggio	61

Il presente capitolo spiega il modo in cui lo spettrometro di massa Agilent a triplo quadrupolo riduce il rumore chimico ed elettronico e come ciascuno dei componenti contribuisce ad accrescere la sensibilità dello strumento.



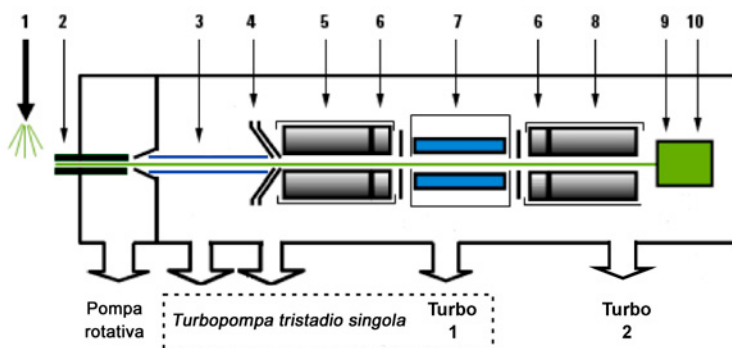
Migliore sensibilità con MS Agilent triplo quadrupolo

Gli spettrometri di massa a triplo quadrupolo producono più sorgenti di rumore, incluso il rumore chimico, elettronico e quello di fondo dei cluster ([Figura 15](#)).

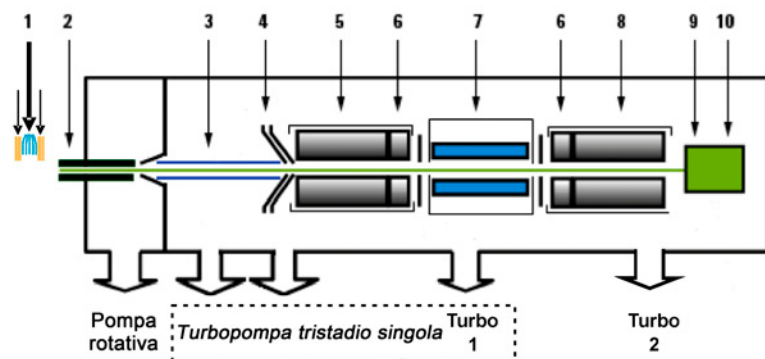
Riduzione del rumore

Il problema acustico deve essere gestito ai vari stadi della strumentazione, dalla sorgente ionica (1) al rivelatore (10) in [Figura 15](#).

Agilent 6430



Agilent 6460 con tecnologia Agilent Jet Stream



Agilent 6490 con tecnologia Agilent Jet Stream

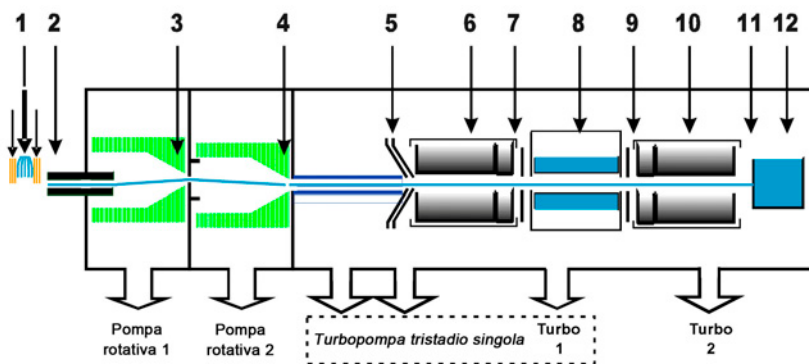


Figura 15 Sorgenti di rumore multiple

Riduzione del rumore con lo strumento Agilent serie 6400 triplo quadrupolo

- 1 Le sorgenti di nebulizzazione ortogonale aumentano al massimo la ionizzazione riducendo al minimo il rumore della matrice e del solvente.
- 2 La combinazione tra il gas essiccante di controcorrente riscaldato, il capillare dielettrico e lo skimmer aumenta la desolvatazione riducendo al minimo il rumore chimico.
- 3 La guida ionica a ottupolo RF permette di catturare gli ioni in maniera estremamente efficace, ottimizzando al contempo la trasmissione degli ioni mediante un'ampia larghezza di banda della massa.
- 4 La radiofrequenza L2 accresce la trasmissione degli ioni con massa elevata.
- 5 Il quadrupolo 1 utilizza quadrupoli iperbolici per ottimizzare la trasmissione degli ioni e la risoluzione spettrale.
- 6 Il segmento del quadrupolo RF accresce la trasmissione degli ioni all'interno e all'esterno della cella di collisione.
- 7 La cella di collisione ad alta pressione con accelerazione lineare ottimizza la frammentazione MS/MS eliminando il cross-talk, anche a tempi di residenza molto bassi. Il gruppo esapolo ad alta frequenza di piccolo diametro agevola la cattura e la focalizzazione degli ioni frammentati. Per il modello 6490, la cella di collisione curva con focalizzazione assiale di campo dell'esapolo include una struttura cellulare rastremata per una maggiore ammissione degli ioni all'ingresso. La sua struttura riduce il rumore generato dallo ionizzatore.
- 8 Il quadrupolo 2 utilizza quadrupoli iperbolici per ottimizzare la trasmissione degli ioni e la risoluzione spettrale.
- 9 Il fuori asse corrispondente al rivelatore a doppio dinodo ad alta energia con compressione del segnale mediante amplificatore logaritmico permette un elevato guadagno con rapido cambio di polarità, lunga durata e basso rumore. La progettazione del fuori asse permette ai frammenti neutri di passare senza urtare il rivelatore.
- 10 Il moltiplicatore ha lunga durata di vita in quanto solo gli elettroni, e mai gli ioni, impattano sulla sua superficie.

Il *cross-talk* è l'interferenza generata quando due segnali diventano parzialmente sovrapposti l'uno sull'altro. In questo caso, gli ioni prodotto residui possono interferire con lo spettro degli ioni prodotto di un conseguente esperimento MRM.

Esempio di riduzione del rumore chimico

Lo spettrometro di massa Agilent serie 6400 triplo quadrupolo attraversa le quattro fasi transitorie di conversione di un segnale nel processo MRM (Figura 16).

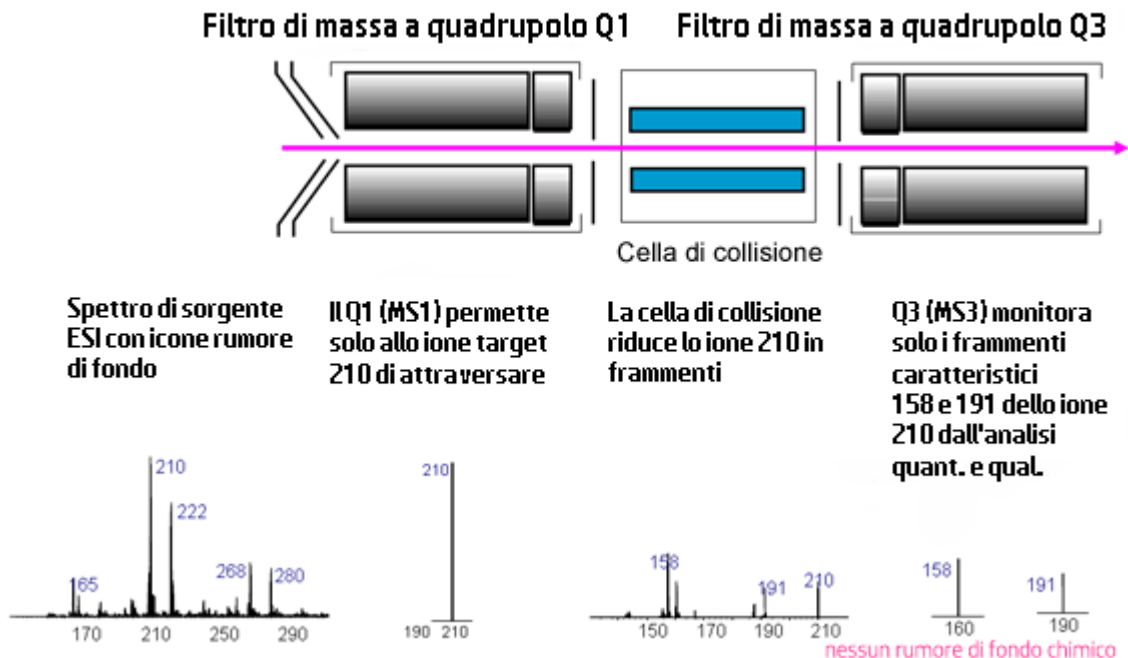


Figura 16 Monitoraggio di reazione multipla (MRM)

Fase 1 Lo spettro all'estrema sinistra rappresenta tutto ciò che subisce ionizzazione presso la sorgente ionica. Questo esempio mostra uno spettro ESI di un pesticida a base di feniluree. Uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo riduce il rumore chimico per una quantificazione di basso livello in una matrice sporca in misura maggiore rispetto a un sistema LC/MS a quadrupolo singolo.

3 Sensibilità del sistema MS Agilent triplo quadrupolo

Esempio di riduzione del rumore chimico

Fase 2 Questa fase viene eseguita selezionando innanzi tutto il pesticida di interesse a un valore di m/z di 210 derivante dalle interferenze coeluenti osservate nel resto dello spettro. Il secondo spettro mostra il risultato dopo aver attraversato il primo quadrupolo, o MS1 (Q1).

Fase 3 Dopo MS1 (Q1), all'interno della cella di collisione si assiste alla formazione di frammenti ionici. Il corrispondente spettro MS/MS è visibile al di sotto della cella di collisione.

Fase 4 È possibile selezionare specifici frammenti ionici in modo che attraversino il quadrupolo MS2 (Q3). Questi vengono selezionati ai fini della quantificazione e della conferma. Ad esempio, lo ione prodotto a un valore di m/z di 158 è più intenso di uno ione prodotto a un valore di m/z di 191. Di conseguenza, si dovrebbe usare la transizione MRM da 210 a 158 per la quantificazione, e la transizione da 210 a 191 per la conferma, dove lo ione con valore m/z di 191 è considerato uno ione qualificatore.

La seconda fase della selettività mediante quadrupolo MS2 (Q3) elimina gran parte del rumore chimico di fondo. Di norma, la possibilità di interferenza isobarica alla stessa identica massa dello ione di frammentazione è remota.

Linearità del sistema MS Agilent serie 6400 triplo quadrupolo

Le analisi condotte sul verapamil mostrano il seguente intervallo lineare dinamico:

6490: sei ordini di grandezza (Figura 17)

6460, 6430, 6420: cinque ordini di grandezza

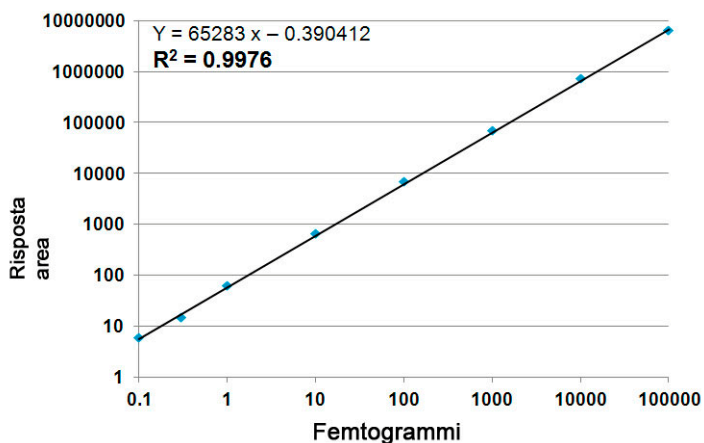


Figura 17 Risultati del verapamil - Curva di calibrazione di 100 attogrammi per 100 picogrammi sulla colonna, sei ordini di grandezza dell'intervallo dinamico lineare (tracciato log-log) acquisiti con Agilent 6490 triplo quadrupolo e tecnologia Agilent Jet Stream

Funzionamento dei componenti per il miglioramento della sensibilità

In questa sezione viene descritto nel dettaglio in che modo ciascun componente del sistema MS Agilent serie 6400 a triplo quadrupolo contribuisce alla riduzione del rumore (Figura 15).

La tecnologia iFunnel di Agilent

La tecnologia iFunnel di Agilent, disponibile sul modello Agilent 6490 a triplo quadrupolo comprende la tecnologia Agilent Jet Stream, il capillare a più canali e la tecnologia ion-funnel a doppio stadio. I paragrafi che seguono descrivono la tecnologia Agilent Jet Stream. La tecnologia con capillare a più canali è in grado di campionare una quantità fino a dieci volte maggiore di ioni carichi in fase gas provenienti dalla sorgente. Cattura la maggior parte del gas dalla regione della sorgente. La tecnologia ion-funnel a doppio stadio (DIF) elimina il gas ma cattura gli ioni. Elimina anche il rumore dei frammenti neutri.

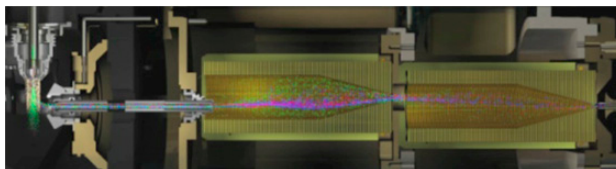


Figura 18 Tecnologia iFunnel di Agilent 6490

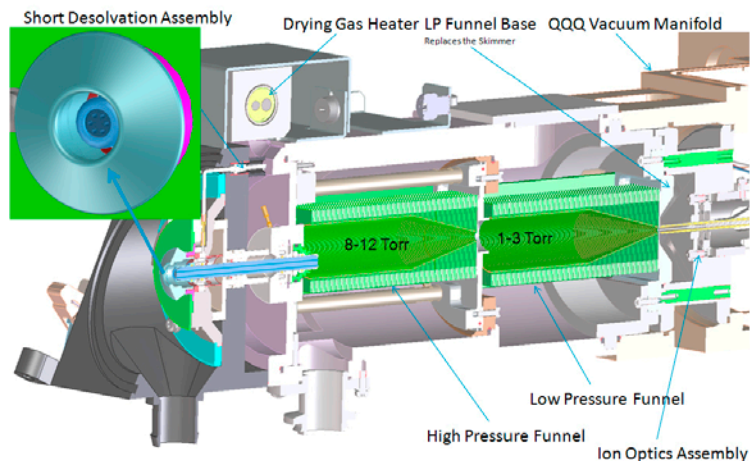


Figura 19 Ion-funnel

La tecnologia Agilent Jet Stream

La tecnologia Agilent Jet Stream accresce la desolvatazione dell'analita collimando il nebulizzatore spray e generando un "segnale notevolmente più luminoso". L'aggiunta di un gas di profilamento (azoto) super riscaldato, co-lineare, concentrico (Figura 20) nel gruppo degli iniettori aumenta significativamente l'essiccazione degli ioni dal cono di nebulizzazione dell'elettrospray, con aumento del rapporto segnale-rumore dello spettrometro di massa, consentendo così al triplo quadrupolo di superare il limite di rilevazione dei femtogrammi.

3 Sensibilità del sistema MS Agilent triplo quadrupolo La tecnologia Agilent Jet Stream

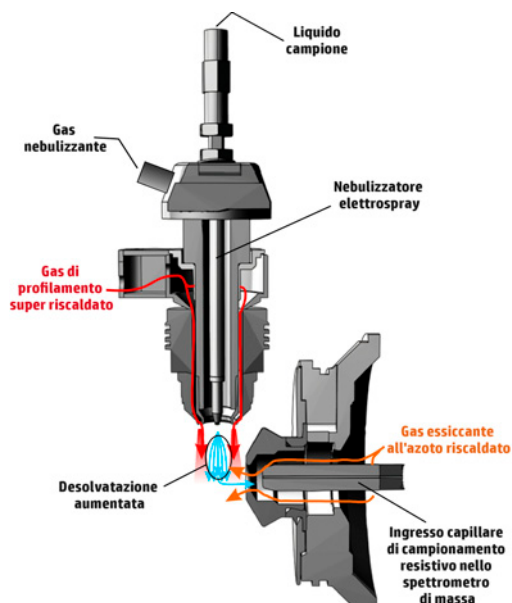


Figura 20 Sorgente ionica elettrospray con tecnologia Agilent Jet Stream

La focalizzazione del gradiente termico con tecnologia Agilent Jet Stream è costituita da un gas di profilamento (azoto) super riscaldato, che viene introdotto in maniera co-lineare e concentrica rispetto all'elettrospray con assistenza pneumatica. L'energia termica sprigionata dall'azoto di profilamento super riscaldato è focalizzata verso il nebulizzatore spray che produce la massima desolvatazione e generazione di ioni possibile. L'accresciuta desolvatazione di ioni molecolari fa sì che un maggior numero di ioni entri nel capillare di campionamento, come illustrato in [Figura 20](#), ottenendo anche un migliore rapporto segnale-rumore. I parametri per la tecnologia Agilent Jet Stream Technology sono la temperatura e la velocità di flusso dell'azoto di profilamento super riscaldato, e la tensione degli ugelli.

Il capillare nel modello 6490A è un capillare resistivo che migliora la trasmissione degli ioni. È dotato di 6 iniettori capillari ed è in grado di campionare una quantità fino a dieci volte maggiore di ioni carichi in fase gas provenienti dalla sorgente.

Il capillare nel modello 6460A è un capillare resistivo che migliora la trasmissione degli ioni e permette un'inversione di polarità praticamente istantanea. È lo stesso, comprovato campione utilizzato nella versione a rapida inversione di polarità del prodotto a quadrupolo singolo di Agilent.

Sorgenti ioniche LC/MS

Agilent offre una scelta di quattro sorgenti ioniche da utilizzare con lo spettrometro di massa a triplo quadrupolo: ESI, APCI, APPI e MMI. È possibile utilizzare anche l'HPLC-Chip.

La presente sezione descrive come le differenti sorgenti ioniche incidono sulla sensibilità.

Progettazione di sorgenti ioniche ESI

La sorgente ortogonale riduce l'introduzione di componenti di campioni non desiderati che interferiscono con l'analisi. L'avanzata progettazione del nebulizzatore produce gocce dalle dimensioni omogenee, garantendo così la massima sensibilità. Dal momento che la sorgente è a terra, è sicura da utilizzare e comporta il vantaggio di attenuare il rumore di fondo dei cluster del solvente (Figura 21).

3 Sensibilità del sistema MS Agilent triplo quadrupolo Sorgenti ioniche LC/MS

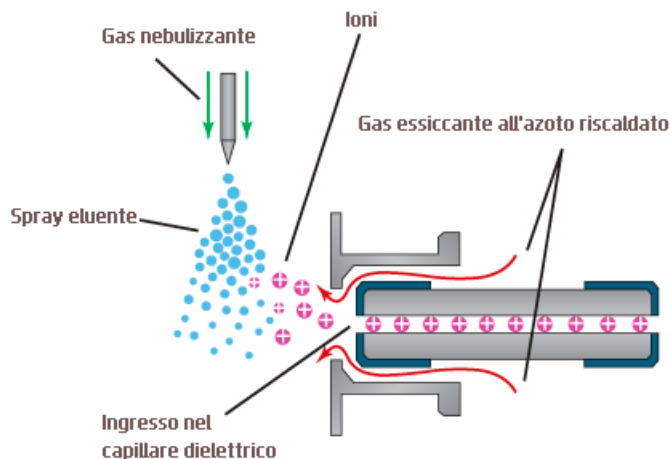


Figura 21 Introduzione ortogonale e ionizzazione per elettro-nebulizzazione

Lo spettrometro Agilent 6490 a triplo quadrupolo è dotato di un capillare a più canali in grado di campionare una quantità fino a dieci volte maggiore di ioni carichi in fase gas provenienti dalla sorgente.

Il capillare nei modelli 6460A, 6430A e 6420A è un capillare resistivo che migliora la trasmissione degli ioni e permette un'inversione di polarità praticamente istantanea. È lo stesso, comprovato campione utilizzato nella versione a rapida inversione di polarità del prodotto a quadrupolo singolo di Agilent.

Per il modello Agilent 6410 a triplo quadrupolo, il capillare è un capillare dielettrico "freddo" di vetro, che aumenta la desolvatazione e migliora la focalizzazione degli ioni con massa elevata, riducendo al minimo il rumore chimico. Parte della desolvatazione ha luogo nel capillare. Apparentemente, infatti, è migliore con i capillari in vetro rispetto ai capillari in acciaio inossidabile, e riduce il rumore dei cluster. Anche la focalizzazione degli ioni ne risulta migliorata.

Ionizzazione chimica a pressione atmosferica (APCI)

Molto spesso la ionizzazione chimica a pressione atmosferica (APCI) integra bene l'elettro-nebulizzazione. Dal momento che l'APCI non genera ioni a carica multipla, e opera a elevate temperature, viene solitamente usata per analizzare composti più piccoli, termicamente stabili, polari e non polari. La sorgente APCI di Agilent è sensibile e, tuttavia, anche estremamente robusta, grazie alla nebulizzazione ortogonale e al gas essiccante di controcorrente. Al pari della sorgente ESI, è in grado di generare ioni positivi e negativi, e la polarità degli ioni può essere invertita in base allo spettro.

Sorgente multimodale Agilent

La sorgente ionica più versatile per MS Agilent serie 6400 a triplo quadrupolo è la sorgente multimodale G1978B di Agilent, illustrata schematicamente in [Figura 22](#).

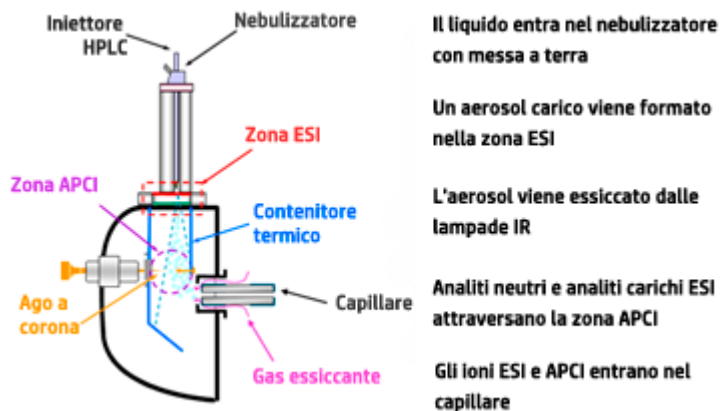


Figura 22 Sorgente multimodale Agilent G1978B

Gli analiti neutri e gli analiti a carica ESI attraversano la camera suddivisa entrando nella zona APCI o nella zona adiacente.

NOTA *Gli analiti si distribuiscono spazialmente tra le due sezioni.*

ESI e APCI sono processi fondamentalmente incompatibili, poiché ciascuno di essi necessita di condizioni proprie per l'essiccazione dell'aerosol e per i campi elettrici. Tuttavia, è possibile formare ioni contemporaneamente da ESI e APCI se le due regioni di ionizzazione sono spazialmente separate.

L'effluente della colonna HPLC viene nebulizzato usando lo stesso nebulizzatore utilizzato per una sorgente ESI dedicata. Le gocce si sviluppano nella "zona ESI", dove un elettrodo ad alta tensione carica le gocce inducendo la formazione degli ioni. Gli ioni che si formano in questa regione attraversano la sorgente ed entrano nel capillare. Le gocce residue sono essiccate per mezzo di due lampade a infrarossi (non illustrate) che emettono alla stessa frequenza di assorbimento dell'acqua. Il vapore e l'analita (o gli analiti) entrano nella zona APCI, dove subiscono ionizzazione. Gli ioni sono quindi attirati nel capillare nello stesso modo in cui avviene con le sorgenti ESI e APCI dedicate.

Sensibilità attesa Quando la sorgente multimodale viene utilizzata esclusivamente come sorgente ESI o APCI, non vengono rilevate perdite di sensibilità per i composti in esame. Per molti composti eseguiti in modalità mista, è possibile ottenere una risposta di pari segnale (rispetto al funzionamento a modalità singola) o un guadagno di sensibilità.

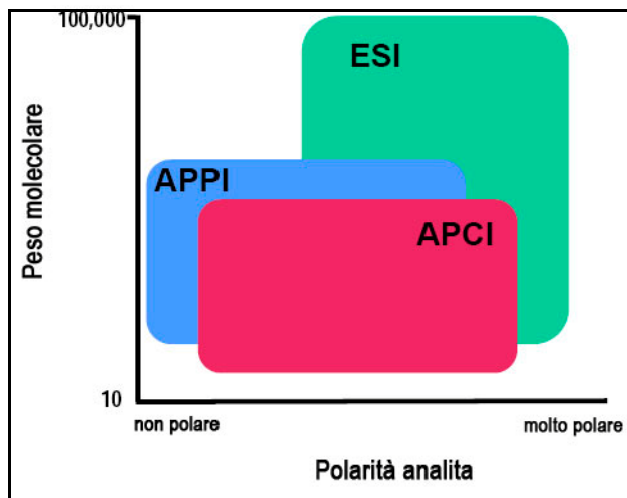
Gli studi, tuttavia, mostrano inoltre che quando si utilizza la sorgente multimodale in modalità ESI e APCI contemporaneamente, è possibile che si verifichi una perdita di sensibilità fino a un fattore di due per alcuni composti.

Risulta quindi fondamentale soppesare i benefici di eseguire analisi contemporaneamente nelle due modalità, a fronte di una perdita potenziale di sensibilità. Per molte applicazioni, una perdita di sensibilità di un valore inferiore a 2 è trascurabile.

Fotoionizzazione a pressione atmosferica (APPI)

Per l'analisi di composti che ionizzano in maniera inadeguata a partire da sorgenti ESI e APCI, la sorgente di fotoionizzazione a pressione atmosferica (APPI) fornisce un'utile alternativa. Alla comprovata nebulizzazione spray ortogonale di Agilent e al gas essiccante di controcorrente, unisce l'innovativa fotoionizzazione derivata dalla tecnologia Syagen. La lampada al krypton di lunga durata emette fotoni a livelli di energia sufficientemente elevati da ionizzare molte grandi classi di composti, ma abbastanza bassi da ridurre al minimo la ionizzazione dell'aria e i comuni solventi per HPLC. Un'energia di ionizzazione relativamente bassa significa che la sorgente APPI provoca una frammentazione minima generando per lo più ioni molecolari e molecole protonate.

La sorgente APPI può ionizzare composti che non ionizzano adeguatamente tramite le sorgenti ESI o APCI, come ad esempio gli idrocarburi policiclici aromatici (IPA). L'APPI, inoltre, può fornire una migliore sensibilità complessiva per alcuni composti sia rispetto all'ESI sia all'APCI. Alcuni esempi di questi composti sono il tetraidrocannabinolo (THC), l'acido benzoico, e le vitamine liposolubili. L'APPI può offrire migliore sensibilità a flussi più bassi rispetto all'APCI. I dati sulla riproducibilità indicano che l'APPI è robusta e altamente riproducibile.



HPLC-Chip

La tradizionale spettrometria di massa nanospray ha dimostrato tutto il suo potenziale in quanto tecnica sensibile, riproducibile ed economicamente vantaggiosa per l'identificazione di peptidi a livello di femtomoli e attomoli. Tuttavia, collegare nanocapillari, colonne e valvole è spesso una procedura noiosa, che richiede competenze e routine. Se gestite in maniera inappropriata, le connessioni di nano flussi tendono a creare fuoriuscite difficili da rilevare, con conseguenti scarse prestazioni e tempi di inattività di tutto il sistema molto prolungati. Gli aghi per nanospray al quarzo spesso si bloccano e devono essere sostituiti con una certa frequenza.

Con l'avvento della tecnologia HPLC-Chip, Agilent sta riducendo in maniera significativa la necessità di interazione dell'utente, rendendo il nanospray una tecnologia all'avanguardia molto robusta. Consultare la documentazione per HPLC-Chip per maggiori informazioni.

Soluzioni per chip Agilent disponibili in commercio:

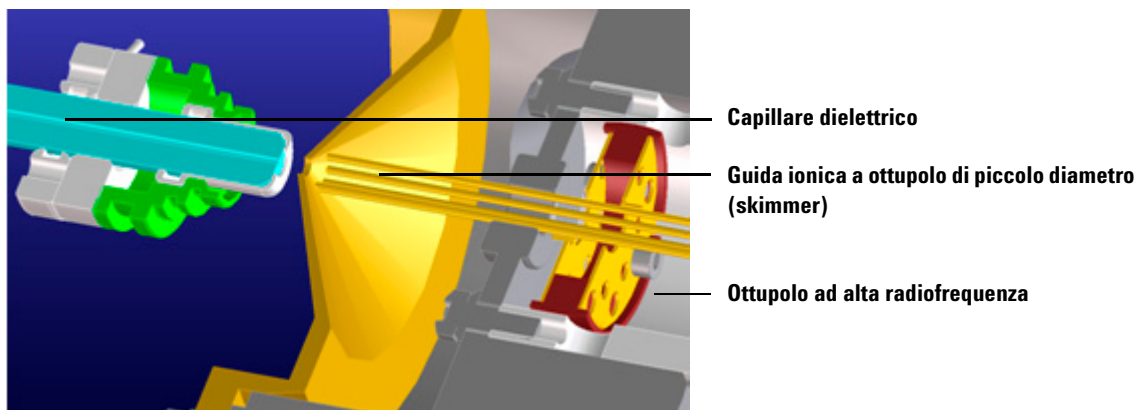
Applicazione	Chip
ID peptide/proteina	ProtID-Chip
Analisi delle proteine intatte	Protein Chip
Analisi dei glicani	PGC-Chip
Analisi dei fosfopeptidi	Phosphochip
Analisi di molecole di piccole dimensioni	SmlMol-Chip
Analisi di glicani su anticorpi monoclonali	mAb-Glyco Chip
Analisi personalizzate su richiesta dell'utente	Custom Chip

Ottica ionica anteriore

I principali componenti sono illustrati in [Figura 23](#). Il triplo quadrupolo utilizza la stessa ottica anteriore dello spettrometro di massa a quadrupolo singolo. Un ulteriore miglioramento è stato realizzato per il modello 6460A nella regione del vuoto esattamente dietro lo skimmer. Questo miglioramento ha consentito un aumento del pompaggio in questa regione, con un moderato aumento del segnale.

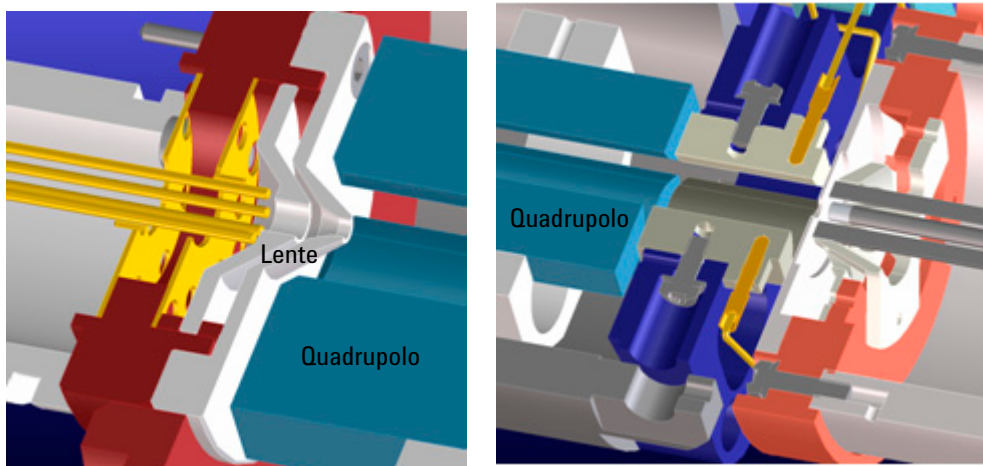
Per il sistema Agilent 6490A, lo skimmer è sostituito dalla tecnologia ion-funnel a doppio stadio descritta in "[Miglioramenti innovativi del modello 6490 triplo quadrupolo](#)" a pagina 24.

Nel modello 6490 il capillare dielettrico è stato sostituito con un piccolo capillare a più canali. È dotato di 6 iniettori capillari, ed è lungo la metà. È in grado di campionare una quantità fino a dieci volte maggiore di ioni carichi in fase gas provenienti dalla sorgente. Cattura la maggior parte del gas dalla regione della sorgente.



3 Sensibilità del sistema MS Agilent triplo quadrupolo

Ottica ionica anteriore



Radiofrequenza lente 2 (trasmissione di masse più elevate)

Quadrupolo iperbolico e post-filtro

Figura 23 Ottica anteriore

Skimmer Agilent utilizza uno skimmer con orifizio di piccolo diametro con distanze molto brevi tra il capillare, lo skimmer e l'ottupolo. Di conseguenza, la guida ionica a ottupolo è in grado di catturare un maggior numero di ioni in uscita dal capillare, mantenendo così il fascio ionico molto ben focalizzato.

Ottupolo 1 I multipoli più grandi forniscono una migliore trasmissione degli ioni su un intervallo di massa più esteso. La profondità del pozzetto potenziale è più ampia per i multipoli più grandi (a uguali tensioni), soprattutto quelli vicini alle barre, con conseguente dispersione di un numero di ioni minore. Questo spiega l'uso prevalente degli ottupoli come guide ioniche negli spettrometri di massa, dove l'obiettivo principale è trasmettere anziché filtrare gli ioni.

Radiofrequenza lente 2 La fase della lente 2 è abbinata a quella del quadrupolo successivo, MS1 (Q1), con una sensibilità notevolmente aumentata.

- Filtri di massa a quadrupolo** I quadrupoli sono costituiti da barre iperboliche che ottimizzano la trasmissione degli ioni e la risoluzione spettrale. All'interno delle barre circolari, la dispersione degli ioni è maggiore.
- Prefiltro** Anche la sezione terminale del gruppo quadrupolo MS1 (Q1) è costituita da barre iperboliche corte, ma le tensioni RF sono sufficientemente elevate soltanto da guidare gli ioni nella cella di collisione. Un simile insieme di barre sul lato di uscita della cella di collisione fa parte del quadrupolo MS2 (Q3). Queste barre corte esclusivamente in radiofrequenza agiscono da pre- e post-filtri rispetto alla cella di collisione al fine di garantire un'ottimale trasmissione degli ioni.

Cella di collisione

Cos'è la cella di collisione curva?

La cella di collisione è un'importante innovazione. La cella di collisione curva con focalizzazione assiale di campo dell'esapolo include una struttura cellulare rastremata per una maggiore ammissione degli ioni all'ingresso. La sua struttura riduce il rumore generato dallo ionizzatore.

Cos'è la cella di collisione?

La cella di collisione rappresenta un'altra innovazione. La cella di collisione è un gruppo esapolo ad alta pressione con accelerazione lineare regolata per ottimizzare la frammentazione MS/MS, eliminando nel contempo il cross-talk anche a tempi di residenza molto bassi (Figura 24).

3 Sensibilità del sistema MS Agilent triplo quadrupolo

Cella di collisione

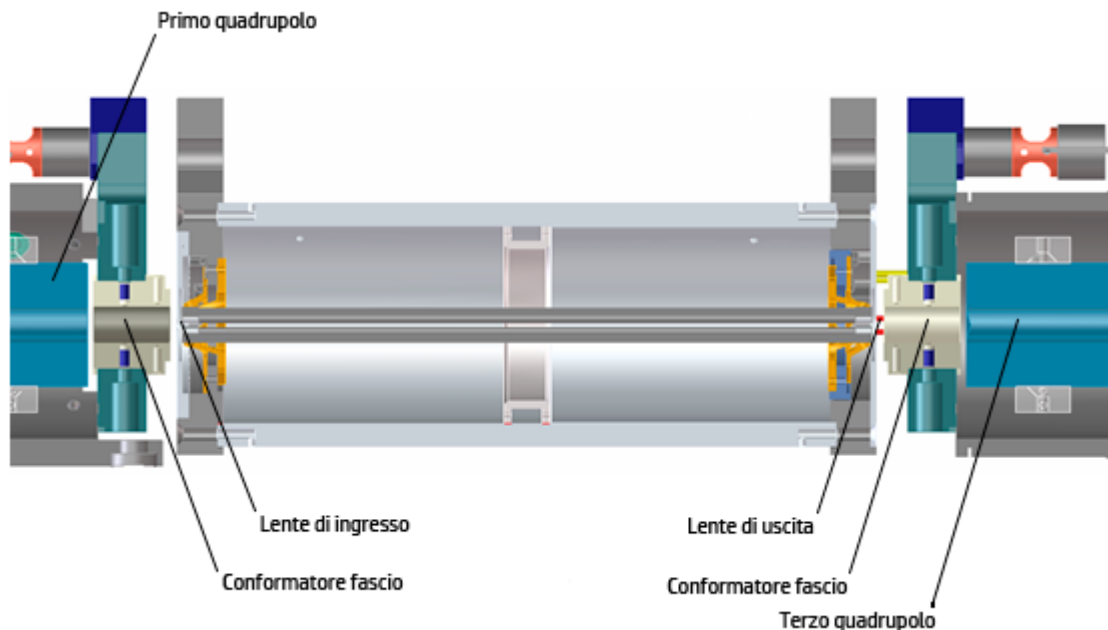


Figura 24 La tecnologia della cella di collisione per i modelli 6460 e 6430 offre maggiore sensibilità e risposte più rapide senza effetto memoria o cross-talk

I componenti che contribuiscono a questa maggiore sensibilità e risposte più rapide sono:

- Cella di collisione a esapolo di piccolo diametro
- Cella di collisione a esapolo ad alta frequenza
- Accelerazione lineare assiale
- Cella di collisione ad alta pressione
- Elettronica digitale ad alta velocità

La cella di collisione contiene azoto, lo stesso gas utilizzato come gas essiccante. Il piccolo diametro del gruppo esapolo agevola la cattura degli ioni frammentati. Parimenti, l'aggiunta di gas (8 mTorr) assiste nella focalizzazione degli ioni.

Perché un esapolo?

La geometria di un esapolo offre vantaggi in due campi: la focalizzazione degli ioni e la trasmissione degli ioni (Figura 25).

- Il primo vantaggio risiede nella focalizzazione degli ioni, per cui un quadrupolo è migliore di un esapolo, il quale a sua volta è migliore di un ottupolo, ossia quadrupolo > esapolo > ottupolo.
- Il secondo vantaggio implica la trasmissione degli ioni in un esteso intervallo di massa, o larghezza di banda di m/z . In questo caso, l'ottupolo sarà migliore dell'esapolo, il quale a sua volta sarà migliore del quadrupolo.

L'esapolo viene scelto poiché, nel complesso, si rivela il migliore ai fini della focalizzazione e della trasmissione degli ioni.

25

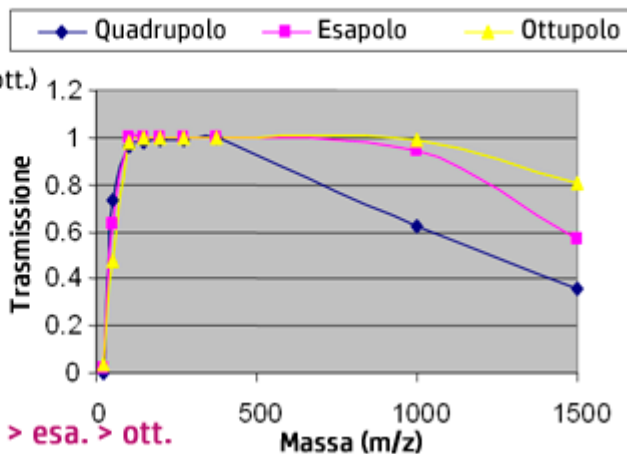
Trasmissione intervallo di massa (ott. > esa. > quad.)

Le variabili includono:

- Numero di poli (ad es. quad., esa., ott.)
- Diametro iscritto (R0)
- Frequenza di trasmissione

La valutazione include

- Modellizzazione teorica
- Simulazione di calcolo
- Risultati sperimentali



Focalizzazione degli ioni: quad. > esa. > ott.

Figura 25 Trasmissione di un esteso intervallo di massa e migliore efficienza di trasmissione con un esapolo

Progettazione della cella di collisione

L'esapolo della cella di collisione è costituito da sei barre ricoperte in maniera resistiva, utilizzate per generare una differenza di potenziale sull'intera lunghezza della cella di collisione (Figura 26).



Figura 26 Progettazione della cella di collisione

Una differenza di potenziale è sempre presente. Questo garantisce agli ioni precursore provenienti da MS1 (Q1), o ai frammenti ionici generati all'interno della cella di collisione, di essere trasmessi senza essere trasportati in maniera casuale.

La raccolta degli ioni in questo modo evita il problema del cross-talk, in cui gli ioni prodotto residui provenienti da un precedente esperimento MRM possono interferire con lo spettro degli ioni prodotto di un esperimento MRM successivo (vedere Figura 27). La tensione dell'energia di collisione viene applicata alla tensione lineare in accelerazione per generare frammenti o ioni prodotto.

Durata di svuotamento della cella di collisione

Il basso livello di cross-talk può essere dimostrato esaminando il tempo necessario per evacuare gli ioni dalla cella di collisione (Figura 27).

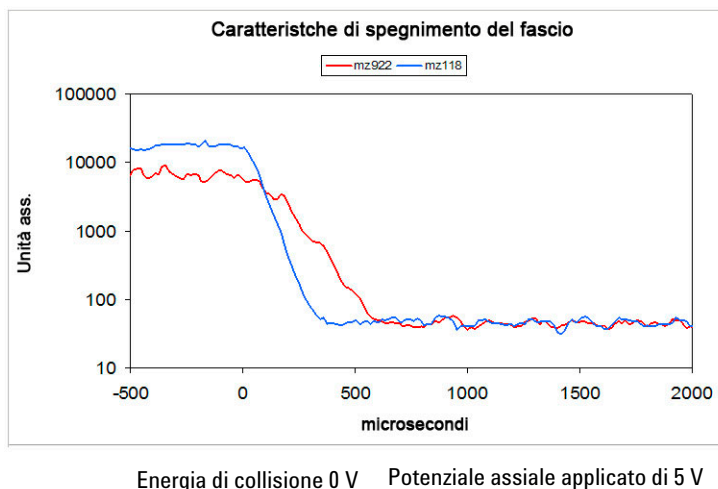


Figura 27 Profilo di svuotamento della cella di collisione (500 pg di Alprazolam, tempo di residenza di 20 ms)

La figura mostra che più elevata è la massa, più tempo sarà necessario per evacuare la cella di collisione. Ad esempio, un valore di m/z di 922 impiega circa 600 μs per evacuare la cella di collisione usando il potenziale lineare, mentre un valore di m/z di 118 impiega solo 350 μs . Ciò dimostra il basso livello di cross-talk dal momento che l'asse Y è logaritmico, ottenendo l'evacuazione totale della cella. Un ritardo di inter-scansione di 5 msec sarà, pertanto, più che sufficiente per eliminare tutti gli ioni dalla cella di collisione.

Rivelatore

Il gruppo rivelatore a dinodo ad alta energia è unico ad Agilent (Figura 28).

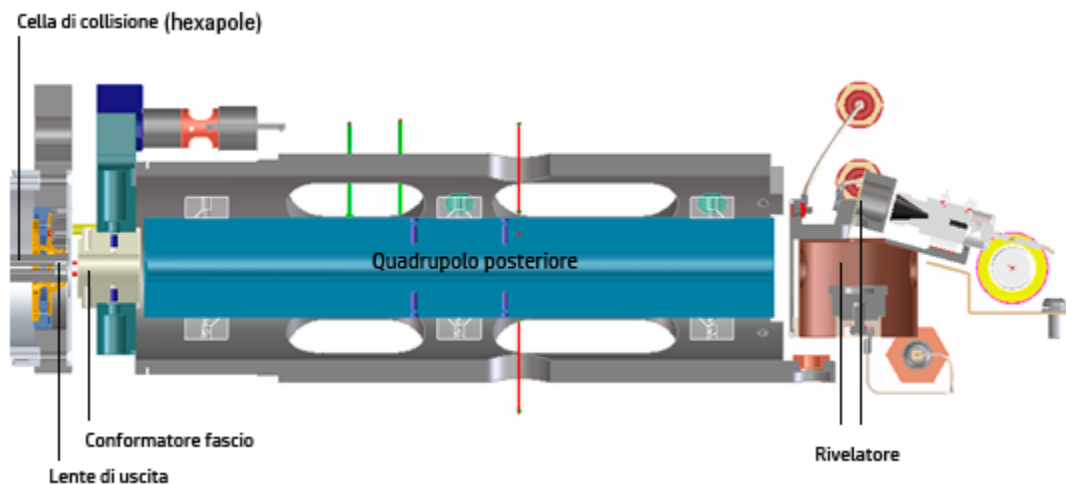


Figura 28 Componenti del rivelatore

I due dinodi sono ortogonali rispetto al fascio ionico e ai frammenti neutri. Questo orientamento riduce la possibilità che molecole neutre urtino contro il rivelatore attraendo contemporaneamente gli ioni con tensioni elevate. I dinodi servono a convertire gli ioni in elettroni prima che questi urtino contro il moltiplicatore. La progettazione fuori asse permette inoltre ai frammenti neutri di attraversare senza urtare contro il rivelatore.

La durata di vita del moltiplicatore è lunga dal momento che solo gli elettroni possono impattare su di esso. Gli ioni non impattano mai contro la superficie del moltiplicatore.

Sistema di pompaggio

6490 triplo quadrupolo

Il sistema 6490 è dotato di due pompe rotative e di una turbopompa tristadio per le prime cinque fasi di vuoto. Le due pompe rotative sono necessarie per diminuire la pressione all'interno dello ion-funnel a doppio stadio. La seconda turbopompa è aggiunta all'ultima fase di vuoto per aiutare a scaricare l'eccesso di gas proveniente dalla cella di collisione curva con focalizzazione di campo assiale dell'esapolo.

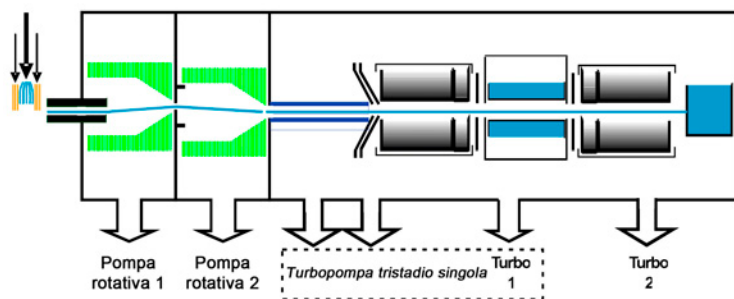


Figura 29 Sistema di pompaggio del modello 6490 triplo quadrupolo

6460 e 6430 triplo quadrupolo

Per le prime quattro fasi di vuoto si utilizza una pompa rotativa singola e una turbopompa tristadio. Questo è ottenuto suddividendo la turbopompa per creare più fasi di vuoto. La seconda turbopompa è aggiunta alla quarta fase di vuoto per aiutare a scaricare l'eccesso di gas proveniente dalla cella di collisione aumentata. Le turbopompe sono supportate da una pompa rotativa (meccanica) singola (Figura 30).

3 Sensibilità del sistema MS Agilent triplo quadrupolo

Sistema di pompaggio

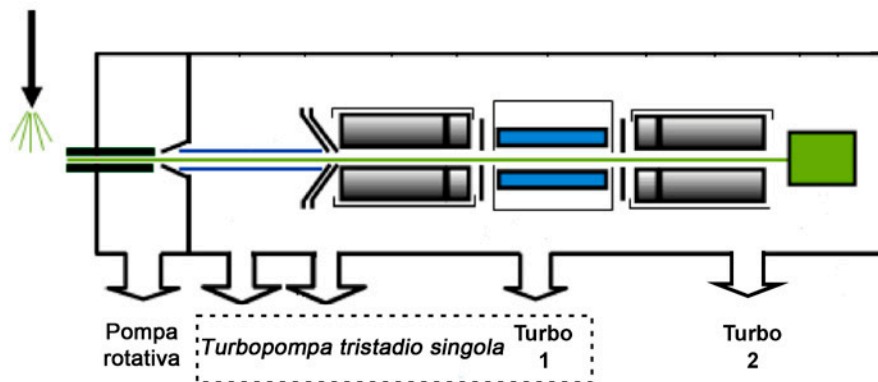


Figura 30 Sistema di pompaggio del modello 6460 triplo quadrupolo

6410 o 6420 triplo quadrupolo

Per l'intero sistema di vuoto si utilizza una turbopompa tristadio singola. Questo è ottenuto suddividendo la turbopompa per creare più fasi di vuoto. Per i modelli 6410 e 6420, non è necessaria una seconda turbopompa. Questa pompa è supportata da una pompa rotativa (meccanica) singola (Figura 31).

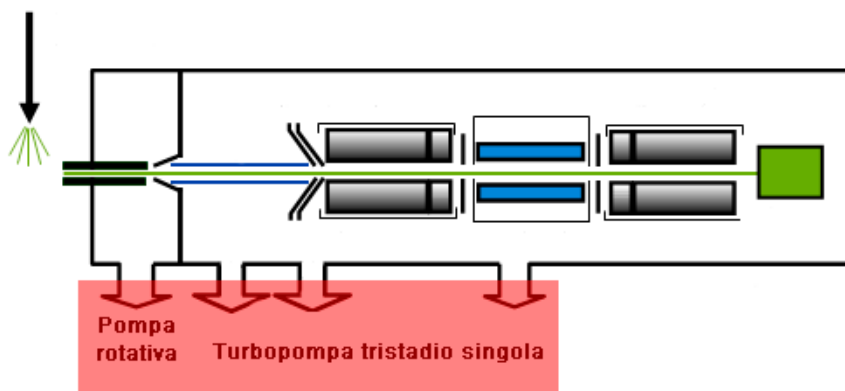
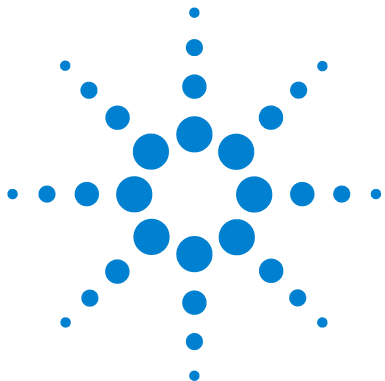


Figura 31 Sistema di pompaggio dei modelli 6410/6420 triplo quadrupolo



4 Software MassHunter di Agilent - Acquisizione dati per la serie 6400 triplo quadrupolo

Calibrazione 65

Acquisizione 67

Nella presente sezione sono illustrati i concetti utili per comprendere la progettazione e il funzionamento del software MassHunter di Agilent, il programma di acquisizione dati per LC/MS serie 6400 triplo quadrupolo.

Il programma di acquisizione dati ([Figura 32](#) a pagina 64) comprende le seguenti funzioni:

- Tutti i parametri LC e MS sono immediatamente visibili.
- I tracciati in tempo reale mostrano lo strumento al lavoro.
- L'esecuzione di più campioni è facilmente gestita attraverso una lista di lavoro - un'interfaccia simile a un foglio lavoro.



4 Software MassHunter di Agilent - Acquisizione dati per la serie 6400 triplo quadrupolo



Figura 32 Programma di acquisizione dati

A partire da queste finestre è possibile effettuare le seguenti operazioni:

- Controllo e monitoraggio delle impostazioni dello strumento
- Calibrazione dello strumento
- Configurazione dei parametri di acquisizione per LC e triplo quadrupolo
- Monitoraggio del cromatogramma e degli spettri di massa in contemporanea con l'analisi dei campioni
- Configurazione delle liste di lavoro per le sequenze dei campioni

Calibrazione

Autocalibrazione e controllo di calibrazione

Un controllo di calibrazione (funzione Checktune) può essere utilizzato per stabilire se le masse di ioni nella miscela di calibrazione sono correttamente assegnate e se la risposta o la sensibilità di questi ioni rientrano nei limiti attesi. Questo controllo di calibrazione richiede al massimo 15 minuti. È possibile eseguire una calibrazione automatica (funzione Autotune) nel caso in cui sia necessaria una calibrazione più accurata (Figura 33). Per tutti i modelli eccetto il sistema 6490, una calibrazione automatica impiega 15-20 minuti per ciascuna polarità; il modello 6490 impiega circa 45 minuti per ciascuna modalità di ionizzazione. L'operazione è completamente automatica poiché la miscela di calibrazione viene erogata dal sistema di erogazione del calibrante (CDS), il quale si attiva automaticamente durante la calibrazione.

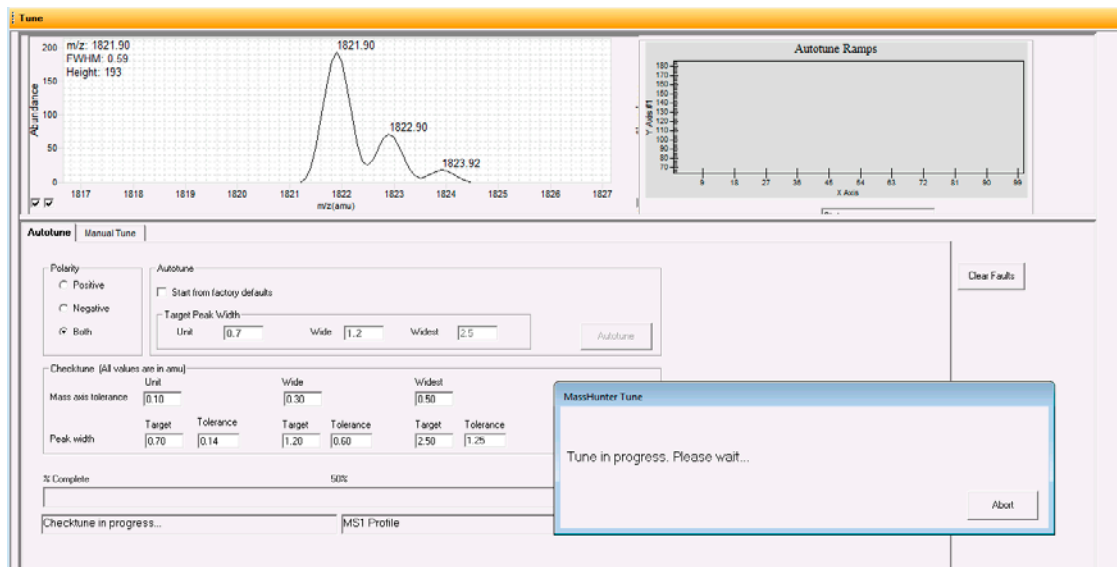


Figura 33 Autocalibrazione in corso

Calibrazione manuale

È disponibile una calibrazione manuale (funzione Manual Tune) delle masse di ioni definite dall'utente, con sei masse di profili corrispondenti. Per la miscela di calibrazione con Autotune, è inoltre disponibile una versione automatizzata.

Acquisizione

Molti moduli LC Agilent e MS serie 6400 triplo quadrupolo possono essere controllati e monitorati (finestra Instrument Status) dallo stesso programma usato per inserire le impostazioni di acquisizione (finestra Method Editor) e configurare gli elenchi di campioni da eseguire (finestra Worklist)(Figura 32 a pagina 64).

La finestra Chromatogram Plot, inoltre, può mostrare i cromatogrammi MS e UV in tempo reale.

Considerata l'ampiezza delle informazioni disponibili, tutte queste finestre possono essere chiuse per una più agevole visualizzazione, ove necessario. Tuttavia, almeno una di esse deve rimanere sempre aperta.



Figura 34 Stato dello strumento e tracciato in tempo reale

4 Software MassHunter di Agilent - Acquisizione dati per la serie 6400 triplo quadrupolo

Acquisizione

www.agilent.com

In questo volume

La Guida ai concetti
presenta il "Quadro
d'insieme" del sistema LC/MS
Agilent serie 6400 triplo
quadrupolo che aiuterà a
comprendere il
funzionamento dell'hardware
e del software.

La presente guida include
i seguenti concetti:

- Introduzione
- Funzionamento interno
- Sensibilità del sistema MS
- Programma di acquisizione
dati per la serie 6400 triplo
quadrupolo

© Agilent Technologies, Inc. 2012

Revisione A, marzo 2012



G3335-94127



Agilent Technologies