

RIJKSINSTITUUT VOOR VOLKSGEZONDHEID EN MILIEUHYGIENE
BILTHOVEN

Rapportnummer 502501016

Bouw van een eigen ontwerp electrospray ionisatiebron
voor een quadropool massa-spectrometer en enkele
toepassingen

E.A.I.M. Evers en A.P.J.M. de Jong

maart 1994

Dit onderzoek is verricht in opdracht van de Directie RIVM in het kader van het project
Analytisch Chemische Meetmethoden (502501).

VERZENDLIJST

| | |
|-------|---|
| 1 | Directie RIVM |
| 2 | Dr. R.A. Bauman |
| 3 | Dr. E.C. Beuvery |
| 4 | Dr. Ir. R.F.M.J. Cleven |
| 5 | Drs A.K.D. Liem. |
| 6 | Dr L. A. van Ginkel |
| 7 | Ing. E. van der Heeft |
| 8 | Dr. E.A. Hogendoorn |
| 9 | Dr. Ir. P. Hoogerhout |
| 10 | Dr. G.F.A. Kersten |
| 11 | Dr. H.A. van 't Klooster |
| 12 | Drs. J.A.M. Lijdsman - Schrijvenaars |
| 13 | P. den Otter |
| 14 | Dr. R.W. Stephany |
| 15 | Dr. G. van de Werken |
| 16 | Dr. P. van Zoonen |
| 17 | Bureau projecten- en Rapportenregistratie |
| 18 | Depot Nederlandse publikaties en Nederlandse bibliografie |
| 19-20 | Auteurs |
| 21-22 | Bibliotheek RIVM |
| 23-29 | Reserve exemplaren |

INHOUDSOPGAVE

| | |
|---|------|
| | blz. |
| VERZENDLIJST | ii |
| INHOUDSOPGAVE | iii |
| SUMMARY | iv |
| SAMENVATTING | v |
| 1. Inleiding | 1 |
| 2. Achtergronden Electrospray Ionisatie | 2 |
| 3. Constructie Bron | 5 |
| 4. Experimenteel | 9 |
| 5. Resultaten | 10 |
| 6. Conclusies | 16 |
| 7. Referenties | 16 |
| 8. Dankzegging | 17 |

SUMMARY

This report describes the manufacturing, the working and results of preliminary applications of a home-built electrospray ionisation source. The source was constructed for a quadrupole mass-spectrometer (MS) (Finnigan 4000). The elements of the source and interface are: a micro needle at high potential to the capillary, a capillary for transport of the ions and a sampling orifice (skimmer) to the mass analyser and detector. That interface enables the transport of ions from atmospheric pressure to the required high vacuum in the mass analyser as well as an appropriate focussing of ions corresponding. The design concerns the physical dimensions of the different parts and the electrical potentials. The results show that the electrospray process, the transport and the focussing operate satisfactorily. The highest sensitivity was measured for Gramicidin S (polypeptide, MW 1141 Dalton) at about 10 femtomol. For substances with a lower molecular weight the sensitivity was much lower and ranged from about 100 fmol for the polysaccharide streptomycin (MW 581 Da) to 50 pmol for polar low MW herbicides glyfosate and glufosinate. It seems useful to construct an extra focussing device between the skimmer and the analyser to enhance the transmission efficiency for the low molecular weight species. (<400 Da)

SAMENVATTING

Dit rapport beschrijft de bouw, de werking alsmede enkele toepassingen van een eigen ontwerp electrospray ionisatiebron voor een bestaande quadropool massaspectrometer (MS). De bron en het interface bestaat uit een micronaald (op een hoog potentiaal t.o.v. het capillair voor de vorming van ionen bij atmosferische druk), een capillair voor transport van ionen en een bemonsteringsopening (skimmer) naar de MS analysator en detector. Het interface bewerkstelligt de overbrugging naar het hoog vacuum van de MS, het transport en de focussing van de ionen voor massa-analyse en detectie. Het ontwerp heeft betrekking op de dimensionering van zowel de verschillende onderdelen als ook van de elektrische potentialen. De resultaten laten zien dat het electrospray-ionisatie proces en het transport en sampling van ionen naar behoren functioneerde.

De hoogste gevoeligheid werd verkregen voor Gramicidine S (polypeptide, MW 1141 dalton) en bedroeg circa 10 fmol. Voor lagere MW stoffen was de gevoeligheid aanzienlijk geringer en lag tussen 100 fmol voor streptomycine (polysaccharide, MW 581 Da) en 50 pmol voor de polaire laagmoleculaire bestrijdingsmiddelen glyfosaat en glufosinaat (MW resp. 169 en 181 Da). Voor verbetering van het transmissierendement van laagmoleculaire verbindingen zou een additioneel focusserings-systeem verbetering kunnen bieden.

1. INLEIDING

Massaspectrometrie is een bij uitstek geschikte techniek voor de karakterisering van onbekende verbindingen. Sinds de ontdekking ervan begin deze eeuw heeft de techniek eerst een geleidelijke en later een stormachtige ontwikkeling doorgemaakt van de status waarmee slechts zuivere gassen, vloeistoffen en vaste stoffen konden worden geanalyseerd tot thans een van de meest krachtige analytische technieken. Vooral de koppeling met chromatografische scheidings-technieken heeft een enorme uitbreiding gegeven van de toepassingsgebieden.

In het verleden waren er steeds inherente beperkingen van de techniek die bredere toepassingen in de weg stonden zoals voor hoogmoleculaire, thermolabele en polaire verbindingen. Deze beperkingen waren: het massabereik van de analysator en de noodzaak om de te onderzoeken stof als gas in de ionenbron te brengen. In het afgelopen decennium zijn hiertoe talrijke oplossingen bedacht. Als belangrijkste kunnen worden genoemd (i) de ontwikkeling van de diverse interfacetechnieken voor vloeistofchromatografie (direct liquid introductie [1], thermospray [2], en particle beam [3]); (ii) de ontwikkeling van secundaire ionizatie technieken (SIMS en FAB) [4], en (iii) de ontwikkeling van de zogenaamde time-of-flight MS [5] (scheiding van deeltjes op basis van verschil in vluchttijd). Laatstgenoemde techniek kent in principe geen beperking ten aanzien van het massabereik.

Op dit moment zijn FAB en het gebruik van hoog energetische laserstralen (techniek die bekend staat als "matrix assisted laser desorption ionisatie" (MALDI) [6]) de meest succesvolle methoden voor ionisatie van hoog moleculaire stoffen.

Een tweede, geheel verschillende ontwikkeling betreft electrospray als ionisatiemethode in MS (ESI-MS). Electrospray is een reeds lang bestaande fysische methode [7,8] waarbij een capillaire vloeistofstroom onder invloed van een hoog elektrisch veld wordt verneveld, zodat druppels worden gevormd met daarin opgeloste ionen. Deze geladen druppeltjes nemen door splitsing en verdamping sterk in grootte af en resulteren uiteindelijk in een soort gasvormig geladen monstermoleculen, zonder dat extra ionisatie-energie is toegevoegd. Dit zachte (laag energetische) ionisatieproces maakt deze techniek in het bijzonder geschikt voor de analyse van grote, thermolabele, en anderszins moeilijk te verdampen c.q. te ioniseren stoffen. Bovendien blijkt dat monstermoleculen meer dan één ladingseenheid kunnen opnemen. Voor biomacromoleculen blijken vaak 1 tot 2 ladingen per kilo-dalton voor te komen. Aangezien de scheiding van ionen in de massaspectrometer plaatsvindt op basis van de massa/lading verhouding leidt een dergelijke meervoudige lading tot een evenredige toename van het bereik. Dit onderzoek heeft zich bezig gehouden met het ontwerp van een electrospray bron op een bestaande quadrupool massaspectrometer. De belangrijkste problemen hierbij zijn het functioneren van electrospray proces zelf en het transport van gevormde ionen in de massaspectrometer.

Een praktisch probleem vormt hierbij de overbrugging van het drukverschil tussen het electrosprayionisatie proces, dat bij atmosferische druk plaatsvindt en het hoge vacuum van de

MS. Een tweede probleem vormt de variabele hydratatiegraad van de monsterionen. De geadsorbeerde watermolekulen moeten zo volledig mogelijk zijn verwijderd op het moment van massaanalyse, onder meer omdat deze tot een foutieve massabepaling zou leiden. Andere te optimaliseren factoren zijn de gevoeligheid en het induceren van fragmentatie voor structuurophelderingsdoel-einden.

Deze en andere aspecten zijn in dit onderzoek onderzocht. Tevens worden enkele toepassingen gedemonstreerd.

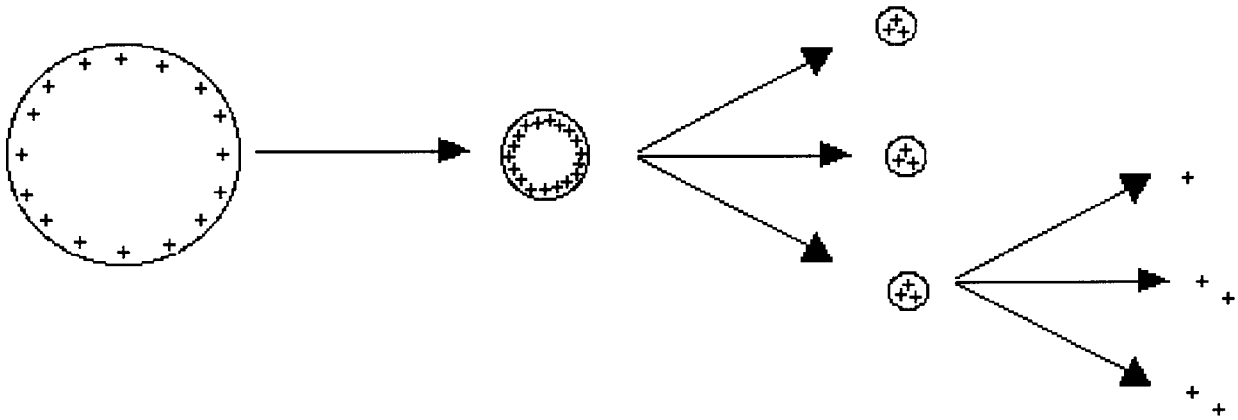
2. ACHTERGRONDEN ELECTROSPRAY IONISATIE

Electrospray als een alternatieve ionisatietechniek in massaspectrometrie (ESI-MS) bestaat in principe uit drie stappen: (1) het electrosprayproces van waterige vloeistoffen; (2) de ionisatie van montermoleculen; (3) de selectie, transport en focussing van gevormde ionen in de massa-analysator voor scheiding en detectie. Deze onderdelen zullen hierna in het kort kwalitatief worden beschreven. Voor een theoretische onderbouwing van deze typisch fysische processen wordt verwezen naar de literatuur [9]

2.1 Electrospray

Electrospray is reeds lang bestaand fysisch proces [7,8] dat berust op het fenomeen dat een capillaire vloeistofstroom in een sterk elektrisch veld de neiging vertoont tot het verstuiwen in een nevel van kleine druppeltjes. Het proces wordt geïnitieerd door electrolyse van de waterige vloeistof in het capillair, waarbij onder meer positieve H_3O^+ ionen en vrije electronen ontstaan. De electronen worden via de metalen naald afgevoerd, terwijl de positieve ionen met de verstoven druppeltjes worden meegevoerd. Onder invloed van het elektrische veld hopen deze zich aan het oppervlak van deze druppeltjes op. Tevens vindt verdamping van vloeistof plaats, hetgeen leidt tot een afname van het volume en de concentratie van de positieve ladingen toeneemt. Aan het oppervlak van de druppel oefenen deze een onderlinge afstotende werking uit die destabiliserend werkt op de druppelvorm. Indien deze krachten de oppervlakte spanningskracht overschrijden, de zg. Rayleigh limiet [11], wordt de druppel instabiel en zal uiteen vallen in een groot aantal kleinere druppeltjes. Op een gegeven moment vindt bij een voldoende kleine druppelgrootte er een zogenaamde “ionverdamping” plaats. Dit is een proces waarbij een positief geladen ion onder invloed van het sterke elektrische veld waarin het zich bevindt tegen de oppervlaktetenspanning in uit de druppel worden gestoten [12]. Dit wordt met de term Coulombse-explosie aangeduid: het uiteenspatten in microdruppeltjes. Deze explosie en verdampingsprocessen volgen elkaar op totdat uiteindelijk een soort gasvormige, geladen deeltjes gevormd worden die zich door de atmosfeer richting anode bewegen (Figuur 1).

Een meer recente theorie beweert dat de al of niet gehydrateerde molecuul-ionen rechtstreeks uit de vloeistof-meniscus vrijkomen aan het eind van het capillair en het begin van het hoogspan-



Figuur 1. Schematische weergave van de vorming van ionen uit microdruppels

ningsveld [10].

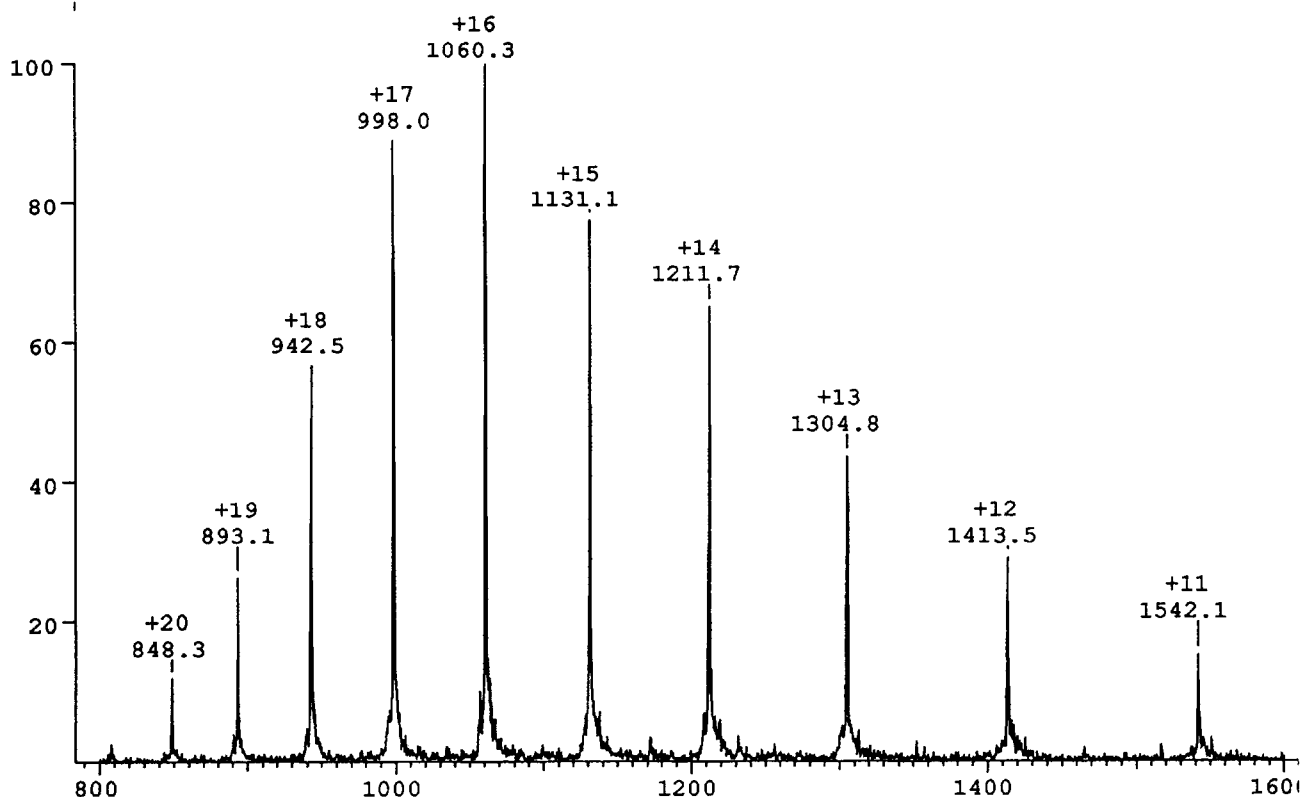
De potentiaal waarbij het verstuiwingsproces aanvangt (onsetpotentiaal, V_0) is afhankelijk van de aard van de vloeistof (viscositeit, oppervlaktespanning, geleidbaarheid), de grootte en vorm van het capillair-uiteinde (dichtheid veldlijnen) en de afstand tussen capillair en anode. Dit potentiaalverschil moet in ieder geval kleiner zijn dan de zogenaamde coronapotentiaal, immers als de coronapotentiaal wordt overschreden wordt de electrospray-stroom weliswaar een factor 20 hoger maar dat wordt bijna uitsluitend veroorzaakt door clusters oplosmiddelmoleculen die de meting verstoren [13]. Vanwege de grote oppervlaktespanning voor water ligt de onsetpotentiaal boven de coronapotentiaal. Door menging met een organische vloeistof, zoals bijvoorbeeld methanol wordt de oppervlaktespanning en dus ook de onsetpotentiaal verlaagd. Omstandigheden waarbij een stabiele spray kan worden verkregen zijn een mengverhouding van 1:1 water-methanol, een potentiaal tussen 2 tot 4 kV en een afstand van 5-10 mm tussen spray-naald en het capillair. Kenmerkend voor electro-spray is dat de initieel gevormde druppeltjes een vrij nauwe grootteverdeling bezitten rond een gemiddelde diameter van enkele μm [14]. De straal r van de initiële druppel is evenredig met de oppervlakte spanning γ en de diëlectrische constante ϵ_0 en omgekeerd evenredig met het kwadraat van de ladingsdichtheid σ .

$$r = 4 \epsilon_0 \gamma / \sigma^2$$

2.2 Electrospray Ionisatie.

Indien zich monstermoleculen in de vloeistof bevinden, dan kan in het hierboven beschreven proces overdracht plaatsvinden van lading naar deze moleculen. Het mechanisme dat hierbij een rol speelt is dat de toename van de concentratie H_3O^+ ionen bij verkleining van de druppelgrootte kan leiden tot ion-molecuulinteracties onder overdracht van een proton (H^+). Een randvoorwaarde hierbij is dat de protonaffiniteit (PA) van het monster groter moet zijn dan 7.8 eV (PA van water). De protonenoverdracht kan het makkelijkst plaatsvinden op basische groepen in het molecuul (functionele groepen met grotere PA dan water). Indien er daarvan meer dan één

aanwezig is kan dat tot een meervoudige protonering leiden. Hierbij zal een statistische verdeling optreden van het aantal ladingen over de verschillende moleculen van die stof. Dit leidt tot kenmerkende ESI spectra, die veelal uit een zogenaamde enveloppe van geprotoneerde $[MW+nH]^{n+}$ ionen bestaat waarvan de intensiteitsverdeling representatief is voor deze ladingsverdeling (zie Figuur 2).



Figuur 2. Het ESI massaspectrum van 10 pmol myoglobine. Het aantal ladingen (n) van de ionen staat bij de pieken vermeld. Het tweede getal geeft de m/z verhouding aan. Het valt te zien dat $(n \cdot m/z - n)$ een constante is die overeenkomt met de moleculaire massa van de stof, is boven de pieken aangegeven. Het spectrum werd opgenomen met een MAT 95 [14]

2.3. Transport van ionen naar massaspectrometer.

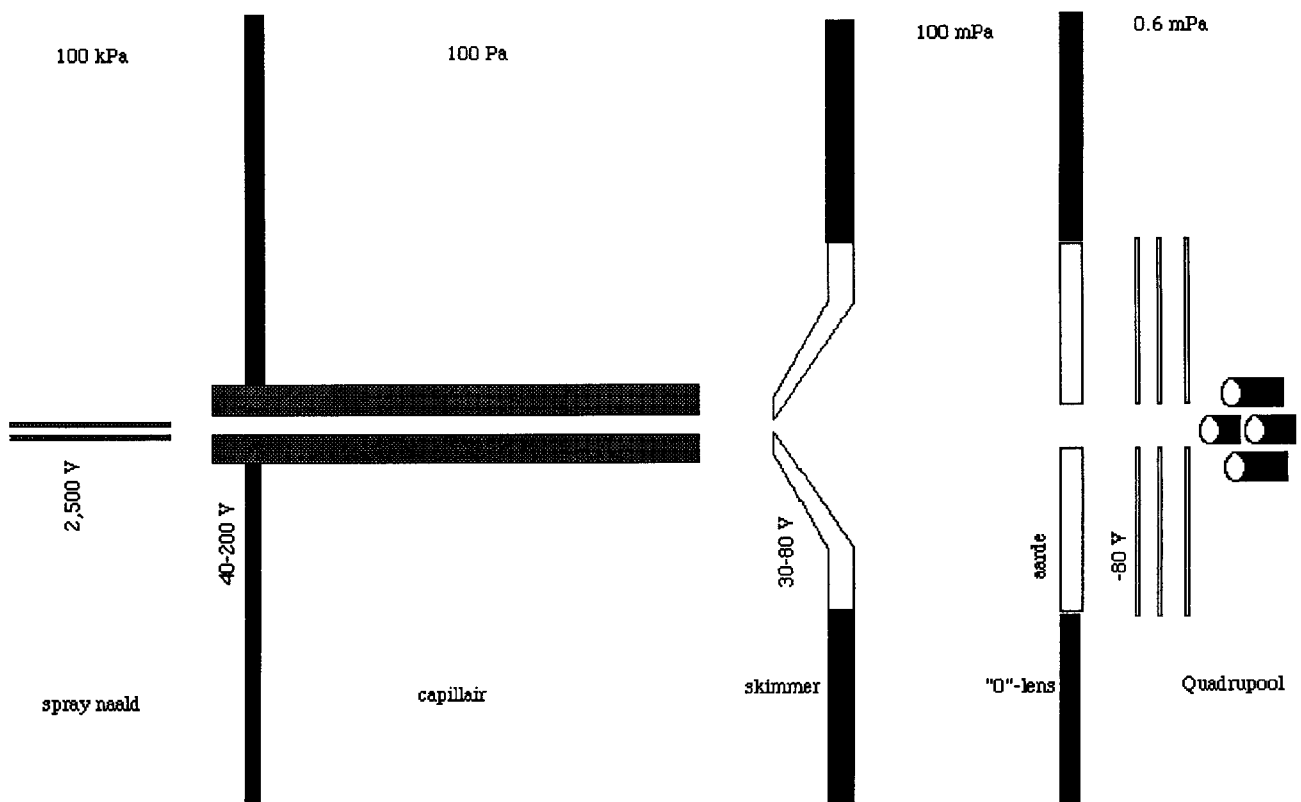
In feite is een ESI bron een interface tussen het atmosferische electrospray proces en de onder hoog vacuum opererende massaspectrometer. Het interface moet voor tenminste drie functies zorgdragen: (1) transport van gevormde ionen naar de MS; (2) overbruggen van het drukverschil en (3) desolvatatie: de verwijdering van geaddeerde watermoleculen aan ionen. Deze 'droog-functie' is essentieel. De gehydrateerde deeltjes $[M+nH^+ \cdot xH_2O]$ blijken tamelijk stabiel en zijn als zodanig ongewenst. In de eerste plaats beïnvloeden ze de massa van de deeltjes. In de tweede plaats wordt het signaal bij wisselende aantallen watermoleculen per monstermolecule over een groot aantal deelsignalen verdeeld, hetgeen de gevoeligheid nadelig zal beïnvloeden. Desolvatatie kan op verschillende manieren worden uitgevoerd. In feite komen de gebruikelijke methoden neer op het veroorzaken van botsingen met gasmoleculen, bijvoorbeeld door ze te leiden tegen een stroom drooggas in, of door ze te versnellen door een gebied met een relatief hoge druk (botsings

geïnduceerde desolvatie). Verwarming van dit gebied tot omstreeks het kookpunt van water kan de effectiviteit van dit proces bevorderen. Het transport van ionen naar de massa-analysator wordt in het volgende paragrafen nader besproken aan de hand van het gekozen ontwerp.

3. CONSTRUCTIE BRON

De constructie van de bron is weergegeven in Figuur 3. Het bestaat uit vier belangrijke onderdelen: (1) een capillair voor transport van ionen vanuit de electrospraygebied naar de massaspectrometer, (2) een lokaal laag vacuum gebied (ongeveer 100 Pa) tussen capillair en skimmer voor desolvatie, (3) een zogenaamde skimmer en (4) een doorvoeropening voor de geladen deeltjes naar de MS (hoogvacuum).

Het capillair heeft een lengte van 320 mm en een inwendige diameter van 0.51 mm. Het capillair



Figuur 3. Schematische weergave van de ESI bron. Boven worden de heersende drukkens aangegeven, onder een aanduiding van de spanningen op de verschillende componenten. De vette zwarte lijnen geven de vacuumafscheidings aan.

wordt verwarmd tot een temperatuur van circa 100°C. Het verbindt het atmosferisch electrospray gebied met een gebied met verlaagde druk juist voor de skimmer. De gasflow door het capillair bedraagt circa 0.12 l lucht/minuut bij een drukval van circa 100 kPa. De snelheid in het capillair

bedraagt circa 100 m/sec aan het begin en loopt op tot enkele kilometers per seconde aan het einde ervan. Deze transversale snelheid is van dezelfde grootte orde als de thermische snelheid van luchtmolekulen bij kamertemperatuur (ca 400 m/sec). Bij de relatief hoge druk aan het begin van het capillair bedraagt de vrije weglengte bij benadering slechts enkele nanometers (10^{-9} m). Dit betekent dat botsingen van ionen in het capillair voor het merendeel met luchtmolekulen zal plaatsvinden en niet met de wand van het capillair. Door botsing met de wand zou het ion ontladen en daardoor verloren gaan. Verderop in het capillair neemt de vrije weglengte weliswaar toe, maar desondanks zal de voorwaarts gerichte bewegingssnelheid nog steeds factoren groter zijn dan radiale diffusiecomponent, zodat ook hier relatief weinig botsingen met de wand van het capillair te voorzien zijn. Botsingen met luchtmoleculen (stikstof en zuurstof), leiden niet tot ladingsverliezen omdat de protonaffiniteit (PA) van zuurstof en stikstof (resp. 4.4 en 5.3 eV) laag is in vergelijking tot de PA van de geprotoneerde molekuulionen ($PA > 7.8$), zodat geen overdracht van protonen zal plaatsvinden. De botsingen met lucht veroorzaken een drijvende kracht die monsterionen in staat stelt tegen een sterk elektrisch veld in te bewegen (tot 15 kV en hoger).

3.1. Gebied tussen Capillair en Skimmer

De positionering van de bemonsteringsopening naar de MS, de zogenaamde skimmer, is van kritisch belang voor het transmissierendement (zie Figuur 4). De adiabatische expansie aan het uiteinde van het capillair veroorzaakt een supersonische lucht- en deeltjesstroom. Deze wordt gekenmerkt door een zogenaamde stille zone en een machschijf (zie schema). Het stromingsprofiel in de stille zone is rechtlijnig in het verlengde van de expansieopening waarbij grootste dichtheid aan deeltjes op het verlengde van de as ligt. De maximale transmissie wordt dan ook verkregen als de skimmeropening exact op de as van het capillair ligt én in de stille zone wordt opgesteld [15]. Indien de skimmeropening buiten de stille zone ligt zal bij de ingang van de conus wederom dispersie optreden met als gevolg een drastisch vermindering in gevoeligheid. De afstand (D) tussen expansieopening en de zogenaamde machschijf volgt uit de formule

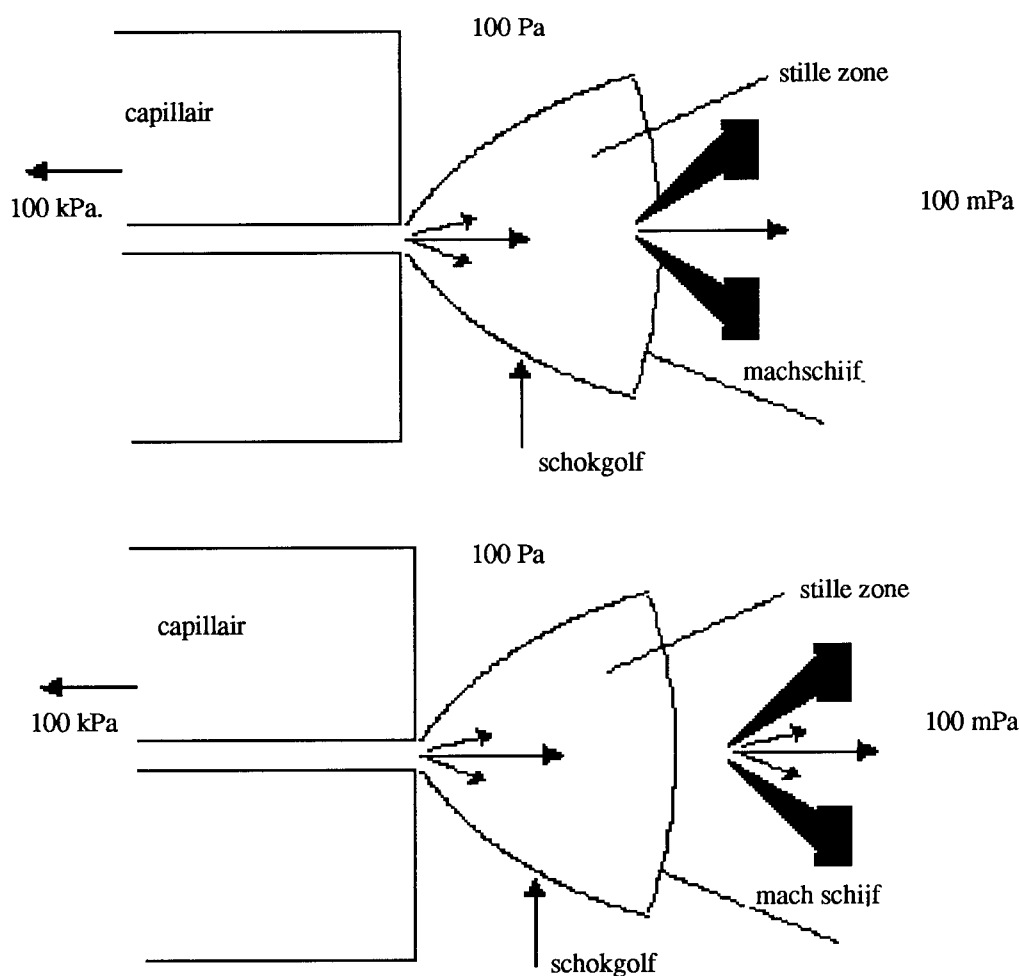
$$D = 0.67 D_0 (P_0/P_1)^{0.5}$$

waarin D_0 = diameter van het capillair, P_0 = druk aan voorzijde van het capillair (atmosferisch) en P_1 = druk aan de achterzijde capillair.

Bij gebruik van een capillair met een diameter van 0.51 mm en een druk aan het einde van 100 Pa, volgt daaruit dat de afstand van de machschijf circa 10 mm bedraagt. In het onderhavige geval zijn P_0 en de diameter van het capillair constant zodat D alleen afhankelijk is van P_1 .

Het stromingsprofiel van lichte ionen, die een relatief gering impulsmoment (mv) bezitten, zal meer beïnvloed worden door diffusie en wederzijdse elektrische afstoting. De baan zal dan ook meer afwijken van de ideale rechte bewegingsrichting dan voor de zwaardere deeltjes, waardoor ze minder effectief door de skimmer zullen worden getransporteerd.

Ook andere invloeden kunnen verstorend werken. Hiertoe kunnen mechanische onvolkomenheden



Figuur 4. Invloed van de positie van de skimmer t.o.v. de machschiif op de ionen transmissie. Indien de skimmer buiten de machschiif gepositioneerd is zal de skimmeropening als dispersie punt functioneren.

Ook andere invloeden kunnen verstoring werken. Hiertoe kunnen mechanische onvolkomenheden van de skimmeropening worden gerekend zoals de aanwezigheid van scherpe randen en bramen die een verstoring kunnen veroorzaken van de symmetrie en homogeniteit van de veldlijnen. Het effect hiervan zal het grootst zijn voor de lichtere deeltjes. Dit wordt dan ook als de belangrijkste reden gezien dat een afgeplatte skimmerconus, ondanks de minder goede aërodynamische eigenschappen, een aanzienlijke beter transmissierendement geeft in vergelijking tot een spitse conus [15].

3.2. Drukken in interface en analysator.

Massaspectrometers opereren onder een hoog vacuum om intensiteitsverliezen veroorzaakt door ion-molecuulinteractie in de analysator te minimaliseren. Voor quadrupool instrumenten is de af te leggen weg veel kleiner dan voor magneet-sector instrumenten. Een waarde van < 0.01 Pa is een gebruikelijke druk voor een quadrupool MS. In tegenstelling tot conventionele bronnen, vindt de

zoveel mogelijk monstermoleculen te extraheren uit een grote overmaat lucht. Dit wordt bereikt door een sterk positief discriminerend effect voor de zwaardere deeltjes met behulp van een zogenaamde skimmer (zie boven). De overmaat lucht wordt grotendeels weggepompt, bij voorkeur middels een differentieel pompsysteem.

In het gekozen ontwerp (zie Figuur 3) zijn de volgende omstandigheden gerealiseerd:

De flow door het capillair (diameter 0.51 mm, drukval ca. 100 kPa) bedraagt circa 17 ml /sec (gemeten bij atmosferische druk). De moleculaire flow door het capillair is alleen afhankelijk van de grootte van de expansieopening en bedraagt bij benadering $0,12 \text{ dm}^3 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{mm}^{-2}$. Het gebied tussen capillair en skimmer wordt afgepompt met een roterende vacuumpomp met een capaciteit van $4.5 \text{ dm}^3 \cdot \text{h}^{-1}$. Dit resulteert in een druk ter plaatse van circa 100 Pa. Het gebied tussen de skimmer en de 0-lens wordt afgepompt met een turbomoleculair pomp met een capaciteit van $400 \text{ dm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ (bij een druk van 20 mPa).

Een skimmeropening met 0.7 mm I.D. en een drukverschil van 200 Pa resulteert in een flow van circa $0.4 \text{ dm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ (bij 200 Pa) ofwel circa $400 \text{ dm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ bij een druk van 20 mPa.

Een skimmeropening met 1.0 mm I.D. en een pompscapaciteit van $400 \text{ dm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ zou de druk in het gebied tussen skimmer en de 0-lens veroorzaken van circa 40 mPa. Een drukovergang over de 0-lens van circa 20 mPa naar het hoogvacuumgedeelte in de analysator geeft vacuumtechnisch gezien enige speelruimte. Een 0-lens met een diameter van 0.5 cm en een drukval van 20 mPa zou bij een opgegeven pompsnelheid van de diffusiepomp van $800 \text{ dm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ resulteren in een druk in het analysatorgedeelte van circa 0.1 mPa. De druk van 0.6 mPa duidt er op dat de effectieve pompsnelheid van de oliediffusiepomp (waarschijnlijk vanwege de weerstanden in slang en ingebouwde klep) niet de opgegeven $800 \text{ dm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ bedraagt maar circa de helft hiervan.

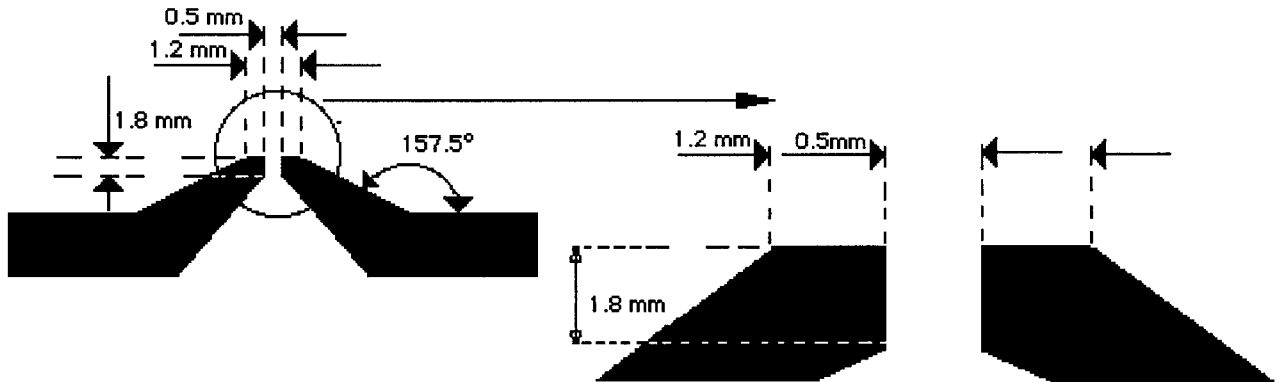
Het huis van de ESI bron is vervaardigd van perspex. Perspex is een goede isolator, licht verspaanbaar en doorzichtig. De lenzen, de skimmer en het capillair zijn vervaardigd van roestvrij staal (RVS). De dimensies van de skimmer, lenzen, capillair en hun onderlinge positionering zijn in eerste instantie conform literatuurgegevens [17].

Verwarming van het capillair wordt verkregen door een wisselspanning van 0.6 V over het capillair met een weerstand van 0.1Ω aan te brengen, hetgeen resulteert in een stroomsterkte van 6 A (3.6 W). Hiermee werd de temperatuur van het capillair ongeveer 100°C .

In tweede instantie werd een glazen capillair gebruikt van 0,5 mm ID (uitwendige diameter 4,2 mm) met aan beide uiteinden een messing kapje voor instandhouding van het elektrisch circuit (ID 4.2 mm, UD 4.5 mm, lengte 7 mm met een opening van 0.5 mm). De voorzijde is met aarde verbonden. De potentiaal van de achterzijde kan worden gevarieerd. De capillair werd verwarmd door een messing omhulsel waarin zich een verwarmingselement bevindt (met regelbare voeding) voor verwarming tot circa 100°C .

3.3 Skimmer.

De skimmer bestaat uit een conus (hoek van 157.5°) met afgeplatte top (Figuur 5). De conus is mechanisch en electrolytisch gepolijst om bramen en scherpe randen te verwijderen. Deze skimmer gaf een maximale transmissie bij een opening van 0.7 mm. Bij grotere openingen verdween het signaal vrijwel volledig, terwijl kleinere openingen een geringere transmissie gaven. De skimmer wordt niet direct verwarmd, maar wordt tijdens het gebruik, door de verwarmde gasstroom geleidelijk verwarmd tot ongeveer 70°C .



Figuur 5. Weergave van de skimmer. De bovenkant van de skimmer is afgeplat en mechanisch en electrolytisch gepolijst.

3.4 Focuseringslenzen.

Het lenzenstelsel van de oorspronkelijke bron werd na de "0-lens" ingebouwd. Deze lenzen verzorgen de extractie en focussing van ionen uit het interface vanaf de "0-lens" in het quadrupoolsysteem. De "0-lens" (aardpotentiaal) vormt zowel een fysieke als elektrische afscheiding van het gebied na de skimmer en het hoogvacuum van de analyser. De doorlaatopening bedraagt 2 mm. Dit resulteert in een druk in de analyser van 0.6 mPa. Het geheel werd zo gemonteerd dat de fixeesteun van de bron in de omhulling van het quadrupoolsysteem valt.

4. EXPERIMENTEEL

De instelling van de focuseringslenzen en quadrupool offset werd steeds eerst geoptimaliseerd met behulp van de standaard E.I. / C.I. bron van het instrument.

De hoogspanning voor de electrospray naald werd geleverd door een Miles Hivolt type TH 25 power supply. De variabele potentialen van zowel het capillair als de skimmer werden geleverd door een EA-HV-5006 voeding via twee regelbare potentiometers van $3.2\text{ M}\Omega$ elk. Deze spanningen werden gemeten met twee Fluke 70 serie II multimeters. De temperatuur werd met een koper-konstantaan thermokoppel bepaald. De ESI vloeistof werd geleverd door een continuë infusiepomp (Harvard syringe infusion pump type 22) met een instelbare flow van $0,01\ \mu\text{l}/\text{min}$ tot $2\text{ml}/\text{min}$. De vloeistof werd met een fused silica capillair naar de ESI naald gevoerd.

(Aanvankelijk $l = 4$ mm ID = 0.2 mm en OD = 0.4 mm, later $l = 260$ mm ID = 0.1 mm en OD = 0.2 mm)

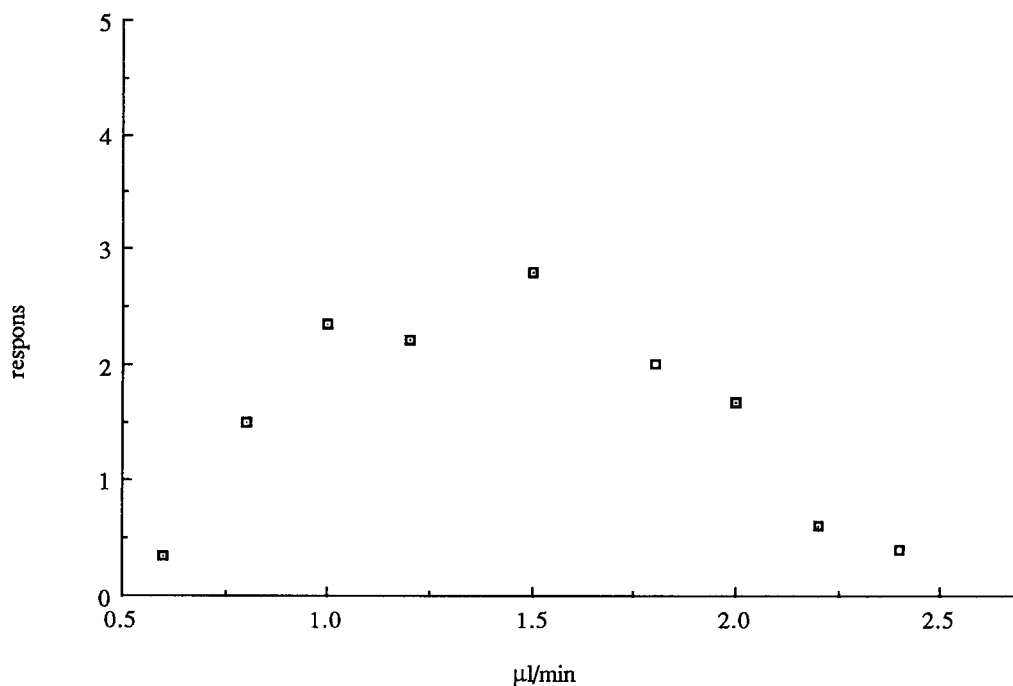
Tenzij anders vermeld waren monsters steeds opgelost in Milli Q water methanol in een verhouding van 1:1 (v/v)

Als teststoffen zijn gebruikt: -de bestrijdingsmiddelen glufosinaat en glyphosaat (Promochem);
-een cyclisch polypeptide Gramicidine S (aminozuursamenstelling: P-V-O-L-F-P-V-O-L-F MW: 1140.6) (Sigma);
-Streptomycine Sulfaat (Sigma);
-de organische zouten tetrahexylamonium-waterstofsulfaat (Fluka Chemika) en tetrabutylamonium-waterstofsulfaat (Sigma).

5. RESULTATEN

In de eerste instantie hadden experimenten betrekking op het functioneren van het interface als geheel. Nadat dit als zodanig succesvol was verlopen zijn die variabelen in het ontwerp onderzocht waarvan op basis van eigen ervaringen en vanuit de literatuur verondersteld mocht worden dat ze een belangrijke invloed hebben op performance, stabiliteit, gevoeligheid en andere grootheden. Achtereenvolgens waren dit (i) de electro spray vloeistof (flow en samenstelling), (ii) de electro spray potentiaal, (iii) de dimensies van de electro spray naald (diameter en vorm), (iv) de potentialen van het transportcapillair en de skimmer, zowel absoluut als relatief ten opzicht van elkaar.

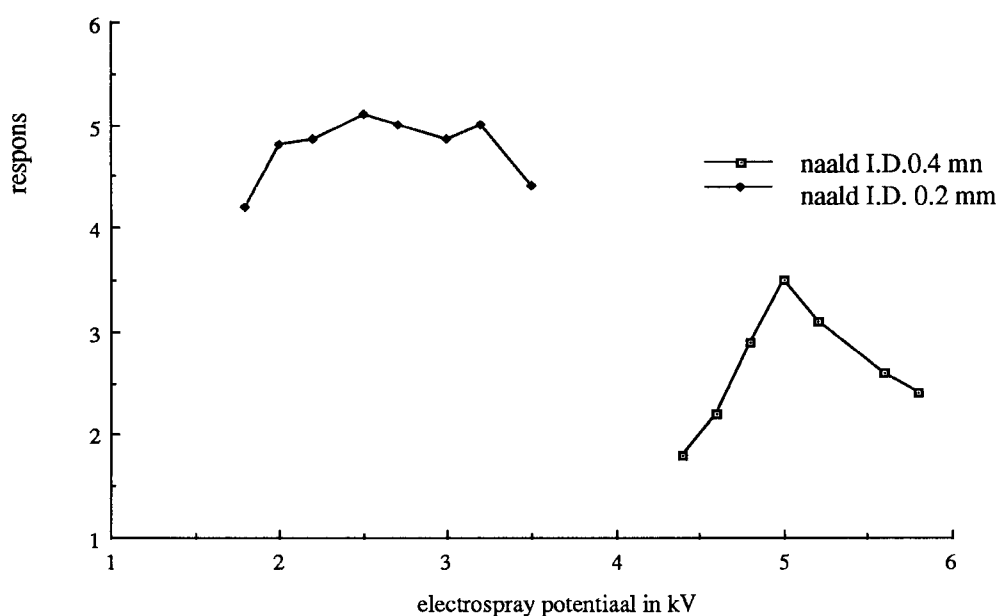
Figuur 6 toont het gevoeligheidsverloop voor gramicidine S als functie van de flow. De maximale



Figuur 6. Gevoeligheidsverloop voor Gramicidine S als functie van de electro sprayflow

respons werd verkregen bij een flow tussen 1 en 2 $\mu\text{l}/\text{min}$. Zowel beneden als boven deze waarden vond een drastische afname van de gevoeligheid plaats. Het resultaat is in overeenstemming met eerdere bevindingen in de literatuur [18].

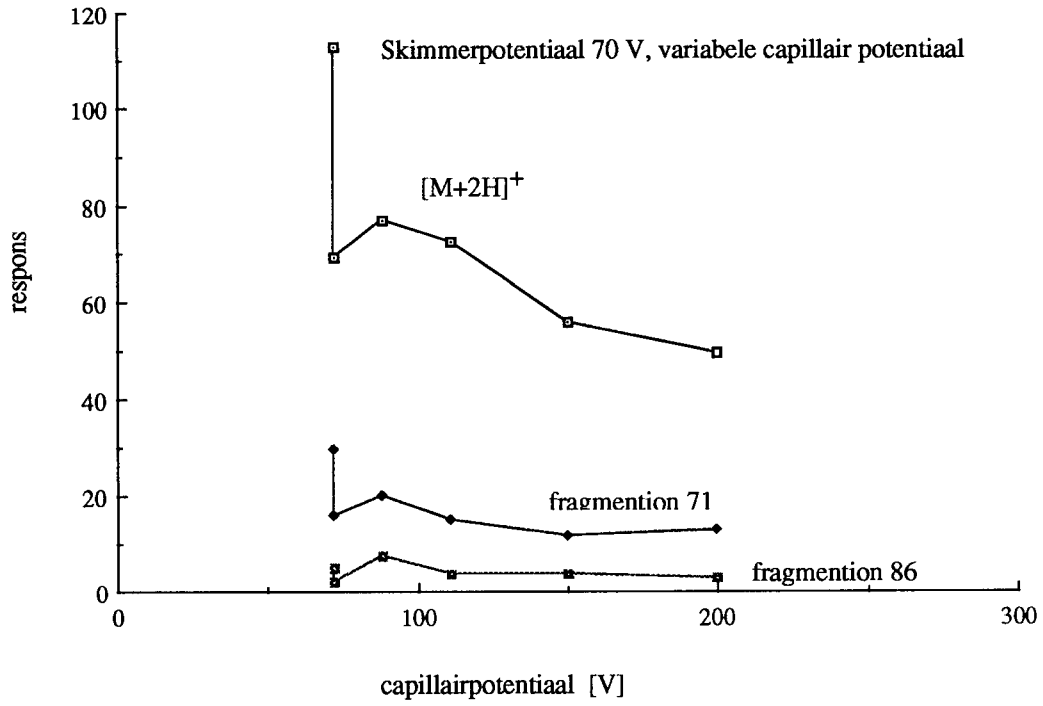
De spanning waarbij het electrosprayproces voor het eerst optreedt (onsetpotentiaal) wordt voornamelijk bepaald door de dimensies en vorm van de naald en de aard en samenstelling van de vloeistof. De invloed van de diameter blijkt uit een experiment waarbij twee naalden met een verschillende diameter zijn gebruikt (Figuur 7). Voor de naald met de grootste diameter (0.4 mm OD) was een relatief hoge spanning nodig die bovendien een vrij scherp intensiteitsmaximum liet zien bij circa 5 kV. Terwille van de stabiliteit en in verband met het ontstaan van corona ontleding, is gestreefd naar een zo laag mogelijke onsetspanning. Herhaling van het experiment



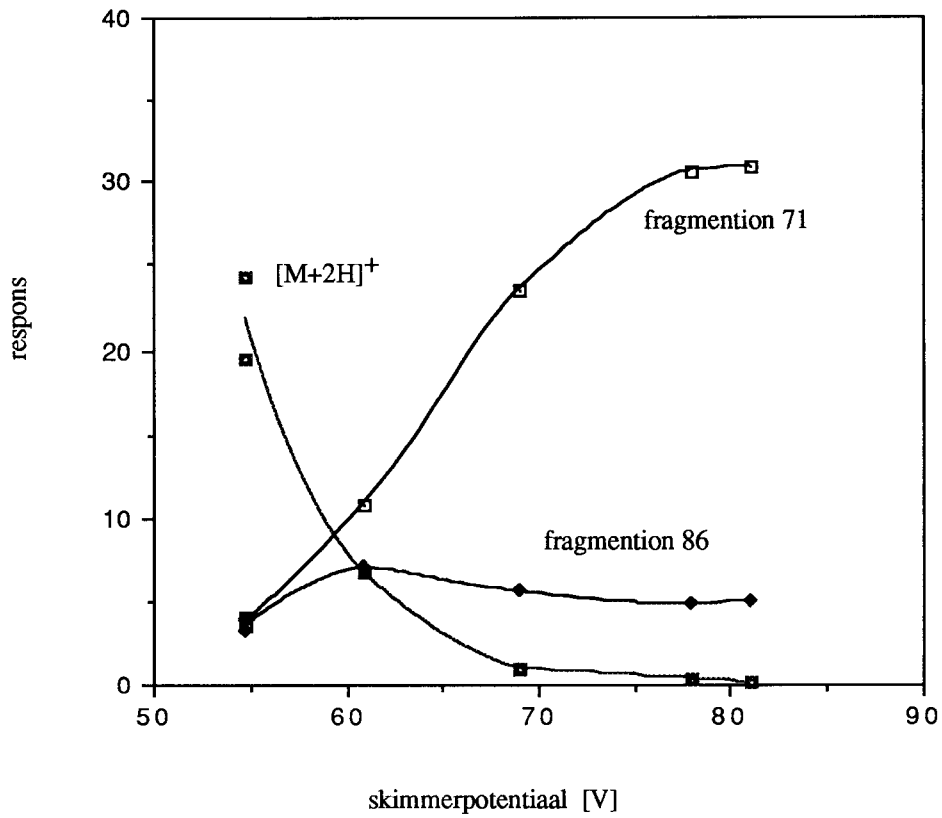
Figuur 7. Vergelijking van het electrospray proces voor Gramicidine S bij twee diameters van de spraynaald.

met een dunne naald (0.2 mm UD) gaf niet alleen electrospray bij een lager voltage, maar had ook een minder kritisch gevoeligheidsverloop. De respons bereikte een maximum tussen 2 en 3 kV. Deze lagere potentiaal kan worden toegeschreven aan de toename van de dichtheid van de potentiaalveldlijnen vanaf een dunnere, scherpere punt.

Een tweede set variabelen betrof de spanning van het transportcapillair (V_c) en skimmer (V_s). Enkele karakteristieke resultaten zijn weergegeven in Figuur 8 en 9. Figuur 8 toont de respons van het moleculair ion ($[M+2H]^{2+}$) en fragmentionen van gramicidine S als functie van V_c bij een constante V_s -waarden. De maximale intensiteit voor het moleculair ion was bij een skimmerpotentiaal V_s tussen 40-50 V, dan treedt er al een zekere fragmentatie op, waarvan de intensiteit toeneemt met een toename van V_s . Tevens blijkt dat de capillairpotentiaal van geringe

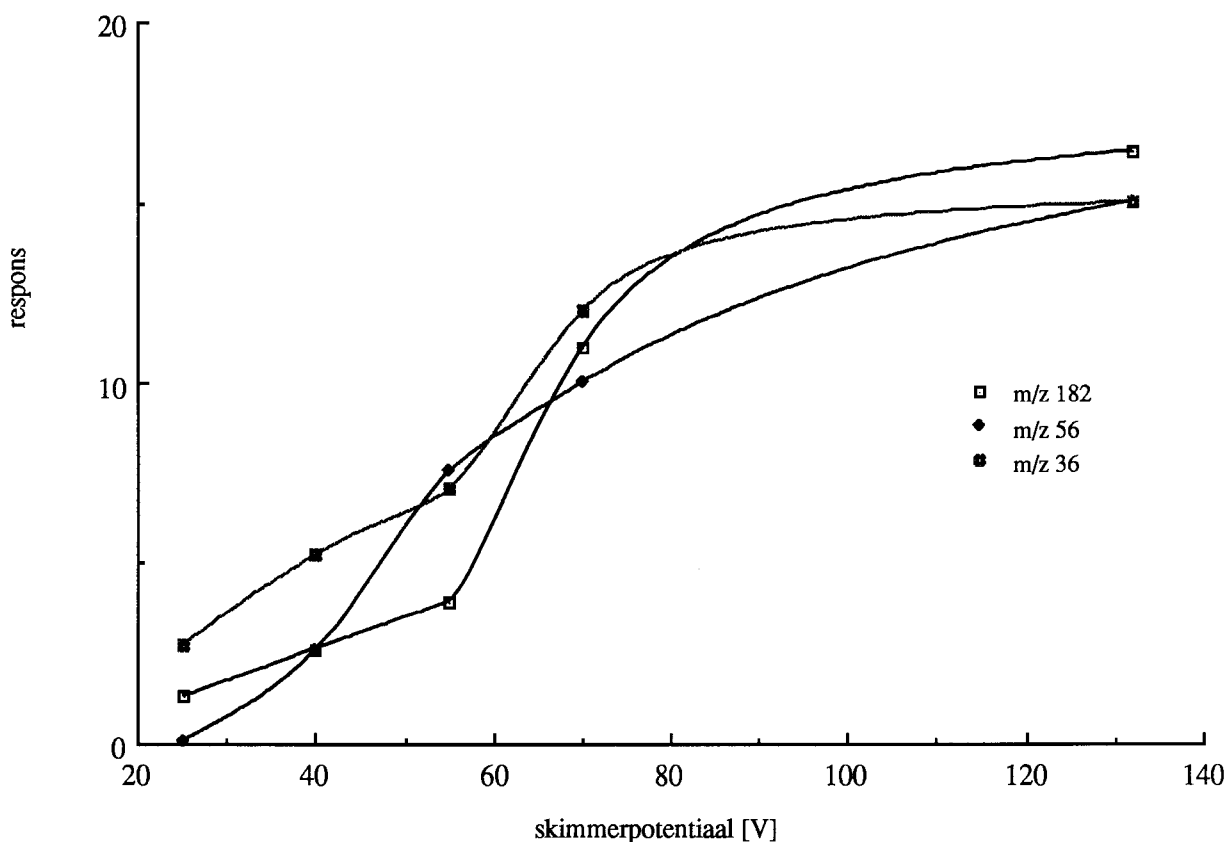


Figuur 8. Invloed van het potentiaalverschil tussen capillair en skimmer op de gevoeligheid en fragmentatie van Gramicidine S



Figuur 9. Invloed van het potentiaalverschil tussen skimmer en "0" lens op de gevoeligheid en fragmentatie van Gramicidine S

invloed is op de totale gevoeligheid en nauwelijks of geen invloed heeft op de fragmentatie. Hieruit kan worden afgeleid dat moleculair-ionen stabiel zijn in het gebied tussen capillair en skimmer, en dat fragmentatie in het traject na de skimmer ontstaat. Deze zijn het gevolg van botsing met luchtmoleculen. De hierbij vrijkomende energie wordt over beide betrokken deeltjes verdeeld naar rato van hun massa. De skimmerpotentiaal beïnvloedt de kinetische energie van de deeltjes en als gevolg daarvan de mate van fragmentatie. De waarneming dat fragmentatie niet het gebied met relatief hoge druk (circa 100 Pa) tussen het capillair en skimmer, maar in het gebied met een relatief lage druk (10 mPa) na de skimmer plaatsvindt is in tegenspraak met eerdere bevindingen in de literatuur [17]. Resultaten voor laag moleculaire verbindingen hebben een ander aspect aan het licht gebracht, namelijk een afhankelijkheid tussen transmissieefficiëntie en de deeltjesmassa. Hiertoe zijn experimenten uitgevoerd met het laag moleculaire glufosinaat (MW 181). Deze stof gaf, in tegenstelling tot het zwaardere gramicidine S, een geleidelijke toename in gevoeligheid te zien van zowel het moleculair ion ($[M+H]^+$) als de fragment ionen bij toename V_s tot circa 130 V (Figuur 10).

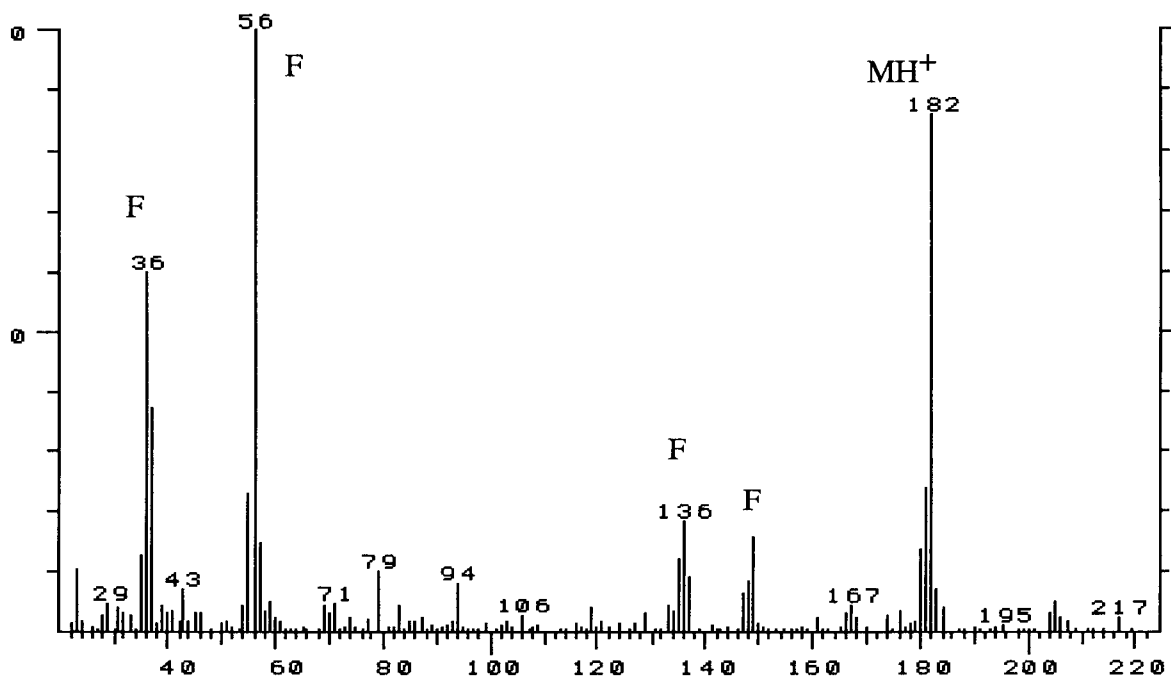


Figuur 10. Verloop van de respons van het geprotoneerde molekuulion (m/z 182) en de fragmentionen m/z 56 en m/z 36 van glufosinaat als functie van het potentiaalverschil tussen "0-lens" en skimmer.

Een verklaring hiervoor kan gevonden in een tweeledig effect van de skimmerpotentiaal. De intensiteit van moleculaire ionen zal steeds het netto resultaat zijn van drie processen: (1) de vorming ervan; (2) verliezen tijdens transport en bemonstering en (3) ontleding ten gevolge van

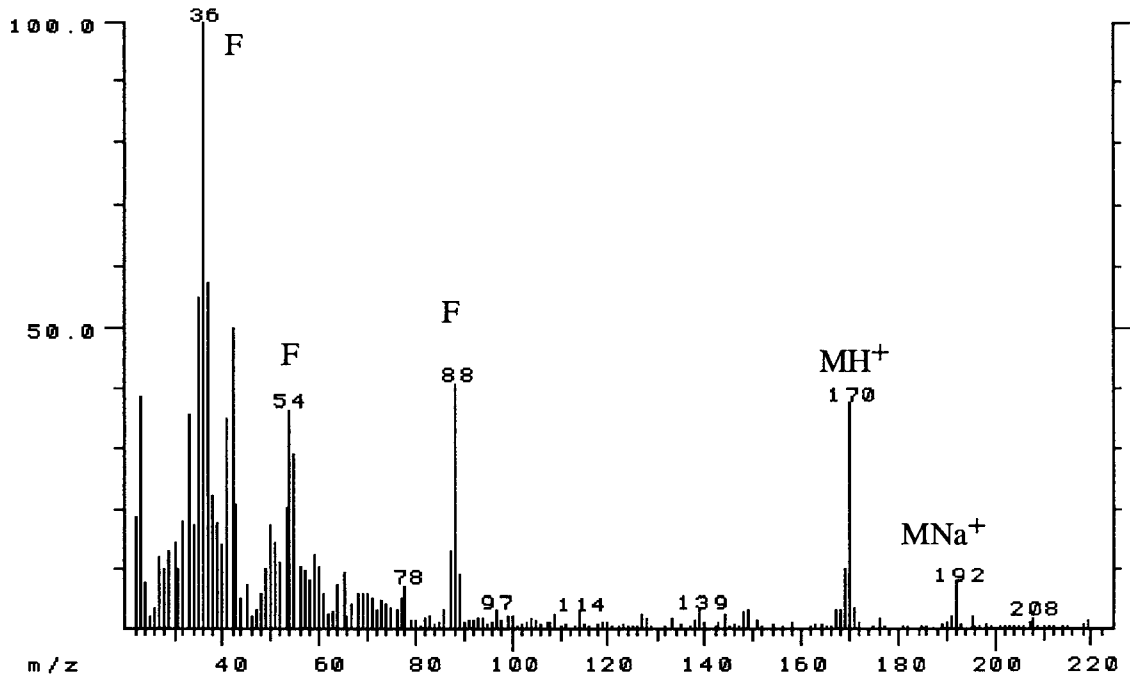
fragmentatie. De efficiëntie waarmee deeltjes vanuit het interface naar de MS wordt getransporteerd is sterk afhankelijk van de wijze waarop de deeltjes zich na de capillaire expansie naar de skimmeropening bewegen. De zwaardere deeltjes zullen vanwege hun hoog traagheidsmoment beter de ideale rechte bewegingsrichting volgen waardoor er relatief grotere aantallen voor de skimmeropening uitkomen dan lichte deeltjes. Echter, niet alleen de massa is hiervoor bepalend, ook de snelheid is hiervoor van belang. Beide factoren bepalen het impulsmoment van het deeltje. De kinetische energie van de ionen wordt voor een belangrijk deel bepaald door de skimmerpotentiaal. Een toename geeft een deeltje een groter impulsmoment, hetgeen tot een verbeterde transmissie kan leiden. Anderzijds kan een verhoogde kinetische energie tot meer fragmentatie leiden. Afhankelijk van de verhouding tussen deze tegengestelde gerichte invloeden, kan er aldus bij een toename van V_s sprake zijn van een toename van zowel de intacte molekuulionen als van de fragmenten. Waarnemingen duiden erop dat relatie tussen kinetische energie en transmissie kritisch is voor deeltjes tot 300-400 Da. Voor zwaardere moleculen wordt deze kritische waarde reeds bij een veel lagere waarde van V_c overschreden, zodat een verdere versnelling geen noemenswaardig effect meer zal sorteren.

De werking van het eigen ontwerp ESI bron wordt geïllustreerd aan de hand van enkele toepassingen. In Figuur 11 en Figuur 12 zijn ESI spectra afgebeeld van de laag moleculaire be-

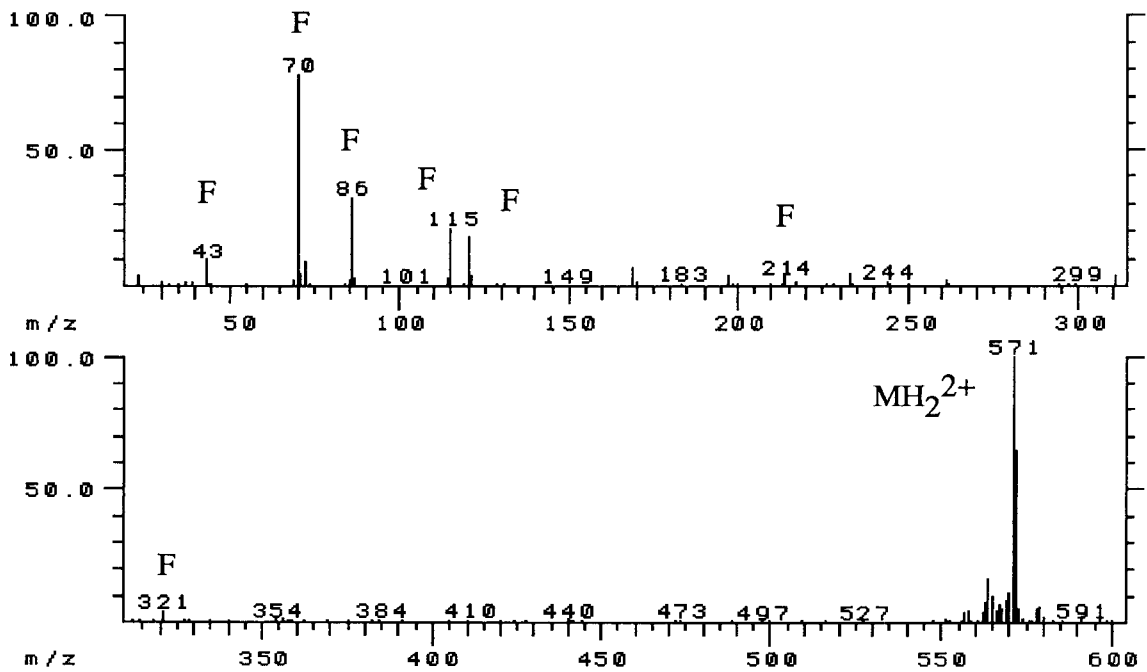


Figuur 11. ESI spectrum van Glufosinaat (MW 181). Condities: skimmerpotentiaal 55 V, capillairpotentiaal 180 V. F: fragmentionen

strijdingsmiddelen glufosinaat en glyfosaat. Beide spectra vertonen vrij intensieve fragmentatie. Het ESI spectrum van Gramicidine S (figuur 14) stemt goed overeen met het MAT 95 ESI spectrum van Gramicidine S met een potentiaalverschil tussen skimmer en capillair van 200 V [14]. Verder zijn spectra opgenomen van streptomycine-sulfaat (een diergeneesmiddel) en tetra-hexyl en tetra-butyl-ammoniumwaterstofsulfaat (een veel gebruikte teststof in ESI).



Figuur 12. ESI spectrum van glyfofaat (MW 169 Da). De skimmerpotentiaal was 55 V en het capillairpotentiaal 180V. Het spectrum bevat naast MH^+ ook Na en K adducties.



Figuur 13. ESI spectrum van Gramicidine S (MW 1140.6). Condities: skimmerpotentiaal 50 V, potentiaal capillair 80V. F: fragmentionen

6. CONCLUSIES

Electrospray ionizatie MS is een techniek waarvan het belangrijkste toepassingsgebied ligt bij grote en/of polaire moleculen. Echter, de massaspectrometer in dit onderzoek bezit een beperkt massabereik (m/z 10-800 Da). Uit de literatuur blijkt dat ESI spectra van de meeste stoffen (peptiden en eiwitten) in het gebied tot m/z 2500 liggen. Dit maakt een vergelijking van het eigen ontwerp met commercieel verkrijgbare instrumenten niet goed mogelijk.

Wel is duidelijk geworden dat voor toepassingen bij de analyse van laagmoleculaire stoffen, zoals polaire milieucontaminanten, diergeneesmiddelen en andere relevante toepassingsgebieden, een verbetering noodzakelijk is van het sampling en focuseringssysteem. Voor de grotere moleculen bezit de zelfbouw skimmer een effectiviteit die vergelijkbaar is met commercieel verkrijgbare electrospray interfaces .

Voor een aantal functionele parameters bestaan nog enkele onduidelijkheden, met name ten aanzien van de dag-tot-dag variabiliteit in de gevoeligheid.

Geconcludeerd kan worden dat de bouw, optimalisatie en uitvoering van experimenten de nodige inzichten hebben opgeleverd in onder meer de werking en functionaliteit van ESI. Het ligt in de bedoeling om het onderzoek uit te breiden door de plaatsing van het interface op een groter instrument (JEOL HX 110 hoogveld sectorinstrument), waarvoor bovengenoemde beperking niet gelden. Enkele van de benodigde aanpassingen hiervoor zijn reeds uitgevoerd, waarna het functionele inzetbaarheid voor macro biomoleculen nader zal worden onderzocht.

7. REFERENTIES

1. Melera A. Adv Mass Spectrom, 8B (1980) 1597.
2. Blakley CR, McAdams MJ, Vestal ML. J Chromatogr, 158 (1978) 261.
3. Willoughby RC, Browner RF. Anal Chem, 56 (1984) 2626.
4. Benninghoven A, Jaspers D, Sichterman W. Appl Phys, 11 (1975) 35.
5. Opsal RB, Owens KG, Reilly JP. Anal Chem, 57 (1985) 1884.
6. Karas M, Hillekamp F. Anal Chem, 60 (1988) 2299.
7. Bose GM. Recherches sur le cause et sur la véritable théorie de l'électricité, Wittenberg (1745).
8. Zeleny JJ. Phys Rev, 10 (1917) 1.
10. Siu KWM, Guevremont R, Le Blanc JCY, et al. Org Mass Spectrom, 28 (1993) 579.
11. Rayleigh JWS. Philos Mag, 14 (1882) 184
12. Iribane JB, Thomson BA. J Chem Phys, 64 (1976) 2287.
13. Goldstein S, Sadoun F, Virelizier H. J Chim Phys 90 (1993) 1345.
14. Van der Heeft E, de Jong APJ M. RIVM rapport, 502501011 (1993).
15. Hiaoka K, Kudaka I, Rapid Comm. in Mass Spectrom. 4 (1990) 519.
16. Chowdhury SK, Katta V, Chait BT. Rapid Comm Mass Spectrom, 4 (1990) 81.
17. Katta V, Chowdhury SK, Chait BT. Anal Chem, 63 (1991) 174

8. DANKWOORD

Onze dank gaat in de eerste plaats uit naar Peter den Otter, die op elk moment klaar stond om onze ideeën bekwaam in materie om te zetten en als er iets fout ging het weer bijstaaftde en repareerde.

Ook Harry van Reenen, Cees Overeem, Walter Steenbergen, Agnes ter Elst en de rest van TWO, die steeds, ons altijd weer urgente vragen snel vervulden, zijn we dank verschuldigd.

De discussies met Ed van der Heeft over botsingen voor of na de skimmer hebben ons begrip bijgebracht over de werking van de elektropray bron.