

Elektrosprayionisation Ionenmobilitätsspektrometrie – Entwicklung, Charakterisierung und Anwendung zur HPLC-Detektion und zum Reaktionsmonitoring



kumulative Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
"doctor rerum naturalium"
(Dr. rer. nat.)

eingereicht in der Wissenschaftsdisziplin "Physikalische Chemie"
am Institut für Chemie - Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät
an der Universität Potsdam

vorgelegt von
Martin Zühlke

Potsdam, August 2017

Published online at the
Institutional Repository of the University of Potsdam:
URN urn:nbn:de:kobv:517-opus4-407452
<http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:kobv:517-opus4-407452>

-
1. Gutachter: Herr Prof. Dr. Hans-Gerd Löhmannsröben, Universität Potsdam
 2. Gutachter: Frau Dr. Ursula Telgheder, Universität Duisburg-Essen
 3. Gutachter: Herr Prof. Dr.-Ing. Stefan Zimmermann, Universität Hannover

i. Liste der Publikationen

1. **Zühlke, M.**; Zenichowski, K.; Riebe, D.; Beitz, T.; Löhmannsröben, H.-G.; An alternative field switching ion gate for ESI-ion mobility spectrometry. *Int. J. Ion Mobil. Spec.* **2017**, 20 (3), 67-73
2. **Zühlke, M.**; Sass, S.; Riebe, D.; Beitz, T.; Löhmannsröben, H.-G.; Real-time reaction monitoring of an organic multi-step reaction by electrospray ionization-ion mobility spectrometry. *ChemPlusChem*, **2017**, 82 (10), 1266-1273
3. **Zühlke, M.**; Zenichowski, K.; Riebe, D.; Beitz, T.; Löhmannsröben, H.-G.; Subambient pressure electrospray ionization ion mobility spectrometry. *Int. J. Ion Mobil. Spec.* **2017**, 20 (1), 47–56.
4. **Zühlke, M.**; Riebe, D.; Beitz, T.; Löhmannsröben, H.-G.; Andreotti, S.; Reinert, K.; Zenichowski, K.; Diener, M. High-performance liquid chromatography with Electrospray ionization ion mobility spectrometry: Characterization, data management, and applications. *J. Sep. Sci.* **2016**, 39, 4756–4764
5. Villatoro J.; **Zühlke, M.**; Riebe, D.; Riedel J.; Beitz, T.; Löhmannsröben, H.-G. IR-MALDI ion mobility spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* **2016**, 408 (23), 6259-68.
6. Villatoro J.; **Zühlke, M.**; Riebe, D.; Beitz, T.; Weber, M.; Riedel J.; Löhmannsröben, H.-G. IR-MALDI ion mobility spectrometry: physical source characterization and application as HPLC detector. *Int. J. Ion Mobil. Spec.*, **2016**, 19 (4), 197-207.
7. **Zühlke, M.**; Riebe, D.; Beitz, T.; Löhmannsröben, H.-G.; Zenichowski, K.; Diener, M.; Linscheid, M. An electrospray ionization-ion mobility spectrometer as detector for high-performance liquid chromatography. *Eur. J. Mass Spectrom.* **2015**, 21 (3), 391-402.
8. Riebe, D.; **Zühlke, M.**; Zenichowski, K.; Beitz, T.; Dosche, C.; Löhmannsröben, H.-G. Characterization of Rhodamine 6G Release in Electrospray Ionization by Means of Spatially Resolved Fluorescence Spectroscopy. *Z. Phys. Chem.* **2011**, 225 (9-10), 1055–1072.

Betreuung von wissenschaftlichen Arbeiten

1. Bachelorarbeit *Elektrosprayionisation-Ionenmobilitätsspektrometrie zur Peptidanalytik*, Amadeus Lehmann, **2016**
2. Bachelorarbeit *Analyse von veterinärmedizinischen Wirkstoffen in Blutplasma und -serum mittels Ionenmobilitätsspektrometrie*, Pia Brinkmann, **2015**
3. Diplomarbeit *Charakterisierung der Elektrosprayionisation durch Ionenmobilitätsspektrometrie und optische Methoden*, Sven Rutkowski, **2014**

ii. Vorträge und Posterpräsentationen

Vorträge

1. **Zühlke, M.;** Saß, S.; Beitz, T.; Löhmannsröben, H.-G. Reaktionsmonitoring mittels ESI-Ionenmobilitätsspektrometrie, *Potsdamer Doktorandensymposium*, Potsdam, **2017**
2. **Zühlke, M.;** Saß, S.; Brinkmann, P.; Riebe, D.; Beitz, T.; Löhmannsröben, H.-G. ESI-ion mobility spectrometry for fast real-time reaction monitoring, *Berlin Chemie Symposium*, Berlin, **2016**
3. **Zühlke, M.;** Saß, S.; Brinkmann, P.; Riebe, D.; Beitz, T.; Löhmannsröben, H.-G. ESI-Ionenmobilitätsspektrometrie zur Detektion in der HPLC, *IMS Anwendertreffen*, Hannover, **2016**
4. **Zühlke, M.;** Saß, S.; Riebe, D.; Beitz, T.; Löhmannsröben, H.-G. ESI-ion mobility spectrometry as a detection method in HPLC and reaction monitoring, *ISIMS*, Boston (USA), **2016**
5. **Zühlke, M.;** Riebe, D.; Zenichowski, K.; Diener, M.; Beitz, T.; Löhmannsröben, H.-G. Ionenmobilitätsspektrometrie als Detektionsmethode in der HPLC, *Anakon*, Graz (Österreich), **2015**
6. **Zühlke, M.;** Riebe, D.; Zenichowski, K.; Diener, M.; Beitz, T.; Löhmannsröben, H.-G. ESI ion mobility spectrometry as detection method in HPLC, *HPLC*, Genf (Schweiz), **2015**
7. **Zühlke, M.;** Rutkowski, S.; Zenichowski, K.; Beitz, T.; Löhmannsröben, H.-G. ESI-Ionenmobilitätsspektrometrie – Charakterisierung und Anwendung, *IMS Anwendertreffen*, Essen, **2014**

Posterpräsentationen

1. **Zühlke, M.;** Riebe, D.; Beitz, T.; Löhmannsröben, H.-G. ESI at subambient pressure – Visualizing the spray via optical imaging and current measurements in ion mobility spectrometry, *Future of Chemical Physics*, Oxford (England), **2016**
2. **Zühlke, M.;** Rutkowski, S.; Zenichowski, K.; Beitz, T.; Löhmannsröben, H.-G. ESI-Ionenmobilitätsspektrometrie: Charakterisierung des Elektrosprays durch Lichtstreuung und Fluoreszenz-Imaging, *JCF Frühjahrssymposium*, Jena, **2014**
3. **Zühlke, M.;** Rutkowski, S.; Riebe, D.; Zenichowski, K.; Beitz, T.; Löhmannsröben, H.-G.; Charakterisierung der Elektrosprayionisation durch Lichtstreuung, Fluoreszenz-Imaging und Ionenmobilitätsspektrometrie, *113. Bunsentagung*, Hamburg, **2014**
4. **Zühlke, M.;** Rutkowski, S.; Zenichowski, K.; Beitz, T.; Löhmannsröben, H.-G. HPLC-ESI ion mobility spectrometry: Characterization and applications, *IMSC*, Genf (Schweiz), **2014**
5. **Zühlke, M.;** Riebe, D.; Beitz, T.; Löhmannsröben, H.-G.; Charvat, A.; Abel, B. IR-MALDI-Ionenmobilitätsspektrometrie zur direkten Untersuchung von Flüssigkeiten, *112. Bunsentagung*, Karlsruhe, **2013**
6. **Zühlke, M.;** Riebe, D.; Beitz, T.; Löhmannsröben, H.-G.; Charvat, A.; Abel, B. IR-MALDI-Ionenmobilitätsspektrometrie für den Nachweis von Neuroleptika und Pestiziden in Flüssigkeiten, *DGMS*, Berlin, **2013**

iii. Zusammenfassung

Die Elektrosprayionisation (ESI) ist eine der weitverbreitetsten Ionisationstechniken für flüssige Proben in der Massen- und Ionenmobilitäts(IM)-Spektrometrie. Aufgrund ihrer schonenden Ionisierung wird ESI vorwiegend für empfindliche, komplexe Moleküle in der Biologie und Medizin eingesetzt. Überdies ist sie allerdings für ein sehr breites Spektrum an Substanzklassen anwendbar. Die IM-Spektrometrie wurde ursprünglich zur Detektion gasförmiger Proben entwickelt, die hauptsächlich durch radioaktive Quellen ionisiert werden. Sie ist die einzige analytische Methode, bei der Isomere in Echtzeit getrennt und über ihre charakteristische IM direkt identifiziert werden können. ESI wurde in den 90er Jahren durch die Hill Gruppe in die IM-Spektrometrie eingeführt. Die Kombination wird bisher jedoch nur von wenigen Gruppen verwendet und hat deshalb noch ein hohes Entwicklungspotential. Ein vielversprechendes Anwendungsfeld ist der Einsatz in der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) zur mehrdimensionalen Trennung. Heutzutage ist die HPLC die Standardmethode zur Trennung komplexer Proben in der Routineanalytik. HPLC-Trennungsgänge sind jedoch häufig langwierig und der Einsatz verschiedener Laufmittel, hoher Flussraten, von Puffern, sowie Laufmittelgradienten stellt hohe Anforderungen an die Detektoren. Die ESI-IM-Spektrometrie wurde in einigen Studien bereits als HPLC-Detektor eingesetzt, war dort bisher jedoch auf Flussratensplitting oder geringe Flussraten des Laufmittels beschränkt.

In dieser kumulativen Doktorarbeit konnte daher erstmals ein ESI IM-Spektrometer als HPLC-Detektor für den Flussratenbereich von 200-1500 $\mu\text{l}/\text{min}$ entwickelt werden. Anhand von fünf Publikationen wurden (1) über eine umfassende Charakterisierung die Eignung des Spektrometers als HPLC-Detektor festgestellt, (2) ausgewählte komplexe Trenngänge präsentiert und (3) die Anwendung zum Reaktionsmonitoring und (4, 5) mögliche Weiterentwicklungen gezeigt.

Erfolgreich konnten mit dem selbst-entwickelten ESI IM-Spektrometer typische HPLC-Bedingungen wie Wassergehalte im Laufmittel von bis zu 90%, Pufferkonzentrationen von bis zu 10 mM, sowie Nachweisgrenzen von bis zu 50 nM erreicht werden. Weiterhin wurde anhand der komplexen Trennungsgänge (24 Pestizide/18 Aminosäuren) gezeigt, dass die HPLC und die IM-Spektrometrie eine hohe Orthogonalität besitzen. Eine effektive Peakkapazität von 240 wurde so realisiert. Auf der HPLC-Säule koeluiierende Substanzen konnten über die Driftzeit getrennt und über ihre IM identifiziert werden, sodass die Gesamttrennzeiten erheblich minimiert werden konnten. Die Anwendbarkeit des ESI IM-Spektrometers zur Überwachung chemischer Synthesen wurde anhand einer dreistufigen Reaktion demonstriert. Es konnten die wichtigsten Edukte, Zwischenprodukte und Produkte aller Stufen identifiziert werden. Eine quantitative Auswertung war sowohl über eine kurze HPLC-Vortrennung als auch durch die Entwicklung eines eigenen Kalibrierverfahrens, welches die Ladungskonkurrenz bei ESI berücksichtigt, ohne HPLC möglich. Im zweiten Teil der Arbeit werden zwei Weiterentwicklungen des Spektrometers präsentiert. Eine Möglichkeit ist die Reduzierung des Drucks in den intermediären Bereich (300 - 1000 mbar) mit dem Ziel der Verringerung der benötigten Spannungen. Mithilfe von Streulichtbildern und Strom-Spannungs-Kurven wurden für geringe Drücke eine verminderte Freisetzung der Analyt-Ionen aus den Tropfen festgestellt. Die Verluste konnten jedoch über höhere elektrische Feldstärken ausgeglichen werden, sodass gleiche Nachweisgrenzen bei 500 mbar und bei 1 bar erreicht wurden. Die zweite Weiterentwicklung ist ein neuartiges Ionentors mit Pulsschaltung, welches eine Verdopplung der Auflösung auf bis zu $R > 100$ bei gleicher Sensitivität ermöglichte. Eine denkbare Anwendung im Bereich der Peptidanalytik wurde mit beachtlichen Auflösungen der Peptide von $R = 90$ gezeigt.

iv. Abstract

Electrospray ionization (ESI) is one of the most widespread ionization techniques for liquid samples in mass and ion mobility (IM) spectrometry. Due to its gentle ionization, ESI is often used for sensitive, complex molecules in biology and medicine. However, it is also applicable to a wide range of substance classes. IM spectrometry was originally developed for the detection of gaseous samples, which are mainly ionized by radioactive sources. It is the only analytical method in which isomers can be separated in real time and directly identified by their characteristic IM. ESI was introduced to IM spectrometry by the Hill Group in the 90s. So far, the combination was only used by a limited number of groups and therefore there is still a large development potential. A highly promising field of application is high-performance liquid chromatography (HPLC) for multidimensional separations. At present, HPLC is the standard method for the separation of complex samples in routine analysis. However, HPLC separations are often time-consuming and the use of different solvents, high flow rates, buffers, as well as solvent gradients impose high demands on the detectors. ESI IM spectrometry was already used as an HPLC detector in a number of studies. However, these studies were restricted to splitting or low flow rates of the mobile phase.

In this cumulative thesis, an ESI IM spectrometer was developed as an HPLC detector for the flow rate range of 200-1500 $\mu\text{l}/\text{min}$ for the first time. Based on five publications, (1) the suitability of the spectrometer as an HPLC detector was comprehensively characterized, (2) selected complex separations are presented, and (3) the application to the reaction monitoring as well as (4, 5) possible further developments are shown.

With the in-house developed ESI IM spectrometer, typical HPLC conditions such as water contents in the mobile phase of up to 90%, buffer concentrations of up to 10 mM, as well as detection limits of up to 50 nM, were achieved successfully. Furthermore, on the basis of a complex separation (24 pesticides/18 amino acids), it could be demonstrated that HPLC and IM spectrometry possess a high degree of orthogonality. An effective peak capacity of 240 was thus realized. Substances coeluting on the HPLC column could be separated in the drift time and were identified by their IM. Thus, the overall separation times could be significantly reduced. The applicability of the ESI IM spectrometer for the monitoring of chemical syntheses was demonstrated for a three-stage reaction. The main starting materials, intermediates and products of all stages could be identified. A quantitative evaluation was possible both by means of a short HPLC pre-separation as well as by a newly developed calibration procedure, which takes charge competition during ESI into account, without HPLC. In the second part of the thesis, two further developments of the spectrometer are presented. One possibility is a reduction of the pressure to the intermediate range (300 - 1000 mbar) with the aim of reducing the required voltages. With the help of scattered light images and current-voltage curves, a reduced release of analyte ions from the droplets was determined at low pressures. However, these losses could be compensated for by higher electric field strengths. Therefore, the same detection limits were achieved at 500 mbar and at 1 bar. The second development is a novel ion gate with pulse switching, which allows a doubling of the resolution up to $R > 100$ with equal sensitivity. A possible application in the field of peptide analysis was demonstrated, achieving a considerable resolutions of $R = 90$ for the peptides.

Inhaltsverzeichnis

<i>i.</i>	<i>Liste der Publikationen</i>	<i>ii</i>
<i>ii.</i>	<i>Vorträge und Posterpräsentationen</i>	<i>iii</i>
<i>iii.</i>	<i>Zusammenfassung</i>	<i>iv</i>
<i>iv.</i>	<i>Abstract</i>	<i>v</i>
1	Einführung und Zielsetzung	1
2	Theoretische Grundlagen	4
2.1	Ionisationsmethoden	4
2.2	Elektrosprayionisation (ESI)	5
2.2.1	Elektrochemische Prozesse innerhalb der ESI-Kapillare	6
2.2.2	Elektrohydrodynamik am Flüssigkeitsmeniskus	9
2.2.3	Entstehung elektrisch aufgeladener Aerosole	12
2.2.4	Tropfenverdunstung und Ladungsverteilungsdynamik	13
2.2.5	Bildungsmechanismen für gasförmige Analytionen	15
2.3	Ionenmobilitäts(IM)-Spektrometrie	18
2.3.1	Ionen transport in der IM-Spektrometrie	18
2.3.2	Typen von IM-Spektrometers	20
2.3.3	Driftzeit IM Spektrometer (DTIMS)	20
3	Verwendete Publikationen	24
3.1	Das ESI IM-Spektrometer als HPLC-Detektor	25
3.2	HPLC ESI IM-Spektrometer: Charakterisierung, Datenverarbeitung und Anwendung	45
3.3	Echtzeit-Reaktionsmonitoring einer organischen Mehrstufenreaktion mit ESI-IM-Spektrometrie	59
3.4	ESI-IM-Spektrometer im intermediären Druckbereich	60
3.5	Ein alternatives Ionentor mit Hochfeld-Pulsschaltung für die ESI IM-Spektrometrie	89
4	Diskussion und Ausblick	101
4.1	Diskussion der wissenschaftlichen Schwerpunkte	102
4.2	Zusammenfassende Diskussion und Ausblick	111
<i>I.</i>	<i>Literaturverzeichnis</i>	<i>I</i>
<i>II.</i>	<i>Abbildungsverzeichnis</i>	<i>VIII</i>
<i>III.</i>	<i>Abkürzungs- und Symbolverzeichnis</i>	<i>IX</i>
<i>IV.</i>	<i>Danksagungen</i>	<i>XIII</i>
<i>V.</i>	<i>Eidesstattliche Versicherung</i>	<i>XIV</i>

1 Einführung und Zielsetzung

In letzten Jahrzehnten hat sich das Anwendungsgebiet der Ionenmobilitäts(IM)-Spektrometrie merklich vervielfältigt. Fernab der ursprünglichen Verwendung im Bereich Militär und Sicherheit zur Detektion von Drogen, Sprengstoffen und Giftgasen wurde die IM Spektrometrie im klinischen, pharmazeutischen und Nahrungsmittelbereich verstärkt eingesetzt.¹⁻⁶ Gründe für diese positive Entwicklung sind die Einführung neuer Arten von IM Spektrometern, die erhöhte Anzahl an zugänglichen Ionisationsquellen, sowie die Möglichkeit kommerzielle Geräte für die Kombination der IM- mit der Massenspektrometrie (IMMS) zu erwerben.⁷ Im Vergleich der Anzahl an Publikationen in den Jahren 1990-1999 mit denen der letzten 10 Jahre (2007-2016) zeigt sich eine deutliche Steigerung. Im Bereich der klassischen Analytik inkl. Massenspektrometrie (MS), Kernspinresonanz- (NMR), UV-, IR-Spektroskopie, Gaschromatographie (GC), Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) erhöhte sich die Anzahl an Publikationen um den Faktor 2,3. Bei der IM-Spektrometrie zeigt der Vergleich einen Faktor von 3,1, bei der IMMS ist er sogar 8,9 (Abb. 1-1).

Die IM-Spektrometrie hat verschiedene Vorteile. Eine Nachweisempfindlichkeit bis in den Pikogramm-bereich macht die IM-Spektrometrie zu einer der sensitivsten Techniken in der Analytik.⁸ Die Analyse bei Atmosphärendruck erlaubt den Bau der IM-Spektrometer als mobile Handgeräte, da im Gegensatz zu anderen Analyseverfahren wie der Massenspektrometrie keine sperrigen Vakuumpumpen notwendig sind.⁹ Darüber hinaus kann die IM-Spektrometrie mit Detektionszeiten < 20 ms als Echtzeitmethode eingesetzt werden.¹⁰ Das Alleinstellungsmerkmal der IM-Spektrometrie ist jedoch die Trennung von isomeren chemischen Verbindungen innerhalb von Sekunden.¹¹⁻¹³ In der IM-Spektrometrie werden Ionen auf einer Driftstrecke unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes in einem Gas nach ihren verschiedenen Ionenmobilitäten aufgetrennt. In die Ionenmobilität gehen maßgeblich die Ladung und der Diffusionsquerschnitt eines Ions ein (vgl. Gleichung 2-32). Der Diffusionsquerschnitt ist ein Maß für die Ausdehnung des Ions, demnach ein Maß für die Struktur bzw. Form des Ions. Somit können Isomere aufgrund ihrer unterschiedlichen Struktur im IM-Spektrometer voneinander getrennt detektiert werden.¹⁴

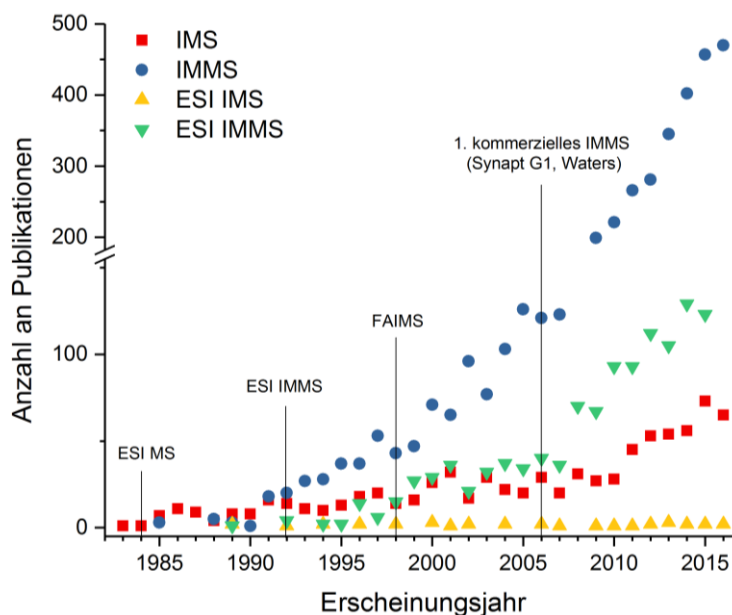


Abb. 1-1 - Zahl der Publikationen in verschiedenen analytischen Bereichen pro Jahr (Quelle: isi web of knowledge)

Den theoretischen Grundstein für die IM-Spektrometrie legte E. Rutherford Ende des 19. Jahrhunderts mit der Untersuchung von Bewegungen der Ionen in einem elektrischen Feld.¹⁵ Zu Beginn des zwanzigsten Jahrhundert verknüpfte P. Langevin theoretische Überlegungen zur Mobilität von Ionen in einem Feld mit praktischen Experimenten und beschrieb die ersten Ionen-Molekül-Wechselwirkungen.¹⁶ 20 Jahre später folgten mit der Entwicklung der ersten Ionentore auch die erste Mobilitätsmessungen von Ionen in verschiedenen Gasen im positiven und negativen Modus.¹⁷⁻²² Intensive Arbeiten von P. Kebarle schlossen sich im Bereich der Kinetik von Ionen-Molekül-Reaktionen nahe dem Atmosphärendruck an.^{23,24} Parallel begannen E.A. Mason und E.W. McDaniel zu den Transportgleichungen von Ionen im elektrischen Feld zu forschen. Ihre Arbeiten mündeten in der heute bekannten Mason-Schamp-Gleichung und wurden 1988 in einem Buch zusammengefasst.²⁵⁻²⁷ Anfang der 70iger veröffentlichte die Arbeitsgruppe um F.W. Karasek die ersten Spektren eines IM-Spektrometers, welches damals unter dem Namen Plasma Chromatograph bekannt war.²⁸⁻³⁰ 1974 kam nach einer Reihe von Patentanmeldungen auch das erste kommerzielle IM-Spektrometer (damals: Plasma Chromatograph) der Firma *Franklin GNO Corporation* auf den Markt.³¹ In den 1980er wurde durch die vielfältigen Arbeiten der Arbeitsgruppen um G.E. Spangler, H.H. Jr. Hill und G.A. Eiceman der Begriff der IM-Spektrometrie geprägt.³²⁻³⁵ Diese entwickelten IM-Spektrometer mit unidirektionalem Gasfluss eines inerten Gases, sodass Ionen-Molekül-Reaktionen minimiert und die Reproduzierbarkeit von IM-Spektren verbessert wurden. Sie bildeten mit ihren Untersuchungen die Grundlage für die heutige moderne IM-Spektrometrie.

In der IM-Spektrometrie wurde und wird überwiegend eine radioaktive Ionenquelle, häufig Nickel (Nuklid ⁶³Ni), zur chemischen Ionisation bei Atmosphärendruck (APCI - Atmospheric-pressure chemical ionization) verwendet.³⁶ Der β -Zerfall des Nuklids setzt hoch energetische Elektronen frei, die das für die Analyse relevante Ion (den Analyten) ionisieren können. Der Umgang mit ⁶³Ni unterliegt jedoch der Strahlenschutzverordnung in Deutschland (§9, StrlSchV), sodass die Anwendungen erheblich eingeschränkt sind. Viele weitere Ionisationsquellen sind der IM-Spektrometrie zugänglich und werden im Kapitel (2.1) zusammenfassend diskutiert. Für die Analyse von Biomolekülen werden bevorzugt die Elektrosprayionisation (ESI) und die matrixunterstützte Laserdesorption und -ionisation (MALDI - Matrix-assited laser desorption and ionization) eingesetzt. Beide Verfahren zeichnen sich durch eine sehr schonende Ionisierung von großen, nichtflüchtigen Molekülen aus, sodass Biomoleküle ohne Fragmentierung analysiert werden können.^{37,38} ESI wurde früher als elektrohydrodynamische Atomisierung (EHDA) bezeichnet und geht auf Malcolm Dole in das Jahr 1968 zurück. Dieser entdeckte bei einem Besuch in einer Automanufaktur ein Verfahren zum Aufsprühen von Lack und überführte es in die chemische Analytik.³⁹ Breite Anwendung fand die Ionisationsquelle in der Massenspektrometrie jedoch erst nach 1984. In diesem Jahr gelang es John B. Fenn unter anderem zusammen mit M. Yamashita mittels ESI positive und negative Ionen von Biomolekülen in der Gasphase zu erzeugen.⁴⁰ K. Tanaka und J.B. Fenn wurden im Jahre 2002 für ihre Arbeiten „zur Entwicklung der sanften Desorptions- und Ionisationsmethoden für die massenspektrometrische Analyse von biologischen Makromolekülen“ mit dem Nobelpreis für Chemie geehrt. ESI gilt heutzutage als zuverlässige Standardmethode in der Massenspektrometrie.⁴¹ In die IM-Spektrometrie wurde ESI 1989 von der Hill-Gruppe eingeführt.⁴² Mit zunehmenden Interesse an der Untersuchung komplexer biologischer Systeme wurden Techniken, die IM- und Massenspektrometrie (IMMS) kombinieren, von vielen Gruppen bevorzugt.⁴³⁻⁴⁶ Aus diesem Grund sind weniger als 50 Publikationen mit ESI und einem stand alone IMS bis heute veröffentlicht worden (Abb. 1-1).

Die IMMS hat seit Einführung der ersten kommerziellen Geräte ihren Durchbruch (Abb. 1-1, ab 2006). In der Kombination mit der MS wird die IM meist nur als Separierungsmethode verwendet. Somit können die Substanzen zeitlich versetzt ins MS eingebracht und komplexe meist biologische Mischungen untersucht werden. Die Komplexität einiger Mischungen brachte die IMMS jedoch an ihre Kapazitätsgrenzen, sodass eine Vortrennung der Probe mithilfe von chromatographischen Verfahren erfolgen musste. Mithilfe der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) ESI IMMS konnte die Clemmer-Gruppe die Analyse hochkomplexer biomolekularer Mischungen, zum Beispiel eine tryptische Proteinmischungen, zeigen.⁴⁷ Die Kapazität des Systems wurde durch die vollständige Analyse von 4000 Einzelpeptiden in einer hochkomplexen Peptidmischung eindrucksvoll bewiesen.⁴⁸ Weniger komplexe Proben können jedoch auch ohne das teure MS analysiert werden. Die Hill-Gruppe war auch hier die erste, die die Anwendung eines ESI IM-Spektrometers als HPLC-Detektor, allerdings nur für Mikrobohrsäulen (Lösungsmittelfluss < 10 µl/min), zeigte.⁴⁹ Aus deren Forschung gründete sich die Firma *Excellims Corporation*, die seit 2005 ESI-IM-Spektrometer und später auch ESI-IMMS als HPLC-Detektoren anbietet.⁷ Andere Arbeiten der Gruppe von Eiceman zeigten die Anwendung für Lösungsmittelflussraten bis zu 500 µl/min, allerdings nur für den negativen Ionenmodus am Beispiel von Chlorphenolen.⁵⁰ Bei all diesen Experimenten war die Ausrichtung der ESI-Nadel axial zur Driftregion. Höhere Flussgeschwindigkeiten würden bei axialer Ausrichtung der ESI-Nadel große Mengen an Lösungsmittel in die Driftregion einführen, sodass auch geladene Nano- und Mikrotropfen detektiert werden könnten. Diese geladenen Tropfen führen zu einem erhöhten Hintergrundrauschen und können zu unregelmäßig verteilten Peaks führen, die die Detektion des Analyten einschränken könnte.

In dieser Arbeit wurde ein selbstentwickeltes ESI IM-Spektrometer als HPLC-Detektor für Flussraten von 200-1500 µl/min für den positiven und negativen Ionenmodus optimiert. Die Ionisationsregion des Spektrometers ist eine Weiterentwicklung des T-Zylinderdesigns von Kurnin *et al.*⁵¹ In der Mitte der zylinderförmigen Ionisationsregion befindet sich eine von Mantelgas umhüllte ESI-Quelle, die orthogonal zum Eingang des IM-Spektrometers ausgerichtet ist. Größere Tropfen werden an dem Eingang vorbeigeführt, kleinere gelangen durch die gewählte Feldlinienführung ins Spektrometer. Die effektive Überführung der kleineren Tropfen und freien Ionen konnte anhand einer konstanten Intensität zweier Substanzen im ausgedehnten Flussratenbereich von 200 bis 1500 µl/min bewiesen werden. Zwei ausgewählte komplexere Mischungen (24 Pestizide, 18 Aminosäuren) konnten die stabile Performance und die hohe Trennkapazität des HPLC ESI IM-Spektrometers zeigen. Ein stabiles Spray konnte mit linearen Gradienten von 10% bis zu 90% wässrigen Anteil bei 300 µl/min erzeugt werden. Eine weitere Anwendungsmöglichkeit des ESI-IM-Spektrometers wurde im Bereich des Reaktionsmonitorings gefunden. Erstmals wurde eine dreistufige Reaktion qualitativ und quantitativ in Echtzeit überwacht und Kinetiken, Ausbeuten und optimale Startbedingungen aus den IM-Spektren abgeleitet. Zur Weiterentwicklung des ESI IM-Spektrometers wurde eine Druckminimierung im Bereich von 300 - 1000 mbar untersucht. Bei reduziertem Druck konnten schon geringere Spannungen zu stabilen Sprayformen führen, sodass gleiche Nachweisgrenzen bei reduzierten und atmosphärischen Druck gefunden wurden. Die Einführung eines alternativen Ionentordesigns im Spektrometer mit drei hochtransparenten gepulsten Folien hingegen ließ Auflösungen von $R > 100$ zu und zeigte somit ein weiteres Entwicklungspotential des Spektrometers.

Das ESI IM-Spektrometer ist eine preiswerte, mobile, schnelle analytische Methode, die vielfältig einsetzbar ist. Ein Teil der Möglichkeiten des Geräts sind in dieser Arbeit beschrieben.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Ionisationsmethoden

In der Ionenmobilitäts (IM) werden ausschließlich gasförmige Ionen zur Detektion genutzt. Die Proben hingegen können in verschiedenen Aggregatzuständen vorliegen. Mithilfe geeigneter Ionisationsmethoden werden die in den Proben enthaltenen Moleküle mit mindestens einer Ladung versehen (Ionisation) und gegebenenfalls in die Gasphase überführt. Dafür werden verschiedene Stoffeigenschaften der Moleküle ausgenutzt, um negative oder positive Ionen zu erzeugen. Leicht ionisierbar sind Moleküle mit geringer Ionisierungsenergie, mit hoher Elektronenaffinität oder Protonenaffinität bzw. Gasphasenbasizität. Die äußeren Bedingungen für eine effektive Ionisation zu schaffen, ist die Aufgabe einer Ionisationsmethode. Eine Ionisation kann mit Hilfe von Temperatur, elektrischen Feldern oder durch Kollision der Moleküle mit Elektronen, Protonen oder Photonen erfolgen.⁵² Daraus resultieren eine Vielzahl an Ionisationsmethoden, die der IM-Spektrometrie ein breites Probenpektrum zugänglich machen. Eine Auswahl der in der IM-Spektrometrie eingesetzten Ionisationsmethoden ist in Abb. 2.1-1 zusammengefasst. Diese sind zumeist aus dem Bereich der Ionisationsmethoden bei Atmosphärendruck aus der Massenspektrometrie bekannt.

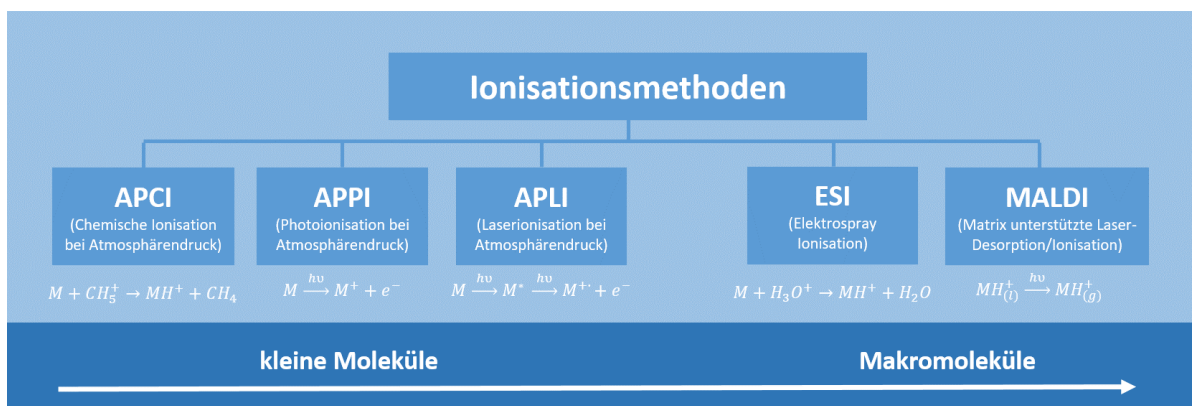


Abb. 2.1-1 - Übersicht der gängigen Ionisationsmethoden in der IM-Spektrometrie inklusive möglicher Ionisierungsreaktionen - Ionisationsmethoden sind von links nach rechts nach Größe der zugänglichen Moleküle sortiert

In der IM Spektrometrie wird das Hauptanwendungsgebiet einer Ionisationsmethode nach der Größe oder Art des zu ionisierenden Moleküls unterschieden. Kleinere organische Moleküle können bei Atmosphärendruck mithilfe von chemischer Ionisation (APCI), Photoionisation (APPI) und Laserionisation (APLI) mit einer Ladung versehen werden. Makromoleküle, wie z.B. Peptide, Proteine oder Polymere, werden vorwiegend mittels Elektrosprayionisation (ESI) oder Matrix-unterstützter Laser-Desorption/ Ionisation (MALDI) ionisiert.⁵³ Beide Methoden zeichnen sich durch eine sehr schonende und dadurch nahezu fragmentfreien Ionisierung aus. Bei Makromolekülen ist ein geringer Fragmentierungsgrad von Vorteil für die spätere Auswertung. Peptide oder Proteine besitzen häufig viele Stellen für Bindungsbrüche. Ein hoher Fragmentierungsgrad dieser Moleküle würde zu einem sehr komplexen Fragmentierungsmuster führen, welches schwer auszuwerten ist. Demnach wird im Bereich der Bio- oder Lebenswissenschaften (z.B. Arzneimittel- und Lebensmittelüberwachung, Proteinanalyse (Proteomics)) hauptsächlich ESI und MALDI verwendet.^{54,55} In dieser Arbeit wurde daher der Schwerpunkt mit ESI auf eine der beiden schonenden Ionisationsmethoden gelegt. Im folgenden Theorieteil wird demnach nur diese Ionisationsmethode ausführlich erläutert.

2.2 Elektrosprayionisation (ESI)

ESI ist ein Ionisationsverfahren bei Atmosphärendruck, bei dem eine Flüssigkeit an der Spitze einer elektrisch hochgeladenen Kapillare in ein fein verteiltes, elektrisch aufgeladenes Aerosol zerstäubt wird. Bei dem Prozess werden Analytmoleküle aus einer flüssigen Lösungsmittelmatrix in gasförmige möglichst lösungsmittelfreie Ionen überführt.

Die Erzeugung eines Elektrosprays (ES) erfolgt, indem man zwischen einer Kapillare mit geringem Innendurchmesser (ca. 1 - 200 μm) und einer Gegenelektrode ein hohes elektrisches Potenzial anlegt (Abb. 2.1-1).⁵⁶ Dadurch kommt es zur Ansammlung gleich geladener Ionen an der Kapillarspitze und damit zu einer sehr hohen elektrischen Feldstärke E_c in diesem Bereich. E_c kann durch das angelegte Potenzial U_{ESI} , durch den Kapillarradius r_c und durch den Abstand zwischen Kapillare und Elektrode d_{ce} beschrieben werden.⁵⁷

$$E_c = \frac{2U_{\text{ESI}}}{r_c \ln(4d_{ce}/r_c)} \quad 2-1$$

In Abhängigkeit von der verwendeten Lösungsmittelmatrix muss eine gewisse Schwellfeldstärke ($E_{\text{on}} \geq 10^6 \text{ V/m}$)⁵⁶ überschritten werden, damit es zur Ausbildung eines Konus an der Kapillarspitze kommt. Aus dem Konus tritt nach einigen Mikrometern ein Strahl geladener Tropfen aus, der anschließend in große und kleine geladene Tropfen zerfällt. Die so gebildeten Tropfen zerfallen anschließend mehrfach, sodass am Ende einer Kaskade von sogenannten Coulomb-Explosionen lösungsmittelfreie Ionen entstehen.

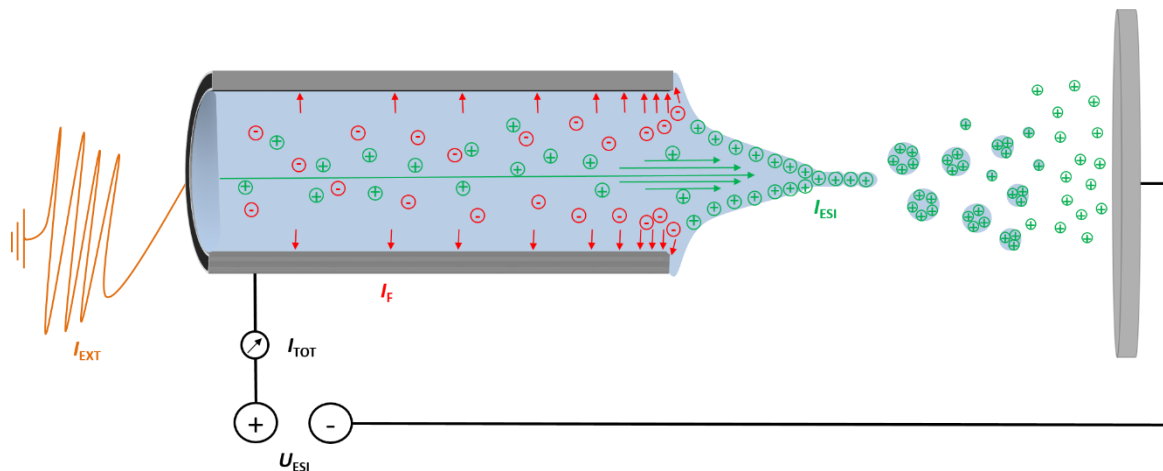


Abb. 2.2-1– Schematischer Aufbau bei einer Elektrosprayionisation im positiven Modus (adaptiert aus^{56,58}), U_{ESI} - Potential zwischen ESI-Kapillare und Gegenelektrode, I_{ESI} - Strom, der durch den ESI-Prozess abfließt, I_{EXT} - Strom, der über die Flüssigkeitszufuhr abfließt, I_F - Strom, der durch die Entladung der Anionen an der Kapillarwandung induziert wird, I_{TOT} - Strom, der durch die Spannungsquelle bereit gestellt wird

Zusammenfassend kann so der ESI-Prozess dargestellt werden. Im Detail ist der ESI-Mechanismus jedoch bis heute noch nicht vollständig verstanden und Teil der aktuellen Forschung.^{41,53,59} Die vielen beteiligten Prozesse reagieren häufig unterschiedlich bzw. partial gegensätzlich auf äußere Einflüsse. Änderungen der ESI-Parameter, z.B. Änderung der Lösungsmittelzusammensetzung, des pH-Wertes, der Düsengeometrie oder des Spray-Modus zeigen somit beim ESI keine klaren Trends in den IM-Spektren. Die bisherigen Erkenntnisse über die Teilprozesse und deren größtenteils empirisch

ermittelten Ergebnisse bei Parameteränderungen, den so genannten Skalierungsgesetzen⁶⁰ werden im folgenden Teil zusammengefasst und in fünf Prozessphasen unterschieden:

- Elektrochemische Prozesse innerhalb der ESI-Kapillare
- Elektrohydrodynamik am Flüssigkeitsmeniskus
- Entstehung elektrisch aufgeladener Aerosole
- Tropfenverdunstung und Ladungsverteilungsdynamik
- Bildungsmechanismen für gasförmige Analytione

In der Beschreibung der fünf Prozessphasen wird nur auf den positiven Ionen-Modus bei Verwendung einer ESI-Metallkapillare eingegangen, da diese für die Arbeit relevant sind. Die meisten Beschreibungen lassen sich jedoch auch auf negative Potentiale und andere Materialien von Kapillaren adaptieren.

Elektrochemische Prozesse innerhalb der ESI-Kapillare

Eine Elektrosprayquelle kann als ein geschlossener Stromkreislauf betrachtet werden.⁶¹ In dem Schaltkreis wird die ESI-Kapillare als Arbeitselektrode betrachtet, da im Inneren der Kapillare die relevante elektrochemisch induzierte Redoxreaktion stattfindet. Das Anlegen eines hohen Potentials an der ESI-Kapillare führt zur Ladungstrennung in der Flüssigkeit und anschließender Freisetzung von geladenen Tropfen und freien Ionen (siehe Abb. 2.2-1). Die geladenen Tropfen und freien Ionen werden durch das elektrische Feld durch ein Gas bei Atmosphärendruck (Ladungslücke) in Richtung Gegenelektrode geleitet und an dieser neutralisiert. Sie induzieren dabei einen Strom in die Gegenelektrode und schließen somit den Stromkreislauf. Das Gesamtsystem kann somit aus elektrochemischer Sicht als eine ladungskontrollierte elektrolytische Flusszelle verstanden werden (Abb. 2.2-2).⁶²

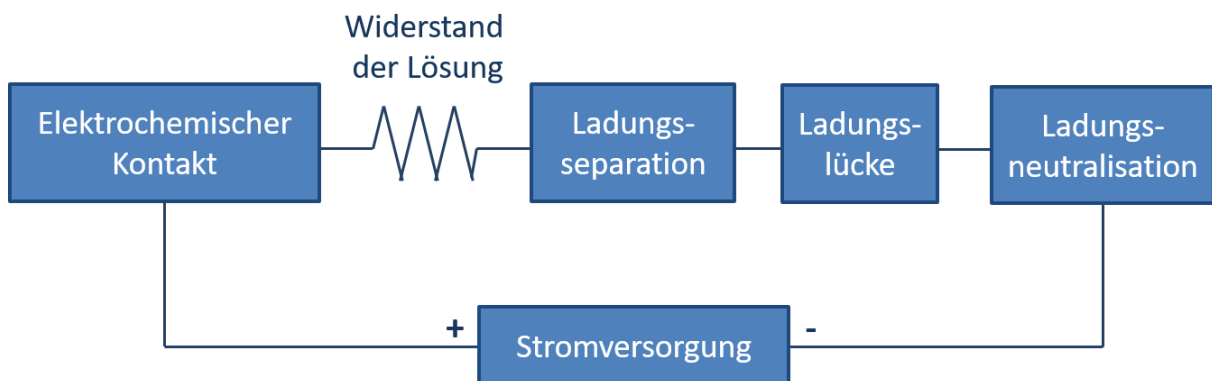


Abb. 2.2-2 - Stromkreislauf der elektrochemischen Teilprozesse bei ESI, Teilprozesse werden als funktionale Blöcke dargestellt - adaptiert von ⁶³

Verlassen die geladenen Tropfen die ESI-Kapillare, werden positive Ladungen der Flüssigkeit im Inneren der Kapillare entzogen, ein Strom fließt ab (I_{ESI} , Abb. 2.2-1). Infolgedessen kommt es zu einer Ladungsverarmung von positiven Ladungen in der Flüssigkeit. Dies übt eine Kraft auf die Anionen in der Lösung aus, sodass sich diese an der Kontaktfläche zur Kapillare entladen (I_F). Um ein Ladungsgleichgewicht in der Flüssigkeit herzustellen, muss gelten: $I_{ESI} = -I_F$. Die Bewegung der An- und Kationen innerhalb der Kapillare werden demnach durch das elektrische Feld bestimmt. An der Spitze der Kapillare ist die Ladungsseparation am stärksten und das elektrische Feld damit am höchsten

(symbolisiert durch die erhöhte Pfeildichte in Abb. 2.2-1). Je näher die Ionen der Kapillarspitze kommen, desto höher ist demnach die Wahrscheinlichkeit einer elektrochemischen Reaktion. Der Großteil der elektrochemischen Reaktionen findet bei Metallkapillaren nachweisbar in den ersten 250 μm stromaufwärts innerhalb der Kapillare statt.⁶⁴ Eine weitere Möglichkeit für einen Ladungsverlust in Flüssigkeit innerhalb der Kapillare besteht über einen Stromabfluss über die Flüssigkeitszufuhr (I_{EXT}). Der gesamte Stromabfluss an der ES-Quelle I_{TOT} setzt sich demnach aus der Summe von I_{EXT} und I_{ESI} zusammen (Gleichung 2-2). Die Hochspannungsquelle versucht jedoch immer das angelegte Potential an der ES-Kapillare aufrecht zu erhalten. Dementsprechend gibt sie genauso viele Ladungsträger in die Lösung, wie durch I_{TOT} verloren gehen.⁵⁸

$$I_{\text{TOT}} = I_{\text{EXT}} + I_{\text{ESI}} \quad 2-2$$

In einem geschlossenen Stromkreislauf sollte die Stromstärke überall identisch sein, demnach ist der Strom an der ESI-Kapillare I_{ESI} proportional zu der erforderlichen Geschwindigkeit der elektrochemischen Reaktion, diese ist gleich der Rate der gebildeten Ionen in Lösung und der Konzentration der überschüssigen Ladungen im Tropfen $[q]$ (mol/L).⁶³ Nach dem 1. Faraday'schen Gesetz der Elektrolyse ergibt sich mit der Faraday-Konstante F , dem Lösungsmittelfluss v_f , dem molaren Äquivalent der Ionen, die an der Produktion von 1 Mol Elektrolyse beteiligt sind n_j und der Konzentration (c_j) des Elektrolyse-Produkt j folgende Gleichung.

$$[q] = \frac{I_{\text{ESI}}}{F \cdot v_f} = \sum_j n_j c_j \quad 2-3$$

Der Strom I_{ESI} , der durch das Verlassen der Tropfen verursacht wird, bestimmt somit das Ausmaß der ablaufenden elektrochemischen Reaktion. Der Massentransport zu der Arbeitselektrode v_f legt fest, wie viel Flüssigkeit für die Reaktion zur Verfügung steht. Die Entscheidung, welche elektrochemischen Reaktionen ablaufen, und mit welcher Rate, definiert hingegen das Grenzflächenpotential an der Spitze der Arbeitselektrode. Dieses ist durch die ablaufenden Reaktionen und Stromabflüsse an der Spitze nicht konstant, wird jedoch durch die angelegte Spannung U_{ESI} möglichst konstant gehalten. Das Grenzflächenpotential ist demnach abhängig von der Ladungsdichte an der Elektrode, dem Material und der Geometrie der Elektrode, vom Lösungsmittelfluss und dessen Zusammensetzung und vom Redox-Potential aller Komponenten und deren Konzentration im System.⁶⁴

Die elektrochemische Spannungsreihe gibt die Ionisierbarkeit verschiedener Komponenten eines elektrochemischen Prozesses bezogen auf die Standardwasserstoffelektrode (E^0 vs. SHE) an. Diese ist auf eine Aktivität von 1 mol/l und einen Wasserstoff-Druck von 1013 hPa bei jeder Temperatur normiert.⁶⁵ Anhand dieser Reihe kann man Komponenten für die Oxidation und Reduktion bei der elektrochemischen Reaktion bestimmen. Komponenten für eine Oxidation haben geringe Redox-Potentiale und ihre chemische Struktur kann eine positive Struktur gut stabilisieren (z.B. Aromaten, hochkonjugierte Moleküle mit Heteroatomen mit freien Elektronenpaaren oder elektronenspendende Gruppen wie OH, OCH₃, N(CH₃)₂ und CH₃). Übersteigt das Grenzflächenpotential der Arbeitselektrode den Wert der Komponente in der elektrochemischen Spannungsreihe kommt es zur Oxidation. Komponenten für die Reduktion hingegen haben ein hohes Redox-Potential, dazu gehören z.B. Aromaten und hochkonjugierte Moleküle oder elektronenziehenden Gruppen wie NO₂ und CN.

Bei ESI-Kapillaren aus Metall im positiven Ionen-Modus konnte jedoch festgestellt werden, dass die Ionisierung der Komponenten hauptsächlich über die Oxidation des Lösungsmittels oder die Korrosion

der ESI-Kapillare abläuft.⁶¹ Am Beispiel einer Stahlkapillare mit einem wässrigen Lösungsmittelgemisch konnte gezeigt werden, dass die geringen Werte innerhalb der elektrochemischen Spannungsreihe (Gleichung 2-4 bis 2-10) der Grund sind. Die bei den Reaktionen entstehenden Elektronen werden an der ESI-Kapillare entladen. Die überschüssigen Protonen hingegen können im weiteren Verlauf des ESI-Prozesses zur Ionisierung einer oder mehrerer Komponenten beitragen. Aus diesem Grund werden vorwiegend Lösungsmittel bei ESI eingesetzt, die zur Selbstionisation neigen (z.B. Autoprotolyse von Wasser).

	$E^0(\text{V})$ vs. SHE	
$4 \text{OH}^- \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2 + 4e^-$	0.40	2-4
$4 \text{OH}^- \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + 2e^-$	0.88	2-5
$2 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 4\text{H}^+ + \text{O}_2 + 4e^-$	1.23	2-6
$2 \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + 2\text{H}^+ + 2e^-$	1.77	2-7
$\text{Fe} + 2\text{OH}^- \rightarrow \text{Fe}(\text{OH})_2 + 2e^-$	-0.87	2-8
$\text{Fe} (s) \rightarrow \text{Fe}^{2+} + 2e^-$	-0.44	2-9
$\text{Fe} (s) \rightarrow \text{Fe}^{3+} + 3e^-$	-0.03	2-10

Findet eine Reduktion oder Oxidation an der ESI-Kapillare statt, erhöht sich die Stromstärke (I_{TOT}) an der Hochspannungsquelle kurzzeitig, da der nachgelagerte Prozess durch die Diffusionsrate der oxidierten Spezies zur Metalloberfläche bestimmt wird. Der innere Widerstand der Lösung ist dementsprechend mitentscheidend für die Amplitude.⁶³ Er wird durch die Leitfähigkeit der Lösung κ bestimmt, die bei einer ESI-Kapillare aus Metall proportional zum Strom I_{TOT} ist.⁶⁶ Zur Erhöhung der Leitfähigkeit werden häufig Elektrolyte (Säuren, Puffer oder Basen) der Lösungsmittelmatrix zugesetzt. Diese können einerseits elektrochemische Prozesse unterstützen, andererseits jedoch die effiziente Bildung von Gasphasenionen (vgl. Kapitelteil 0) beeinflussen. Deshalb sollten Elektrolyte mit der geringsten Signalunterdrückung gefunden und diese in der geringsten Konzentration eingesetzt werden (z.B. Ammoniumacetat < 5 mmol/L). Bei starken Säuren kann die Bildung der entstehenden Ladungen durch den elektrochemischen Prozess auf Protonenbildung beschränkt werden. Die Konzentration der so entstandenen Protonen $[\text{H}^+]_{\text{elec}}$ (mol/L) verursachen eine maximale pH-Wertänderung $\Delta\text{pH}_{\text{max}}$ vom bisherigen pH-Wert der Lösung $\text{pH}_{\text{initial}}$ (Gl. 2-12). Die pH-Wertänderung kann durch I_{TOT} und v_f beeinflusst werden (Gl. 2-11).⁵⁸

$$[\text{H}^+]_{\text{elec}} = \frac{I_{\text{TOT}}}{n_j \cdot F \cdot v_f} \quad 2-11$$

$$\Delta\text{pH}_{\text{max}} = -\log([\text{H}^+]_{\text{initial}} + [\text{H}^+]_{\text{elec}}) - \text{pH}_{\text{initial}} \quad 2-12$$

Der Einfluss der elektrochemischen Prozesse ist jedoch umstritten,⁶⁴ eine Vielzahl der ESI-Messungen wird von der Elektrochemie nicht signifikant beeinflusst, da der Prozess unter Standardbedingungen zu langsam abläuft.⁵⁸ 1 M Lösung im kritischen elektrischen Feld zwischen zwei Elektroden für ein Volumen von 1 mm³ würde z.B. mindestens 10⁴ s brauchen, bis die Elektrolyten aufgebraucht sind.

Durch eine geschickte Wahl der ESI-Parameter kann jedoch die Elektrolyse begünstigt, die Ladungstrennung und der Strom maximiert I_{MAX} werden (vgl. 2-13). Zu diesen Parametern gehören:

- eine hohe elektrische Feldstärke E_C (vgl. Gl. 2-1),
- eine geringe Flussrate der Lösung (v_f),
- eine hohe I_{TOT} durch eine floatende ES-Kapillare,
- eine hohe Leitfähigkeit der Lösung (κ) durch Zuführung von Elektrolyten und
- ein effizienter Massentransport über eine große Kontaktfläche zwischen ES-Kapillare und Flüssigkeit und einer metallischen Arbeitselektrode.

$$I_{MAX} = n_j \cdot F \cdot c \cdot v_f$$

2-13

Elektrohydrodynamik am Flüssigkeitsmeniskus

Verlässt die Flüssigkeit das Innere der ESI-Kapillare würde sich in Abwesenheit einer Potentialdifferenz zwischen Kapillare und Gegenelektrode ein Tropfen an der Kapillarspitze bilden. Dieser Tropfen wäre aufgrund der ins Flüssigkeitsinnere wirkenden Oberflächenspannung γ der energetisch günstigste Zustand. Wird hingegen ein Potential angelegt, induzieren die Ionen gleicher Ladungen auf der Oberfläche der Flüssigkeit (Ladungsdichte σ , Gl. 2-14) an der Kapillarspitze eine Formveränderung der Flüssigkeit. Schon Anfang der 60er Jahre untersuchte G.I. Taylor den „Zerfall von Wassertropfen in einem elektrischen Feld“ und stellte fest, dass die kegelförmige Form des Flüssigkeit als energetisch günstigster Zustand aus der Abstoßung der freien gleichgeladenen Ionen und der Oberflächenspannung der Flüssigkeit entsteht (Taylor-Konus).^{67,68} Alle wirkenden Kräfte in einem Taylor-Konus sind in Abb. 2.2-3 - links aufgeführt. In einem ideal konischen geformten Taylor-Konus herrscht demnach ein Gleichgewicht aus potentieller Energie (Außendruck und Schwerkraft), kinetischer Energie aus der Flüssigkeitsbewegung und der tangential wirkenden Polarisationsspannung und der Verlustenergie aufgrund der Viskosität der Flüssigkeit (Abb. 2.2-3).⁶⁹

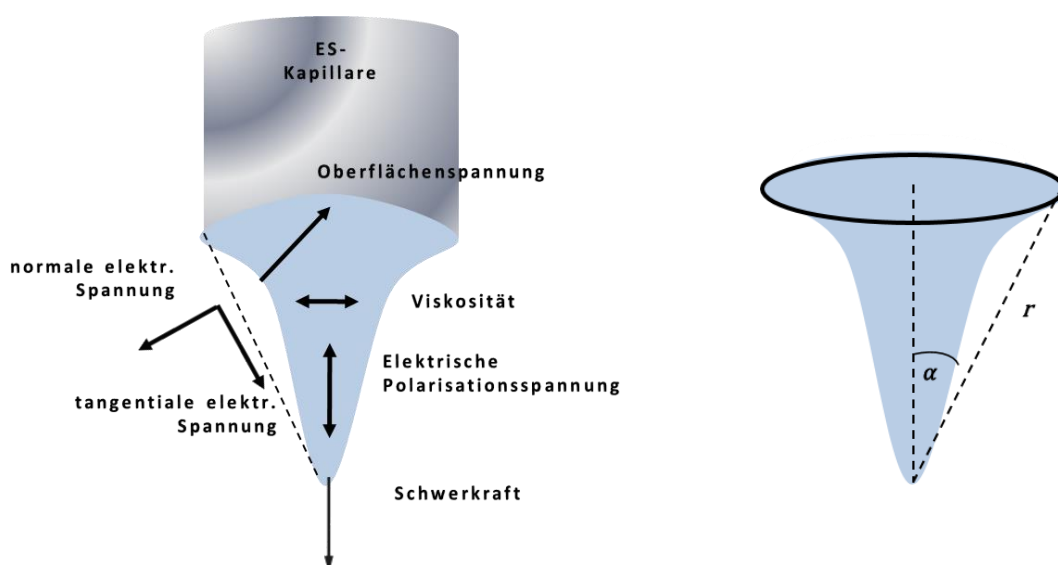


Abb. 2.2-3 - links: Wirkende Kräfte beim Taylor-Konus, rechts: Beschreibung der Form des Taylor-Konus mithilfe des Krümmungsradius des Flüssigkeitsmeniskus α und dem Radius des Meniskus r , beides adaptiert von ^{70,71}

Die Form des Konus wird durch den Krümmungsradius des Flüssigkeitsmeniskus $r \cdot \tan \alpha$ bestimmt (Abb. 2.2-3 - rechts). Sie kann mithilfe der angelegten elektrischen Feldstärke E_c und γ mit Beachtung der Dielektrizitätskonstante im Vakuum ϵ_0 verändert werden (Gl. 2-15).⁷² Die Gleichung 2-15 gilt jedoch nur für einen ideal konisch geformten Taylor-Konus in dem Moment bei dem der Druck der leitenden Flüssigkeit gleich dem Gegendruck des umgebenden Gases ($\Delta p = 0$) und damit der Formfaktor a_1 vernachlässigbar ist.⁷³ Der Taylor-Konus ist jedoch nicht statisch und hat demnach nicht immer eine ideale konische Form. Kontinuierlich werden Flüssigkeit und Ladungsträger über die ESI-Kapillare bereitgestellt und an der Spitze des Konus über den austretenden Strahl wieder abgegeben. Δp kann demnach experimentell nicht fixiert werden und ändert sich fortwährend.⁷⁴ Soll hierbei jedoch die Form des Taylor-Konus erhalten bleiben, müssen sich unter Berücksichtigung von elektrischen Wechselwirkungen die Volumen- und die Oberflächenarbeit nach der Laplace-Gleichung kompensieren. Im Taylor-Konus kann dies über eine Krümmung des Konus geregelt werden. Ist der Druck in der Flüssigkeit höher ($\Delta p > 0$) entsteht ein langgezogener Meniskus, der zur Achse hin gekrümmt ist, im entgegengesetzten Fall ($\Delta p < 0$) kann ein kurzer Meniskus, der von der Achse weg gekrümmt ist, beobachtet werden. Diese Änderungen in der Geometrie des Konus wird über den Formfaktor a_1 beschrieben. Dieser ging aus Berechnungen zur Grenzen der Stabilität eines Taylor-Konus hervor und hat einen direkten Zusammenhang zu Δp (a_1 , Δp sind dimensionslos, Gl. 2-16).⁷³

$$\sigma = \epsilon_0 \cdot E_c \quad 2-14$$

$$\frac{1}{2} \epsilon_0 E_c^2 = \frac{\gamma}{r \cdot \tan \alpha} \quad 2-15$$

$$\frac{\Delta p}{\gamma} = -0,524826 a_1 \quad 2-16$$

Der abnehmende Radius des Flüssigkeitsmeniskus weg von der Kapillaröffnung führt zu einer signifikant Steigerung der elektrischen Feldstärke zur Spitze hin.⁷¹ Beim Erreichen einer Schwellfeldstärke E_{on} tritt beim halben Öffnungswinkel des Taylor-Konus ($\alpha = 49,3^\circ$) ein Flüssigkeitsstrahl aus (Gl. 2-17).⁷⁵ Für eine ESI-Kapillare mit dem Innendurchmesser $100 \mu\text{m}$ hat ein typischer Jet aus einem Taylor-Konus einen Durchmesser (d_{jet}) von $1 \mu\text{m}$ oder kleiner.⁶⁴ d_{jet} ist abhängig von v_f und der Leitfähigkeit der Flüssigkeit κ . Zusammen mit der nur von der relativen Permittivität ϵ abhängigen dimensionslosen Funktion $G(\epsilon)$ kann der Durchmesser des Jets direkt bestimmt werden (Gl. 2-18). Der bei dem Prozess abfließende Strom I_{ESI} wird ebenfalls über eine solche dimensionslose Funktion $g(\epsilon)$ und v_f , γ , κ definiert (Gl. 2-19).⁷³

$$E_{on} = \sqrt{\frac{2\gamma \cos 49,3^\circ}{\epsilon_0 \cdot r_c}} \quad 2-17$$

$$d_{jet} = G(\epsilon) \sqrt[3]{\frac{v_f \cdot \epsilon_0}{\kappa}} \quad 2-18$$

$$I_{ESI} = g(\epsilon) \sqrt{\gamma \cdot \kappa \cdot v_f} \quad 2-19$$

Der Taylor-Konus ist eines der am besten untersuchtesten Geometrien beim ESI, da er hauptsächlich für die Massen- oder die IM-Spektrometrie Anwendung findet. Es gibt jedoch verschiedene Spraymodi, die je nach v_f , γ , κ und E_c mehr oder weniger deutlich voneinander getrennt beobachtet werden

können. Eine mögliche Einteilung der Spraymodi nach steigender E_C ist in Abb. 2.2-4 dargestellt. In Abwesenheit eines elektrischen Feldes ist der Abtropfmodus (I: *dripping mode*) an der Spitze der ES-Kapillare zu beobachten. Der Tropfen bildet sich als energetisch günstigster Zustand, da ohne elektrisches Feld nur die Oberflächenspannung ins Flüssigkeitsinnere wirkt. Wird die elektrische Feldstärke leicht erhöht, werden zwei Effekte sichtbar. Einerseits findet eine Polarisierung der Flüssigkeit an der Spitze der Kapillare statt, sodass diese eine stärkere Wölbung hin zur Gegenelektrode aufweist. Andererseits werden die entstehenden Tropfen aufgrund der nach außen wirkenden Oberflächenladung kleiner (II: *microdripping mode*). Die Frequenz der kontinuierlichen Tropfenbildung steigt mit erhöhter E_C bis sich spindelförmige Flüssigkeitsfäden bilden (III: *spindle mode*). Diese Form entsteht durch eine Streckung des Tropfens am Flüssigkeitsende entlang der Achse des elektrischen Feldes zwischen ES-Kapillare und Gegenelektrode aufgrund der elektrischen Polarisation in der Flüssigkeit. Die Geschwindigkeit des periodischen Ablöseprozesses des Tropfens vom Flüssigkeitsverband und die Tropfengröße entscheidet, ob der *spindle mode* (III) oder der *multispindle mode* (IV) vorliegt.⁷⁶

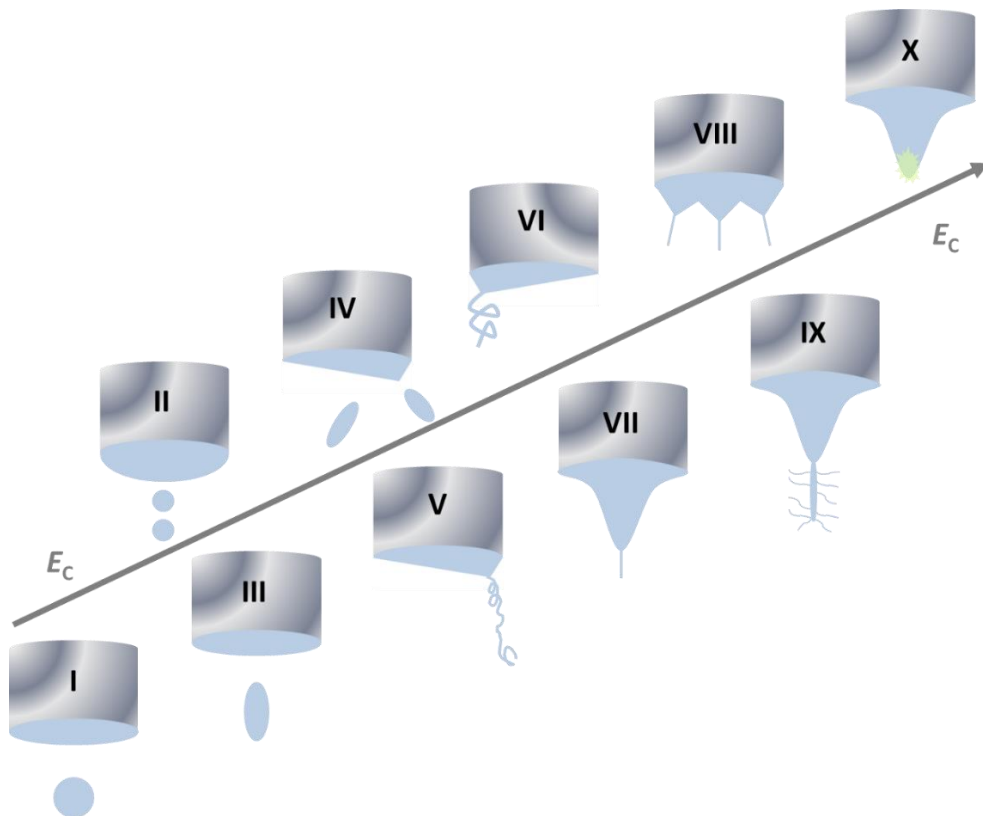


Abb. 2.2-4 - Modifizierte schematische Darstellung unterschiedlicher Spraymodi nach Cloupeau^{77,78} und Jaworek⁷⁹ bei steigender elektrischer Feldstärke - Erläuterung der römischen Ziffern im Text

Wird die E_C zu hoch, kann der abfließende Strom I_{ES} nicht mehr über Tropfen gewährleistet werden, sodass sich ein Strahl an der Spitze des Flüssigkeitsmeniskus ausbildet. Anfangs wird der gleichmäßige Flüssigkeitsstrahl durch ein Vibrieren der geladener Tropfen bzw. freier Gasionen gestört (V: *oscillating jet mode*). Das Vibrieren verursacht eine ungleichmäßige Tropfenbildung.⁸⁰ Bei weiterer Erhöhung von E_C entsteht ein abgeschrägter Flüssigkeitskonus an der Spitze, der in ein ca. 100 μm breiten Jet übergeht. Konus und Jet rotieren spiralförmig um die gedachte verlängerte Achse der ESI-Kapillare (VI: *precession mode*).⁷⁹ Beim Conejet-Modus (VII: *cone jet mode*) bildet sich folgend ein hochsymmetrisches Konus aus, der sich stabil in Richtung der Gegenelektrode ausrichtet. Aus diesem Konus tritt

ein Strahl mit einem Außendurchmesser $< 100 \mu\text{m}$ aus. Steigt E_c weiter an, teilt sich der Meniskus in mehrere Jets auf (VIII: *multijet mode*). Die Anzahl der Jets steigt mit E_c und v_f an und lässt damit höhere Flussraten als der Conejet-Modus zu.⁸¹ Die Aufteilung der Jets führt bei hohen Flussraten außerdem zu feineren Tropfen und wesentlich höherer Anzahl an freien Gasphasenionen (vgl. Kapitelteil 0).⁷⁸ Bei der höchsten Feldstärke im Bereich der elektrohydrodynamische Zerstäubung ist eine diffuse unregelmäßige Form eines Konus mit mehreren Jets zu beobachten (IX: *ramified jet mode*). Die Durchmesser der produzierten Tropfen variieren infolgedessen zwischen $100 \mu\text{m}$ und 2mm .

Bei Flüssigkeiten mit geringer elektrischer Leitfähigkeit ($\kappa < 10^{-11} \text{S/m}$)⁸² und/oder hoher Oberflächenspannung ($\gamma > 0,05 \text{N/m}$)⁸³ können Koronaentladungen zu Unregelmäßigkeiten im Spraykonus führen. Eine weitere Erhöhung der E_c führt dann zu einem kontinuierlichen Stromabfluss ($I > 10^{-6} \text{A}$) über Koronaentladungen und zurück zu einer Ausbildung eines stabilen Taylor-Konus. Dieser asymmetrische Kegel zeichnet sich aufgrund der Entladungen durch ein umhüllendes Leuchten an der Spitze des Meniskus aus.⁷⁷ Weitere Erhöhung von E_c führt zu einem Übergang in die chemische Ionisation bei Atmosphärendruck (APCI).

Entstehung elektrisch aufgeladener Aerosole

Die Generierung eines einheitlichen, monodispersen Aerosols mit möglichst kleinen Tropfendurchmessern d_d mit einer hohen Abtropffrequenz f_d ist essentiell für eine möglichst hohe Ionenausbeute.⁸⁴ Im Gegensatz zu allen anderen Modi zeichnet sich nur der Conejet-Modus (VII) durch eine sehr geringe Tropfengrößenverteilung aus.⁷⁷ Durch die Abstoßung gleichgeladener Ladungen im Flüssigkeitsstrahl zerfällt in Abhängigkeit verschiedener Parameter nach einigen $100 \mu\text{m}$ der Jet in fein verteilte Tropfen (Abb. 2.2-5).

Bei einem hängenden Tropfen an einer Kapillare in einem feldfreien Raum kann der hydrodynamische Tropfendurchmesser d_{hd} aus der Gleichung 2-20 berechnet werden.⁸⁵ Er wird durch den Durchmesser der Kapillare r_c , der Oberflächenspannung γ , der Dichte der Flüssigkeit ρ und der Gravitationskonstante g bestimmt.

$$d_{hd} = \sqrt[3]{\frac{12 r_c \cdot \gamma}{\rho \cdot g}} \quad 2-20$$

Bei einem ESI-Prozess hingegen wird der Durchmesser der entstehenden Primärtropfen d_d hauptsächlich durch die Oberflächenspannung γ , die Leitfähigkeit κ und die Flussrate der Flüssigkeit v_f bestimmt.⁸⁶ Der Einfluss des äußeren elektrischen Feldes zwischen ESI-Kapillare und Gegenelektrode und das inhomogene Feld in der Nähe der Spitze des Flüssigkeitsmeniskus führt jedoch zu einer Tropfengrößenverteilung. Aus diesem Grund existieren zu allen vier Einflussparametern bis heute nur Skallierungsgesetze.^{77,78} Um möglichst kleine Tropfendurchmesser zu erreichen müssen daher die folgenden Bedingungen geschaffen werden:

- niedrige Flussrate v_f ,
- hohe Leitfähigkeit κ und
- hohe Oberflächenspannung γ .

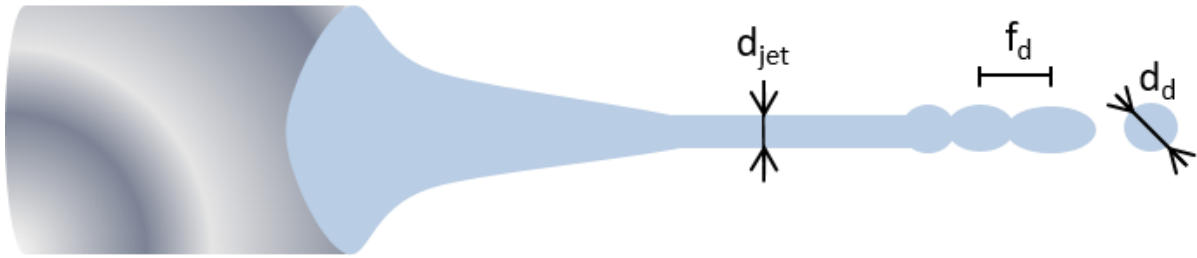


Abb. 2.2-5 - Schematische Darstellung des Zerfallsprozesses des Jets in Tropfen - adaptiert von ⁸⁷

Der Durchmesser des Jets d_{jet} hängt von den gleichen Parametern ab, wodurch ein relativ konstantes Verhältnis zwischen Jettdurchmesser und Tropfendurchmesser gefunden werden konnte (Gl. 2-21). Es bezieht sich auf sowohl auf theoretische Berechnungen als auch empirischen Ergebnisse.^{56,88} Die Geschwindigkeit der Bildung der Tropfen (Abtropffrequenz f_d) variiert zwischen 10^7 bis 10^{10} Tropfen pro Sekunde und wird dabei hauptsächlich von v_f beeinflusst (Gl.2-22).^{68,87} Je nach Volumen des Tropfens kann dieser eine unterschiedliche Konzentration an überschüssigen Ladungen $[q]$ enthalten. Dabei beeinflusst die Elektrochemie in der Kapillare über den abfließenden Strom I_{ESI} , als auch die Flussrate v_f die Anzahl der Ladungen (Gl. 2-3).⁶⁴

$$\frac{d_d}{d_{\text{jet}}} \approx 1,7 \text{ bis } 1,9 \quad 2-21$$

$$f_d = \frac{6 v_f}{\pi \cdot d_d^3} \quad 2-22$$

Tropfenverdunstung und Ladungsverteilungsdynamik

Bei der Entstehung der Primärtropfen liegt ein Gleichgewicht zwischen Oberflächenspannung und Coulomb-Abstoßung vor. Die Oberflächenspannung wirkt ins Flüssigkeitsinnere und ist für die Tropfenform verantwortlich. Ihr entgegen wirkt, aufgrund der Abstoßung gleich geladener Ionen, die Coulomb-Kraft F_{Cou} . Sie hängt vom Abstand zwischen zwei Ionen r_{1-2} , den Ladungen der jeweiligen Ionen q_1 und q_2 und ϵ_0 ab (Gl. 2-23). Das Gleichgewicht wird jedoch durch die Verdunstung des Lösungsmittels gestört. Die Verdunstung führt zur Annäherung der gleichgeladenen Ionen und zu einer Erhöhung der Oberflächenladungsdichte bis das sogenannte Raleigh-Limit erreicht wird. Es hängt von der Ladung des Tropfens q_d , ϵ_0 , der Oberflächenspannung des Lösemittels γ und dem Tropfenradius r_d ab (Gl. 2-24). Wird das Raleigh-Limit überschritten führt dies zum Zerfall des Tropfens, die sogenannte Coulomb-Explosion setzt ein.⁸⁹ Das Raleigh-Limit gilt jedoch nicht für alle Lösungsmittel gleichermaßen, so wurden zerfallende Tropfen bei verschiedenen Lösungen zwischen 70-90% des Raleigh-Limits beobachtet.⁹⁰

$$F_{\text{Cou}} = \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \frac{q_1 q_2}{r_{1-2}^2} \quad 2-23$$

$$q_d = 8\pi(\epsilon_0 \gamma r_d^3)^{1/2} \quad 2-24$$

Der Zerfall der Tröpfchen hat die Bildung sogenannter Tochtertropfen zur Folge, die nach wenigen Mikrosekunden weiter zerfallen. Bei jeder Coulomb-Explosion werden ca. 1% an Masse und zwischen

15-25% der Ladungen des Primärtropfens auf die Tochtertropfen übertragen.⁹¹ Eine mögliche Kaskade der Bildung von Tochtertropfen durch Lösungsmittelverdampfung und wiederholte Tropfenteilungen ist in Abb. 2.2-6 dargestellt. Die Zeit zwischen den Coulomb-Explosionen wird von Explosion zu Explosion kleiner, da durch den verringerten Tropfendurchmesser das Raleigh-Limit schneller erreicht werden kann. Bei der Verwendung von Wasser als Lösungsmittel kommt es zur Spaltung, wenn etwa 40% an Volumen verloren sind.⁹² Am Ende einer Reihe von Explosionen entstehen freie, vollständig desolvatisierte Ionen, die sogenannten Gasphasenionen.

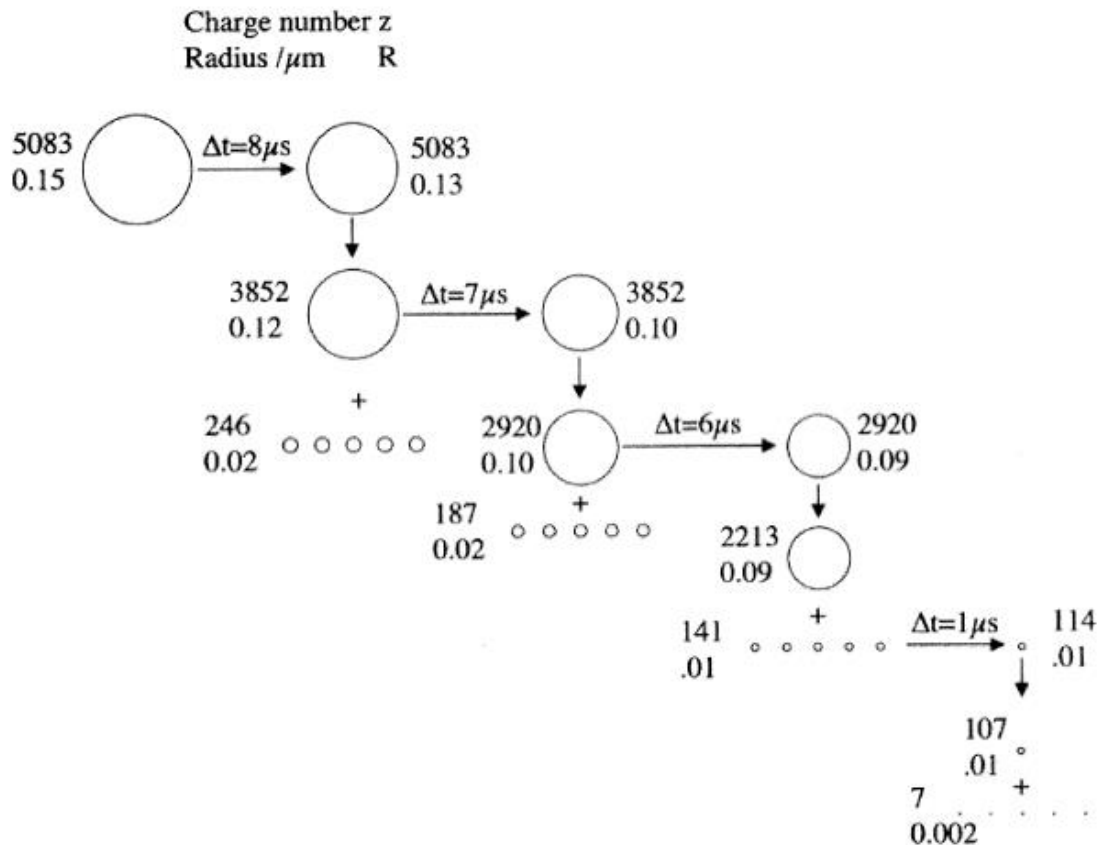


Abb. 2.2-6 - Kaskade des Tropfzerfalls für geladene Wassertropfen, die durch NanoESI erzeugt wurden.⁹²

Die Verdunstung des Lösungsmittels ist die treibende Kraft für diese Kaskade. Sie kann als Aggregatzustandswechsel von flüssig zu gasförmig unterhalb der Siedetemperatur beschrieben werden. Die Verdunstung wird über den Sättigungsdampfdruck der verdunstenden Flüssigkeit definiert. Im thermodynamischen Gleichgewicht entspricht dieser dem Partialdruck in der Gasphase.⁹³ Verdunstung kann demnach nur auftreten, wenn der Sättigungsdampfdruck größer ist als der Partialdruck des Gases. Tropfen weisen aufgrund ihrer gekrümmten Oberfläche einen höheren Sättigungsdampfdruck p_k als glatte Oberflächen p_v auf. Je kleiner der Radius des Tropfens r_d , desto größer ist die p_k . Dieser Zusammenhang kann über die Kelvin-Gleichung (Gl. 2-25) mithilfe der allgemeinen Gaskonstanten R und der Molmasse M beschrieben werden.⁹⁴ Die Kelvin-Gleichung betrachtet die flüssige Phase als inkompressible Flüssigkeit und gasförmige Phase als ideales Gas.

$$\ln \frac{p_k}{p_v} = \frac{2\gamma M}{r_d R T \rho} > 0$$

2-25

Bildungsmechanismen für gasförmige Analytionen

Der exakte Mechanismus der Bildung der Gasphasenionen ist bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt, wird jedoch von mehreren Modellen beschrieben. Diese unterschiedlichen Modelle beschreiben den letzten Schritt der Freisetzung der Ionen für unterschiedliche Stoffklassen. Jedes Modell beschreibt die gemachten Beobachtungen für seine Stoffklasse am besten. Die Modelle werden demnach parallel verwendet (Abb. 2.2-7).⁵³

Das **Ionenverdampfungsmodell (IEM - Ion Evaporation Model)** geht von einer direkten Verdampfung freier Ionen von der Oberfläche hochgeladener Mikrotropfen aus, wenn deren Radius kleiner als 10 nm ist. Der Grenradius konnte durch experimentelle Ergebnisse mit purem Wasser und verschiedenen Natriumchlorid-Konzentrationen als Spraylösung unter Bestimmung von Diffusionskoeffizienten ermittelt werden. Das Ergebnis der Untersuchungen war, dass abhängig von der Salzkonzentration die meisten Tropfen schneller zu „trockenem“ Salz verdampfen, als die Verdampfung um ein Ion stattfinden kann.⁹⁵ Mithilfe theoretischer Berechnungen zu optimalen thermodynamischen und kinetischen Konditionen zur Freisetzung eines einzelnen geladenen desolvatisierten Ions aus einem Tropfencluster erfolgte die Bestätigung der experimentellen Befunde.⁹⁶ Somit findet der Prozess nur statt, wenn:

1. die elektrostatische Energie groß genug wird,
2. die kritische Größe immer noch größer als der Rückstand und
3. größer als das Raleigh-Limit ist.

Die freien Gasphasenionen entstehen demnach schon aus den größeren geladenen Tröpfchen. Eine Positionierung der Ionen nahe der Flüssigkeit-Gas-Grenzfläche ist dafür vorteilhaft (Abb. 2.2-7 - a). Das IEM ist eine gute Beschreibung für die Freisetzung von kleinen Ionen.⁹⁵

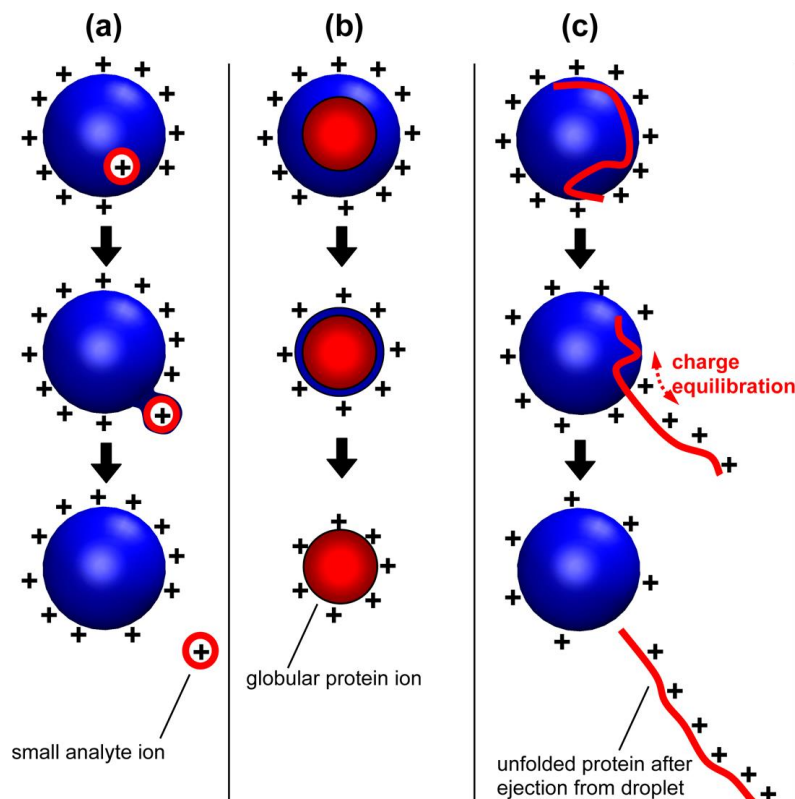


Abb. 2.2-7 - Zusammenfassung der verschiedenen Modelle zur Freisetzung von Ionen bei ESI: (a) IEM, (b) CRM, (c) CEM⁵⁹

Das **Modell des geladenen Rückstands (CRM - charged residue model)** gibt hingegen die Bildung von Gasphasenionen von Makromolekülen wie Proteine und Polymeren am wahrscheinlichsten wieder. Das CRM setzt einen schrittweisen Verlust von Lösungsmittel aus Tropfen über eine Spaltungskaskade voraus, die zu einer vollständigen Desolvatisierung des Analytens führt (Abb. 2.2-7 - b).³⁹ Bei der Verdampfung der letzten Lösungsmittelmoleküle kommt es zur Übertragung der Ladung vom Lösungsmittel auf den Analyten. Dieser Prozess findet hauptsächlich an funktionellen Gruppen auf der Oberfläche des Makromoleküls, die eine höhere Gasphasenbasizität als Wasser aufweisen, statt. Mehrere basische Stellen in einem Makromolekül können demnach zu Mehrfachladungen des Analyten führen. Mehrere Analytmoleküle in einem Tropfen können hingegen eine Aggregatbildung, die Bildung sogenannter Multimere, zur Folge haben.⁹⁷

Die durchschnittliche Ladungszahl z_{\emptyset} der Makromoleküle in Wasser bezogen auf ihre Molmassenzahl M_z kann durch Gleichung 2-26 gut beschrieben werden. a und b sind hierbei molekülabhängige Konstanten. Für sphärische Dendrimere und sphärische Proteine nimmt b einen Wert von 0.53 an und für native Proteine ist b zwischen 0.52 und 0.55.⁵⁶ a ist hingegen ein stoffklassenspezifischer Fitparameter.⁹⁸ Diese auf empirischen Daten beruhende Gleichung ist im guten Einklang mit dem CRM. Die durchschnittliche Ladungszahl z_{\emptyset} auf einem Makromolekül ist somit gleich der Anzahl der Ladungen auf einem Wassertropfen des Radius R , der gerade das Makromolekül enthält und sich an der Rayleigh-Grenze befindet. Der letzte Verdampfungsprozess überträgt demnach alle Ladungen der Lösungsmittellionen auf das Makromolekül.⁹⁹ Hat das Makromolekül die gleiche Dichte ρ wie Wasser kann mithilfe der Avogadro-Konstanten N_A und dem Radius R die Molmasse des Makromoleküls M berechnet werden (Gl. 2-27).¹⁰⁰ Quantitative Vorhersagen des Proteinladungszustands sind mithilfe des CRM demnach möglich und für Makromoleküle mit sphärischer Form zutreffend. Proteine mit großen Abweichungen von der sphärischen Form haben jedoch eine Ladung, die höher ist als die von Gleichungen vorhergesagte.^{56,101}

$$z_{\emptyset} = a \cdot M_z^b \quad 2-26$$

$$M = \frac{4}{3\pi} R^3 \cdot \rho \cdot N_A \quad 2-27$$

Die nicht zufriedenstellende Voraussage von Proteinladungszuständen führte zu einem weiteren Modell, welches von einer Kombination von IEM und CRM ausgeht.¹⁰² Die durchschnittliche Anzahl der Ladungen eines nativen Proteins wird nach dem Modell durch die Emission von Ladungsträgern im Feld bestimmt (Gl. 2-28). Es besagt, dass die Emission von Ladungen die elektrische Feldstärke reduziert und weitere Coulomb-Explosionen verhindert, demgegenüber steht die neutrale Lösungsmittelverdampfung. Wenn die Auswirkungen der Krümmung der Tropfen vernachlässigt werden, dann wird die Emission eines Ions aus dem Tröpfchen immer auftreten, wenn das elektrische Feld an der Tropfenoberfläche eine kritische Höhe E^* erreicht hat. Dieses Modell erklärt über seinen Mechanismus demnach besser die Anzahl an Ladungen auf einem nativen Protein.

$$z_{\emptyset} = \frac{\pi \varepsilon_0 E^*}{e} R^2 \quad 2-28$$

Für denaturierte Proteine und unpolare Polymere hat sich das so genannte **Kettenauswurfmodell (chain ejection model, CEM)** durchgesetzt, welches sich auf Moleküldynamik-Simulationen stützt (Abb. 2.2-7 - c).¹⁰³ Denaturierte Proteine liegen entfaltet vor. Die Entfaltung kann z.B. durch ein saures Lösungsmittel hervorgerufen werden. Bei einer Proteinentfaltung wechseln die Eigenschaften des Proteins von kompakt und hydrophil zu verlängert und hydrophob. Für entfaltete Proteinketten ist es im Inneren des Tröpfchens energetisch ungünstig, sodass sie zur Tropfenoberfläche streben, um Lösungsmittelwechselwirkungen mit den hydrophoben Regionen zu minimieren. Ein Kettenende kann dann den Tropfen verlassen und wird in die Dampfphase aus dem Tropfenverband ausgestoßen. Darauf folgen ein sequentielles Ausstoßen des verbleibenden Proteins und eine Trennung vom Tropfen.⁵⁹

2.3 Ionenmobilitäts(IM)-Spektrometrie

Ionentransport in der IM-Spektrometrie

Die Ionenmobilitäts(IM)-Spektrometrie beruht auf den größenabhängigen Wanderungsgeschwindigkeiten von Ionen unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes in einem Gas. In Abwesenheit eines elektrischen Feldes und bei konstanter Temperatur verteilen sich die Ionen im gegebenen Raum aufgrund eines Konzentrationsgradienten $\partial c/\partial x$ statistisch durch die sogenannte Diffusion. Das Erste Fick'sche Gesetz beschreibt hierzu die Bewegung der Ionen im eindimensionalen Raum von hoher zu niedriger Konzentration pro Zeit und Fläche über die Teilchenstromdichte J , die senkrecht zur Diffusionsrichtung über den Diffusionskoeffizienten D liegt (Gleichung 2-29).

$$J = -D \frac{\partial c}{\partial x} \quad 2-29$$

Mit angelegtem homogenem elektrischem Feld E beschleunigen die Ionen, während die Stöße der Ionen mit den neutralen Gasmolekülen diese abbremsen. Es resultiert eine mittlere Geschwindigkeit einer Ionensorte v_D , die abhängig von der Länge der durchlaufenden Strecke, die Driftstrecke l , unterschiedliche Driftzeiten t_D ergibt. Aus dem Verhältnis von Driftgeschwindigkeit v_D und dem elektrischen Feld E ergibt sich wiederum eine Proportionalitätskonstante, die Ionenmobilität K (Gleichung 2-30).

$$v_D = \frac{l}{t_D} = K \cdot E \quad 2-30$$

$$K = \frac{q D}{k_B T} \quad 2-31$$

$$K = \frac{3 q}{16 N} \left(\frac{1}{m_I} + \frac{1}{m_G} \right)^{1/2} \left(\frac{2\pi}{k_B T_{\text{eff}}} \right)^{1/2} \frac{1}{\Omega_D} \quad 2-32$$

Die Bewegung der Ionen im Gas in einem schwachen elektrischen Feld kann mithilfe der Einstein-Smoluchowski-Beziehung ausgedrückt werden (Gleichung 2-31).¹⁴ Die Ionenmobilität wird somit über die Ladung des Ions q , die Boltzmann-Konstante k_B und die Temperatur T mit dem Diffusionskoeffizienten D in Zusammenhang gebracht. Die Beziehung ist sehr allgemein gehalten und vernachlässigt die Ionen-Neutral-Wechselwirkungen, die die Kollision zwischen den neutralen Gasmolekülen und den Ionen betrachtet. Aus diesem Grund wird in der IM Spektrometrie die **Mason-Schamp-Gleichung** verwendet (Gleichung 2-32). N ist dabei die Teilchendichte der neutralen Gasmoleküle, m_I die Masse des Ions, m_G die Masse des Neutalmoleküls des Gases und T_{eff} die effektive Driftgastemperatur. Diese Gleichung berücksichtigt über den so genannten Diffusions- oder Kollisionsquerschnitt Ω_D die Größe des Ions.²⁷ Ω_D approximiert alle möglichen Konformere eines Ions in eine Fläche und quantifiziert so die Möglichkeit für eine Kollision des Ions mit den Gasmolekülen. Ω_D ist demnach abhängig vom verwendeten Gas in der Driftregion. Je kleiner eine Ionensorte bzw. je kleiner die Gasmoleküle sind, desto kleiner Ω_D , desto weniger Stöße mit den neutralen Gasmolekülen finden statt. Dies führt zu einer hohen v_D , wodurch bei einem konstanten E ein hohes K resultiert.

Die Mason-Schamp-Gleichung ist jedoch auf schwache elektrische Felder begrenzt. Bei den hohen elektrischen Feldern gilt die Gleichung nur noch bei gleichzeitiger Erhöhung des Druckes p , bzw. der Gasdichte N , sodass für die Mason-Schamp-Gleichung die Bedingung in Gleichung 2-33 erfüllt sein muss.¹⁰⁴ Der Einfluss der Veränderung von N kann über das Verhältnis der Intensität des Analytenpeaks I_A und der elektrischen Feldstärke in der Driftregion E quantifiziert werden. Trägt man das Verhältnis gegen $1/t_D$ auf, erhält man einen linearen Zusammenhang.¹⁰⁵

$$\frac{E}{N} \ll \left(\frac{m_G}{m_G + m_I} \right)^{1/2} 0.78 \Omega_D \quad 2-33$$

Dann ist K bei gegebenem Druck p und einer konstanten Temperatur T eine stoffspezifische Konstante. Die Abhängigkeit von T und p wird über die reduzierte Ionenmobilität K_0 , über den Normaldruck $p_0 = 101.33 \text{ kPa}$ und über die Temperatur $T_0 = 273.15 \text{ K}$ beschrieben (Gleichung 2-34).

$$K_0 = K \left(\frac{p}{p_0} \cdot \frac{T_0}{T} \right) \quad 2-34$$

Eine Möglichkeit zur vereinfachten Ermittlung von reduzierten Ionenmobilitäten wurde von Eiceman et al. postuliert.¹⁰⁶ Unter der Voraussetzung, dass ein Analyt nur einen Substanzpeak produziert, nicht sensitiv für veränderte Lösungsmittelzusammensetzung und für Verunreinigungen im Gas in der Quellregion ist, kann er als Gerätestandard verwendet werden. Mithilfe der Gleichung 2-35 kann die reduzierte Ionenmobilität einer unbekannt Substanz K_0^{unb} durch experimentelle Ermittlung der Driftzeit des Standards t_D^{Sta} und der unbekannt Substanz t_D^{unb} unter Verwendung einer literaturbekannt reduzierten Ionenmobilität eines Standards K_0^{Sta} ermittelt werden.¹⁰⁷ Als Standard-Referenzen für den positiven Modus bei Atmosphärendruck wurden im Laufe der Zeit verschiedene Stoffe vorgeschlagen: 2,4-di-Methylpyridin (2,4-lutidine),¹⁰⁸ Dimethylmethylphosphonat (DMMP),¹⁰⁶ 2,6-di-*tert*-Butylpyridin (DTBP)¹⁰⁶ und Tetraammoniumhalogenide (TAAH).¹⁰⁹ Die TAAH zeigen gegenüber Temperatur, Feldstärke, den chemischen Bedingungen innerhalb der Röhre wenig Einfluss und haben nur eine geringe Tendenz zur Clusterionenbildung. Sie sind in verschiedenen Kettenlängen ($m/z = 130$ bis 691) erhältlich, nur gering toxisch und leicht kommerziell zugänglich. Alle Mobilitäten der anderen Standards sind nur in einem eingeschränkten Temperaturbereich temperaturunabhängig. Außerhalb dieses Bereiches werden sie jedoch gerne zur Validierung des Temperatureinflusses eingesetzt.¹¹⁰

$$\frac{K_0^{\text{unb}}}{K_0^{\text{Sta}}} = \frac{t_D^{\text{Sta}}}{t_D^{\text{unb}}} \quad 2-35$$

$$K_0^{\text{Sta}} \cdot t_D^{\text{Sta}} = C_i \quad 2-36$$

Um möglichst genaue reduzierte Ionenmobilitäten zu erhalten bzw. um das IM-Spektrometer zu kalibrieren wurde 2010 die Kombination eines Instrumenten- (z.B. TAAH) und eines Mobilitätsstandards (z.B. 2,4-Lutidine) vorgeschlagen. Mithilfe des Instrumentenstandards kann eine Gerätekonstante (C_i , siehe Gl. 2-36) bestimmt werden, die durch den Mobilitätsstandard auf Kontaminationen überprüft werden kann. Gegebenenfalls kann anschließend ein Korrekturfaktor eingeführt werden. Anschließend erfolgt die Ermittlung von K_0 der unbekannt Substanz.¹¹¹

Typen von IM-Spektrometers

In 2015 wurden in einem Review insgesamt acht verschiedene Typen von IM-Spektrometern unterschieden.³⁶ Alle trennen die Gasphasenionen mithilfe eines oder mehrerer elektrischer Feldern, die mit Gleich- und/oder Wechselspannung betrieben werden. Zu ihnen gehören: das T-Wellen (traveling-wave - TWIMS),^{112,113} das Ionenfallen (Trapped IMS - TIMS),¹¹⁴ das Open Loop¹¹⁵ und das transversal Modulations- Ionenmobilitätsspektrometer (TMIMS),¹¹⁶ sowie der differentielle Mobilitätsanalysator (Differential Mobility Analysers - DMA)¹¹⁷ und das Oberton Mobilitätsspektrometer (Overtone Mobility Spectrometers - OMS).¹¹⁸ Die beiden häufigsten Vertreter sind jedoch das Asymmetrische Hochfeld IM-Spektrometer (high field asymmetric - FAIMS)¹¹⁹ und das Driftzeit IM-Spektrometer (DTIMS).¹²⁰

FAIMS wird auch DMS (Differential Mobility Spectrometer) genannt und gehört zu den Spektrometern mit einem nicht linearen Ionentransport. Ionen werden demnach über ihre Ionenmobilität bei hoher elektrischer Feldstärke ($E > 10,000$ V/cm) und bei niedriger getrennt. Dazu wird zu einem elektrischen Feld mit Gleichspannung zusätzlich ein starkes asymmetrisches Wechselfeld mit einer Radiofrequenz angelegt. Das Wechselfeld ruft eine Ablenkung der Ionen orthogonal zum Ionenpfad vor und nur eine Ionensorte kann bei einer definierten Wechselspannung am Ende der Driftregion detektiert werden. In Abhängigkeit von der Spannung des Wechselfeldes können so die Ionen in einem Diagramm aufgetragen werden.¹¹⁹ In dieser Arbeit wurde jedoch nur das DTIMS verwendet. Dies wird im folgenden Kapitel ausführlich erläutert.

Driftzeit IM Spektrometer (DTIMS)

Ein Driftzeit IM Spektrometer (DTIMS) besteht aus einer Reihe von Stapelringelektroden, bei denen ein möglichst gleichförmiges elektrisches Feld entlang der Achse des Driftröhres erzeugt wird. Die Stapelelektroden sind von Isolatoren getrennt und über Widerstände (M Ω) verbrückt, sodass ein Potentialgradient von Ionisations- zur Detektionsregion erzeugt wird. Das DTIMS wurde ursprünglich für die Detektion von gasförmigen Proben entwickelt und wird daher in Ionisations-, Drift- und Detektionsregion unterteilt. Bei flüssigen Proben wird zur Entfernung des Lösungsmittels häufig eine hochtemperierte Desolvatationsregion ($T = 150^{\circ}$ - 220° C) zwischen Ionisations- und Driftregion in den Aufbau eingefügt (siehe Abb. 2.3-1).¹²¹ An einem Ende des DTIMS wird auf Höhe des Detektors ein inertes Gas (meist Stickstoff, Helium oder Argon) - das so genannte Driftgas - eingesetzt.

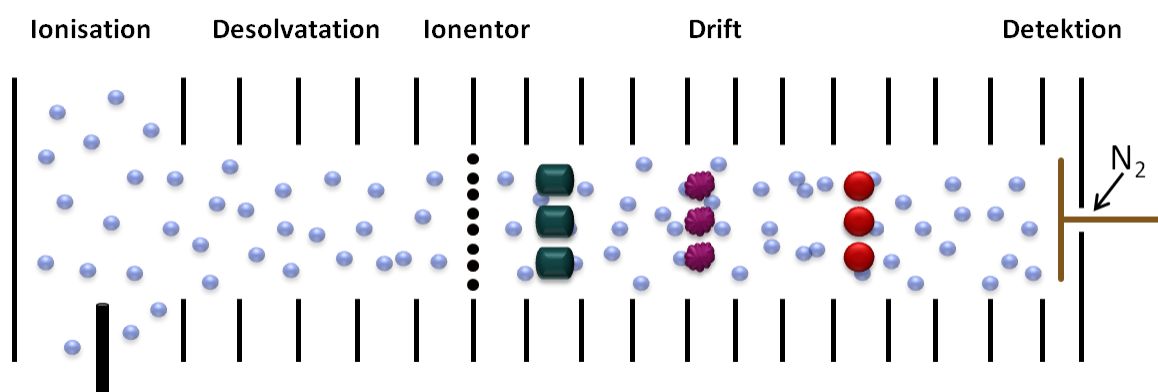


Abb. 2.3-1 - Schematischer Aufbau eines ESI-Ionenmobilitätsspektrometers mit direkter Probenzufuhr, unidirektionalem Strömungssystem und orthogonal ausgerichteter ESI-Quelle in der Ionisationsregion

Die Probenzufuhr kann mit unidirektionalem oder indirekt mit bidirektionalem Strömungssystem stattfinden.¹²⁰ In einem unidirektionalen Strömungssystem wird die Probe direkt in die Ionisationsregion entgegen der Driftgasrichtung eingeleitet. Nicht ionisierte Bestandteile in der Probe werden schnell durch das Driftgas aus dem Gerät geleitet. In dem bidirektionalen Strömungssystem hingegen wird die Probe in einem Trägergas an einem Ende des Driftröhres eingeführt und in die Ionisationsregion befördert. Nach Reaktionen zwischen Probenneutralen und einem Reservoir von Ionen, die als Reaktant-Ionen bezeichnet werden, bewegen sich die gebildeten Analytionen in Richtung Detektor. Die Ionen werden demnach bei beiden Arten der Probenzufuhr in der Ionisationsregion erzeugt. Die verschiedenen Ionisationsarten und -quellen wurden bereits in Kapitel 2.1 näher erläutert.

Das bidirektionale Strömungssystem findet sich häufig in Analysatoren, die mit Membraneinlässen ausgestattet sind. Sie können als Handgeräte gebaut und für die Vor-Ort-Analytik verwendet werden.¹²² Die Membran wird eingesetzt, um den Eintrag von Feuchtigkeit in der Driftröhre gering zu halten. Die schwache Durchlässigkeit gasförmiger Moleküle durch die Membran (Permeation) vermindert dabei jedoch die Nachweisempfindlichkeiten.¹²³ Der Permeabilitätskoeffizient P_r kann über die Partialdrücke des Probenraums hinter der Membran p_{int} und vor der Membran p_{ext} , den atmosphärischen Druck p , die Dicke d_{Mem} und die Querschnittsfläche A_{Mem} der Membran, sowie mit der Trägergasströmungsrate innerhalb der Membran F_{gas} berechnet werden.⁸

$$p_{\text{int}} = \frac{A_{\text{Mem}} P_r p p_{\text{ext}}}{F_{\text{gas}} d_{\text{Mem}} + P_r A_{\text{Mem}} p} \quad 2-37$$

Bei einem unidirektionalen Strömungssystem ist der Eingang des IM-Spektrometers meist offen oder nur durch ein hochtransparentes Netz elektrisch von der Ionisationsregion abgeschirmt. Die Transparenz des Einlassnetzes ist eine Funktion aus dem Quotienten der elektrischen Feldstärke vor dem Netz E_1 und nach dem Netz E_2 .¹²⁴ Nähert sich der Quotient E_2/E_1 der Zahl 1 an, wird die maximale Transparenz des Netzes erreicht. Im Beispiel einer ESI-Quelle in der Ionisationsregion ist das Verhältnis E_2/E_1 jedoch klein und es kommt zu erheblichen Ionenverlusten am Einlassnetz. Ohne Einlassnetz hingegen würde die hohe Spannung der Ionisationsregion die Homogenität des elektrischen Feldes in der Desolvationsregion stören. Dies kann eine Ablenkung der Ionen orthogonal zum Ionenpfad verursachen und somit auch zu Ionenverlusten führen.

Die Bildung der Ionen ist je nach Ionisationsmethode ein turbulenter Prozess, bei dem die gebildeten Ionen eine relativ breite räumliche Verteilung aufweisen. Eine geringe Startverteilung der Ionen ist jedoch eine Voraussetzung für eine hohe Auflösung der Peaks im IM-Spektrum. Daneben gibt es Ionenquellen, die kontinuierlich Ionen produzieren (z.B. ESI) und welche, die nur gepulst Ionen generieren (z.B. bei einer laserbasierte Ionisation) können. Bei den kontinuierlichen Quellen gibt es keinen Startpunkt, welcher als Start der Aufnahme eines IM-Spektrums genutzt werden kann. Aus diesen Gründen werden die Desolvations- und Driftregion durch ein so genanntes **Ionentor** getrennt. Ein Ionentor ist ein elektrisch geschaltetes Gitter, welches vorwiegend in zwei unterschiedlichen Designs in der IM-Spektrometrie eingesetzt wird (Abb. 2.3-2). Beim **Bradbury-Nielsen-Design** werden dünne ($d \approx 50 \mu\text{m}$) parallel angeordnete Drähte in einer Ebene senkrecht zum Ionenpfad in die Mitte einer Stapelringelegrode eingebracht. Besitzen zwei benachbarte Drähte das gleiche Potential wie die umliegende Stapelringelegrode, können die Ionen passieren. Haben die benachbarten Drähte jedoch ein leicht unterschiedliches Potential zur Stapelringelegrode (Abb. 2.3-2 - links, z.B. $U_{\text{rot}} = +50 \text{ V}$, $U_{\text{grün}}$

= - 50 V) werden die Ionen durch die Querspannung seitlich ablenkt und entladen sich an den Drähten oder an den umliegenden Elektrodeninnenseiten. Sie erreichen demnach nicht den Detektor und man kann von einem geschlossenem Ionentor sprechen.¹²⁵ Das **Tyndall-Powell-Design** besteht aus zwei oder drei Ebenen von parallelen Drähten oder Gittern, die im Ionenpfad räumlich versetzt zueinander angeordnet sind (Abb. 2.3-2 - rechts). Besitzen die Ebenen einen kontinuierlichen Potentialabfall im Verlauf des Ionenpfades ist das Ionentor offen. Ist ein Ebenenpotential höher als das vorherige oder niedriger als das im Ionenpfad folgende Potential, gilt das Ionentor als geschlossen. Bei einem zwei Ebenen Design wird das Potential, der im Ionenverlauf ersten Ebene verändert. Beim drei Ebenen Design wird das mittlere Potential variiert. Ist der Potentialunterschied zwischen zwei Ebenen groß genug, können die Ionen die Potentialbarriere nicht überschreiten und entladen sich, das Ionentor ist geschlossen. Die dritte Ebene beim Tyndall-Powell-Design sorgt für einen schärferen elektrischen Feldgradienten, da Desolvatationsregion und Driftregion von der elektrisch geschalteten Ebene abgeschirmt sind.¹²⁶ In beiden Designs kann ein externer Puls (z.B. über ein Signalfrequenzgenerator) zwischen den geschlossen und offen Ionentorpotentialen hin- und herschalten. Beide Designs werden noch heute verwendet.^{127,128}

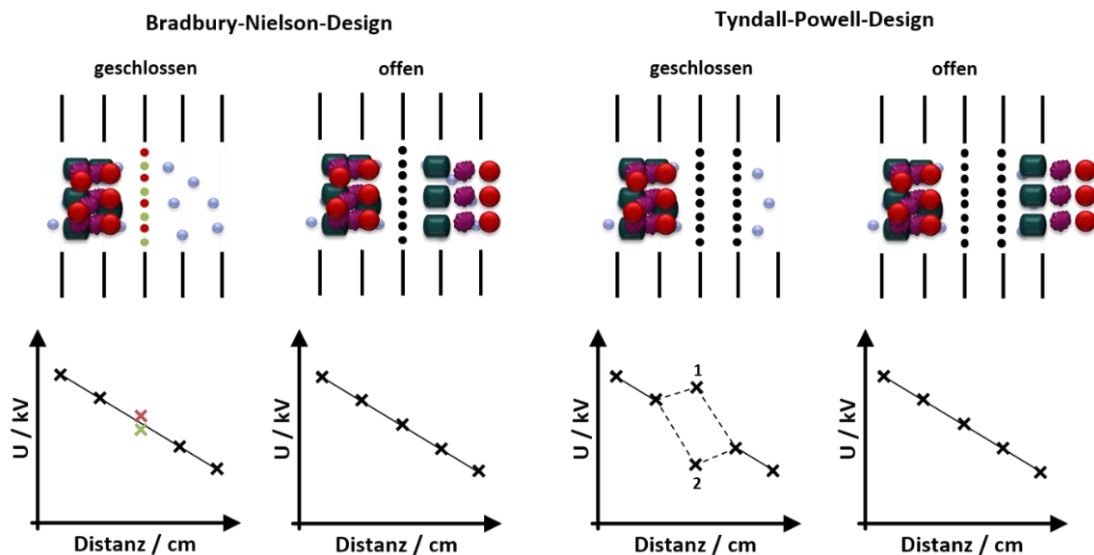


Abb. 2.3-2 - Schematische Darstellung der zwei gängigsten Designs von Ionentoren in der IM-Spektrometrie (oben)^{125,126} mit passendem Schema für die elektrische Schaltung im offenen und geschlossenen Zustand, beim Tyndall-Powell-Design sind zwei Schaltungen für den geschlossenen Zustand bekannt, sie sind mit 1 und 2 im Schema gekennzeichnet

Die Trennung der Ionen nach ihrer Mobilität findet in der **Driftregion** statt. Die Ionen durchlaufen demnach das homogene elektrische Feld und werden wie in 0 beschrieben getrennt. Um Ionen-Molekül-Reaktionen so gering wie möglich zu halten, wird die Region mit einem inerten, sauberen und trockenen Gas gespült. Durch die Kollisionsinteraktion der Ionen gelangen diese zeitversetzt am Faraday-Detektor an und induzieren dort Ströme im Bereich von weniger pA bis nA. Über einen Verstärker wird das Stromsignal vervielfacht und mittels eines Oszilloskops oder eines Analog-Digitalwandlers in Form eines IM-Spektrum als Intensität I [nA] zur Driftzeit t_D [ms] dargestellt. Kurz vor dem Detektor ist meist ein Abschirm- oder Aperturgitter zur elektrischen Abschirmung angeordnet. Ohne die elektrische Abschirmung würden nicht nur die auftreffenden Ionenladungen registriert werden, sondern auch die herannahenden Ionen würde man detektieren.¹²⁹ Dies würde zu einer erheblichen Signalverbreiterung im IM-Spektrum führen.

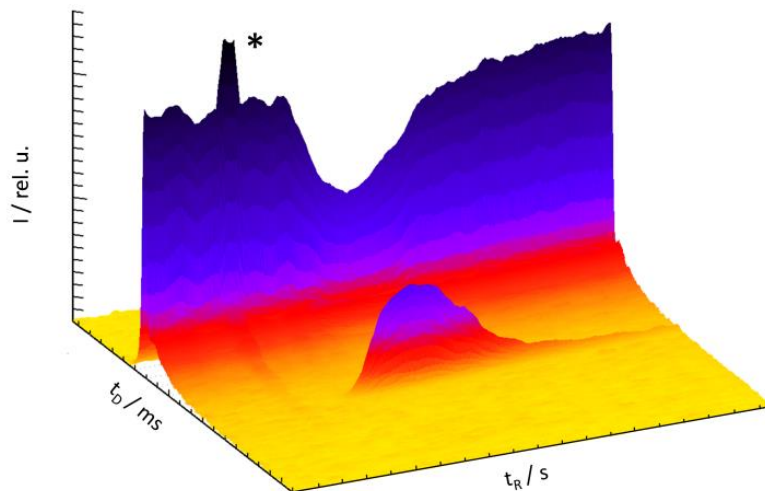
3 Verwendete Publikationen

Diese kumulative Doktorarbeit umfasst insgesamt fünf wissenschaftliche Publikationen. Jede Publikation wird in den folgenden Unterkapiteln (3.1 bis 3.5) jeweils auf der ersten Seite kurz vorgestellt und der Eigenanteil des Autors dargelegt, anschließend folgt die originale Publikation.

3.1 Das ESI IM-Spektrometer als HPLC-Detektor

“An electrospray ionization-ion mobility spectrometer as detector for HPLC”

Zühlke, M.; Riebe, D.; Beitz, T.; Löhmannsröben, H.-G.; Zenichowski, K.; Diener, M.; Linscheid, M. *Eur. J. Mass Spectrom.* **2015**, *21* (3), 391-402



Die Publikation beinhaltet folgende Kapitel:

In dieser Publikation wird die Charakterisierung des ESI-Sprays einer neuartigen ESI-Quellregion mithilfe von Streulichtmessungen vorgestellt. Außerdem wurde die Eignung des stand-alone ESI IM-Spektrometers in Umgang mit verschiedenen HPLC-Parametern (Flussraten, Salzeinfluss, etc.) überprüft und schließlich dessen Anwendung als HPLC-Detektor anhand gering komplexer Mischungen getestet.

Beitrag des Autors zur Publikation:

Auf der Grundlage eines an der Universität Potsdam entwickelten modularen ESI IM-Spektrometers und der elektrischen Schaltung für das Bradbury-Nielsen-Ionentor von der Humboldt Universität zu Berlin wurde durch die Firma KNAUER Wissenschaftliche Geräte GmbH das verwendete ESI IM-Spektrometer konstruiert und angefertigt. Der Aufbau des Spektrometers und der Streulichtmessungen an der Universität Potsdam von mir realisiert. Alle in der Publikation verwendeten Streulichtaufnahmen und IM-Spektren, sowie deren Auswertung, führte ich ebenso durch. Fernerhin war ich an der Diskussion zu den Ergebnissen beteiligt, bereitete nahezu alle Bilder für den wissenschaftlichen Artikel vor. Der Schreibprozess fand in enger Zusammenarbeit mit den Koautoren statt.

Manuscript of

M. Zühlke et al., *Eur. J. Mass Spectrom.* **2015**, 21 (3), 391–402

Received: 19 May 2015 • Revised: 26 June 2015 • Accepted: 27 June 2015 • Publication: 15 July 2015

Special Issue Celebrating the 20th Anniversary of EJMS—European Journal of Mass Spectrometry

An electrospray ionization-ion mobility spectrometer as detector for HPLC

Martin Zühlke¹, Daniel Riebe¹, Toralf Beitz¹, Hans-Gerd Löhmannsröben¹, Karl Zenichowski², Marc Diener², Michael W. Linscheid³

1 University of Potsdam, Physical Chemistry, Karl-Liebknecht-Str. 24-25, 14476 Potsdam

2 KNAUER Wissenschaftliche Geräte GmbH, Hegauer Weg 38, 14163 Berlin

3 Humboldt University, Department of Chemistry, Brook-Taylor-Str. 2, 12489 Berlin-Adlershof

Abstract

The application of electrospray ionization (ESI) ion mobility (IM) spectrometry on the detection end of HPLC has been a subject of study for some time. So far, this method has been limited to low flow rates or required splitting of the liquid flow. This work presents a novel concept of an ESI source facilitating stable operation of the spectrometer at flow rates between 10-1500 $\mu\text{l}/\text{min}$ without flow splitting, advancing the T-cylinder design developed by Kurnin *et al.* Flow rates eight times higher than previously reported are achieved due to more efficient dispersion of the liquid at increased electrospray voltages combined with nebulization by a sheath gas. Imaging revealed spray operation in a rotationally symmetric multijet mode. The novel ESI IM spectrometer tolerates high water contents ($\leq 90\%$) and electrolyte concentrations up to 10 mM, meeting another condition required of HPLC detectors. Limits of detection of 50 nM for promazine in the positive mode and 1 μM for 1,3-dinitrobenzene in the negative mode were established. Three mixtures of reduced complexity (5 surfactants, 4 neuroleptics, 2 isomers) were separated in the millisecond regime in stand-alone operation of the spectrometer. Separations of two more complex mixtures (5 neuroleptics, 13 pesticides) demonstrate the application of the spectrometer as an HPLC detector. The examples illustrate the advantages of the spectrometer over the established diode array detector, in terms of additional ion mobility separation of substances not fully separated in the retention time domain as well as identification of substances based on their characteristic IMs.

Keywords

ESI, IMS, HPLC, Spray Imaging, neuroleptics, pesticides, surfactants

Introduction

Detectors often employed in high performance liquid chromatography (HPLC) are based on UV absorption, fluorescence emission and electrochemical transformation of analytes. For a sensitive determination, there have to exist specific groups, e.g. chromophores, within the analyte molecules. Widely applicable detectors, such as refractive index detectors, on the other hand, are generally rather insensitive. Therefore, in recent decades, novel and broad range detectors like the evaporative light scattering detector (ELSD)¹ or the corona charged aerosol detector (CAD)² have been introduced to the market. A further class of instruments are atmospheric pressure ionization (API) mass spectrometers. These can be used to investigate a broad range of substances by the simple exchange of ionization sources. The ionization sources primarily used are electrospray ionization (ESI) and chemical ionization at atmospheric pressure (APCI). However, there is a plenitude of further API sources and the development of novel techniques is a rapidly expanding field. Examples of these methods are direct analysis in real time (DART), atmospheric pressure photo ionization (APPI) and atmospheric pressure laser ionization (APLI). The advantage of API mass spectrometry is the reliable identification of substances, the drawback is the high cost of the instrumentation.

A possible compromise could be presented by ion mobility (IM) spectrometry. IM spectrometry is a well-established technique for the detection of gaseous substances and compounds at surfaces that are readily transferred into the gas phase by thermodesorption. Typical investigated compounds include explosives, drugs and industrial chemicals.^{3,4} However, polar, nonvolatile substances in liquids cannot directly be investigated by currently available commercial IM spectrometers. These compounds are preferably ionized by ESI which was introduced into IM spectrometry by the Hill group.^{5,6} With the increasing interest in studying biological systems, techniques combining IM and mass spectrometry that incorporate ESI sources were developed by several groups.⁷⁻¹⁰

The Hill group also was the first to demonstrate the application of an ESI-IM spectrometer as an HPLC detector.^{11,12} The Clemmer group could demonstrate the analysis of complex biomolecular mixtures, such as tryptic digests of protein mixtures¹³ and complex peptide mixtures,¹⁴ by HPLC-ESI-IM mass spectrometry. However, these studies were either limited to solvent flow rates below 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ in combination with microbore columns or required LC flow-splitting. In all of these experiments, the alignment of the ESI needle was axial to the drift tube. Higher flow rates introduce large quantities of solvent into the drift tube, resulting in solvated ions and/or large solvent cluster ions as well as charged nano- and microdroplets. These charged particles lead to an increased background noise and can cause statistically distributed ghost peaks.

Two attempts to increase the solvent flow rate were reported by the Eiceman group¹⁵ and Kurnin *et al.*¹⁶ The Eiceman group was able to perform HPLC separation of chlorophenols on a C18 column at flow rates up to 500 $\mu\text{l}/\text{min}$ and a water content of up to 80 %. In these experiments, the ESI source was aligned axial in the spectrometer axis. The authors designed a novel interface for the removal of solvents and worked at challenging instrument parameters. The work of Kurnin *et al.*¹⁶ presented a promising approach based on an additional ionization tube (T-cylinder) orthogonal to the spectrometer axis. The ESI was performed in this tube. The authors report stable operation at flow rates up to 200 $\mu\text{l}/\text{min}$. However, no characterization of the spray in the novel capillary cylinder electrode geometry was reported, and neither systematic investigations of important properties of the ESI

source applied to HPLC IM spectrometry, such as limits of detection (LOD), water and buffer tolerance, nor applications are discussed in the paper.

In this work, an ESI IM spectrometer based on the ESI source design of Kurnin *et al.*¹⁶ was developed that can be employed as an HPLC detector in the interesting range of solvent flow rates from 200 $\mu\text{l}/\text{min}$ up to 1.5 ml/min . In the first part of the manuscript, the ESI source is examined in detail on the basis of imaging of the spray. Further emphasis of the investigation lies on the evaluation of crucial prerequisites for the utilization of the instrument as an HPLC detector, including the determination of LOD as well as an assessment of the tolerance against significantly increased flow rate, water content and salt concentration. In the last part of the manuscript, the ESI IM spectrometer is characterized as a stand-alone device by means of direct injection and subsequent IM separation of three mixtures of reduced complexity. Finally, two applications of the instrument as an HPLC detector are presented in the form of separations of mixtures of pesticides and neuroleptics.

Experimental

A home-built ESI-IM spectrometer (Fig. 1) was employed as a stand-alone device and as an HPLC detector. This spectrometer consists of an ionization source, two different drift tubes separated by an ion gate (Bradbury-Nielsen design), and the Faraday detector.

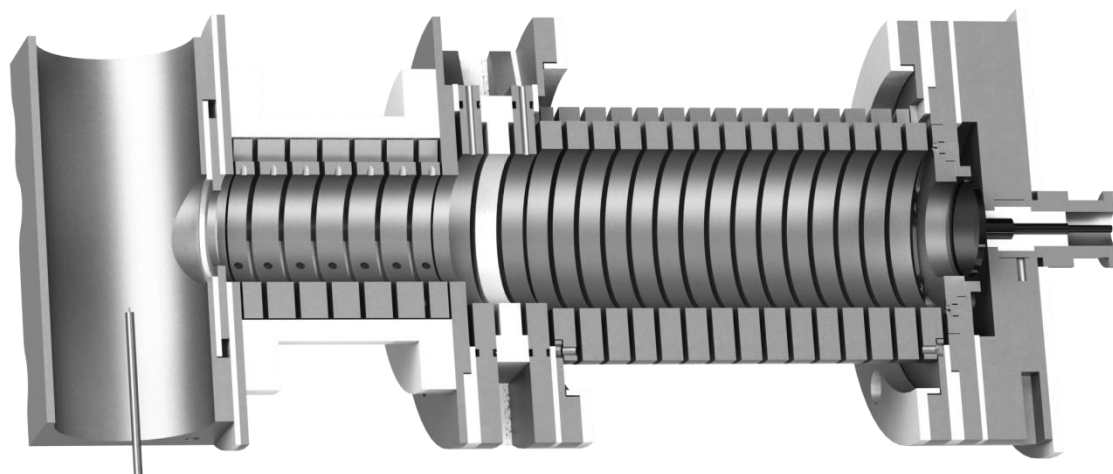


Fig. 1 Cutaway representation of the home-built ESI IM spectrometer showing the ionization tube with ESI capillary on the left, followed by two drift tubes separated by a Bradbury-Nielsen ion gate and the Faraday detector on the right

The drift tubes are both constructed from ceramic tubes that contain metal ring electrodes separated by ceramic spacers and connected by resistors. While the first, shorter drift tube with a length of 52 mm is for the desolvation of the ions (stainless steel electrodes: 34 mm outer diameter (OD), 20 mm inner diameter (ID), 5 mm thickness (h), 6 mm thickness of repeating unit (consisting of electrode and isolator ring)), the ion pulses formed by the ion gate are separated in the 90 mm long drift tube (stainless steel electrodes: OD = 50 mm, ID = 30 mm, h = 4 mm, repeating unit: h = 5 mm). Desolvation and drift tubes were kept at temperatures of 160 °C and 150 °C, respectively. The ion gate consists of two sets of parallel wires with a thickness of 75 μm and a spacing of 650 μm . The wires are tensioned

by a spring construction. The ions are detected at a Faraday plate with a diameter of 20 mm. The resulting current is amplified by a $5 \cdot 10^8$ V/A amplifier (FEMTO LCA-10K-500M) and fed to an oscilloscope (Handyscope HS3, Tiepie). Analysis of the 3D data (retention time t_R and drift time t_D during HPLC-IM spectrometry measurements) is carried out with a version of the mass spectrometry software OpenMS¹⁷ adapted to IM spectrometry.

The ESI capillary is aligned orthogonally to the drift tube. The design of the ESI source is based on the T-cylinder design of Kurnin *et al.*¹⁶ mentioned above. The main element is a 30 mm ID aluminum cylinder placed orthogonally to the spectrometer axis. In the center of the 70 mm long cylinder is a circular aperture with a diameter of 20 mm. This aperture constitutes the inlet to the desolvation tube of the IM spectrometer. In contrast to the original design, the entrance electrode is a 50 μm thick steel mesh instead of an inlet diaphragm. The ESI capillary is placed on the central axis of the cylinder which constitutes the ESI counter electrode. The voltage applied to the ESI capillary is described by U_{ESI} , whereas the voltage difference between ESI capillary and counter electrode is described by ΔU_{ESI} . The latter is more informative for the description of the electrospray mode. The ESI source consists of the actual ESI capillary (Hamilton, gauge 32, ID = 110 μm , OD = 230 μm) inserted into a 1/16" steel capillary used to supply a sheath gas flow. The aluminum cylinder can be heated individually. In total, the spectrometer features four heating zones (spray cylinder, desolvation tube, drift tube, drift gas). The sheath gas is operated at a flow of 850 ml/min, except where noted otherwise, and the drift gas flow is 1.3 l/min. An additional desolvation gas flow was not used.

A simplified ionization region (Fig. 2) was developed for the optical imaging of the spray. The setup incorporates a 100 μm thick steel mesh sheet (90 % optical transparency) rolled into a cylinder (ID = 30 mm). The spray is illuminated with a white light source and imaged orthogonally to the light direction and spectrometer axis by means of a CCD camera (objective: AF-S DX NIKKOR 55-200, Nikon).

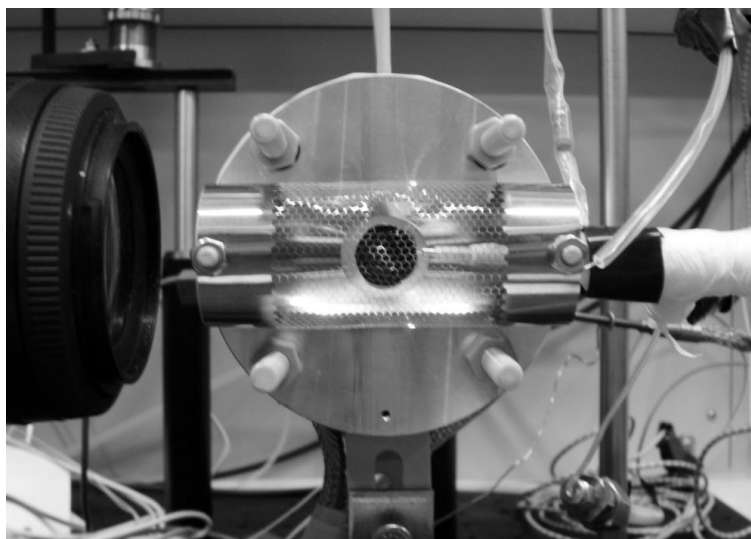
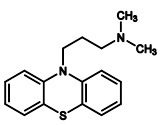
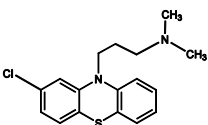
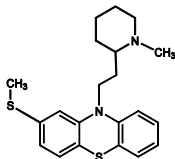
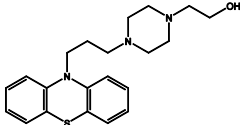
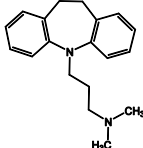
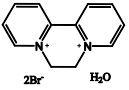
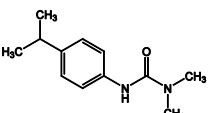
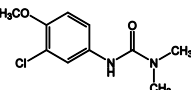
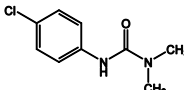
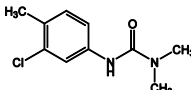
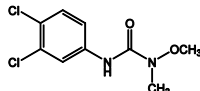
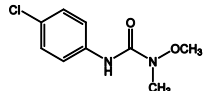
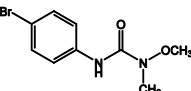
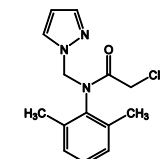
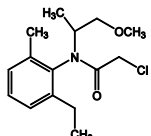
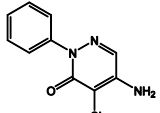
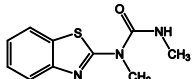
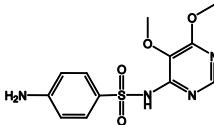
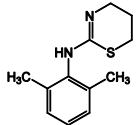
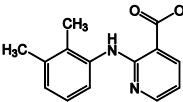
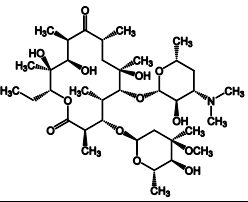
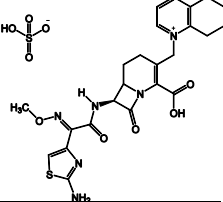
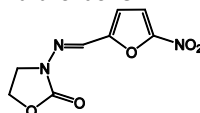
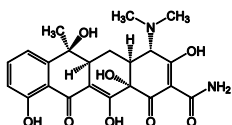


Fig. 2 Photograph of the simplified ionization source used for optical imaging of the electrospray

The HPLC setup consists of an HPLC pump (Azura P 6.1L, KNAUER), an injection valve (Knauer) and an RP column (Hypersil Gold, Thermo, 150 x 2.1 mm, 3 μm). Nitrogen 5.0 (Air Liquide) was used as sheath and drift gas. All substances were acquired from Sigma Aldrich. The main substance classes investigated were neuroleptics, pesticides and surfactants. The compounds of 12 pesticides, five neuroleptics and seven further pharmaceuticals are shown in table 1. The surfactants investigated are

six tetraalkylammonium bromides ($N(C_nH_{2n+1})_4Br$): tetraethylammonium bromide (TEAB, $N(C_2H_5)_4Br$), tetrabutylammonium bromide (TBAB, $N(C_4H_9)_4Br$), tetrahexylammonium bromide (THAB, $N(C_6H_{13})_4Br$), tetraoctylammonium bromide (TOAB, $N(C_8H_{17})_4Br$), tetradecylammonium bromide (TDAB, $N(C_{10}H_{21})_4Br$) and dodecylethyltrimethylammonium bromide (DEDMA, $N(CH_3)_2(C_2H_5)(C_{12}H_{25})Br$). 1,3-Dinitrobenzene (1,3-DNB) and amino acids arginine and tryptophane were investigated as well.

Tab. 1 Overview to chemicals used in this work

neuroleptics				
Promazine	Chlorpromazine	Thioridazine	Perphenazine	Imipramine
				
pesticides				
Diquat dibromide monohydrat	Isoproturon	Metoxuron	Monuron	Chlortoluron
				
Linuron	Monolinuron	Metobromuron	Metazachlor	Metolachlor
				
Chloridazon	Methabenzthiazuron			
				
pharmaceuticals				
Sulfadoxine	Xylazine	Flunixin	Erythromcin	Cefquinome sulfate
				
Furazolidone	Tetracycline			
				

Results

The ionization source utilized in the ESI-IM spectrometer is based on a T-cylinder design in which the inner surface of the ionization cylinder is the counter electrode of the ESI capillary (Fig. 1). The underlying principle is the separation of solvated ions and charged nanodroplets from microdroplets that do not contribute to the ion signal due to incomplete evaporation based on a combination of hydrodynamic and electrostatic forces. Large microdroplets are transported out of the ionization cylinder due to the sheath gas flow, while ions and charged nanodroplets are diverted orthogonally into the spectrometer by an electric field. The introduction of solvent into the drift tube and the detection of incompletely evaporated, charged droplets and solvent cluster ions are thus greatly reduced.

Characterization of the ESI source. One possible way of elucidating the ESI process in the T-cylinder source is the visualization of the spray. However, since optical access to the electrospray in the source is limited, a transparent steel mesh sheet shaped into a cylinder was developed as an optically accessible variant of the source region (Fig. 2). This setup allowed images of the spray with the camera facing directly towards the ESI capillary as well as from the side. Additionally, the total ion current (TIC) could be measured at the same time. During the TIC measurements, the ion gate is kept open.

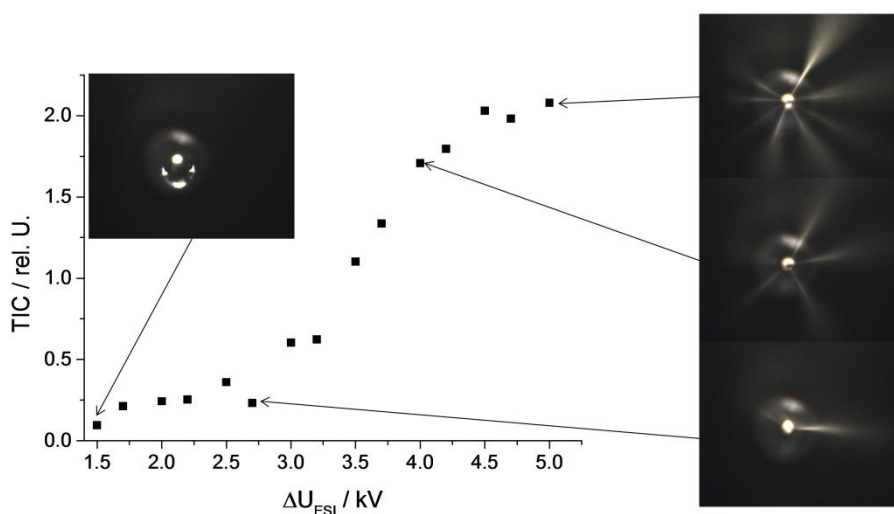


Fig. 3 Total ion current (TIC) in dependence of ESI voltage ΔU_{ESI} (solvent: methanol/water mixture (8:2), flow rate 10 $\mu\text{l}/\text{min}$) and images of the spray with the camera facing towards the capillary

Figure 3 shows the increase of the TIC with the ESI voltage. It can be seen that the low TIC at $\Delta U_{\text{ESI}} = 1.5 \text{ kV}$ results from the release of small charged droplets in the dripping mode. However, this process is relatively inefficient in terms of ion release. With increasing ESI voltage a transition to the multijet mode is observed at $\Delta U_{\text{ESI}} = 3.0 \text{ kV}$. The cone jet mode used in mass spectrometry is not observed. This is presumably due to the electrode geometry. Further increase of the ESI voltage results in a strong increase of the TIC combined with additional forking of the jets. The high symmetry of the spray at high ESI voltages, resulting from the rotationally symmetric cylinder geometry, is also visible in Fig. 3.

It is interesting to compare the ESI parameters used by Kurnin *et al.*¹⁶ with these findings. The authors worked at voltages ΔU_{ESI} between 2-3 kV. Therefore, it is very likely that the results of Kurnin *et al.*¹⁶ were obtained with a spray below the multijet threshold (Fig. 3). Only by using voltages from 3.5-5 kV combined with efficient nebulization of the liquid by the sheath gas, stable operation at flow rates up to 1.5 ml/min, representing a strong increase over the flow rates reported by Kurnin *et al.*¹⁶, could be achieved in this work.

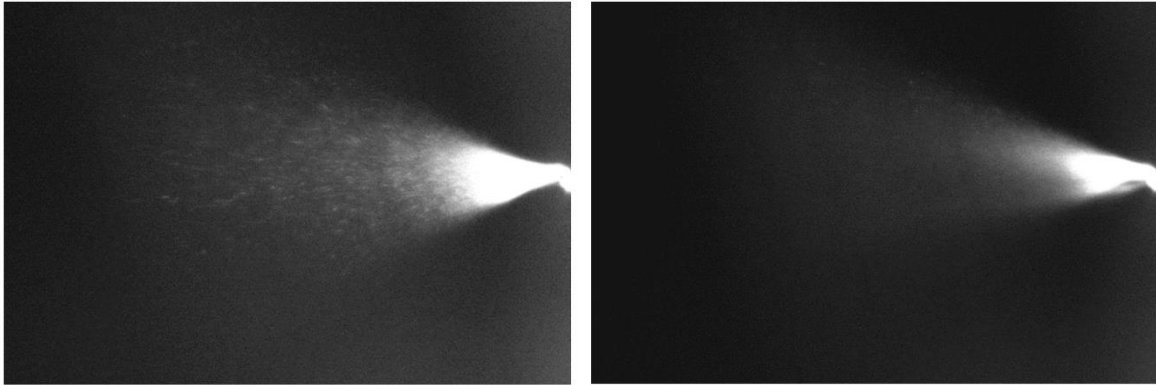


Fig. 4 Images of the spray from the side (flow rate of the liquid 500 $\mu\text{l}/\text{min}$, flow rate of the sheath gas 800 ml/min) at two ESI voltages (left: 3 kV and right: 5 kV)

An example of the influence of the increased ESI voltage on the spray is shown in figure 4. The more efficient nebulization of the spray at a flow rate of 500 $\mu\text{l}/\text{min}$ with increasing ESI voltage is clearly visible. While larger, isolated droplet aggregates can be observed in the spray cone at $\Delta U_{\text{ESI}} = 3$ kV (left image), they are not present in the spray cone at $\Delta U_{\text{ESI}} = 5$ kV. Generally, the spray cone in the light scattering image is significantly finer and more homogeneous at 5 kV.

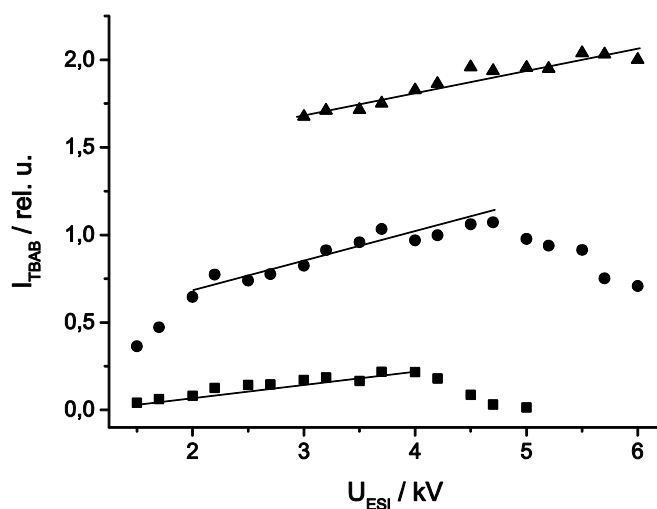


Fig. 5 Intensity of the TBAB ion signal with increasing ESI voltage at different flow rates of 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ (squares), 100 $\mu\text{l}/\text{min}$ (circles) and 300 $\mu\text{l}/\text{min}$ (triangles) and a constant sheath gas flow rate of 800 ml/min. The lines represent a fit to the linear part of the plots

The considerably increased voltages applied to the ESI source can result in the formation of corona discharges which will be discussed in the following paragraph. The onset of corona discharge manifests

itself as a pronounced increase in the TIC accompanied by a faint blue glow. The following dependence of the analyte signal on the ESI voltage was found (Fig. 5). At a flow rate of 10 $\mu\text{l}/\text{min}$, the analyte ion signal (20 μM TBAB) increases nearly linearly with the ESI voltage. Slightly above the onset voltage for the corona discharge, the analyte ion signal collapses. This behavior is characteristic of the appearance of corona discharges in ESI as well. An increase of the solvent flow rate leads to an increased onset voltage of the corona discharge. At a flow rate of 100 $\mu\text{l}/\text{min}$, the voltage above which a drop of the analyte ion signal is observed, is already increased to a value of 4.8 kV (Fig. 5). A further increase of the flow rate to 300 $\mu\text{l}/\text{min}$ results in a continuous linear increase of the signal intensity up to 5.5 kV. A collapse of the analyte ion signal is not observed up to 6 kV at this flow rate.

The flow rate dependence of the corona discharge onset voltage, obtained by the criteria described above, was investigated (Fig. 6). The shift of the onset towards increasing voltages with increasing flow rate is clearly visible. Above a flow rate of 300 $\mu\text{l}/\text{min}$, the onset is at the upper limit of the voltage range typically used in this work (3.5-5 kV). However, ESI voltages at the lower end of this range proved optimal in the HPLC separations described below. Higher voltages were only required at flow rates above 500 $\mu\text{l}/\text{min}$.

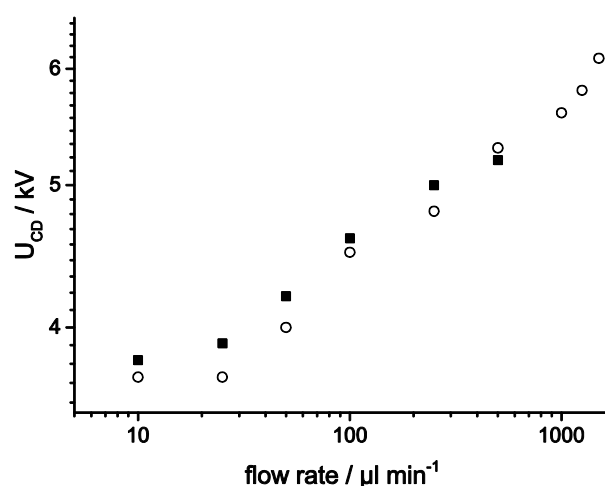


Fig. 6 Onset voltage of the corona discharge U_{CD} in dependence of the flow rate of an 8:2 methanol/water mixture with (circles) and without (squares) sheath gas of 800 ml/min

In the voltage range below the onset of the corona discharge, the intensity of the analyte ion signal increases almost linearly with the ESI voltage (Fig. 5). At high ΔU_{ESI} , the ion signal of both TBAB and arginine increases linearly with the flow rate up to a value of 150-200 $\mu\text{l}/\text{min}$ (Fig. 7). Above a flow rate of 200 $\mu\text{l}/\text{min}$, a broad plateau of the signal intensity is reached. The intensity decreases above 2000 $\mu\text{l}/\text{min}$. This behavior correlates with the images of the spray shown in figure 7. Above a flow rate of 200 $\mu\text{l}/\text{min}$, the dispersion of the solvent visibly deteriorates (higher intensity of scattered light) in the center of the spray cone. This part of the spray does not contribute to the release of ions anymore.

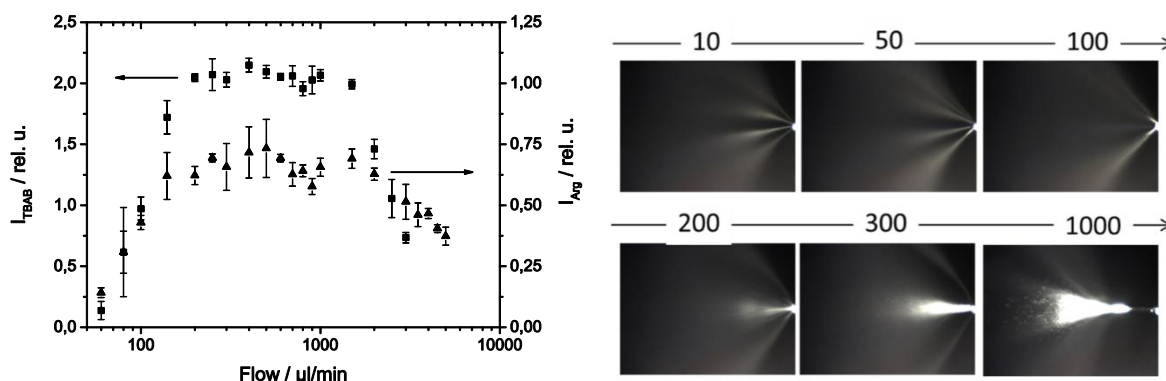


Fig. 7 a) Intensity of the ion signals of TBAB (squares) and arginine (triangles) in 8:2 acetonitrile/water with 0.1 % formic acid in dependence of the flow rate of the solvent, b) spray images (side view) at different flow rates in $\mu\text{l}/\text{min}$ (sheath gas flow 850 ml/min, $\Delta U_{\text{ESI}} = 4.2 \text{ kV}$)

The signal increase up to a flow rate of 150-200 $\mu\text{l}/\text{min}$ was not observed in the cone jet mode in an axial ESI capillary jet arrangement (only up to 10 $\mu\text{l}/\text{min}$).²¹ The signal increase up to 15-20-fold higher flow rates found in the present work could be due to the increased number of jets in the multijet spray (that transform into a uniform distribution along a conical surface at higher flow rates). The ionization efficiency in the cone jet mode customarily used in mass spectrometry decreases with increasing flow rate, evidenced by the fact that the highest ESI efficiencies are achieved at low flow rates in nanoESI.¹⁸ Therefore, the formation of multiple jets presents a possibility of efficiently releasing ions at high flow rates. The increased number of jets in combination with an improved nebulization of the droplets at higher ESI voltages facilitates the transfer of ions from the liquid to the gas phase and explains the increase of the signal intensity with the ESI voltage and the flow rate.

The gas velocity of the sheath gas was under the threshold to supersonic speed. In view of the increased gas consumption, increasing the gas flow into the supersonic range is not necessary in the source design and application scope described in this work. However, working at supersonic sheath gas rates can potentially further increase the tolerance of high flow rates and improve the release of ions and therefore sensitivity due to the more efficient dispersion of the liquid.^{19,20}

The investigations show that ESI in the T-cylinder source is composed of three parallel subprocesses: 1) the discharge of droplets and ions on the wall of the ionization cylinder (counter electrode), 2) the removal of large, lowly charged droplets by the sheath gas and 3) the orthogonal extraction of small nanodroplets as well as ions already released in the source cylinder into the spectrometer. At high ESI voltages (3-5 kV), the new ESI source allows a stable operation of the IM spectrometer over a wide range of solvent flow rates (10-1500 $\mu\text{l}/\text{min}$). The range of flow rates between 200-1500 $\mu\text{l}/\text{min}$ is especially interesting for the application of the spectrometer as an HPLC detector.

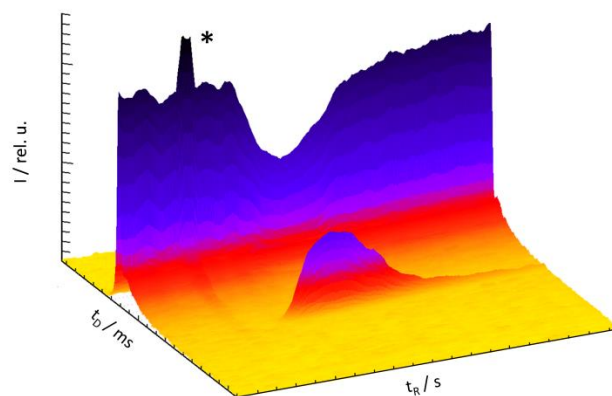


Fig. 8 3D-plot of 10 μM promazine (5 μl injection volume, 8:2 acetonitrile/water mixture with 0.1 % formic acid) at a flow rate of 300 $\mu\text{l}/\text{min}$ in stand-alone operation, showing the dependence of the signal intensity on the drift time t_D and retention time t_R (sheath gas flow 850 ml/min , $\Delta U_{\text{ESI}} = 4.2 \text{ kV}$), * - peak at low retention time is artifact of sample valve switching)

Stand-alone operation of the ESI IM spectrometer. The ESI IM spectrometer can be operated as a stand-alone instrument by direct injection of substances, and as a detector in an HPLC system. Direct injection of 5 μl of a 10 μM solution of promazine at a flow rate of 300 $\mu\text{l}/\text{min}$ yields the 3D-spectrum shown in figure 8. At a low drift time, a peak caused by solvent cluster ions (or impurities present in the sample, such as ammonium and sodium salts)²² and the promazine ion $[\text{M}+\text{H}]^+$ peak at a higher drift time are visible. Along the retention axis, the injection of 10 μM promazine results in the appearance of a new peak and the simultaneous reduction of the intensity of the solvent ion peak. The shape of the ion peak is mirrored recognizably in the dip in the intensity of the solvent ion signal. This observation indicates the competition of solvent and analyte for a limited pool of charges or the rivalry in the accumulation of either analyte or solvent ions on the surface of the charged droplets (excess charge).^{22,23}

In order to validate its analytical capabilities, the spectrometer was characterized in relation to its limit of detection (LOD) and linear range. These parameters were established in the positive as well as in the negative range for a number of selected compounds.

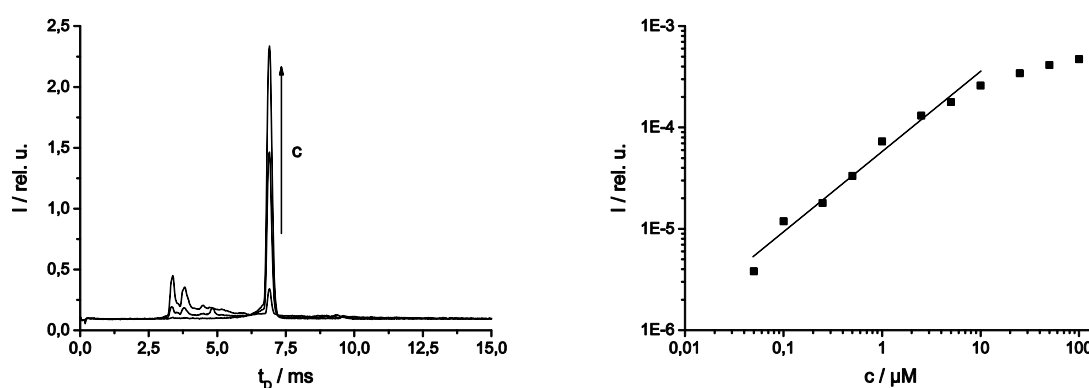


Fig. 9 a) IM spectra of 0.05-100 μM promazine ($\Delta U_{\text{ESI}} = 4.2 \text{ kV}$) in 8:2 methanol/water and b) corresponding calibration curve (LOD (no column) = 50 nM, LOD (column) = 100 nM)

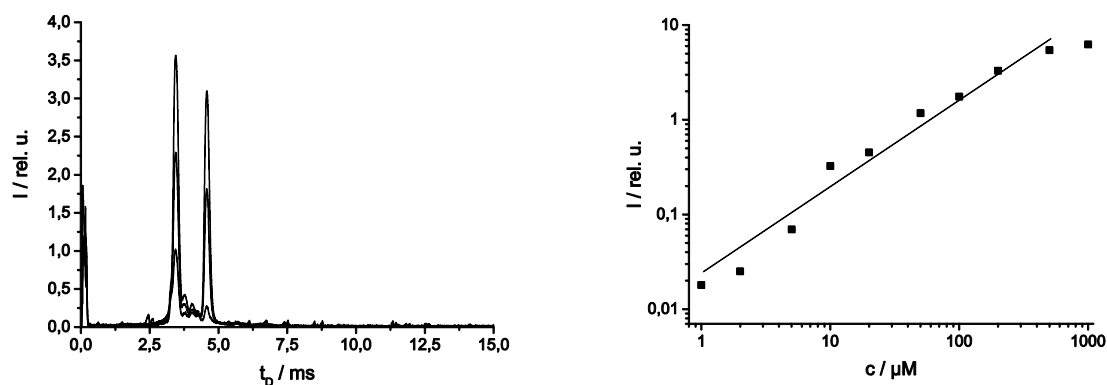


Fig 10 a) IM spectra of 1-1000 μM 1,3-DNB ($\Delta U_{\text{ESI}} = -2.5$ kV) in 8:2 methanol/water recorded in the negative mode and b) corresponding calibration curve (LOD (no column) = 1 μM)

In figure 9, the IM spectra of 0.05-100 μM promazine and the calibration curve are shown. The spectra exhibit symmetrical, Gaussian shaped peaks at $t_D = 7$ ms that are readily evaluated. The calibration function was measured with and without using an HPLC column, yielding only small differences. LOD of 50 nM, linear and dynamic ranges of two and three orders of magnitude, respectively, are found in the case of promazine. 1,3-DNB was investigated as an example of a substance detected in the negative mode (figure 10). A LOD of 1 μM and a linear range of three orders of magnitude was obtained for 1,3-DNB. The substances and LOD listed in table 2 illustrate the versatility of the detector in view of compounds detectable by ESI IMS. In addition to the examples of amino acids (L-arginine), neuroleptics (promazine) and surfactants (TBAB) already shown, nitro aromatic substances (1,3-DNB, TNT), additional pharmaceutically relevant antibiotics such as sulfonamides (sulfadoxine), thiazine amides (xylazine), fenamates (flunixin), glycosides (erythromycin) and nitrofurans (furazolidone) were also investigated.

Tab. 2 LOD and linear ranges of selected compounds

Substance	ESI mode (+/-)	LOD / μM	Linear range / μM
Promazine	+	0.05	0.05 - 100
TBAB	+	0.25	0.25 - 100
L-Arginine	+	1	1 - 100
1,3-DNB	-	1	1 - 1000
TNT	-	2.5	2.5 - 1000
Sulfadoxine	+	1	1 - 50
Xylazine	+	1	1 - 100
Flunixin	+	1	1 - 100
Cefquinome	+	2	2 - 100
Erythromycin	+	1	1 - 100
Furazolidone	+	1	1 - 100

The potential for detecting analytes over a large range of compositions of solvent mixtures such as methanol/water and acetonitrile/water is an important criterion for an HPLC detector. In the case of UV-detectors, for example, the increased absorption of some eluents in the UV range below 250 nm decreases the signal to noise ratio of the detection. In contrast, increased water content in the eluent generally leads to deteriorating ESI efficiency.

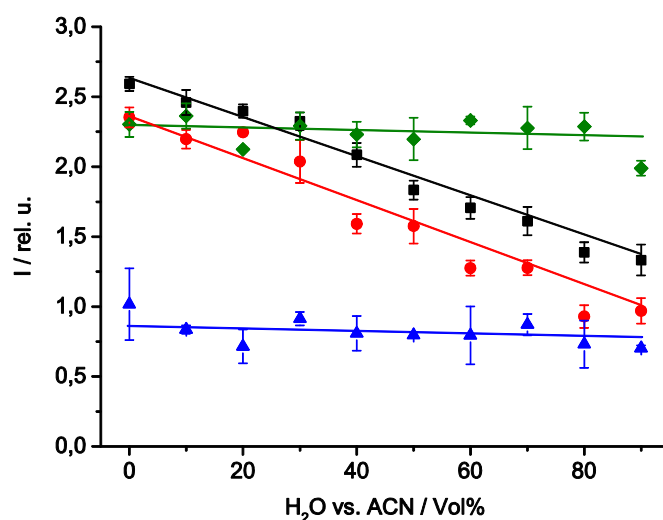


Fig. 11 Water content dependence of the analyte ion signal for TBAB (black squares), promazine (red circles), L-arginine (blue upright triangles), L-tryptophan (green diamonds) ($\Delta UES = 4.2$ kV, solvent flow rate 300 $\mu\text{l}/\text{min}$, sheath gas flow rate 850 ml/min)

The reason for this effect is the high surface tension of water that impedes the formation of small droplets at the Taylor cone. The ESI onset voltage is proportional to the root of surface tension.²² Consequently, the onset ESI voltage is 1.8 times higher for water than for methanol as the ESI solvent. Therefore, high water contents pose a challenge to the ESI IM spectrometer. The influence of the water content was determined for four substances for water contents from 0-90 vol% (Fig. 11). It is obvious that all substances can be detected over the whole range of the composition of the solvent mixture. The ionization efficiency, on the other hand, is affected by the composition of the solvent. The two amino acids investigated are insensitive to a change in solvent composition. A reduction of the peak area of up to 60 % is observed for other compounds, such as promazine. The successful detection of all substances can be attributed to the relatively high ESI voltages compensating the differences in ESI onset voltages.

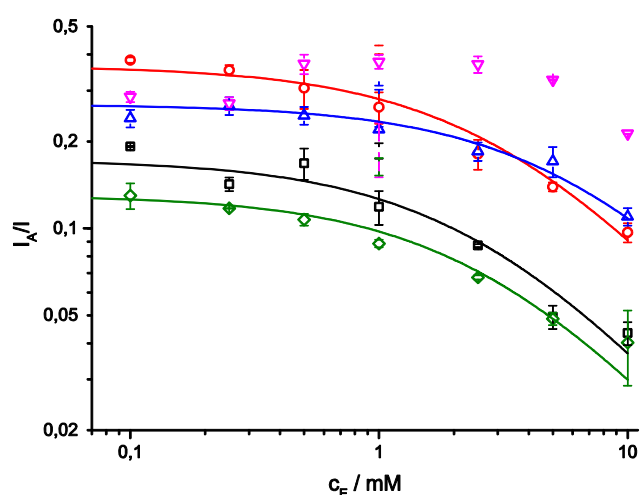


Fig. 12 Salt content dependence (ammonium acetate) of five selected compounds in 8:2 acetonitrile/water: tetracycline (black squares), TBAB (red circles), promazine (blue upright triangles), metazachlor (magenta inverted triangles), L-arginine (green diamonds), lines represent fits according to equation 1 ($\Delta UES = 4.2$ kV, solvent flow rate $100 \mu\text{l}/\text{min}$)

Another prerequisite for an HPLC detector is the compatibility with buffering agents, as these are employed in a broad range of separations. In mass spectrometry, ammonium acetate is often used due to its volatility. The salt content dependence (Fig. 12) of five selected compounds from different fields of application (tetracycline, TBAB, promazine, metazachlor, L-arginine) has been investigated over a broad range of ammonium acetate concentrations of 0.1-10 mM. The influence of the electrolytes on the analyte release efficiency can be described by a simple model for the phase equilibrium of the analyte between the releasing, charged droplet surface and the electrically neutral droplet core developed by Kebarle and Verkerk²³ and expanded by Enke²⁴ for ESI mass spectrometry. According to this model, the intensity of the analyte ion signal I_A of a two component system of analyte (A) and electrolyte (E) can be described as:

$$I_A = pf \frac{k_A C_A}{k_A C_A + k_E C_E} I. \quad (1)$$

The constants k_A and k_E are characteristic sensitivity constants of A^+ and E^+ . I is the TIC (calculated from the sum of solvent, electrolyte and analyte signals). The product $p \cdot f$ is independent of the chemical nature of the ions, f describes the partition of the ions transferred from the liquid to the gas phase and p describes the detection efficiency. The ratio k_A/k_E determines the shape of the curve, while its height is given by the product $p \cdot f \cdot I$. Fitting the experimental data to the Kebarle function yields an estimate of the ratio k_A/k_E for each analyte. This ratio is a measure of the detection sensitivity for the corresponding analyte. The data for tetracycline, TBAB, promazine and L-arginine were readily fitted to the Kebarle model (Fig. 12). Even though the model was originally developed to describe the ionization in the cone jet mode used in mass spectrometry, it can also be used to describe the multijet mode employed in the T-cylinder geometry in IM spectrometry. In contrast to these four compounds, a different electrolyte (buffer) dependence is observed in the case of metazachlor. First, the metazachlor ion signal is increasing with the concentration of ammonium chloride. At 2.5 mM of salt, a maximum is reached, above which the ion signal decreases again. This behavior can be explained by

two opposing effects. At first, the increasing ammonium acetate concentration facilitates the ionization of metazachlor by adduct formation with NH_4^+ ions. However, the reduced release of analyte ions predominates at higher electrolyte concentrations. The important insight for the analytical application of the method gained in these experiments is that the spectrometer is compatible with buffering agent concentrations up to 10 mM and can be used for the detection of analytes in buffer solutions.

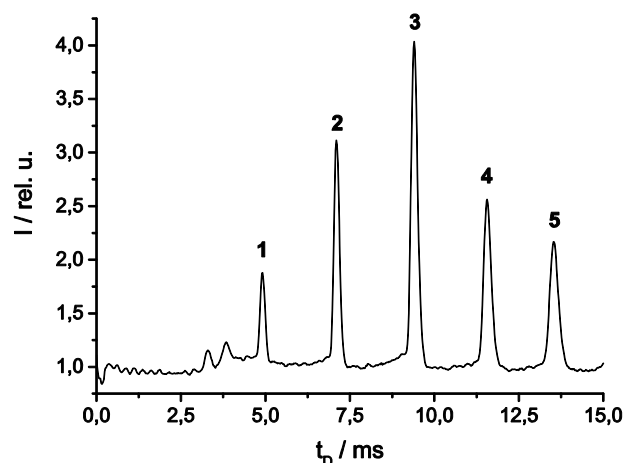


Fig. 13 Separation of a mixture of five tetraalkylammonium bromides in 8:2 acetonitrile/water (1 – TEAB, 2 – TBAB, 3 – THAB, 4 – TOAB, 5 – TDAB) (20 μM each, injection of 5 μl of the mixture, solvent flow rate 40 $\mu\text{l}/\text{min}$)

As mentioned above, the spectrometer presented in this work can be operated as a stand-alone spectrometer for the investigation of mixtures of reduced complexity and as an HPLC detector for multidimensional separations. The ability of separating ion mixtures in real time is a prerequisite of both application cases. The separation capacity of the spectrometer with its relatively short drift tube will be characterized with three exemplary applications.

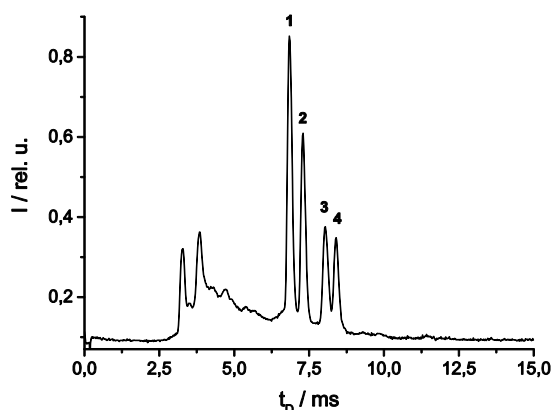


Fig. 14 Separation of a mixture of four phenothiazine derivatives in 8:2 acetonitrile/water (1 – promazine, 2 – chlorpromazine, 3 – thioridazine, 4 – perphenazine) (50 μM each, injection of 5 μl of the mixture, solvent flow rate 20 $\mu\text{l}/\text{min}$)

The first example is a 20 μM mixture of five tetraalkylammonium bromides (Fig. 13). The alkyl chains of the tetraalkylammonium ions vary from ethyl to decyl. The components are separated without difficulty. Since these substances are permanent ions, the differences in the detection efficiency are a result of the varying surface activities. The compound class of tetraalkylammonium salts is also an interesting candidate for the mobility calibration of the spectrometer.²⁵

The second mixture is related to a pharmacology application and is comprised of four phenothiazines used as neuroleptics (Fig. 14). The four compounds (promazine, chlorpromazine, thioridazine, perphenazine) only vary in the structure of the side chains of the phenothiazine ring. An almost complete separation of the four compounds is observed. They can therefore be detected in the IM spectrometer simultaneously in real time.

The third example (Fig. 15) is the separation of TBAB and DEDMAB. This example serves to demonstrate the ability of the spectrometer to distinguish isomeric compounds. Both isomers are almost baseline separated. The compact TBAB ion appears before the elongated DEDMAB ion in the spectrum.

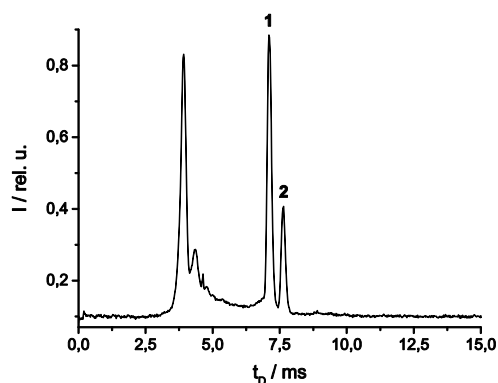


Fig. 15 Separation of a mixture of isomers in 8:2 acetonitrile/water (1 – DEDMAB, 10 μM , 2 – TBAB, 20 μM , solvent flow rate 300 $\mu\text{l}/\text{min}$)

Operation of the ESI IM spectrometer as an HPLC detector. After demonstrating the essential prerequisites for the use of the spectrometer as an HPLC detector, i.e. low LOD, suitability for high flow rates, tolerance of increased water and salt contents and the general capacity for multidimensional separations, are fulfilled, two HPLC application examples will be shown. The first example is the HPLC separation of five neuroleptics on an RP18 column (Fig. 16). In addition to the substances shown in figure 14, imipramine, which could not be separated from promazine in the IM spectrometer alone, was added to the mixture. In the chromatogram shown in figure 16, co-elution of the peaks was forced in order to simulate the behavior of a complex and rapid HPLC separation. However, in the 3D-surface formed by the retention and drift time axes the peaks are completely separated due to the second separation dimension introduced by the IM spectrometer. The order of appearance of the substances in the chromatogram and the IM spectrum is also noteworthy. While perphenazine is eluted in the chromatogram before chlorpromazine and thioridazine, it is observed as the last peak in the IM spectrometer. A factor of orthogonality between the mass and the collision cross section below 14 % is reported²⁵ for the combination of IM and mass spectrometry. The factor of orthogonality of the

combination of IM spectrometry and HPLC seems to be larger. While the collision cross section often correlates with the mass of a molecule, the properties that determine the retention time of an analyte (depending on column type, e.g. polarity) do not necessarily have to correlate with the collision cross sections (size, shape) that determine the ion mobility.

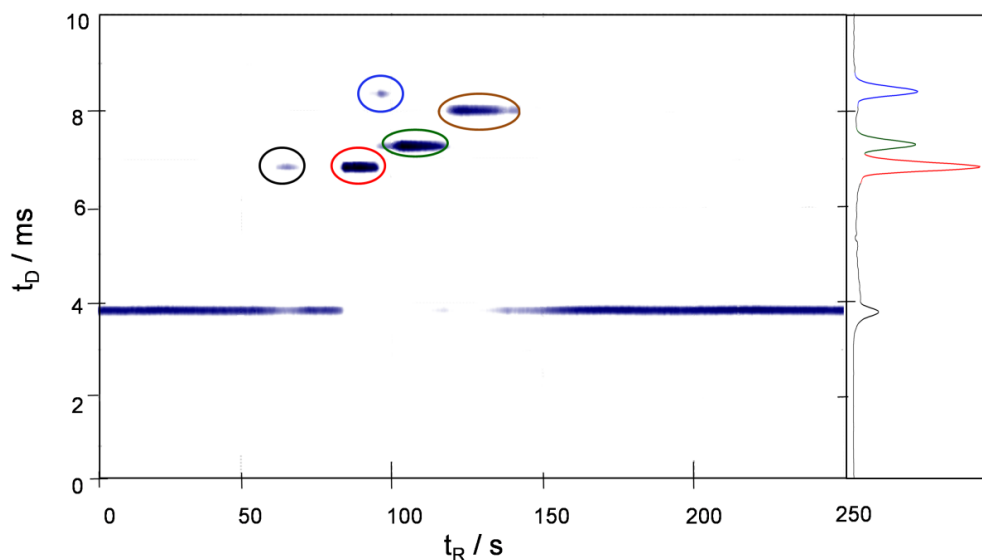


Fig. 16 3D HPLC IM separation of five neuroleptics (1 – imipramine, 2 – promazine, 3 – perphenazine, 4 – chlorpromazine, 5 – thioridazine) on an RP18 column ($\Delta U_{\text{ESI}} = 3.7$ kV, solvent flow rate $300 \mu\text{l}/\text{min}$, sheath gas flow rate $1 \text{ l}/\text{min}$, isocratic eluent: 1:1 acetonitrile/water with 0.1 % formic acid) with sum HPLC chromatogram above and extracted IM spectrum at $t_R = 95$ s shown on the right.

The second example is the HPLC separation of 12 pesticides on an RP18 column. In this example the analytical focus was not the multidimensional separation but the identification of analytes by their mobilities in analogy with mass spectrometry.

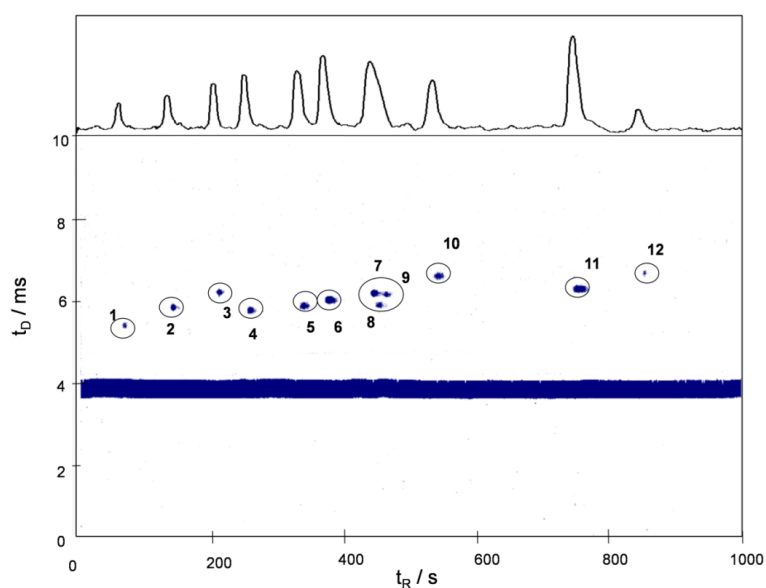


Fig. 17 3D HPLC IM separation of 12 pesticides (1 – diquat, 2 – chloridazon, 3 – metoxuron, 4 – monuron, 5 – methabenzthiazuron, 6 – chlortoluron, 7 – monolinuron, 8 – isoproturon, 9 – metobromuron,

10 – metazachlor, 11 – linuron, 12 – metolachlor) on an RP18 column ($\Delta U_{\text{ESI}} = 4.2$ kV, solvent flow rate 300 $\mu\text{l}/\text{min}$, sheath gas flow rate 800 ml/min, gradient eluent: A: H₂O (0.1 % formic acid), B: ACN, time table 0 - 8 min: 30% → 40% B, 8 - 12 min: 40% → 90% B, 12 - 20 min: 90% B) with sum HPLC chromatogram above.

Unambiguous identification is based on the substance specific mobility that is characteristic of each ion in a defined drift gas under the assumption of a low field strength. The identification of analytes analogous to mass spectrometry can be achieved by compiling a mobility database. Also in this example, a strict correlation of retention and drift time is not observed. Metoxuron (Fig. 17 – 3) and linuron (Fig. 17 – 11) have similar drift times but appear in the chromatogram at different retention times. The substances monolinuron (Fig. 17 – 7), isoproturon (Fig. 17 – 8) and metobromuron (Fig. 17 – 9) represent an example of the advantages of the two-dimensional separation as they are neither properly separated in the chromatogram nor in the IM spectrum. In the 3D-spectrum, the peaks can be completely separated.

Conclusions

This work systematically investigates the suitability of an ESI IM spectrometer as an HPLC detector. An important prerequisite is the tolerance of flow rates from 200-1500 $\mu\text{l}/\text{min}$ common in HPLC. In order to accommodate these flow rates, the principle of a T-cylinder ESI source established by Kurnin *et al.* was significantly improved. Spray modes and ion release of the novel ESI source were characterized by means of imaging. Essential requirements for the application of the ESI IM spectrometer as an HPLC detector, such as the low LOD and tolerance of high water and salt contents, were investigated. For promazine, an LOD of 50 nM was established. LOD of other substances were determined to be around 1 μM . Methanol/water and acetonitrile/water mixtures with a water content of up to 90 % were successfully used as the mobile phase. Ammonium acetate was investigated as an MS compatible buffer and could be employed up to a concentration of 10 mM. The major conditions for the application of the spectrometer as an HPLC detector are therefore fulfilled. Two major advantages of the spectrometer over the DAD are the capability of multidimensional separations and the identification of analytes via substance specific mobilities that can be stored in a database. The capacity for multidimensional separations was shown for three substance mixtures in stand-alone operation of the spectrometer. The suitability of the HPLC detector was demonstrated on the basis of two exemplary applications (neuroleptics, pesticides). The examples highlight the advantages of the increased separating power due to the complementary 3D information over the individual information of retention time and drift time.

Acknowledgment

The Authors gratefully acknowledge the financial support for this research received from the German Federal Ministry for Economic Affairs and Energy (BMWi) through the AiF (Grant No. KF2167703NT2). The analysis of the 3D spectra was carried out with software based on the software framework OpenMS developed at the FU Berlin in the group of Prof. Knut Reinert by Hans-Christian Ehrlich and Sandro Andreotti. Experimental work was supported by Hans Mathé, Sven Rutkowski, Pia Brinkmann

and Manuela Zenichowski. The authors would like to thank Stefan Kleinschmidt for the manufacture of mechanical components and Genadiy Ronis for the manufacture of electronic components.

References

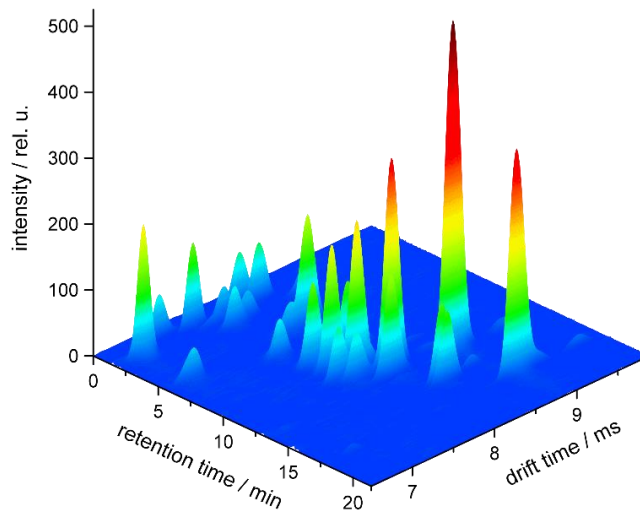
1. K. Mojsiewicz-Pieńkowska, "On the Issue of Characteristic Evaporative Light Scattering Detector Response", *Crit. Rev. Anal. Chem.* **39**, 89-94 (2009).
2. T. Vehovec and A. Obreza, Review of operating principle and applications of the charged aerosol detector, *J. Chromatogr. A*, **1217**, 1549-1556 (2010).
3. G. A. Eiceman and Z. Karpas, *Ion mobility spectrometry*. CRC Press, Boca Raton (2005).
4. H. Borsdorf, T. Mayer, M. Zarejousheghani and G. A. Eiceman, "Recent developments in ion mobility spectrometry", *Appl. Spectrosc.* **46**, 472 (2011).
5. C. B. Shumate and H. H. Hill, "Coronaspray Nebulization and Ionization of Liquid Samples for Ion Mobility Spectrometry", *Anal. Chem.* **61**, 601-606 (1989).
6. D. Wittmer, Y. H. Chen, B. K. Luckenbill and H. H. Hill, "Electrospray ionization ion mobility spectrometry", *Anal. Chem.* **66**, 2348-2355 (1994).
7. D. E. Clemmer, R. R. Hudgins and M. F. Jarrold, "Naked Protein Conformations: Cytochrome c in the Gas Phase", *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 10141-10142 (1995).
8. C. Wu, W. F. Siems, G. R. Asbury and H. H. Hill, "Electrospray Ionization High Resolution Ion Mobility Spectrometry", *Anal. Chem.* **70**, 4929-4938 (1998).
9. C. A. Srebalus, J. Li, W. S. Marshall and D. E. Clemmer, "Gas-phase separations of electro sprayed peptide libraries", *Anal. Chem.* **71**, 3918-3927 (1999).
10. T. Wyttenbach, P. R. Kemper and M. T. Bowers, "Design of a New Electrospray Ion Mobility Mass Spectrometer", *Int. J. Mass Spectrom.* **212**, 13-23 (2001).
11. Y. H. Chen, H. H. Hill and D. P. Wittmer, "Analytical Merit of Electrospray Ion Mobility Spectrometry as a Chromatographic Detector", *J. Microcol. Sep.* **6**, 515-524 (1994).
12. D.-S. Lee, C. Wu and H. H. Hill, "Detection of Carbohydrates by Electrospray Ionization - Ion Mobility Spectrometry following Microbore High-Performance Liquid Chromatography", *J. Chromatogr. A* **822**, 1-9 (1998).
13. S. J. Valentine, M. Kulchania, C. A. Srebalus Barnes and D. E. Clemmer, "Multidimensional separations of complex peptide mixtures: a combined high-performance liquid chromatography/ion mobility/time-of-flight mass spectrometry approach", *Int. J. Mass Spectrom.* **212**, 97-109 (2001).
14. Y. J. Lee, C. S. Hoaglund-Hyzer, C. A. Srebalus Barnes, A. E. Hilderbrand, S. J. Valentine and D. E. Clemmer, "Development of high-throughput liquid chromatography injected ion mobility quadrupole time-of-flight techniques for analysis of complex peptide mixtures" *J. Chromatogr.* **782**, 343-351 (2002).
15. F. K. Tadjimukhamedov, J. A. Stone, D. Papanastasiou, J. E. Rodriguez, W. Mueller, H. Sukumar and G. A. Eiceman, "Liquid Chromatography/Electrospray Ionization/Ion Mobility Spectrometry of Chlorophenols with Full Flow from Large Bore LC Columns", *Int. J. Ion Mobil. Spec.* **11**, 51-60 (2008).

16. I. V. Kurnin, A. A. Kayumov, M. Z. Muradymov, N.V. Krasnov and A. V. Samokish, "Coupling of liquid chromatograph with ion-mobility spectrometer", *Int. J. Ion Mobil. Spec.*, **16**, 169-176 (2013).
17. M. Sturm, A. Bertsch, C. Gröpl, A. Hildebrandt, R. Hussong, E. Lange, N. Pfeifer, O. Schulz-Trieglaff, A. Zerck, K. Reinert and O. Kohlbacher, „OpenMS - An open-source software framework for mass spectrometry“, *BMC Bioinformatics* **9**, 163 (2008).
18. M. Wilm and M. Mann, "Analytical properties of the nanoelectrospray ion source", *Anal. Chem.* **68**, 1–8 (1996).
19. Z. Takáts, J. M. Wiseman, B. Gologan and R. G. Cooks, "Electrosonic spray ionization. A gentle technique for generating folded proteins and protein complexes in the gas phase and for studying ion - Molecule reactions at atmospheric pressure", *Anal. Chem.* **76**, 4050-4058 (2004).
20. R. Wang, P. Allmendinger, L. Zhu, A. J. Gröhn, K. Wegner, V. Frankevich, and R. Zenobi, „The Role of Nebulizer Gas Flow in Electrosonic Spray Ionization (ESSI)“, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **22**, 1234-1241 (2011).
21. X. Tang, J. E. Bruce and H. H. Hill, "Characterising Electrospray Ionization Using Atmospheric Pressure Ion Mobility Spectrometry", *Anal. Chem.* **78**, 7751-7760 (2006).
22. P. Kebarle and L. Tang, "From ions in solution to ions in the gas phase - the mechanism of electrospray mass spectrometry", *Anal. Chem.* **65**, 972A-986A (1993).
23. P. Kebarle and U. H. Verkerk, "Electrospray: From ions in solution to ions in the gas phase, what we know now", *Mass Spectrom. Rev.* **28**, 898-917 (2009).
24. C. G. Enke, "A predictive model for matrix and analyte effects in electrospray ionization of singly-charged ionic analytes", *Anal. Chem.* **69**, 4885-4893 (1997).
25. P. Dwivedi, A. J. Schultz and H. H. Hill, "Metabolic profiling of human blood by high-resolution ion mobility mass spectrometry (IM-MS)" *Int. J. Mass Spectrom.* **298**, 78–90 (2010).

3.2 HPLC ESI IM-Spektrometer: Charakterisierung, Datenverarbeitung und Anwendung

“High-performance liquid chromatography with electrospray ionization ion mobility spectrometry: Characterization, data management, and applications”

Zühlke, M.; Riebe, D.; Beitz, T.; Löhmannsröben, H.-G.; Andreotti, S.; Reinert, K.; Zenichowski, K.; Diener, M. *J. Sep. Sci.* **2016**, *39*, 4756–4764



Die Publikation beinhaltet folgende Kapitel:

In dieser Publikation wird die 2D-Separation zweier komplexer Mischungen (24 Pestizide, 18 Aminosäuren) mit dem HPLC ESI IM-Spektrometer vorgestellt. Hierzu wurden die Berechnung der effektiven Peakkapazität des HPLC ESI IM-Spektrometers, die Quantifizierung einiger Pestizide (Einzelsubstanzen und im Gemisch) und die Entwicklung der *OpenIMS* Software vorgenommen.

Beitrag des Autors zur Publikation:

Auf Grundlage des in der vorherigen Publikation entwickelten ESI IM-Spektrometers wurden zwei komplexe Mischungen mit dem HPLC ESI IM-Spektrometer durch mich untersucht und deren Trennung optimiert. Die Identifizierung der Komponenten im jeweiligen Gemisch gelang durch Messungen der Einzelsubstanzen am HPLC ESI IM-Spektrometer. Ebenso wurde die Quantifizierung der Pestizide durch die Messung von Konzentrationsreihen von mir durchgeführt. Unterstützt wurde die Auswertung durch die Entwicklung der *OpenIMS* Software. Die Programmierung der Software wurde von der Freien Universität Berlin im ständigen Dialog mit KNAUER und der Universität Potsdam erledigt. In der Firma KNAUER wurde die Peakkapazität des Spektrometers berechnet. Alle verwendeten Bilder und Tabellen für das Paper wurden hingegen von mir vorbereitet. Die Diskussion der Ergebnisse sowie der Schreibprozess fanden in enger Zusammenarbeit mit den Koautoren statt.

Manuscript of

M. Zühlke et al., *J. Sep. Sci.* **2016**, 39, 4756–4764

Received: 5 July 2016 • Revised: 21 October 2016 • Accepted: 21 October 2016

2016 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

HPLC-Electrospray ionization-ion mobility spectrometry: characterization, data management and applications

Martin Zühlke,¹ Daniel Riebe,¹ Toralf Beitz,¹ Hans-Gerd Löhmannsröben,¹ Sandro Andreotti,² Knut Reinert,² Karl Zenichowski,³ Marc Diener³

1 University of Potsdam, Physical Chemistry, Karl-Liebnecht-Str. 24-25, 14476 Potsdam

2 Freie Universität Berlin, Institute of Computer Science, Takustr. 9, 14195 Berlin

3 KNAUER Wissenschaftliche Geräte GmbH, Hegauer Weg 38, 14163 Berlin

Abstract

The combination of HPLC and electrospray ionization ion mobility spectrometry facilitates the two-dimensional separation of complex mixtures in the retention and drift time plane. The ion mobility spectrometer presented here was optimized for flow rates customarily used in HPLC between 100–1500 $\mu\text{l min}^{-1}$. The characterization of the system with respect to such parameters as the peak capacity of each time dimension and of the 2-D spectrum was carried out based on a separation of a pesticide mixture containing 24 substances. While the total ion current chromatogram is coarsely resolved, exhibiting coelutions for a number of compounds, all substances can be separately detected in the 2-D plane due to the orthogonality of the separations in retention and drift dimensions. Another major advantage of the ion mobility detector is the identification of substances based on their characteristic mobilities. Electrospray ionization allows the detection of substances lacking a chromophore. As an example, the separation of a mixture of 18 amino acids is presented. A software built upon the free mass spectrometry package OpenMS was developed for processing the extensive 2-D data. The different processing steps are implemented as separate modules which can be arranged in a graphic workflow facilitating automated processing of data.

Keywords

Ion mobility spectrometry, electrospray ionization, two-dimensional separation, high-performance liquid chromatography, pesticides, amino acids

1 Introduction

The development of multidimensional separation techniques and novel detectors belongs to the most heavily investigated topics in present HPLC research [1]. Mixtures of high complexity occurring in environmental or biological samples (proteomics, metabolomics) can only be investigated by multi-dimensional separation techniques. The design of novel detectors can aim to achieve different goals. These include the capacity to detect a broad range of substances, such as compounds which lack chromophores and can therefore not be directly analyzed by optical methods, high sensitivity as well as additional information not obtainable in one dimension. Detectors allowing a reliable identification of substances are particularly valuable. This feature is exhibited, e.g., by mass spectrometers which can provide the mass of compounds facilitating the calculation of their sum formula, given a high enough resolution. However, high costs are associated with such high-resolution instrumentation.

A more inexpensive alternative is ion mobility (IM) spectrometry. This method provides drift times and, due to the short analysis times (about 20 ms for the acquisition of a single spectrum), is readily combined with HPLC into a two-dimensional separation scheme. Additionally, a characteristic substance-dependent physical quantity, namely the ion mobility, is obtained. Substances can be characterized by their IM as they are identified by their mass in mass spectrometry. Another similarity to the latter is the possibility to implement different ionization sources such as electrospray ionization (ESI) and chemical ionization at atmospheric pressure (APCI).

ESI-IM spectrometry was first demonstrated in 1972 [2] and was developed more systematically in the 1990s [3]. The technique allows the investigation of a wide range of substance classes [4-6], and can be employed either as a stand-alone spectrometer (at atmospheric pressure) [7] or in combination with mass spectrometry (at reduced pressure < 10 mbar or at atmospheric pressure) [8]. Since stand-alone ESI-IM spectrometers are ideally operated at flow rates between 1-10 $\mu\text{l min}^{-1}$, their applicability as HPLC detectors is usually limited to using microbore columns or flow splitting [9,10]. At higher flow rates, the quality of the spectra deteriorates due to incomplete desolvation of the produced ions, i.e. the detection of charged solvent clusters or nano droplets. In recent years, several groups succeeded in operating ESI-IM spectrometers at significantly higher flow rates by modifying the source region [11, 12]. The highest flow rate at which stable operation could be shown, 1500 $\mu\text{l/min}$, was achieved by our group [13]. In that work, the two-dimensional separation of a simple mixture of 12 pesticides was demonstrated. Coelutions arising in the retention time dimension in that analysis could be resolved in the drift time dimension.

The present work contains two focal points. First, emphasis is placed on conveying the advantages of the IM-spectrometer detector in principle. To that end, two applications are presented. One is the separation of a pesticide mixture containing 24 substances and the second is a separation of 18 amino acids, representing a class of compounds largely lacking an aromatic chromophore. The sensitive detection of non-aromatic amino acids via UV absorption is not possible without derivatization. The HPLC-IM spectrometer produces 3-D data sets which cannot be processed by standard HPLC software. Therefore, a new fork of the mass spectrometry software package, OpenMS, was developed for evaluating the accumulated data. On one hand, OpenMS had to be adapted to be compatible with IM spectrometry data. On the other hand, IM spectrometry specific modules had to be developed. With the resulting software, OpenIMS, the accumulated data can be processed and analyzed automatically via an individually created workflow.

2 Material and Methods

2.1 Instrumentations

The main parts of our setup are the HPLC system and the home-built ESI-IM spectrometer. A schematic overview of the setup is presented in the supporting information (Fig. S1). The HPLC system consists of a pump (Azura P 6.1L, KNAUER), an injection valve (KNAUER) and the HPLC column. For the separation of the pesticide mixture an RP column (Hypersil Gold, Thermo, 150 x 2.1 mm, 3 μm) and for that of the amino acids mixture a hydrophilic interaction chromatography (HILIC) column (Eurospher II HILIC, KNAUER, 100 x 2.0 mm, 3 μm) were employed.

The mobile phase of the pesticide mixture separation was composed of acetonitrile (solvent A) and 0.1% aqueous formic acid (solvent B). The following solvent gradient was used: 0-5 min, 25 % A; 5-25 min, 25-80 % A. For the separation of the amino acids mixture acetonitrile with an aqueous 20 mM ammonium acetate solution was used in two compositions (Solvent A: 9/1, solvent B: 1/9). The gradient was: 0-10 min, 100 % A; 10-30 min, 100 % -80 % A. In both separations the flow rate was 300 $\mu\text{l min}^{-1}$.

The home-built ESI-IM spectrometer (supporting information, Fig. S1) was already described in detail [13]. It is divided into an ionization source, a desolvation and a drift tube separated by an ion gate (Bradbury-Nielsen design), and the Faraday detector. The ionization source consists of an ESI capillary (Hamilton, gauge 32) inserted into a 1/16" steel capillary with the applied voltage U_{ESI} . The ESI capillary is arranged orthogonally to the desolvation tube on the central axis of a 70 mm long aluminum cylinder (ID = 30 mm) with the applied voltage U_{IMS} . The desolvation tube has a length of 52 mm (stainless steel electrodes: OD = 34 mm, ID = 20 mm, 5 mm thickness, 6 mm repeating unit) and was kept at temperatures of 160 °C. The 90 mm long drift tube was held at 150°C (stainless steel electrodes: OD = 50 mm, ID = 30 mm, 4 mm thickness, 5 mm repeating unit). The drift gas flow was 1.3 l/min and the sheath gas flow 1.8 l/min. Nitrogen 5.0 (Air Liquide) was used as drift gas. The ions are detected at a Faraday plate with a diameter of 20 mm. The resulting current is amplified by a $5 \cdot 10^8$ V/A amplifier (FEMTO LCA-10K-500M) and fed to an oscilloscope (Handyscope HS3, Tiepie).

2.2 Chemicals

All substances were acquired from Sigma Aldrich. Two substance mixtures consisting of 24 pesticides and 18 amino acids are used for the characterization of the IM detector. The following compounds are contained in the pesticide mixture (supporting information: Tab. S1): diquat dibromide (1), aldicarb sulfoxide (2), imidacloprid (3), aldicarb sulfone (4), methomyl (5), oxamyl (6), chloridazone (7), metoxurone (8), 3-hydroxycarbofuran (9), aldicarb (10), monurone (11), propoxur (12), diuron (13), chlortolurone (14), carbofuran (15), carbaryl (16), methabenzthiazuron (17), monolinuron (18), isoproturon (19), metobromuron (20), metazachlor (21), methiocarb (22), linuron (23) and metolachlor (24). The amino acid mixture is comprised of the following compounds: DL-methionine (Met), DL-valine (Val), L-glutamine (Gln), glutamic acid (Glu), glycine (Gly), L-histidine (His), L-alanine (Ala), L-arginine (Arg), L-aspartic acid (Asp), L-asparagine (Asn), L-cysteine (Cys), L-isoleucine (Ile), L-leucine (Leu), L-phenylalanine (Phe), L-proline (Pro), L-serine (Ser), L-threonine (Thr), L-tyrosine (Tyr) and L-tryptophan (Trp). The surfactant tetrabutylammonium bromide (TBAB, $\text{N}(\text{C}_4\text{H}_9)_4\text{Br}$) and 2,6-di-tert-butyl-pyridine (DTBP, $\text{C}_{13}\text{H}_{21}\text{N}$) were used as internal IM standard.

2.3 OpenIMS Software

Analysis of the 3-D data (retention time t_R and drift time t_D during HPLC-IM spectrometry measurements) is carried out with OpenIMS. OpenIMS is a development fork of OpenMS suited for IMS data processing. OpenMS [14] is an open-source software C++ library for LC/MS data management and analyses. It offers an infrastructure for the rapid development of mass spectrometry related software. OpenMS is free software available under the three clause BSD license. It comes with a vast variety of pre-built and ready-to-use tools for proteomics and metabolomics data analysis (TOPPTools) and powerful 2-D and 3-D visualization (TOPPView). The program allows the automated processing of MS data by combining selected modules to a workflow. While some modules only had to be adapted to IMS data, other modules were newly developed.

The OpenIMS software was used for the automated processing of all presented HPLC-IM spectrometry data. Exemplarily, the general data processing pathway will be briefly presented in the following. A more detailed description of the utilized modules will be given in the according section of the supporting information. The workflow includes all necessary steps for automatic conversion and preprocessing of recorded binary raw data, peak detection (peak picking) for individual IM spectra, detection of 2-D analyte features (signals), as well as their representation via classical chromatograms and according characterization, respectively. Fig. 1 shows a schematic workflow representation. Internal (black/slim) and external (blue/broad) data flow pathways are symbolized as arrows. The same workflow is shown as screenshot (supporting information: Fig. S2) of the TOPPAS GUI as part of OpenIMS, which allows for an intuitive graphical workflow composition including module parameter definitions.

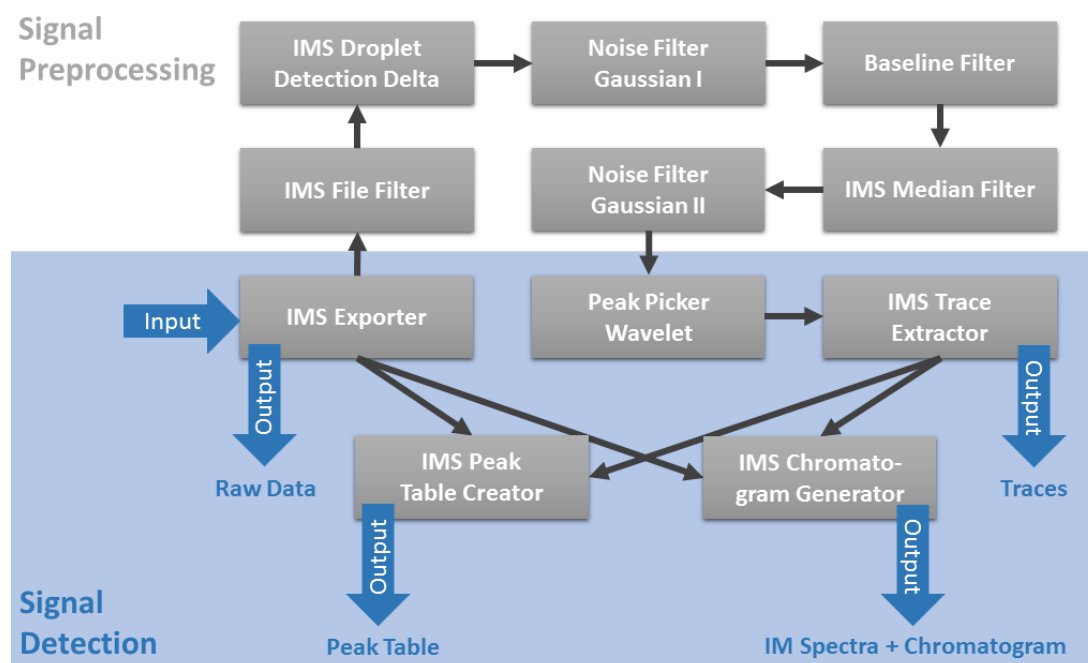


Fig. 1 Example OpenIMS workflow for LC-IMS data batch processing from raw data to visualizable 3D data, extracted and analyzed LC-IMS features and according chromatograms. Schematic workflow representation including utilized OpenIMS modules and data flow pathways (description of modules in supporting information).

Transformation of custom made binary file format exported from a home-build data recording software into the open mzML file format [15] grants access to all further OpenIMS modules. Data shown are LC retention time versus IMS drift time representations. Having selected the data range of interest via the IMS file filter, in order to reduce disc space requirements, several data filter functionalities can be used.

The droplet removal module is applied first. Its purpose is the removal of sporadic artefacts due to incompletely desolvated nano droplets originating from the ESI source by exploiting their characteristic shape in the drift and retention time dimensions. The highly charged droplets cause a short signal spike due to a saturation of the transimpedance amplifier. The effect is relatively small and only affects < 0.5 % of the IM spectra of the pesticide separation and < 0.2 % of the IM spectra of the amino acid separation. Since the droplet artefacts do not possess an elution profile in t_R dimension, they are not being treated as analyte signals (see below for further explanation).

The next step in the workflow is a commonly utilized, Gaussian-weighted moving average noise filtering module. It is applied to the individual IM spectra in order to reduce high-frequency noise without affecting the peak shape and to accelerate the peak detection. A low-pass frequency is set via the Gaussian width parameter (here 0.2 ms). After the noise removal, baseline correction of the IM spectra is achieved with the baseline filter module. The width of the top-hat filter structure element was set to 1 ms. A second Gaussian noise removal along t_R is also applied. Since the peak width along t_R is much broader compared to IM spectra, so a Gaussian width of 15 s was selected.

After the preprocessing steps, the signal detection and analysis utilizing four modules for peak picking, feature finding, peak table and chromatogram generation follows. The peak picking module identifies potential signal peaks for individual IM spectra and replaces the peak raw data with a centroid representation of position and 2D area. To distinguish random signal noise from weak analyte signals the trace extractor module attempts to fit an elution profile on a trace of picked centroids of neighboring IM spectra. The resulting features represent the detected analyte signals, characterized by their coordinates in t_D (or mobility) and t_R , as well as their volume (intensity). The latter is calculated by multiplying and summing up individual centroid areas and t_R distances along the feature trace. Both modules are supplied with the key parameters of expected peak widths and minimal signal to noise ratios which were chosen as peak width in $t_D = 0.5$ ms; peak width in $t_R = 10$ s; signal-to-noise (S:N) $t_D = 0.5$ s and S:N $t_R = 1$ here, respectively. Pre-processed raw data and detected features can be superimposed using the multiple layer visualization features of TOPPView.

The results of the work flow can either be presented with the peak table creator (supporting information, Tab. S2) classical chromatograms can be exported and processed using a different software.

3 Results and Discussion

3.1 Separation of pesticides in the drift time (t_D) dimension

The pesticides of the investigated mixture containing 24 components can be grouped based on their main structural element into urea- (9 compounds), carbamate-type (10) and other compounds (5), see supporting information Tab. S1). The compounds are structurally similar, and therefore well suited for

characterizing the separation power of the IM spectrometer. In contrast to the capabilities of most other HPLC detectors, single substances and simple mixtures can be investigated in stand-alone operation by direct injection, analogous to ESI mass spectrometry. As a result, drift time spectra of each pesticide are obtained (supporting information: Fig. S3). In general, these spectra consist of one peak due to cluster ions of the solvent and one peak associated with the analyte ions. The drift times of the ions vary in a narrow drift time window between 6.7 ms and 8.8 ms. This finding correlates with the structural similarity of the substances. The IM peak capacity can be defined as [16],

$${}^1n = \frac{\Delta t_D}{w_b} \quad (1)$$

where the peak capacity 1n is the quotient of the available drift time span Δt_D divided by the average full width at half maximum (FWHM) w_b . The obtained value of ${}^1n = 7.3$ represents the upper limit of simultaneously separable substances for the given pesticide mixture along the t_D dimension. Drift time values are largely dependent on instrument parameters such as voltage, drift tube length, pressure and temperature. In order to facilitate comparisons to other results, reduced mobilities K_0 were determined. These values constitute a characteristic physical quantity of the molecular ions and essentially depend only on the collision partners (the drift gas molecules). There are a number of ways of calculating reduced mobilities. Here, the mobility was determined in relation to the reference standard TBAB via $K_0(\text{analyte}) = t_D(\text{TBAB}) K_0(\text{TBAB})/t_D(\text{analyte})$. The K_0 values of the pesticide ions are reported in the supporting information (Tab. S2).

The inverse mobilities, and thus the collision cross sections, correlate with the ionic mass/charge ratios (m/z). An according correlation is shown in Fig. 2. On the one hand, a linear relation can be observed due to the structural similarity. On the other hand, the mobilities of ions with similar masses exhibit a relatively strong variation. This finding reflects the structural differences of the ions. The potential of using IM spectrometry for the separation of isomers is based on the same effect. Three pairs of compounds with similar masses but markedly different mobilities are highlighted in Fig. 2. The obtained correlation qualitatively matches those from the literature. There, factors of orthogonality around 14 % are reported for IM-mass spectrometry [17].

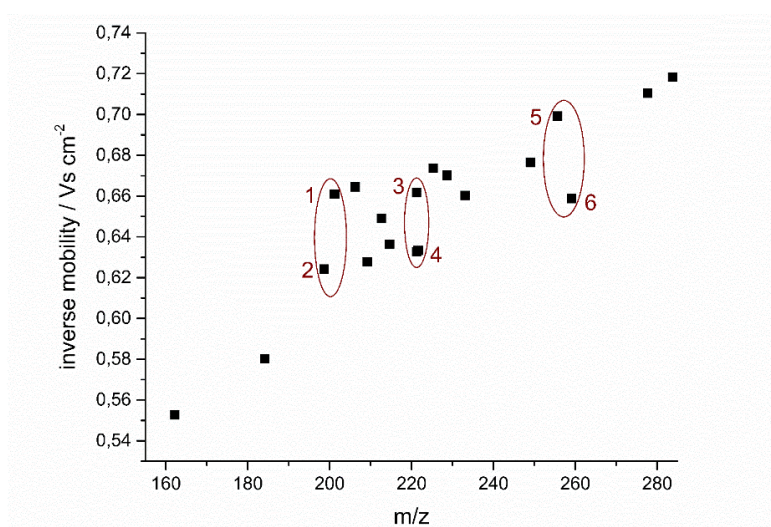


Fig. 2 Correlation of inverse reduced mobilities and m/z for 24 pesticides, highlighted substances are: carbaryl (1), monurone (2), carbofuran (3), chloridazone (4), imidacloprid (5), metobromuron (6)

3.2 Separation of pesticides in drift (t_D) and retention (t_R) time dimensions

While simple mixtures can be investigated in the stand-alone IM spectrometer, complex mixtures have to be pre-separated on the HPLC column. This constitutes a 2-D scheme in the dimensions t_R (HPLC column) and t_D (IM drift tube). The 3D spectrum obtained for the separation of a pesticide mixture is shown in Fig. 3. The projection of 3D spectra into the t_R/t_D -plane results in the corresponding 2D spectra (Fig. 4). The traces spanning the entire (t_R) axis (Fig. 4, drift time: 5-6 ms) can be assigned to the cluster ions of the solvent. Numbered spots between 6 ms and 9 ms represent the individual pesticide ions.

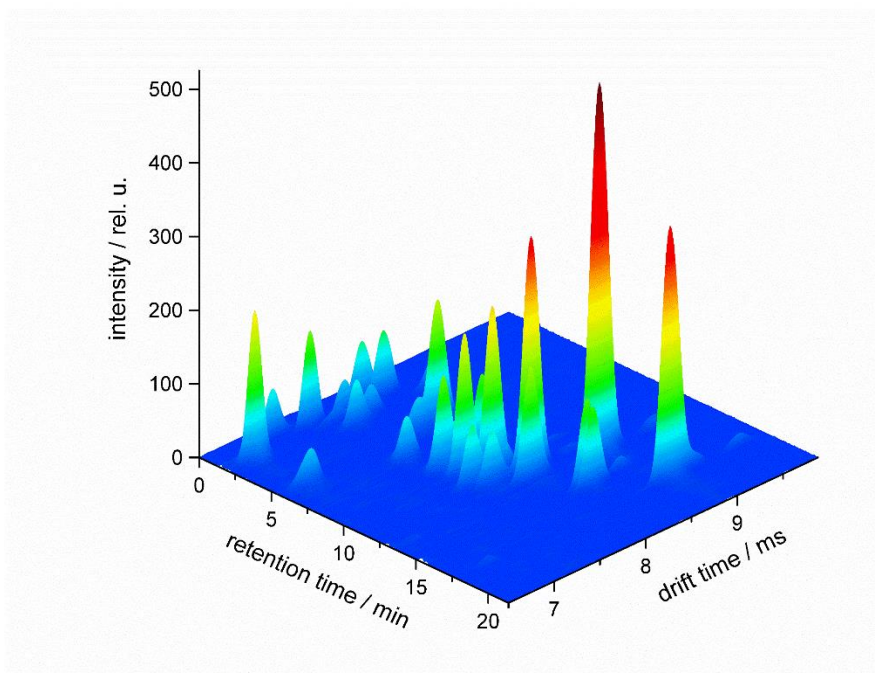


Fig. 3 Section of the 3D spectrum of a HPLC-IM spectrometry separation of a mixture of 24 pesticides (signals belonging to cluster ions of solvent was removed for clarity)

Routine HPLC analyses involve the evaluation of one-dimensional chromatograms, since most HPLC detectors (e.g. electrochemical or optical detectors), except mass spectrometers, do not provide an additional dimension of separation. If a mass spectrometer is being used as HPLC detector, the signal traces of all ions formed can be combined into a so-called total ion current (TIC) chromatogram. This approach can be used in IM spectrometry as well. In the upper trace of Fig. 4, all ions in a drift time range of 6-9 ms were combined and presented as a TIC chromatogram. Many of the individual analyte peaks shown in the TIC chromatogram are not baseline separated. The reason is the partial or complete coelution of the pesticides in certain segments of the chromatogram resulting in incompletely resolved or fully overlapping peaks, precluding the identification of the entire range of substances or their quantification. Examples of this are the overlapping peaks of substances numbered 8, 9 and 10 as well as 18 and 19. In Fig. 4, the IM spectrum at a retention time of 1.85 min resulting from the coelution of substances 3, 4 and 5 is shown. In this IM spectrum, three substances are detected simultaneously. The 2-D spectrum is needed in order to detect all 24 pesticides baseline separated from each other.

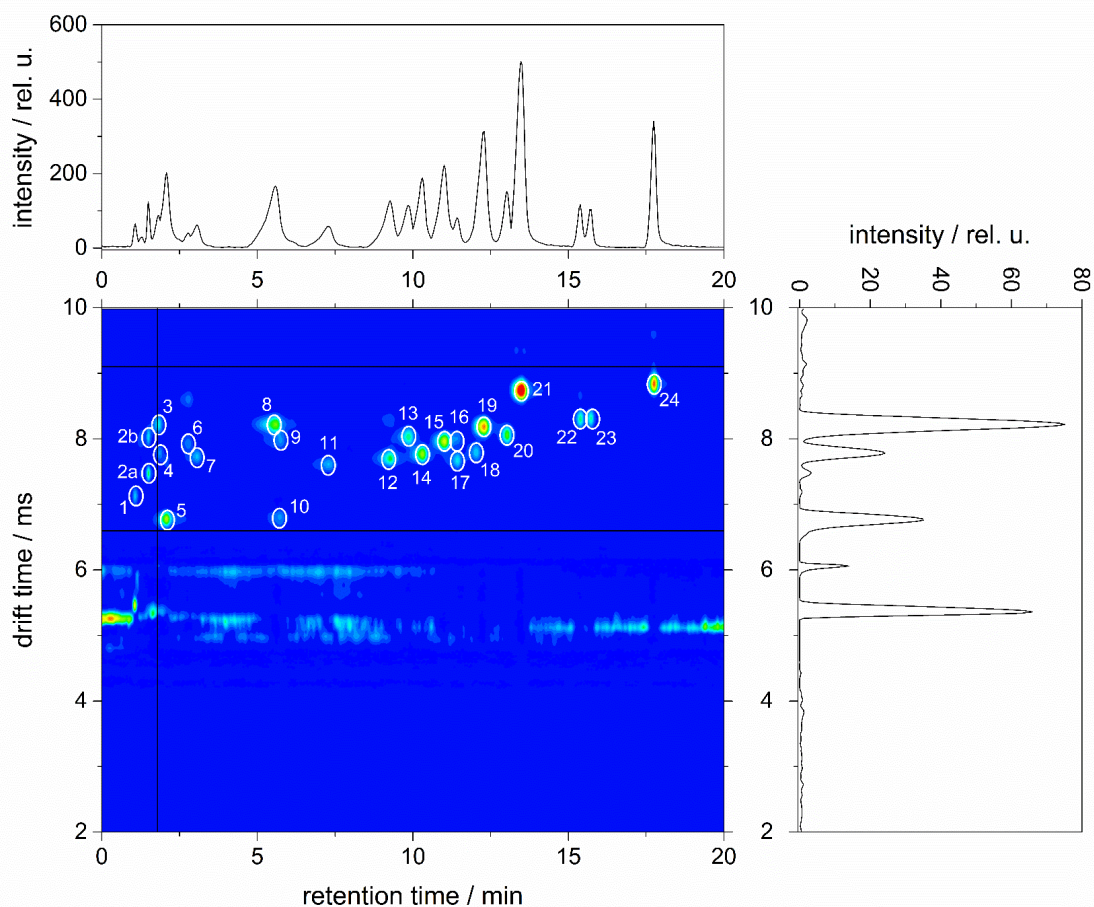


Fig. 4 TIC chromatogram ($t_D = 6 - 9$ ms, upper trace), 2D representation and IM spectrum (right trace) at a retention time of 1.85 min of a HPLC-IM spectrometric separation of a mixture of 24 pesticides (please refer to section 2 for identity of substances, application of the IMS median filter (see supporting information) for reduction of the solvent cluster ion intensity)

3.3 Effective peak capacity of the 2D separation

Another advantage of the HPLC-IM spectrometric separation is the orthogonality of the two separation principles. The chromatographic (reversed phase) separation depends on the partition equilibrium of the analytes between the aqueous mobile and apolar stationary phase. It is therefore essentially a result of the polarity of the molecules. The IM spectrometric separation, on the other hand, reflects differences in the size and shape of the molecular ions. The weak correlation of drift and retention times is shown in Fig. 5.

A quantitative description of the separation potential of the two-dimensional HPLC-IM spectrometric separation is necessary for a comparison with other two-dimensional separation techniques. Two suitable quantities for the description of the separation potential are the orthogonality and the effective peak capacity. Their determination is based on the calculation of the one- (eq. 1) and two-dimensional (eq. 2) theoretical peak capacities [18]:

$${}^{2D}n = {}^1n \cdot {}^2n \quad (2)$$

Here, 1n and 2n are the one-dimensional theoretical peak capacities of the t_D and t_R dimensions, respectively. Analogous to a 2D-LC study [19], let the orthogonality O be defined as the quotient of the effective area occupied by peaks and the available total area: $O = A_{\text{eff}}/A_{\text{tot}}$. The effective peak capacity ${}^{2D}n_{\text{eff}}$ is then determined by the product of theoretical peak capacity ${}^{2D}n$ and orthogonality O [19].

$${}^{2D}n_{\text{eff}} = {}^{2D}n \cdot O \quad (3)$$

Since the effective area occupied by peaks is not accessible directly, an approach [18] is used where the effective area is divided into triangles (Fig. 5). The sides of the triangles are represented by vectors. The area of the triangles can be determined by calculating the cross product of the two corresponding vectors. The length of the resulting vector corresponds to the area of the parallelogram spanned by both vectors. Accordingly, half of this vector's length is the area of the triangles. The sum of all triangle areas is the effective area.

The effective area of the pesticide separation can be represented by four vectors (**a** - **d**) forming three triangles. The total area is determined by a rectangle with sides equivalent to the drift time and retention time differences of the respective first and last peaks. The resulting orthogonality value is determined as $O = 0.56$. The one-dimensional theoretical peak capacity of the LC dimension and the IM spectrometric dimension are ${}^2n = 59.0$ and ${}^1n = 7.3$. The resulting effective peak capacity determined via Eq. 3 is ${}^{2D}n_{\text{eff}} = 240$. This effective peak capacity is smaller than values obtained for high resolution LC/LC separations (${}^{2D}n_{\text{eff}} = 845$, $O = 0.60$ in [18]), but is achieved in much shorter time (20 min vs. 270 min in [18]). The combination of HPLC and IM-separation dimensions allows a significant increase in separation power compared to the individual methods without any compromise in HPLC analysis time.

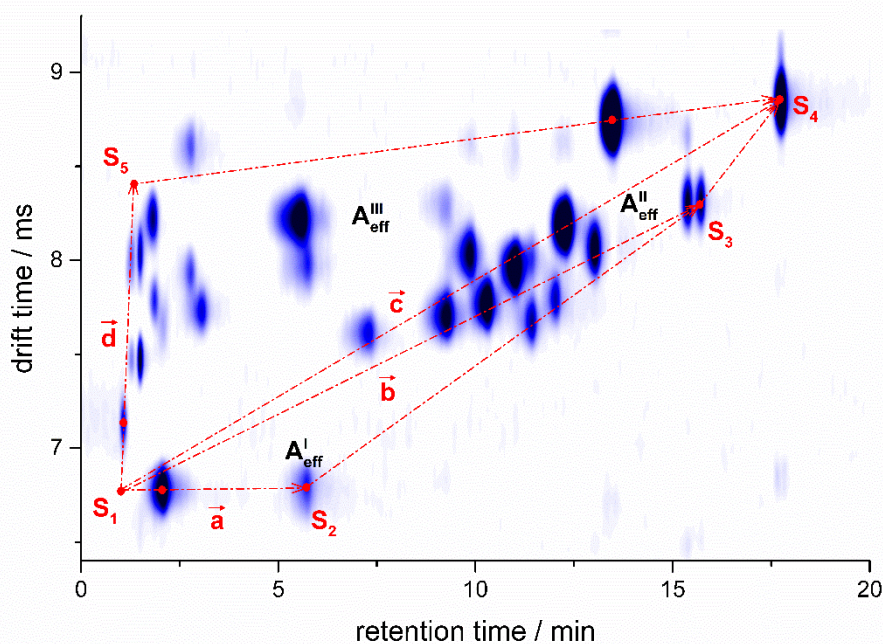


Fig. 5 t_R/t_D plot for determination of the effective area by division into triangles (S_i – vertices of the triangles, A'_{eff} – areas of the triangles)

3.4 Quantification of the pesticides

The limits of detection (LOD) and linear ranges of the pesticides after direct injection and after pre-separation on an HPLC column were determined. The LOD after direct injection of 10 predominantly pharmaceutical substances, which were previously determined with the same setup [13], varied between 50 nM and 2 μ M. The direct injection LOD of all pesticides measured in this work were in the range between 0.2 - 5 μ M. Two examples are the LOD of metolachlor with 0.2 μ M and of isoproturone with 1 μ M (Fig. 6). Compared to the LOD after direct injection, the LOD after pre-separation on an HPLC column are significantly higher. Two possible explanations are the increasing dilution of the analytes on the column at longer retention times and changes in the solvent composition due to the solvent gradient. The latter reason especially influences the ionization efficiency of the analytes in the ESI process. The linear ranges normally comprise two, in some cases three orders-of-magnitude.

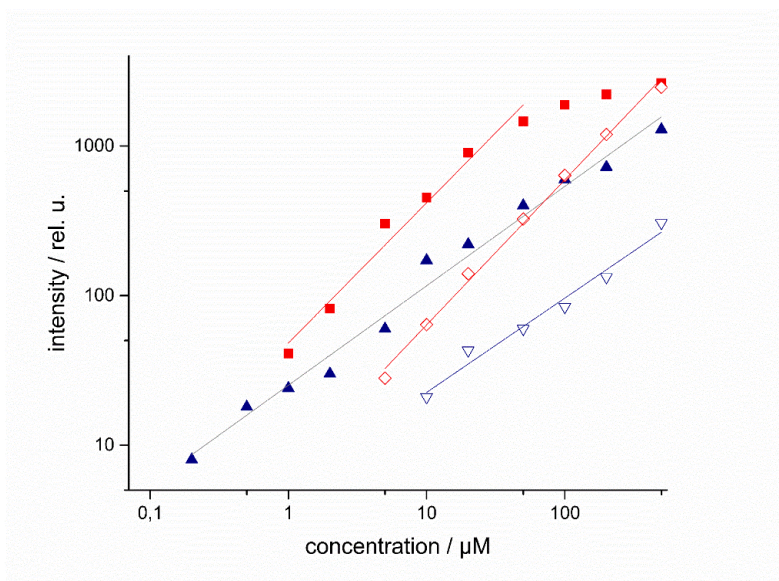


Fig. 6 Dependence of the signal intensity on the concentration of selected pesticides, after direct injection (isoproturone: solid red squares ($R^2 = 0.975$), metolachlor: solid blue triangles ($R^2 = 0.985$)), and after pre-separation on a HPLC column (isoproturone: open red diamonds ($R^2 = 0.996$), metolachlor: open inverted triangles ($R^2 = 0.976$))

3.5 2-D separation of amino acids

In order to achieve sufficient separation on RP columns as well as good sensitivity for optical detection of amino acid mixtures, several derivatization (pre-/post column) techniques have been developed. Those steps mean an additional effort and are potential error sources. Therefore, direct amino acid detection is desirable and possible using detection methods, such as ELSD [20], ESI-MS [21] and ESI-IM spectrometry [22]. The separation of a mixture of 17 amino acids was already demonstrated by the combination of HPLC and IM spectrometry [22]. There, an RP-18 phase was used, resulting in incomplete separation, due to insufficient retention of the non-derivatized, highly polar/zwitterionic amino acids. The separation of up to six coeluting amino acids was carried out in the drift time dimension. The flow rate of the ESI-IM spectrometer was 4 μ l/min, requiring flow splitting after the LC column. One possibility of achieving a higher separation power for non-derivatized amino acids is the

application of special HILIC columns [21,23]. In this work, a standard HILIC column, better suited for the separation of highly polar/ionic compounds, was used. However, complete separation of all 18 amino acids was not achieved. This is only possible by the two-dimensional separation in the HPLC-IM spectrometer. All coeluting peaks can be separated in the 2-D spectrum (Fig. 7). Flow splitting was not necessary in our method. The advantage of the two-dimensional separation is especially apparent for the substance triples Thr/Asp/Gly and Asp/Glu/Gln. These can only be separated in the second dimension, the IM spectrometer. This finding is, analogous to the pesticide separation, the result of the high orthogonality between retention time and drift time. A corresponding representation is shown in the supporting information (Fig. S5).

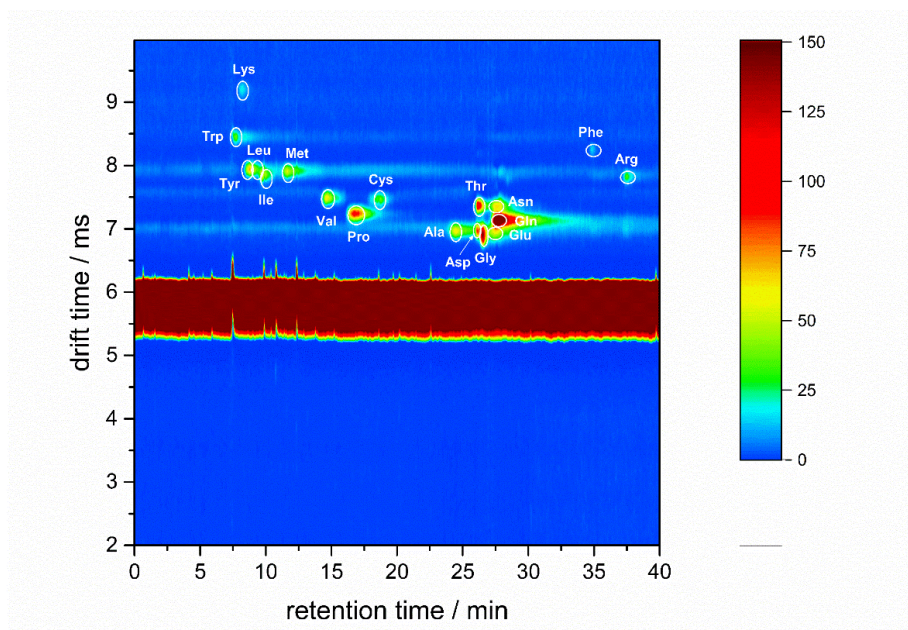


Fig. 7 2D spectrum of an HPLC-IM spectrometric separation of a mixture of 18 amino acids (please refer to section 2 for identity of substances)

4 Concluding remarks

The novel HPLC detector was characterized with two mixtures containing pesticides and amino acids, respectively. The system comprising of HPLC column and IM spectrometer facilitates the separation in the two dimensions, namely retention time and drift time. Several advantages arise due to the 2-D spectra which are unique features of the IM spectrometry based detector. In contrast to one-dimensional detectors or the diode array detector, the IM detector allows the identification of substances with a mobility database. If the ion mobilities are unknown, they can be obtained, using quantum chemically optimized geometric ion structures, by different programs based on trajectory calculations [24-27]. Furthermore, complex separations not possible in one dimension can be carried out by the two-dimensional HPLC-IM spectrometric technique. Because the separation in the drift-time dimension is very fast (ms range), this version of two-dimensional chromatography can be easily implemented. Alternatively, fast HPLC separation can be achieved by a deliberate reduction of the separation in the first dimension, which can be compensated by the additional separation in the second dimension. This is possible due to the high orthogonality ($O = 0.56$) of the HPLC and IM spectrometry separations, greatly enhancing the separation power without delay in LC analysis time.

The adaptation of the software package OpenMS to IM spectrometry data gives access to a large collection of algorithms already developed for the mass spectrometry community. An important advantage is the possibility of establishing custom-made, intuitive workflows that can be performed automatically.

5. Acknowledgment

The authors gratefully acknowledge the financial support for this research received from the German Federal Ministry for Economic Affairs and Energy (BMWi) through the AiF (Grant No. KF2167703NT2).

References

- [1] Schmidt, T. C., Schmitz, O. J., Teutenberg, T., Multidimensional chromatography. *Anal. Bioanal. Chem.* 2015, 407, 117–8.
- [2] Gieniec, M. L., Cox, J., Jr., Teer, D., Dole, M., 20th Annual Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics 1972, Dallas, TX, June 4-9
- [3] Wittmer, D., Chen, Y. H., Luckenbill, B. K., Hill, H. H., Electrospray Ionization Ion Mobility Spectrometry *Anal. Chem.* 1994, 66, 2348–2355.
- [4] Wu, C., Siems, W. F., Klasmeier, J., Hill, H. H., Separation of isomeric peptides using electrospray ionization/high-resolution ion mobility spectrometry. *Anal. Chem.* 2000, 72, 391–5.
- [5] Beegle, L. W., Kanik, I., Matz, L., Hill, H. H., Electrospray ionization high-resolution ion mobility spectrometry for the detection of organic compounds, 1. Amino acids. *Anal. Chem.* 2001, 73, 3028–34.
- [6] Matz, L. M., Hill, H. H., Separation of benzodiazepines by electrospray ionization ion mobility spectrometry–mass spectrometry *Anal. Chim. Acta* 2002, 457, 235–245.
- [7] Jafari, M. T., Kamfirozi, M., Jazan, E., Ghoreishi, S. M., Selective extraction and analysis of pioglitazone in cow plasma using amolecularly imprinted polymer combined with ESI ion mobility spectrometry. *J. Sep. Sci.* 2014, 37, 573–579
- [8] Thomas, A., Görgens, C., Guddat, S., Thieme, D., Dellanna, F., Schänzer, W., Thevis, M., Simplifying and expanding the screening for peptides <2 kDa by direct urine injection, liquid chromatography, and ion mobility mass spectrometry. *J. Sep. Sci.* 2016, 39, 333–341
- [9] Matz, L. M., Dion, H. M., Hill, H. H., Evaluation of capillary liquid chromatography-electrospray ionization ion mobility spectrometry with mass spectrometry detection. *J. Chromatogr. A* 2002, 946, 59–68.
- [10] Lee, D.-S., Wu, C., Hill, H. H., Detection of carbohydrates by electrospray ionization-ion mobility spectrometry following microbore high-performance liquid chromatography *J. Chromatogr. A* 1998, 822, 1–9.
- [11] Tadjimukhamedov, F. K., Stone, J. a., Papanastasiou, D., Rodriguez, J. E., Mueller, W., Sukumar, H., Eiceman, G. a, Liquid chromatography/electrospray ionization/ion mobility spectrometry of chlorophenols with full flow from large bore LC columns *Int. J. Ion Mobil. Spectrom.* 2008, 11, 51–60.
- [12] Kurnin, I. V., Kayumov, A. a., Muradymov, M. Z., Krasnov, N. V., Samokish, A. V., Coupling of liquid chromatograph with ion-mobility spectrometer *Int. J. Ion Mobil. Spectrom.* 2012, 16, 169–

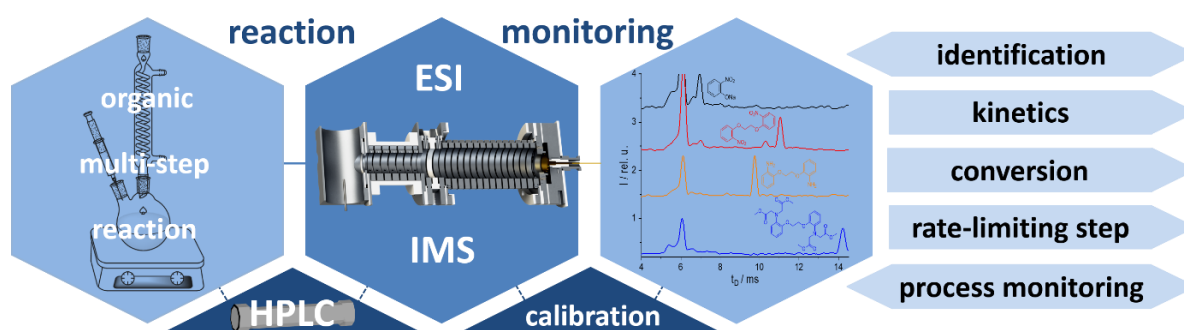
- 176.
- [13] Zühlke, M., Riebe, D., Beitz, T., Löhmannsröben, H.-G., Zenichowski, K., Diener, M., Linscheid, M. W., An electrospray ionization-ion mobility spectrometer as detector for high-performance liquid chromatography. *Eur. J. Mass Spectrom. (Chichester, Eng)*. 2015, 21, 391–402.
- [14] Sturm, M., Bertsch, A., Gröpl, C., Hildebrandt, A., Hussong, R., Lange, E., Pfeifer, N., Schulz-Trieglaff, O., Zerck, A., Reinert, K., Kohlbacher, O., OpenMS – An open-source software framework for mass spectrometry *BMC Bioinformatics* 2008, 9, 163.
- [15] Martens, L., Chambers, M., Sturm, M., Kessner, D., Levander, F., Shofstahl, J., Tang, W. H., Römpp, A., Neumann, S., Pizarro, A. D., Montecchi-Palazzi, L., Tasman, N., Coleman, M., Reisinger, F., Souda, P., Hermjakob, H., Binz, P.-A., Deutsch, E. W., mzML--a community standard for mass spectrometry data. *Mol. Cell. Proteomics* 2011, 10, R110.000133.
- [16] Merenbloom, S. I., Bohrer, B. C., Koeniger, S. L., Clemmer, D. E., Assessing the peak capacity of IMS-IMS separations of tryptic peptide ions in He at 300 K. *Anal. Chem.* 2007, 79, 515–22.
- [17] Laphorn, C., Pullen, F., Chowdhry, B. Z., Ion mobility spectrometry-mass spectrometry (IMS-MS) of small molecules: separating and assigning structures to ions. *Mass Spectrom. Rev.* 2013, 32, 43–71.
- [18] Dück, R., Sonderfeld, H., Schmitz, O. J., A simple method for the determination of peak distribution in comprehensive two-dimensional liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 2012, 1246, 69–75.
- [19] Bedani, F., Kok, W. T., Janssen, H.-G., Optimal gradient operation in comprehensive liquid chromatography x liquid chromatography systems with limited orthogonality. *Anal. Chim. Acta* 2009, 654, 77–84.
- [20] Peterson, J. A., Lorenz, L. J., Risley, D. S., Sandmann, B. J., Amino acid analysis of peptides using HPLC with evaporative light scattering. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 1999, 22, 1009–1025.
- [21] Langrock, T., Czihal, P., Hoffmann, R., Amino acid analysis by hydrophilic interaction chromatography coupled on-line to electrospray ionization mass spectrometry. *Amino Acids* 2006, 30, 291–7.
- [22] William J. Warren, Anthony J. Midey, Adam M. Graichen, C. W., *Rapid Separation and Detection of Amino Acids by HPLC-HPIMS*, 2015.
- [23] Boersema, P. J., Divecha, N., Heck, A. J. R., Mohammed, S., Evaluation and optimization of ZIC-HILIC-RP as an alternative MudPIT strategy. *J. Proteome Res.* 2007, 6, 937–46.
- [24] Shvartsburg, A. A., Jarrold, M. F., An exact hard-spheres scattering model for the mobilities of polyatomic ions *Chem. Phys. Lett.* 1996, 261, 86–91.
- [25] Mesleh, M. F., Hunter, J. M., Shvartsburg, A. A., Schatz, G. C., Jarrold, M. F., Structural Information from Ion Mobility Measurements: Effects of the Long-Range Potential *J. Phys. Chem.* 1996, 100, 16082–16086.
- [26] Kim, H., Kim, H. I., Johnson, P. V., Beegle, L. W., Beauchamp, J. L., Goddard, W. A., Kanik, I., Experimental and theoretical investigation into the correlation between mass and ion mobility for choline and other ammonium cations in N₂. *Anal. Chem.* 2008, 80, 1928–36.
- [27] Campuzano, I., Bush, M. F., Robinson, C. V., Beaumont, C., Richardson, K., Kim, H., Kim, H. I., Structural Characterization of Drug-like Compounds by Ion Mobility Mass Spectrometry: Comparison of Theoretical and Experimentally Derived Nitrogen Collision Cross Sections. *Anal. Chem.* 2012, 84, 1026–1033.

3.3 Echtzeit-Reaktionsmonitoring einer organischen Mehrstufenreaktion mit ESI-IM-Spektrometrie

“Real-time reaction monitoring of an organic multi-step reaction by electrospray ionization-ion mobility spectrometry”

Zühlke, M.; Sass, S.; Riebe, D.; Beitz, T.; Löhmannsröben, H.-G.

ChemPlusChem, **2017**, 82 (10), 1266-1273



Die Publikation beinhaltet folgende Kapitel:

In dieser Publikation wird die qualitative Analyse von Edukten, Zwischenprodukten und Produkten mit einer Driftzeit zur Massen-Ladungs-Korrelation einer chemischen Mehrstufenreaktion vorgestellt. Weiterhin wird die Prozessüberwachung der Reaktion über Intensitäts-Zeit-Profile präsentiert. Der quantitative Verlauf einer Beispielreaktion inklusive Bestimmung der Kinetik und Umsatzüberwachung wurde einerseits durch die Vortrennung über eine HPLC-Säule und andererseits mithilfe eines verlängerten Kalibrierverfahrens mit dem stand-alone ESI IM-Spektrometer gezeigt.

Beitrag des Autors zur Publikation:

Die Reaktionsführungen aller Stufen inklusive Probenahme wurden durch den Kollegen S. Sass vollzogen. Die Messungen aller entnommenen Reaktionsmischungen mit und ohne HPLC am ESI IM-Spektrometer führte hingegen ich durch. Auch die Vergleichsmessungen am ESI MS zur Überprüfung der Identifizierung der einzelnen Substanzen in der Reaktion, sowie die Ermittlung von Kalibrationskurven am ESI IM-Spektrometer mit und ohne HPLC wurden von mir realisiert. Die Auswertung und die Diskussion zu den Ergebnissen fanden maßgeblich durch mich statt. Außerdem bereitete ich alle Bilder für das Paper vor und schrieb in enger Zusammenarbeit mit den Koautoren den Großteil der Publikation.

Manuscript of

M. Zühlke et al., *ChemPlusChem*, **2017**, 82 (10), 1266-1273

Manuscript received: 4 July 2017 • Revised manuscript received: 18 August 2017

Real-time reaction monitoring of an organic multi-step reaction by electrospray ionization-ion mobility spectrometry

Martin Zühlke, Stephan Sass, Daniel Riebe, Toralf Beitz, Hans-Gerd Löhmannsröben

University of Potsdam, Physical Chemistry, Karl-Liebknecht-Str. 24-25, 14476 Potsdam

Abstract

The capability of electrospray ionization (ESI)-ion mobility (IM) spectrometry, as a stand-alone real-time technique and in combination with HPLC, for reaction monitoring was assessed in this work. A three-step chemical reaction, consisting of a Williamson ether synthesis followed by a hydrogenation and an *N*-alkylation step, was chosen for demonstration. The determination of intermediates and products was performed with a drift time to mass-per-charge correlation. Adding a HPLC column to the setup increased the separation power and allowed the determination of further species. Monitoring the intensities of the various species over the reaction time allows the detection of the end of reaction, the determination of the rate-limiting step, the observation of the system response in discontinuous processes and the optimization of the mass ratios of the starting materials. However, charge competition in ESI influences the quantitative detection of substances in the reaction mixture. Therefore, two different methods were investigated, which allow the quantification and the investigation of reaction kinetics. The first method is based on the pre-separation of the compounds on an HPLC column and their subsequent individual detection in the ESI-IM spectrometer. The second method involves an extended calibration procedure which considers charge competition effects and facilitates nearly real-time quantification.

Keywords

Ion mobility spectrometry, electrospray ionization, BAPTA-AM, HPLC, reaction monitoring

1 Introduction

A deeper understanding of chemical reactions is an essential requirement for optimizations of chemical synthesis in research and industry. Fast online detection methods enable the determination of reactive intermediates and the rate-limiting step and consequently allow the elucidation of the reaction kinetics and the underlying reaction mechanism. Typical techniques for monitoring reactions are spectroscopic methods, such as near-infrared (NIR),^[1] ultraviolet (UV),^[2] Raman,^[3] or nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy,^[4] which often allow direct contactless access to the reaction mixture, avoiding any disturbance and providing real-time monitoring. A number of different syntheses can be monitored spectroscopically. Nevertheless, various properties can hamper applications, such as low sensitivity for dilute intermediates (Raman), a high complexity of the reaction mixture (UV, NIR, Raman), a difficult interpretation of spectra or impurities (NMR). Other techniques, such as mass spectrometry (MS)^[5,6] and chromatographic methods^[7], allow the characterization of more complex reactions. Gas chromatography (GC) and liquid chromatography (LC) are proven techniques for synthesis control in the industry, but they are often time consuming. In the case of MS, many publications demonstrating the fast analyzation of the compounds in the reaction exist. However, expensive equipment and, in the case of atmospheric pressure ionization (API) sources, charge competition influencing the ionization efficiency of the individual components, are disadvantageous.

A technique less often applied in reaction monitoring is ion mobility (IM) spectrometry, which is less expensive compared to MS. The fundamental principle of IM spectrometry is the separation of ions according to their mobility (K) in an electric field (E), usually at atmospheric pressure. K is a characteristic physical constant for a molecular ion in a drift gas and is described via the Mason equation.^[8]

$$K = \frac{l}{E t_D} = \frac{3}{16} \frac{q}{N} \left(\frac{1}{m} + \frac{1}{M} \right)^{1/2} \left(\frac{2\pi}{k_B T_{\text{eff}}} \right)^{1/2} \frac{1}{\Omega_D} \quad (1)$$

Here l is the drift path length, t_D is the drift time, q is the charge, N is the number density of the drift gas, m is the mass of the drift gas molecules, M is the mass of the ions, T_{eff} is the temperature in the drift tube, k_B is the Boltzmann constant and Ω_D is the collisional cross section. Ω_D is a measure of the shape of an ion and is the most important parameter in IM spectrometry. In contrast to MS, in IM spectrometry the collisional cross section determines the separation, and thus isomers can be separated. The ionization methods most frequently applied in IM spectrometry are either based on the evaporation of analytes with subsequent ionization in the gas phase by chemical ionization at atmospheric pressure (APCI) via electron or proton transfer reactions (e.g. with ^{63}Ni or corona discharge), or rely on the direct ionization of liquids by electrospray ionization (ESI) or matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI).^[9]

Only few applications of APCI-IM spectrometry for reaction monitoring have been reported. These include the online monitoring of monomer concentrations (vinyl acetate) in (semi-) batch emulsion polymerization reactors^[10] and a kinetic study of the acetylcholine hydrolysis catalyzed by acetylcholinesterase (AChE) and its inhibition by neostigmine and galanthamine.^[11] In 2010, the company Excellims demonstrated reaction monitoring of the Michael addition of cyclohexylethylamine to dimethylitaconate using ESI-IM spectrometry.^[12] Several studies focus on the potential of ESI-IM in combination with mass spectrometry (IM-MS) for reaction monitoring. In one study,^[13] the monitoring

of the reaction products formed when 7-fluoro-6-hydroxy-2-methylindole is deprotonated by aqueous sodium hydroxide were investigated demonstrating the advantages of the IM-MS method combination. Other works show the detection of short-lived intermediates and quantitative investigations monitoring the reductive amination reaction of nicotinaldehyde and 4-picolylamine to di-(2-picolyl)amine.^[14] In another study, the combination of stable isotope labelling with direct infusion IM-MS was investigated for qualitative and quantitative monitoring of biocatalytic reactions.^[15] This approach was applied to lipase and monooxygenase enzymes and included multi-substrate screening.

However, for the less expensive stand-alone ESI-IM spectrometry, a demonstration of the quantitative monitoring of all components of a reaction mixture is still missing. Thus, in this work, the capability of ESI-IM spectrometry, as a stand-alone method or in combination with HPLC, for qualitative and quantitative reaction monitoring was evaluated. The enhancement of the separation power by the combination of HPLC with ESI-IM spectrometry is based on our previous work.^[16,17] A three-step reaction consisting of a Williamson ether synthesis followed by a hydrogenation and an *N*-alkylation reaction was chosen for the characterization of reaction monitoring by ESI-IM spectrometry. These reaction steps are frequently used in chemical synthesis. The ether synthesis and the alkylation are representatives for classical electrophilic or nucleophilic substitutions, whereas the hydrogenation is an example for a heterogeneous catalysis. However, the product is BAPTA-AM, which is a precursor of the calcium sensor BAPTA that is used for spectroscopic *in vivo* measurements in biological applications.^[18,19]

2 Results and Discussion

In this work, all three steps of the reaction sequence (Fig. 1) were monitored during the total reaction time. Each reaction step was carried out separately in a flask. The reaction conditions of every step were based on literature-known syntheses.^[20–23] The detailed conditions can be found in the supplementary information (S.1.2 Synthesis). Every step was followed by a work up and the purified products were analyzed by standard analytical methods before being used as the starting materials for the respective next step. At different reaction times, samples were taken by syringe and introduced into the ESI-IM spectrometer (for details see experimental section). The following chapter is divided into three subchapters which are focused on the determination of reaction intermediates and products (chapter 2.1), on different tasks of reaction monitoring based on the pure intensities (chapter 2.2) and on two methods allowing the quantification of all components in the reaction mixture (chapter 2.3). In these subchapters, ESI-IM spectrometry is characterized stand-alone as well as in combination with HPLC for pre-separation. In each chapter, only one reaction step is discussed for demonstration purposes.

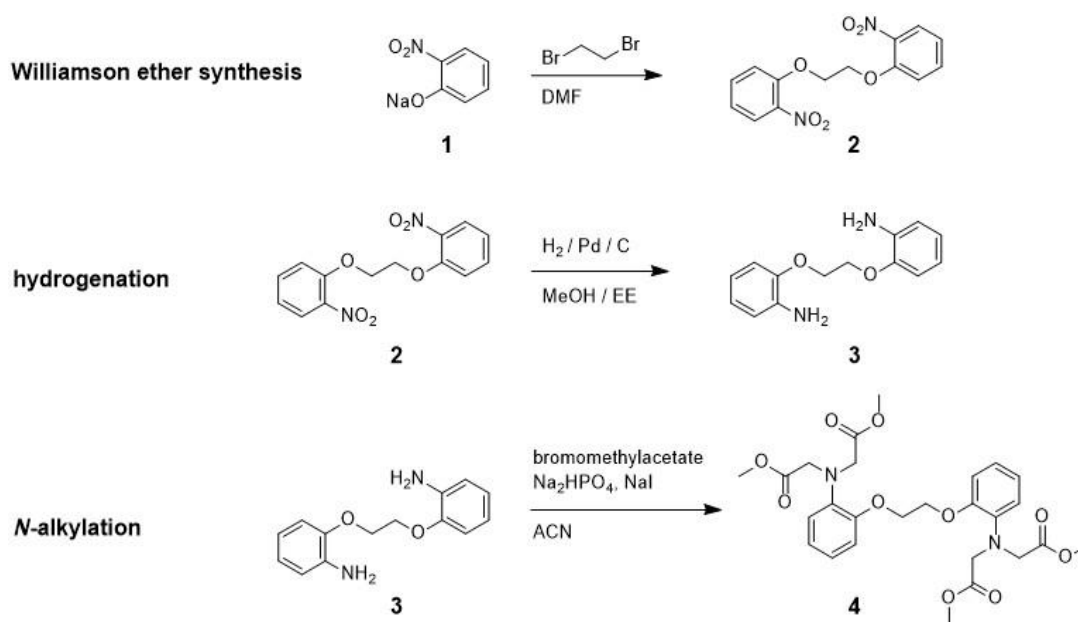


Fig. 1 - Reaction sequence starting from 1,2-dibromoethane and sodium 2-nitrophenoxide to 1,2-bis(aminophenoxy)ethane-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid methylester (BAPTA-AM)

2.1. Intermediate and product detection

2.1.1 Direct detection by IM spectrometry

ESI-IM spectrometry enables a very fast detection of intermediates and products. For a demonstration, the *N*-alkylation of substance **3** to **4**, which constitutes the most complex reaction step and includes the highest number of intermediates, was chosen. In Fig. 2a, three IM spectra taken after 3 min, 25 min and 390 min reaction time are shown. In the IM-spectra, the discharge current (intensity in nA) of all ions arriving the detector at the same drift time is plotted over their drift time (drift time in ms). The peak group between 5-7 ms observed in all IM spectra is due to solvent cluster ions. The five peaks between 9-15 ms can be assigned to the starting material, different intermediates and the product. They have a constant peak-to-peak distance of $\Delta t_D \approx 1.13$ ms indicating a structural relation as well as a constant mass difference between neighboring peaks. In the IM spectrometry literature, there are several examples of substances belonging to homologous series showing good drift time (or inverse ion mobility) – mass correlations, facilitating simple mass assignments of unknown members of the series.^[24] Assuming singly protonated molecules ($M+1$) for the five peaks between 9-15 ms, as they are usually observed for small molecules in ESI, the drift times of the corresponding ions can be plotted against the mass-to-charge-ratio (m/z) in order to verify the species. The high correlation of the detected constituents shown in figure 2b possesses a coefficient of determination of $R^2 = 0.99$ and allows a reliable assignment of the IM peaks to constituents of the reaction mixture. The starting material has the lowest drift time. Increasing degrees of *N*-alkylation lead to a peak shift to higher drift times. Thus, the peak with the highest drift time can be assigned to the product and the intermediates to the one-, two- and three-times substituted species of the starting material **3**. The assumed $M+1$ peak for the starting material and product was verified via MS measurements (see supplementary information). In contrast to the HPLC separation (Fig. 3) which shows a less clear order of substance peaks, in IM spectrometry, analytes are ordered by size.

There is an alternative, more elaborate way of peak assignment based on the quantum chemical calculation of substance structures and the subsequent determination of collision cross sections by programs calculating collision trajectories.^[25–27] Mobilities can be obtained from the cross sections by the Mason equation [Eq. (1)]. The cost of calculation increases in the case of flexible molecules. There, all energy-averaged conformations must be regarded by applying molecular dynamics simulations.

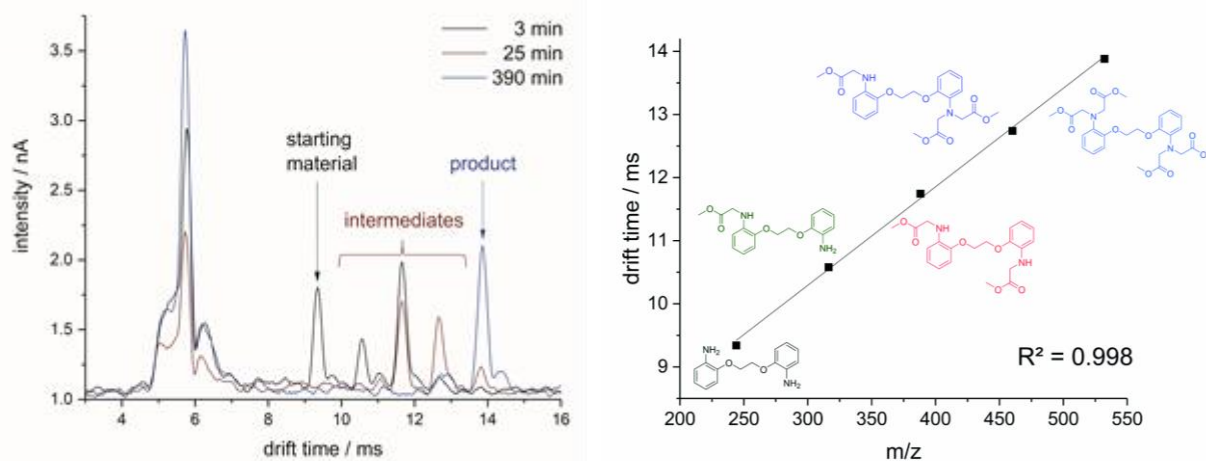


Fig. 2 - Consecutive *N*-alkylation of substance **3** to **4** - a: IM spectra at different reaction times (drift time between 5-7 ms solvent cluster peak and between 9-14 ms the five different species of the *N*-alkylation) - b: direct determination of the five species of the *N*-alkylation via drift time vs. mass-to-charge-ratio (*m/z*)

2.1.2 Two-dimensional detection by HPLC IM spectrometry

The peak capacity *n* in IM spectrometry is often limited to $n < 10$. Thus, the combination of IM spectrometry with a separation method of high orthogonality, e.g. HPLC, can facilitate the complete separation of complex reaction mixtures. New information can appear due to the complementary separation on the LC column and in the drift tube. Due to the different time scales of HPLC (minutes) and IM spectrometry (milliseconds), both methods can be easily combined yielding 2D spectra consisting of the dimensions retention and drift time.^[16,17] A 2D spectrum of the consecutive *N*-alkylation from **3** to **4** is shown in figure 3 at the reaction time corresponding to the maximum intensity of the disubstituted species (5min). All constituents of the reaction mixture can be separated in the plane of the 2D spectrum. The species can also be determined via drift time vs. *m/z* ratio, as in the 1D IM spectrum. In comparison to the 1D IM spectrum additional compounds are found. In addition to the five species found in the IM spectra (Fig. 2a), the disubstituted species peak is split into two different peaks that can be assigned to two constitutional isomers. The *N,N*-disubstituted species has the two alkyl chains on the same nitrogen atom. In the *N,N'*-disubstituted species, each nitrogen atom is connected to an alkyl chain. The *N,N*-disubstituted species elutes first because of its higher polarity. Own computational calculations with density functional theory (DFT) show that the charge density at the nitrogen atom becomes smaller with increasing substitution due to the electron withdrawing effect of the carbonyl group. This correlates with approximations of the pK_a value which decreases at higher substitution.^[28] The area of the first peak is only half the value of the second peak's area. This suggests that the *N,N'*-substitution is preferred. This experimental result is in agreement with quantum

chemical calculations on the reaction pathway. The three-step calculation procedure starts with a systematic variation of the torsion angle in AMBER followed by PM7 and B3LYP/6-31G(d)+D3 optimizations (see supplementary material - S.3). The energy calculated for the ground state conformation of the *N,N'*-substituted species is 33 kJ/mol below that of the corresponding *N,N*-isomer. This difference could explain the preferred formation. The separation on the reversed phase LC column is poor. The effect of the increasing mass gained with each additional *N*-alkylation step is canceled by the increasing polarity of the alkylated amine due to the carbonyl groups.

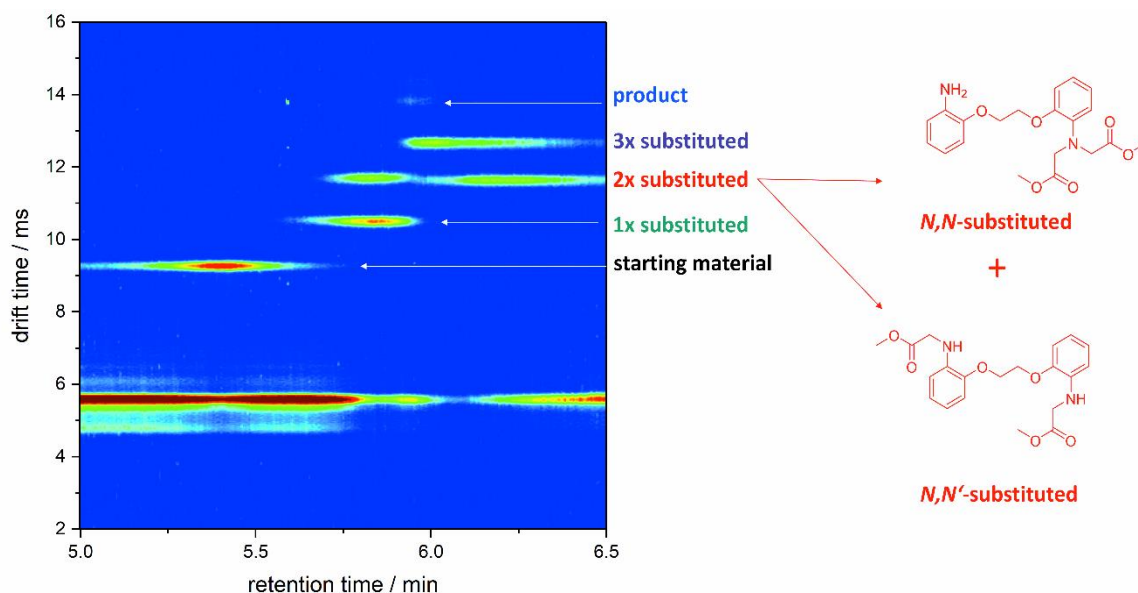


Fig. 3 - Consecutive *N*-alkylation of substance **3** to **4** - HPLC ESI-IMS spectrum at 5 min reaction time (the color of the words refer to Fig. 2b for color code of the substances, drift time between 5-7 ms solvent cluster peak and between 9-14 ms the five different species of the *N*-alkylation)

2.2 Process monitoring

In certain process monitoring tasks, exact knowledge of concentrations is not always required. Tracking relative intensities can provide the necessary information. These tasks include the detection of the end of reaction, the determination of the rate-limiting step, the observation of the system response in discontinuous processes and the optimization of the mass ratio of the starting materials.

2.2.1 Direct monitoring by IM spectrometry

After the qualitative determination of the components in the reaction mixture, their temporal appearance profile is interesting because it allows the determination of the rate-limiting step and the deduction of the reaction mechanism. As IM spectra can be measured in less than one second, IM spectrometry enables the measurement of a large number of samples in a short time and thus nearly real-time monitoring (sampling is the limiting factor). The reaction progress of the *N*-alkylation was monitored over 24 h and is presented in figure 4. In the figure, the normalized intensities of all five *N*-alkylation species over the reaction time are displayed, enabling a conversion control. The intensity maxima of all components are passed sequentially. Furthermore, the time between subsequent

intensity maxima increases. This indicates a decrease in the rate constants of each additional alkylation step. The rate-limiting step is the last alkylation step. One reason could be the steric hindrance of the three alkyl chains that impedes this last alkylation.

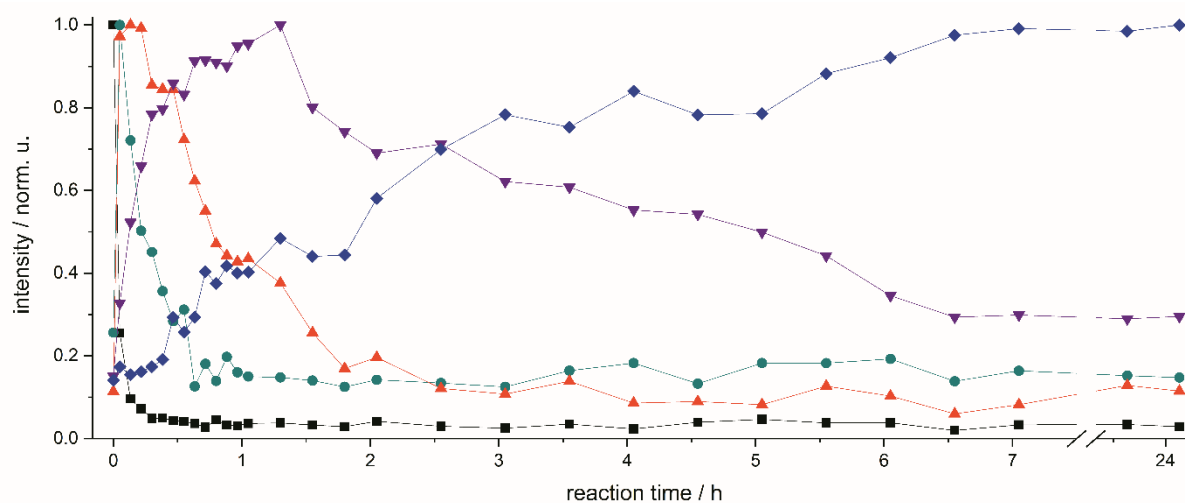


Fig. 4 Consecutive *N*-alkylation of substance **3** to **4** over the reaction time (refer to Fig. 2b for the color code: black - starting material **3**, cyan - 1x substituted species of **3**, red - 2x substituted species of **3**, purple - 3x substituted species of **3**, dark blue - product **4**, intensities were normalized separately)

A well-known problem in ESI is charge competition between analytes which can lead to their partial or complete suppression. As already discussed, the negative charge density at the nitrogen decreases with each alkylation step. This is reflected in the pK_a values which also decrease with each alkylation step. It is thus probable that the intensity curves are influenced by charge competition.^[29] Therefore, HPLC-IM spectrometry measurements (not shown) were carried out to address this issue. Although the intermediates could not be separated completely in the LC dimension, the curves of the educt, intermediates and the product in figure 4 could be qualitatively reproduced, indicating that the influence of the charge competition effect is not strong.

2.2.2 Monitoring by HPLC IM spectrometry

The focus of the last subchapter was the detection of the end of reaction and the determination of the rate-limiting step. In this paragraph a discontinuous process is simulated, allowing the observation of the system response and the optimization of the mass ratio of the starting materials. In comparison to the *N*-alkylation, charge competition is much stronger among the species involved in the Williamson ether synthesis. Therefore, HPLC-IM spectrometry was used for reaction monitoring.

The discontinuous process is simulated by stepwise injection of the starting material **1**, changing the molar ratio between both starting materials from 1:1 to 3:1. The intensities of the starting material **1** (black), the intermediate (green) and the product **2** (blue) were monitored (Fig. 5). After each injection, the concentration of the starting material immediately rises before it declines and, after a short initial period, the product concentration increases before it reaches a plateau. The temporal concentration profile of the intermediate is more interesting. The reaction pathway shown on the top of figure 5 shows that first, the starting material **1** reacts with 1,2-dibromoethane to form the intermediate.

Secondly, the intermediate reacts with **1** again to product **2**. Thus, for the formation of product **2**, 1 mol of 1,2-dibromoethane and 2 mol of **1** are needed. Due to the initial molar ratio (1:1), the intermediate is formed as the main product. After the second injection, a strong increase of the concentration of the intermediate caused by the reaction of **1** with the remaining 1,2-dibromoethane is observed. Subsequently, the intermediate reacts to the product due to the optimal molar ratio between both starting materials. After the third injection, the intensity of the intermediate is not increased any further due to the surplus of starting material **1**. Thus, the ratio of both starting materials **1** and 1,2-dibromoethane determines the reaction yield and the concentration level of the intermediate.

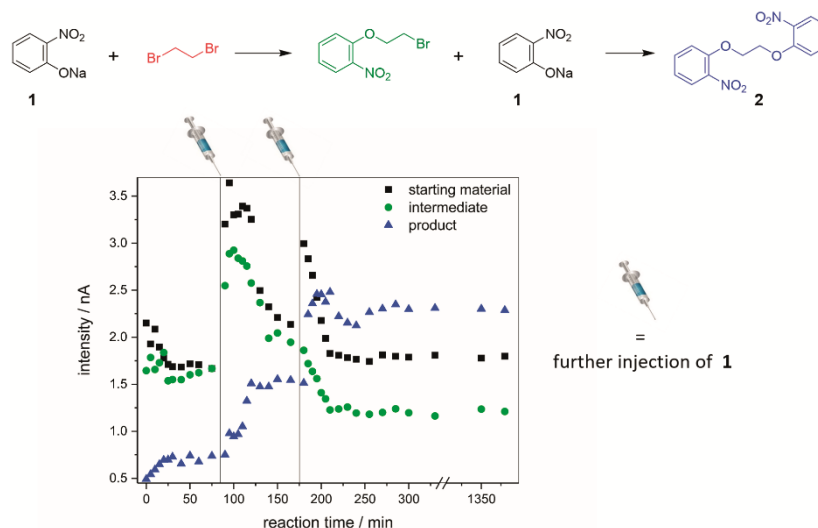


Fig. 5 - Intensity over reaction time of the Williamson ether synthesis for starting material **1**, intermediate and product **2** with a stepwise injection of starting material **1**

2.3 Quantification

Charge competition influences the quantitative detection of all compounds in the reaction mixture. Thus, two different methods which consider this effect and allow the quantitative determination of all substances were investigated. The first method is based on the pre-separation of the compounds on an HPLC column and the subsequent individual detection in the ESI-IM spectrometer. The second method involves an extended calibration procedure which takes charge competition effects into account. The benefit of this method is the nearly real-time quantification by direct IM spectrometry without the need of a pre-separation step. For the illustration of both methods, the hydrogenation as a heterogeneous reaction was chosen.

2.3.1 HPLC-IM spectrometer: quantification, kinetics and conversion control

The separate calibrations of the isolated starting material **2** and product **3** show a linear range of about two orders of magnitude (Fig. 6a). Based on this calibration and the pre-separation of all constituents of the reaction mixture, concentration-time profiles over the complete reaction time were determined (Fig. 6b). Three features are noteworthy in these profiles. The first is the fast drop of the concentration

of **2** due to adsorption on the activated carbon (catalyst) which is not sampled. The second feature is the linear decrease of the concentration of the starting material after this initial period of adsorption and the linear increase of the concentration of the product with the reaction time. After 90 min, a plateau of **2** and **3** is reached, signifying the final conversion of the reaction. Fitting the linear segment yields good coefficients of determination ($R^2 = 0.86$ for **2**, $R^2 = 0.97$ for **3**). This allows the determination of rate constants and indicates a reaction order of zero. The zero-order rate constants obtained for the decrease of the starting material is $k_2 = (2.1 \pm 0.2) \mu\text{mol s}^{-1} \text{L}^{-1}$ and for the formation of the product is $k_3 = (2.2 \pm 0.1) \mu\text{mol s}^{-1} \text{L}^{-1}$. Both rate constants have very similar values, indicating that side reactions do not occur.

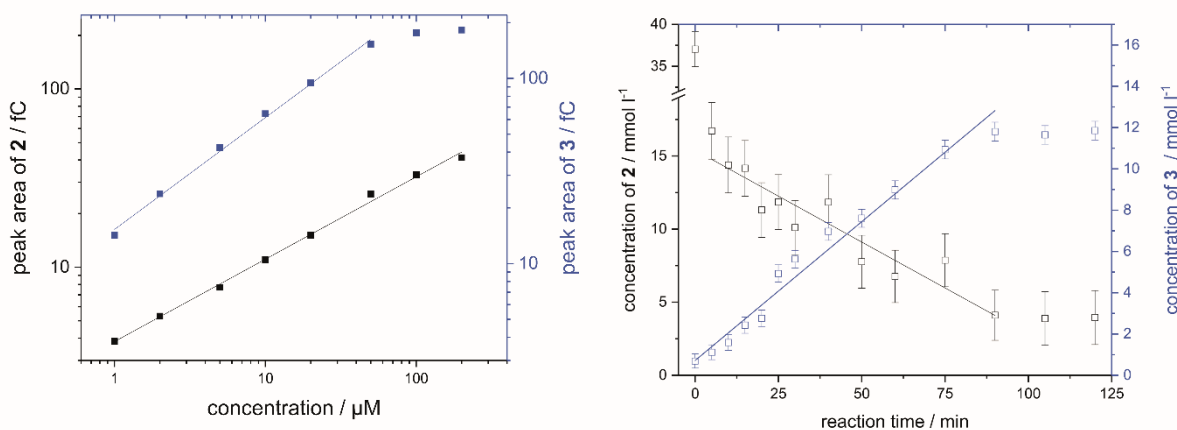


Fig. 6 - Reaction monitoring of the hydrogenation **2** (black traces) yielding **3** (blue traces) with HPLC ESI-IM spectrometry - a: calibration and b: concentration over reaction time

2.3.2 IM spectrometer: direct quantification

The quantification without pre-separation on an HPLC column requires an extended calibration procedure which considers charge competition effects. In addition to the normal calibration procedure of the individual substances, the mutual suppression of starting material and product must be regarded. One possible way is the calculation of concentration-dependent correction factors. The correction factors are based on the fact that there are a limited number of charges in a droplet produced during the ESI process.^[30] If there is only one ionizable compound in the droplet, all charges are available to it. If there are more than one ionizable compound, all compounds compete for the same pool of charges. Assuming the overall number of ions produced by ESI is nearly constant, the sum area of all IM-peaks should be nearly constant as well (neglecting diffusion processes). The following procedure for the calculation of the correction factors was applied: IM spectra with a constant concentration of **2** and a varying concentration of **3** were measured and vice versa. In the absence of **3**, the peak intensity of **2** is in the maximum. Increasing concentrations of **3** lead to a loss in the peak intensity of **2**. The maximum peak intensity of **2** divided by the peak intensity of **2** at a defined concentration of **3** yields to an individual correction factor. The correction factor (CF) depends on the relative intensity of both compounds. Hence, for every intensity ratio of **2** and **3** there is a CF for each compound. The relationship for **2** is displayed in Fig. 7a and can be described by an asymptotic

function. Nonlinear regression gives the following function parameters $CF = 0.89 - 1.07 \times 0.98^x$ and $R^2 = 0.995$. Here, x describes the ratio of the intensities of starting material **2** and product **3**. The correction function was applied to the peak intensities, yielding concentrations. The temporal concentration profiles obtained by both methods, HPLC-IM spectrometry and direct IM spectrometry with extended calibration procedure, are compared in Fig. 7b.

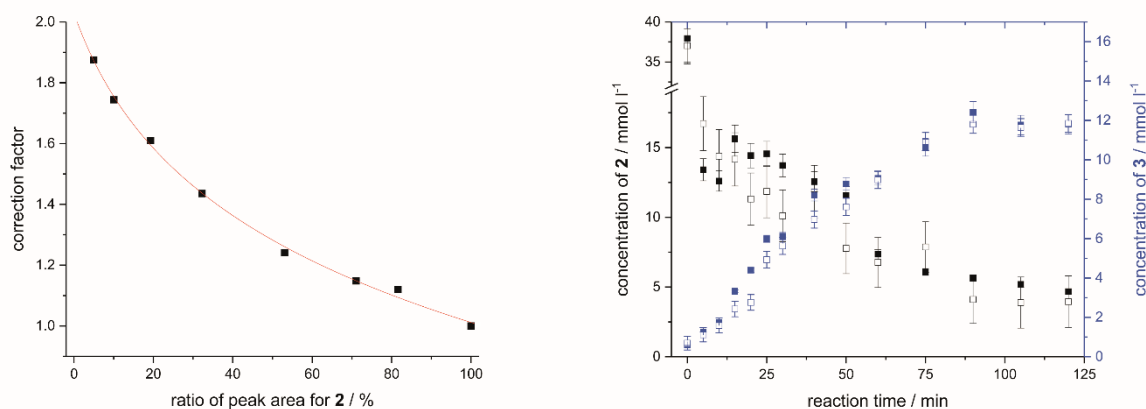


Fig. 7 - Reaction monitoring of the hydrogenation with ESI-IM spectrometry - a: correction factor of **2** for charge competition as a function of the ratio of intensities of **2** and **3**, b: concentrations of **2** (black) and **3** (blue) over reaction time in direct ESI-IM spectrometry (filled symbols) vs. HPLC-ESI-IM spectrometry (open symbols)

Both methods yield similar results. However, this finding might only apply to this specific case, since the range of concentrations investigated is relatively narrow. For a more general approach, the correction factor vector used here should be extended to a correction matrix that takes additional constant concentrations of **2** at varying concentrations of **3** (and vice versa) into account.

3 Conclusions

This work demonstrates that ESI-IM spectrometry can be applied for reaction monitoring. A three-step reaction sequence consisting of a Williamson ether synthesis followed by a hydrogenation and an *N*-alkylation step were investigated. On the one hand, the stand-alone IM spectrometry can be used for qualitative and quantitative real-time monitoring of reaction mixtures of low complexity. On the other hand, the inclusion of a pre-separation step via HPLC enables the investigation of more complex mixtures albeit at the expense of the real-time ability. IM spectrometry was shown to provide the determination of all reaction participants including intermediates, relative intensity based (without calibration) monitoring and concentration-based (with calibration) monitoring of the reaction process.

The determination of the various compounds is based on their ion mobilities, which are characteristic physical constants for any ion-drift gas molecule pair. A reliable assignment of substances based on the measured mobilities can require demanding DFT calculations. However, simple drift time-mass correlations of the reactants are often sufficient. But IM resolutions are often limited to 60 results in overlapping peaks in the IM-spectrum.^[31] If the composition of the reaction mixture is too complex for

stand-alone IM spectrometry, two dimensional LC-IM spectrometry can enable the separation of all substances. The separation benefits from the high orthogonality of the different separation principles.^[16]

Relative intensity-based measurements can yield valuable information avoiding extensive calibration. This could be shown for the detection of the end of reaction, the determination of the rate-limiting step, the observation of the system response in discontinuous processes and the optimization of the mass ratio of the components of starting material. Charge competition in ESI process can influence the measured intensities, even complete suppression of some substances is possible. To address this, two-dimensional HPLC-IM spectrometric separations should be carried out for evaluation of these charge competition effects.

If the charge competition effects cannot be neglected, LC-IM spectrometric separation in combination with calibration yields concentration information of the reaction process. An alternative allowing nearly real-time measurements is the application of an extended calibration procedure. Although this procedure usually requires a large number of measurements, a simplified version applied in this work can give sufficient results.

4 Experimental Section

All IM spectra were recorded with a home-built ESI-IM spectrometer which was already described in detail.^[17] The spectrometer is divided into four sections. The first part is the cylindrical ionization region (inner diameter, ID = 30 mm) containing an ESI capillary (Hamilton, gauge 32) inserted into a 1/16" steel capillary arranged orthogonally to the axis of the IM spectrometer. This region is followed by a desolvation (length = 50 mm, outer diameter, OD = 47.5 mm, ID = 25 mm, thickness = 23 mm, repeating unit = 3.17 mm, T = 160°C) and a drift region (length = 100 mm, OD = 47,5 mm, ID = 25 mm, thickness = 2.54 mm, repeating unit = 3.17 mm, T = 140°C) separated by an ion gate in the Bradbury-Nielsen design. The fourth part is the detection region consisting of a Faraday plate with a diameter of 18 mm connected to a 10⁹ V/A amplifier (Physimetron A6203) and an oscilloscope (Handyscope HS3, Tiepie). Nitrogen 5.0 (Praxair) was used as drift gas (flow rate = 1.3 l/min) and the sheath gas (flow rate = 1.8 l/min).

The HPLC system for the pre-separation of the reaction mixture consists of a LPG pump (Azura P 6.1L, KNAUER), an injection valve (KNAUER) and a reversed phase (RP) column (Hypersil Gold, Thermo, 100 x 2.1 mm, 3 µm). The mobile phase of all reaction mixture separations was composed of acetonitrile (solvent A) and 0.1 % aqueous formic acid (solvent B) and the flow rate was 300 µl/min. Different solvent gradients were used for the following reaction mixtures:

1. Consecutive alkylation: 0-3 min, 30 % A; 3-4 min, 30-90 % A; 4-7 min, 90% A
2. Alkylation: 0-1 min, 30 % A; 1-2 min, 30-90 % A; 2-5 min, 90% A
3. Hydrogenation: 0-3 min, 30 % A; 3-4 min, 30-90 % A; 4-7 min, 90% A

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge the financial support for this research received from the German Federal Ministry for Economic Affairs and Energy (BMWi) through the AiF (Grant No. KF2167703NT2) and Rainer Neumann for the quantum-chemical calculations. Experimental work was supported by Stefan Mies.

References

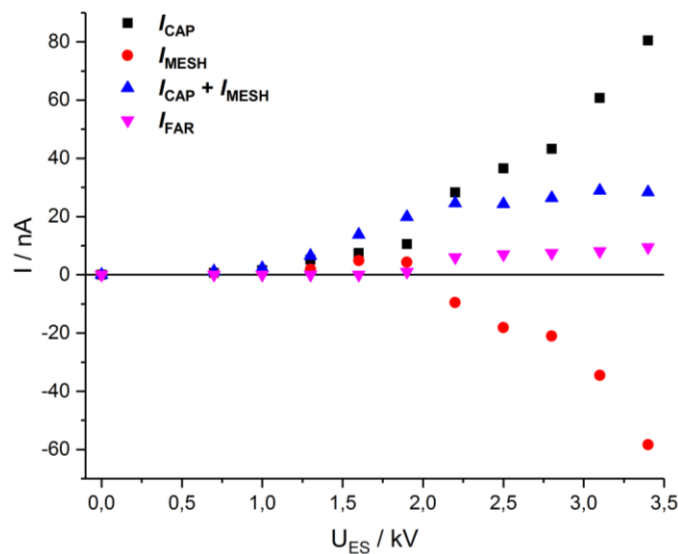
- [1] N. Heigl, C. Petter, M. Rainer, M. Najam-ul-Haq, R. Vallant, R. Bakry, G. Bonn, C. Huck, *J. Near Infrared Spectrosc.* **2007**, *15*, 269–282.
- [2] K. Grabow, U. Bentrup, *ACS Catal.* **2014**, *4*, 2153–2164.
- [3] K. A. Esmonde-White, M. Cuellar, C. Uerpmann, B. Lenain, I. R. Lewis, *Anal. Bioanal. Chem.* **2017**, *409*, 637–649.
- [4] F. Dalitz, M. Cudaj, M. Maiwald, G. Guthausen, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2012**, *60*, 52–70.
- [5] L. S. Santos, *Reactive Intermediates : MS Investigations in Solution*, Wiley-VCH, Weinheim, **2009**.
- [6] D. Schröder, *Acc. Chem. Res.* **2012**, *45*, 1521–1532.
- [7] W. A. Schafer, S. Hobbs, J. Rehm, D. A. Rakestraw, C. Orella, M. McLaughlin, Z. Ge, C. J. Welch, *Org. Process Res. Dev.* **2007**, *11*, 870–876.
- [8] E. A. Mason, E. W. McDaniel, *Transport Properties of Ions in Gases*, John Wiley & Sons, Inc, Weinheim, FRG, **1988**.
- [9] H. Borsdorf, T. Mayer, M. Zarejousheghani, G. A. Eiceman, *Appl. Spectrosc. Rev.* **2011**, *46*, 472–521.
- [10] W. Vautz, W. Mauntz, S. Engell, J. I. Baumbach, *Macromol. React. Eng.* **2009**, *3*, 85–90.
- [11] S. Armenta, M. Blanco, *Anal. Chim. Acta* **2011**, *685*, 1–8.
- [12] C. Krueger, C. Hilton, M. Osgood, J. Wu, C. Wu, *Appl. Note IMS-2010-01A* **2010**, 1–4.
- [13] E. L. Harry, A. W. T. Bristow, I. D. Wilson, C. S. Creaser, *Analyst* **2011**, *136*, 1728–1732.
- [14] K. M. Roscioli, X. Zhang, S. X. Li, G. H. Goetz, G. Cheng, Z. Zhang, W. F. Siems, H. H. Hill Jr., *Int. J. Mass Spectrom.* **2013**, *336*, 27–36.
- [15] C. Yan, J. W. Schmidberger, F. Parmeggiani, S. A. Hussain, N. J. Turner, S. L. Flitsch, P. Barran, *Analyst* **2016**, *141*, 2351–2355.
- [16] M. Zühlke, D. Riebe, T. Beitz, H.-G. H.-G. Löhmannsröben, S. Andreotti, K. Reinert, K. Zenichowski, M. Diener, *J. Sep. Sci.* **2016**, *39*, 4756–4764.
- [17] M. Zühlke, D. Riebe, T. Beitz, H.-G. Löhmannsröben, K. Zenichowski, M. Diener, M. W. Linscheid, *Eur. J. Mass Spectrom. (Chichester, Eng)*. **2015**, *21*, 391–402.
- [18] R. Pethig, M. Kuhn, R. Payne, E. Adler, T. H. Chen, L. F. Jaffe, *Cell Calcium* **1989**, *10*, 491–8.
- [19] K. Jahn, C. Hille, *PLoS One* **2014**, *9*, e105334.
- [20] S. Heilporn, F. Broeders, D. Daloz, J. C. Braekman, J. M. Boeynaems, *Bull. des Sociétés Chim. Belges* **1994**, *103*, 309–319.
- [21] R. Y. Tsien, *Biochemistry* **1980**, *19*, 2396–2404.
- [22] Y. M. A. Naguib, *Molecules* **2009**, *14*, 3600–3609.
- [23] G. Gryniewicz, M. Poenie, R. Y. Tsien, *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 3440–3450.

- [24] H. Borsdorf, H. Schelhorn, J. Flachowsky, H.-R. Döring, J. Stach, *Anal. Chim. Acta* **2000**, *403*, 235–242.
- [25] M. F. Mesleh, J. M. Hunter, A. A. Shvartsburg, G. C. Schatz, M. F. Jarrold, *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 16082–16086.
- [26] A. A. Shvartsburg, M. F. Jarrold, *Chem. Phys. Lett.* **1996**, *261*, 86–91.
- [27] I. Campuzano, M. F. Bush, C. V. Robinson, C. Beaumont, K. Richardson, H. Kim, H. I. Kim, *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 1026–1033.
- [28] A. C. Lee, G. M. Crippen, *J. Chem. Inf. Model.* **2009**, *49*, 2013–2033.
- [29] L. W. Beegle, I. Kanik, L. Matz, H. H. Hill Jr., *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 3028–34.
- [30] G. S. Jackson, C. G. Enke, *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 3777–3784.
- [31] K. Cottingham, *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 435 A-439 A.

3.4 ESI-IM-Spektrometer im intermediären Druckbereich

“Subambient pressure electrospray ionization ion mobility spectrometry”

Zühlke, M.; Zenichowski, K.; Riebe, D.; Beitz, T.; Löhmannsröben, H.-G.,
Int. J. Ion Mobil. Spec. **2017**, *20* (1), 47–56.



Die Publikation beinhaltet folgende Kapitel:

In dieser Publikation wird die Charakterisierung des ESI-Sprays mithilfe eines Kapillar-Platten-Aufbau im intermediären Druckbereich (300-1000 mbar) in einer Hochvakuumkammer vorgestellt. Weiterhin erfolgten Strommessungen an verschiedenen Elementen des IM-Spektrometers zur Ermittlung von Ladungsverlusten im IM-Spektrometer im selben Druckbereich. Anschließend wurde die analytische Anwendung des IM-Spektrometers im intermediären Druckbereich untersucht.

Beitrag des Autors zur Publikation:

Bei dieser Publikation setzte ich den Aufbau des Kapillar-Platten-Designs in einer Hochvakuumkammer um und führte die Streulicht- und Strommessungen im intermediären Druckbereich mit diesem Aufbau durch. Die Grundlage der Messungen am ESI IM-Spektrometer bildete die hohe Gasdichtigkeit des im ersten wissenschaftlichen Artikel präsentierten Spektrometers der Firma KNAUER. Bei verminderten Druck wurden alle Strommessungen an den Bauteilen des ESI IM-Spektrometers, sowie die Aufnahme von IM -Spektren durch mich vollzogen. Die Auswertung der gewonnen Daten wurde ebenfalls von mir realisiert. Fernerhin war ich an der Diskussion zu den Ergebnissen maßgeblich beteiligt und bereitete alle Bilder für das Paper vor und schrieb in enger Zusammenarbeit mit den Koautoren die Publikation.

Manuscript of

M. Zühlke et al., *Int. J. Ion Mobil. Spec.* **2017**, 20 (1), 47–56

Received: 10 February 2017 • Accepted: 20 February 2017 • Published online: 27 February 2017

Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2017

Subambient pressure electrospray ionization ion mobility spectrometry

M. Zühlke, K. Zenichowski, D. Riebe, T. Beitz, H.-G. Löhmannsröben

University of Potsdam, Physical Chemistry, Karl-Liebknecht-Str. 24-25, 14476 Potsdam, Germany

Abstract

The pressure dependence of sheath gas assisted electrospray ionization (ESI) was investigated based on two complementary experimental setups, namely an ESI-ion mobility (IM) spectrometer and an ESI capillary - Faraday plate setup housed in an optically accessible vacuum chamber. The ESI-IM spectrometer is capable of working in the pressure range between 300 and 1000 mbar. Another aim was the assessment of the analytical capabilities of a subambient pressure ESI-IM spectrometer. The pressure dependence of ESI was characterized by imaging the electrospray and recording current-voltage ($I-U$) curves. Qualitatively different behavior was observed in both setups. While the current rises continuously with the voltage in the capillary-plate setup, a sharp increase of the current was measured in the IM spectrometer above a pressure-dependent threshold voltage. The different character can be attributed to the detection of different species in both experiments. In the capillary-plate experiment, a multitude of charged species are detected while only desolvated ions attribute to the IM spectrometer signal. This finding demonstrates the utility of IM spectrometry for the characterization of ESI, since in contrast to the capillary-plate setup, the release of ions from the electrospray droplets can be observed. The $I-U$ curves change significantly with pressure. An important result is the reduction of the maximum current with decreasing pressure. The connected loss of ionization efficiency can be compensated by a more efficient transfer of ions in the IM spectrometer at increased E/N . Thus, similar limits of detection could be obtained at 500 mbar and 1 bar.

Keywords

Ion mobility spectrometry, Electrospray ionization, subambient pressure, Imaging

1 Introduction

The introduction of electrospray ionization (ESI) in mass spectrometry (MS) enabled the fragment-free, routine investigation of biomacromolecules such as peptides and proteins for the first time. As early as 1972 [1], a first work on ESI-ion mobility (IM) spectrometry was published. In the 1990s, the technique was systematically advanced [2]. In MS or IM-MS, ESI is usually carried out under atmospheric pressure. The ions, solvated cluster ions and charged nano-droplets formed are then transferred through a capillary into a first vacuum stage of the mass spectrometer. This transfer entails significant ion losses as a result of the low spatial overlap of spray cone and capillary orifice as well as ions being discharged within the capillary. Therefore, there are endeavors to carry out ESI directly in the first vacuum stage. The ions formed there can be transferred into the next vacuum stage of the mass spectrometer with high efficiency by using an ion funnel. The technical feasibility has already been demonstrated in a number of works [3–5]. The lower pressure limit for ESI is found at approximately 40 mbar. Further decrease of the pressure is prevented by the vapor pressures of commonly used HPLC solvents and electrical discharges (Paschen's law) at voltages required for ESI. At very low pressures, in the high vacuum range, nonvolatile electrolytes such as ionic liquids or liquid metals can in principle be dispersed by ESI. A promising and highly investigated application of ESI in vacuum is in the field of space propulsion [6].

Motivated by this application, a large number of systematic experimental investigations for the characterization of ESI in vacuum have been initiated [7–9]. In the intermediate pressure range between 30-1000 mbar, the number of publications is considerably lower. In an investigation of the current-flow rate dependence of the electrospray in the Taylor cone regime, the authors could show that the current in highly conductive liquids (conductivity $\kappa > 10^{-2}$ S/m) is largely unaffected by the nature (air, CO₂, SF₆) and pressure (170-2000 mbar) of the surrounding gas [10]. Another study enquired into a pulsating electrospray at intermediate pressures [11]. The authors reported a linear dependence between logarithmic pressure and the ESI voltage if the ion current was maintained constant. With respect to the electric field E they suggested the scaling law $E \sim U_{ES} / \ln(p)$ which amends the equation $E = c U_{ES} / (r \ln(4d/r))$ [12]. This equation describes the electric field at the tip of the ESI capillary. In the equation, r is the capillary radius, d the distance between capillary and counter electrode, and c is a constant. Furthermore, the authors mention that the pressure region for stable ESI is limited by the vapor pressure of the liquid [11].

In the literature concerning IM spectrometry, the use of an ESI source at intermediate pressure has not been reported so far. Currently used drift tubes are operated either at pressures below 10 mbar or at 1 bar, whereas the ESI source is always operated at atmospheric pressure. Therefore, an evaluation of the optimal pressure range for the operation of an ESI source in an IM spectrometer is unavailable yet. In this work, our IM spectrometer, developed as an HPLC detector covering solvent flow rates of 1-1500 $\mu\text{l}/\text{min}$ [13], was employed for this purpose. A sheath gas assisted ESI source is employed in order to achieve this large flow range. The spectrometer can be operated in the pressure range of 300-1000 mbar and with two separate configurations of the ESI capillary, one of which is in axial while the other is in orthogonal alignment with the drift tube. In this work, only the axial alignment has been studied in depth.

The work has two major aims. First, the characterization of the electrospray is the basis of assessing the optimal pressure range for an ESI-IM spectrometer. Characterizations of ESI are frequently carried

out by imaging the spray cone as well as recording $I-U$ curves at the counter electrode. From a physical-chemical perspective, ESI-IM spectrometry can be a valuable alternative and addition to these measurements, since it provides information on the release of ions and consequently on the ionization efficiency. Furthermore, sampling of the spray cone is more representative than in MS and transfer losses (larger area of acceptance, i.e. inner diameter of the drift tube) are significantly decreased. For a proper characterization, possible sources of loss in the IM spectrometer and the resulting transfer efficiency and its pressure dependence had to be investigated. Second, one potential technical advantage of a subambient pressure IM spectrometer is the reduction of the voltages required in the drift tube. This is a result of the dependence of the drift time on the ratio of the electric field strength to the number density and consequently the pressure of the bathgas (E/N and E/p). Thus, at lower pressures, it is possible to achieve a constant drift time at lower voltages (at a constant E/N) or increase the efficiency of the transfer of ions into the drift tube at a constant voltage. A reduction of the high voltage is interesting from a cost as well as safety aspect.

2 Experimental Part

2.1 Instrumentations

In the intermediate pressure range, the ESI source was characterized by two different experiments: a capillary-plate experiment and a home-built IM spectrometer. The intermediary pressure was generated with the help of a vacuum membrane pump (Vacuubrand, PC 3004 vario). In both experiments, the ESI source was a steel capillary (Hamilton, 110 μm ID) inserted into a 1/16" steel capillary. A sheathgas flow through the outer capillary supported the spray process. The applied voltage at the ESI source relative to the counter electrode is described by U_{ES} .

ESI capillary-Faraday plate experiment. In this experiment, the ESI capillary was arranged in-axis to a Faraday plate ($\varnothing = 20$ mm) in a distance of 5 mm (Fig. 1a) with an applied voltage U_{ES} . The experiment was housed in a stainless-steel vacuum chamber ($\varnothing = 100$ mm), which has six orifices. Two orifices were used as windows for illuminating and one for imaging the electrospray. The other orifices were used as electrical feedthroughs. The beam of a light emitting diode (Thorlabs M405L3, $\lambda = 405$ nm, nominal emission power 870 mW) was focused with a lens ($\varnothing = 50$ mm, $f = 150$ mm) on the spray plume. Orthogonal to the plane defined by the spray axis and the LED beam, a macro objective (SIGMA, 105mm, F.28 EX DG, Japan) collects the scattered light and maps it to an EMCCD camera (iXON^{EM+} A-DU888-DC-UVB, Andor Technology). The current at the ESI capillary was measured as a voltage drop over a 10 M Ω resistor with a handheld multimeter (VOLTcraft VC175 CAT III). The resulting current at the Faraday plate (I_{TIC}) was amplified by a variable amplifier (FEMTO DLPCA-200) with an amplification factor of $1 \cdot 10^7$ V/A and fed to an oscilloscope (Handyscope HS3, TiePie engineering).

IM spectrometer. The home-built ESI-IM spectrometer was already described in detail [13] (Fig. 1b). It is divided into an ionization source, a desolvation and a drift tube separated by an ion gate (Bradbury-Nielsen design), and the Faraday detector. The desolvation tube has a length of 52 mm (stainless steel electrodes: outer/inner diameter OD/ID = 34/20 mm, 5 mm thickness, 6 mm repeating unit) and the

drift tube of 90 mm (stainless steel electrodes: OD = 50 mm, ID = 30 mm, 4 mm thickness, 5 mm repeating unit). Both tubes consist of a hard-soldered metal-ceramic composite, sealed via FKM O-rings towards its neighbour spectrometer parts. Therefore, the complete spectrometer including the ESI source is vacuum-tight. The applied voltages are U_{Desolv} for the desolvation region and U_{Drift} for the drift region. U_{IMS} is defined as the sum of both. The spectrometer possesses originally an orthogonal ESI source enabling flow rate between 1-1500 $\mu\text{l}/\text{min}$, which allows the application of the spectrometer as HPLC detector. In this work, an ESI source in an axial configuration was investigated. To keep the vacuum-tightness of the spectrometer, the ESI capillary was bent (see Fig. 1b). The tip of the ESI capillary is now centered in a distance of 5 mm to the inlet mesh of the desolvation tube. The applied voltage between ESI capillary and inlet mesh is U_{ES} . The currents at the ESI capillary (I_{CAP}), at the cylindrical ionization region (I_{CYL}), at the entrance mesh of the desolvation tube (I_{MESH}) and at the ion gate (I_{IG}) were measured as a voltage drop over a 10 M Ω resistor with two different handheld multimeter types (VOLT CRAFT VC175, VOLT CRAFT VC830). The resulting current at the Faraday plate (I_{FAR}) is amplified by an amplifier (FEMTO DLPCA-200) and fed to an oscilloscope (Handyscope, HS3, TiePie engineering). As drift gas nitrogen 5.0 (Air Liquide) was used with a flow of 1.3 l/min.

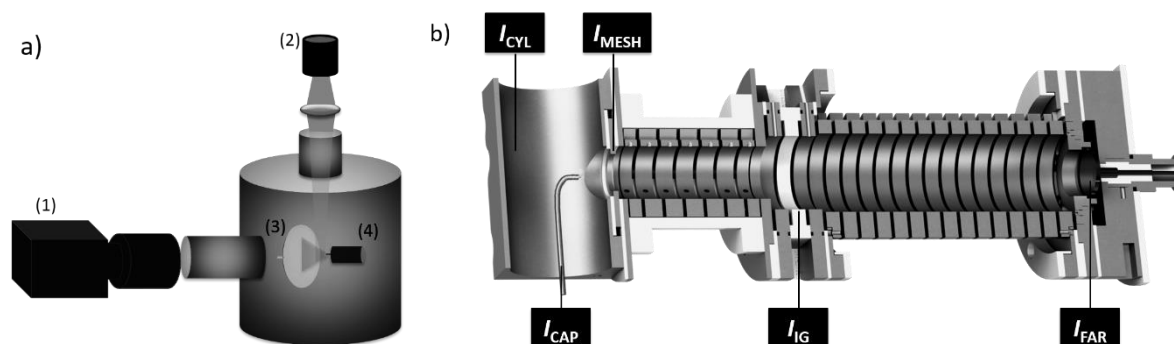


Fig. 1 a) Schematic drawing of the capillary-plate geometry in a vacuum chamber including EMCCD camera with macro objective (1), light emitting diode (2), Faraday plate (3), ESI source (4), and b) cutaway representation of the IM spectrometer with positions of the current measurements.

2.2 Chemicals

The solvents acetonitrile (Roth, HPLC-grade) and water (Milli-Q, Merck) were used in a ratio of 8:2 [v:v]. All substances including tetrabutylammonium bromide (TBAB, > 98 %), promazine hydrochloride (99,9 %), formic acid (FA, > 96 %) and L-arginine (> 98 %) were acquired from Sigma Aldrich.

3 Results

Spray characterization

While in ESI-IM spectrometry for an axial source alignment, the highest signal intensities are achieved at flow rates between 1-10 $\mu\text{l}/\text{min}$ and a 20 μm capillary ID [14], lower flow rates are applied in MS. The reason is a narrower spray cone, which is more suitable to the acceptance area of the inlet capillary of the mass spectrometer. Additionally, the diameter of the electrospray droplets decreases with the solvent flow rate according to $d = G(\epsilon)(Q\epsilon_0/\kappa)^{1/3}$ [15], where d is the droplet diameter, Q is the flow

rate, κ is the conductivity and ϵ and ϵ_0 are the relative and vacuum permittivities. $G(\epsilon)$ is a factor close to unity. Smaller electrospray droplets facilitate the release of ions and thus result in a higher ionization efficiency. Accordingly, Marginean et al. [11] used smaller flow rates between 100-300 nl/min (10 μm capillary ID). At even lower flow rates, the authors did not obtain a stable spray. The IM spectrometer used in this work was initially designed for higher flow rates up to 1500 $\mu\text{l}/\text{min}$. Therefore, an electrospray capillary with a larger inner diameter of approximately 110 μm was used.

The characterization of the electrospray is a prerequisite for a better understanding of the analytical performance parameters of the spectrometer at reduced pressure. In the literature, the different electrospray modes are commonly investigated by I - U measurements at the counter electrode and by the acquisition of spray images. Since the ionization region of our spectrometer is not accessible to imaging of the spray, a capillary-plate setup was established in a vacuum chamber (see Experimental part). In a second step, the investigation of the electrospray was extended to the IM spectrometer.

ESI capillary-Faraday plate experiment in a vacuum chamber. At atmospheric pressure and without sheath gas a stable operation of the spray is only possible above a threshold voltage of $U_{\text{ES}} = 3.1$ kV. At this voltage, discharge processes (corona discharges) are observed already below a pressure of 800 mbar. A reduction of the voltage to 2.2 kV facilitates operation without discharges in the pressure range investigated. However, at this voltage, no spray is produced. Therefore, the dispersion of the liquid was assisted by the shear effect of a sheath gas flowing through a tube enclosing the electrospray capillary. Above a gas flow of 500 ml/min, pressures below 400 mbar and a voltage of 2.2 kV, a significant ion signal is detected (Fig. 2) and the spray cone becomes visible (Fig. 3). Consequently, the influence of the sheath gas flow rate onto the total ion current (TIC or I_{TIC}) was systematically investigated at a pressure of 400 mbar (Fig. 2). A largely linear increase of the TIC with the flow rate is observed until a flow rate of 1200 ml/min, where upon a plateau is reached for our experimental setup. Therefore, a sheath gas flow of 1200 ml/min was chosen for subsequent investigations.

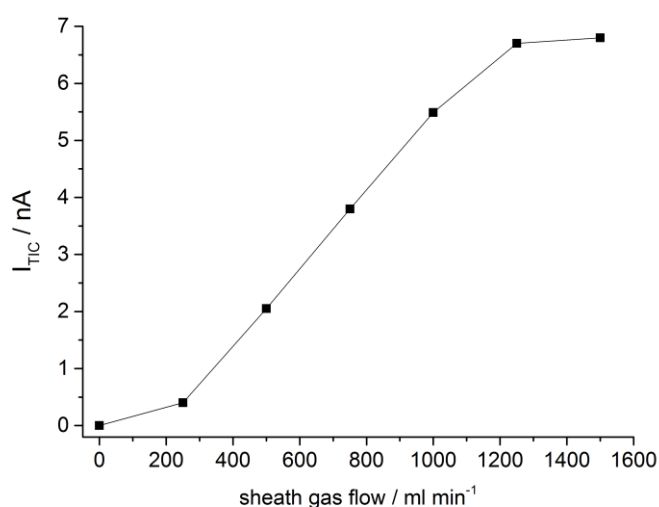


Fig. 2 I_{TIC} with increasing sheath gas flow rates at constant pressure in the vacuum chamber ($p = 400$ mbar), voltages ($U_{\text{ES}} = 2.2$ kV) and solvent composition (ACN: $\text{H}_2\text{O} + 0.1$ % FA, [8:2, v:v], solvent flow = 20 $\mu\text{l}/\text{min}$)

The effects of sheath gas flow and ESI capillary voltage on the electrospray, U_{ES} , were investigated by spray imaging (Fig. 3) as well as TIC measurements (Fig. 4).

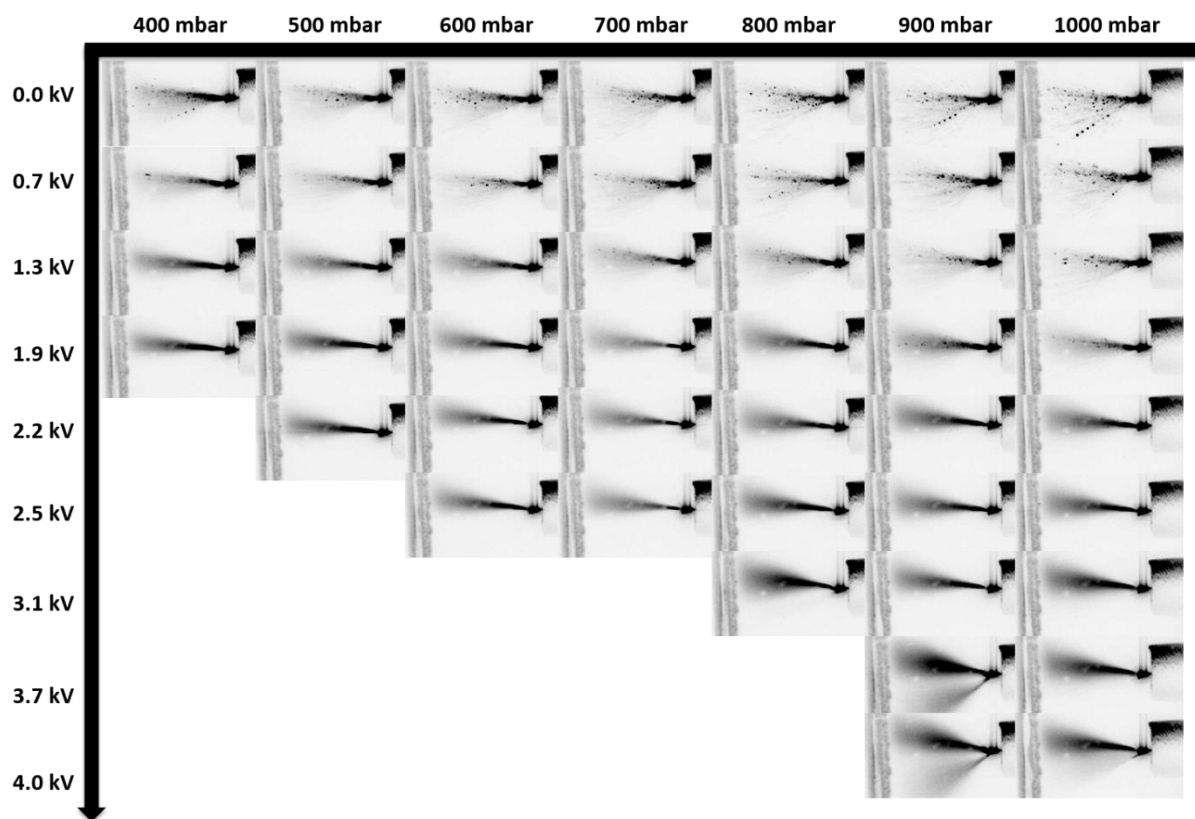


Fig. 3 Spray imaging in dependence of electro spray voltage (U_{ES}) and pressure (p) at constant solvent conditions (ACN: $H_2O + 0.1\%$ FA, [8:2, v:v], solvent flow $20\ \mu\text{l}/\text{min}$) and sheath gas flow rate $1200\ \text{ml}/\text{min}$

At a sheath gas flow of $1200\ \text{ml}/\text{min}$ and a pressure of $400\ \text{mbar}$, a spray cone is already obtained without applying a voltage. As expected, no current can be detected at the counter electrode (Fig. 3, first row). The distinctness of the spray cone and the dispersity of the spray increase with falling pressure (see $U_{ES} = 0\ \text{kV}, 0.7\ \text{kV}, 1.3\ \text{kV}, 1.9\ \text{kV}$ in Fig. 3). This finding can be attributed to the changing pressure difference at both ends of the capillary. The associated flow rate and consequently the linear velocity of the gas molecules in the capillary could in principle be described quantitatively by the Hagen-Poiseuille equation. However, we cannot apply this equation here since the flow rate of the sheath gas is fixed by a mass flow controller. The pressure decreases from the outlet pressure at the start to the final pressure at the end of the capillary. Since the product of pressure p and velocity v is constant [16], the velocity of the gas molecules increases towards the end of the capillary. Therefore, a decreased final pressure leads to an increased shear effect of the gas on the outflowing solvent due to the increased velocity of the gas molecules. Thus, the increased distinctness of the spray cone with decreasing pressure can be explained. However, the effect of an increased capillary voltage U_{ES} is much more pronounced. At low pressures, the homogeneity of the spray cone increases up to a voltage of $1.9\ \text{kV}$. The effect of the pressure reduction is especially noticeable at a voltage of $U_{ES} = 1.3\ \text{kV}$. While no spray cone, but a cloud of larger droplets, can be observed at $1\ \text{bar}$, a spray cone is formed at pressures below $800\ \text{mbar}$ whose homogeneity increases with decreasing pressure.

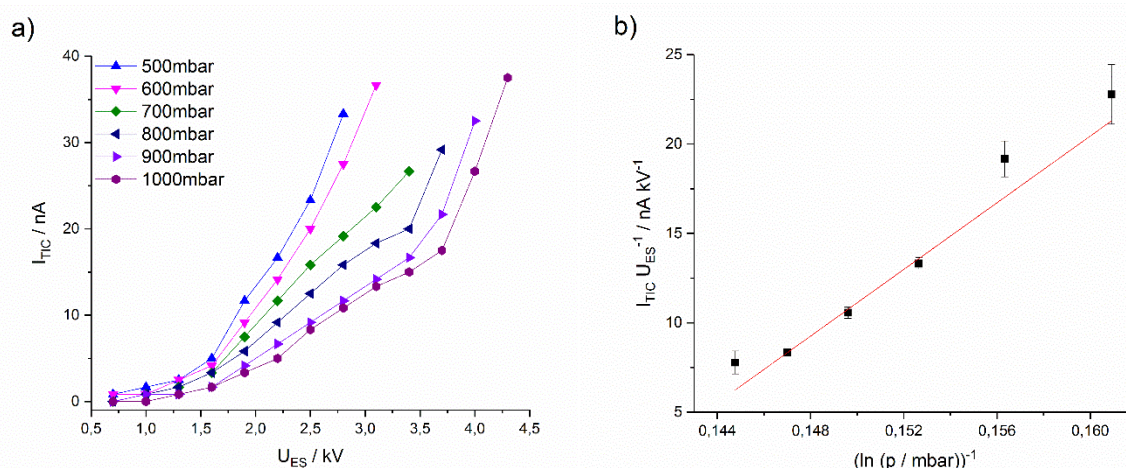


Fig. 4 a) Current-voltage (I_{TIC} - U_{ES}) curves in the pressure range 500-1000 mbar, b) Current-voltage ratio I_{TIC}/U_{ES} in dependence of $1/\ln(p/mbar)$ - solvent flow 20 μ l/min, sheath gas flow 1200 ml/min

In addition to the acquisition of spray images, curves relating the TIC (I_{TIC}) to the capillary voltage (U_{ES}) were recorded in the pressure range of 500-1000 mbar (Fig. 4a). The TIC was measured at the counter electrode. The I_{TIC} - U_{ES} curves feature a distinct pressure dependence (Fig. 4b). The slopes I_{TIC}/U_{ES} from the middle segments of the curves in Fig. 4a suggest a linear relationship with respect to $1/\ln(p)$. This corresponds to the scaling law $E \sim U_{ES} / \ln(p)$ proposed by Marginean et al. [11]. Although the ESI sources used in this work and by Marginean et al. significantly differ (flow rates, spray mode), qualitatively similar behavior is observed. It can be concluded that the spray used in this work can still be classified as a regular electro spray instead of a sonic spray. According to Marginean et al. [11], the decrease of the pressure is balanced by a decrease in the “electrical pressure” $p_E = \frac{1}{2} \epsilon_0 E^2$. Consequently, a reduction of U_{ES} is observed at decreasing pressures (for $I = \text{const.}$). The even steeper slope in the third segment found in the curves of higher pressures can be attributed to a change of spray modes. At a pressure of 900 mbar and a capillary voltage of 3.7 kV for instance, the transition from the conejet to the multijet mode (Fig. 3) is observed [13].

IM spectrometer. ESI source and its counter electrode in the simple capillary-plate geometry can be described as an electrical circuit [17]. With this capillary-plate setup, only the combined current produced by ions and charged droplets can be measured. In view of the analytical application, a characterization of the ion release from the spray droplets, which cannot be elucidated with this simple experiment, is more interesting. Therefore, the investigations of the capillary-plate experiment were complemented by spray characterization in the IM spectrometer. However, this can only be accomplished without distortions after identifying all loss sources of ions in the spectrometer. To that end, all sources of charge generation and loss in the IM spectrometer were examined in detail. The investigated components include the electro spray capillary (I_{CAP}), the mesh as counter electrode (I_{MESH}), the ion gate (I_{IG}), the drift tube and the aperture grid (see Fig 1b). The electro spray capillary (source of charge generation, Fig. 5a) and the counter electrode (main source of charge loss, Fig. 5b) emerged as the most relevant components. The currents associated with both components were determined by measuring the voltage drop across a 10 M Ω resistor.

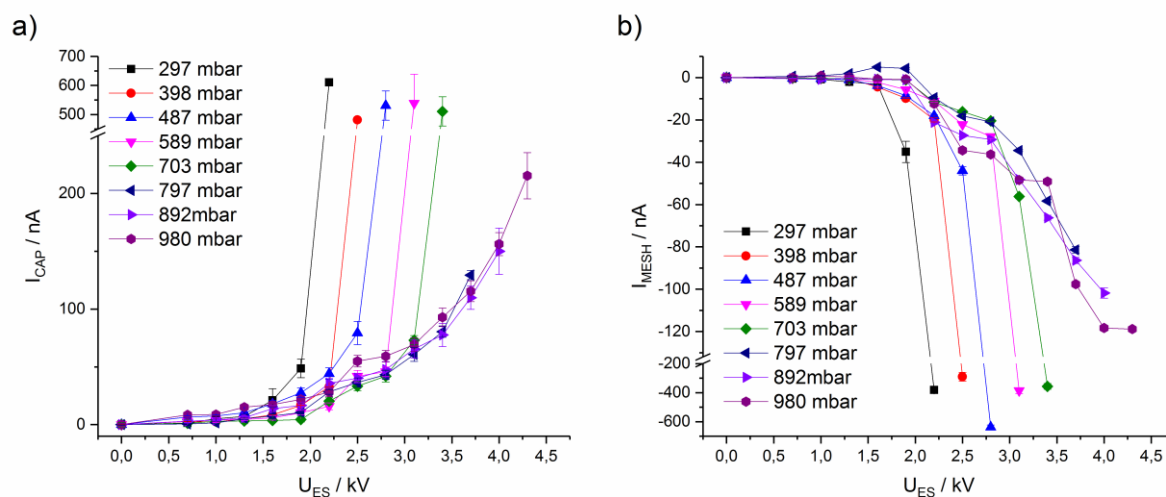


Fig. 5 I - U_{ES} curves measured at a) the electro spray capillary and b) the counter electrode (mesh) – leaps in both plots are due to corona discharge (solvent flow 20 μ l/min, sheath gas flow 1200 ml/min, drift gas flow 500 ml/min)

Compared to the I_{TIC} - U_{ES} curves measured in the capillary-plate experiment (Fig. 4a), the corresponding I_{CAP} curves (Fig. 5a) exhibit a gentle increase up to a voltage of ca. 2 kV, followed by a strong enhancement of the capillary current. The curves are largely independent of the pressure in the range of 300-1000 mbar. Pronounced leaps in the curve signify the onset of corona discharges at the respective pressures. The I_{MESH} - U_{ES} curves for the counter electrode (negative, current loss, see Fig. 5b) qualitatively mirror the I_{CAP} - U_{ES} plot for the ESI capillary (positive, current gain). This behavior can be attributed to the larger amount of charge passing the mesh and being partly discharged. Another interesting aspect is the dependence of the ion transparency, defined by the ratio of ions leaving the mesh to the number of ions entering the mesh, on the ratio of the electric fields after and before the entrance mesh (E_2/E_1). Here E_2 is the electric field in the desolvation tube and E_1 the electric field between ESI capillary and entrance mesh. This ratio E_2/E_1 is obviously decreasing with increasing capillary voltage (U_{ES}). Tabrizchi et al. already demonstrated the decrease of losses at a counter electrode (mesh) with the ratio E_2/E_1 in a similar setup of a corona discharge IM spectrometer [18]. Because the electrical field between the tip of the ESI capillary and the counter electrode (mesh) is inhomogeneous, we prefer to use the ratio U_2/U_1 (U_1 and U_2 are the voltages between ESI capillary and mesh as well as the voltage drop in the desolvation tube) instead. The U_2/U_1 dependence of the ion fraction that is not discharged at the entrance mesh (ion transparency) was systematically investigated at different pressures. We found that the dependence of the ion transparency (Fig. 6a) on the ratio U_2/U_1 was largely linear. Furthermore, the slope of the curve increases only slightly with the pressure between 300 and 1000 mbar. Put another way, the fraction of ions discharged at the counter electrode is less dependent on the ratio U_2/U_1 with decreasing pressure. A striking observation is that the ion transparency of the mesh at high ratios of U_2/U_1 exceeds the optical transparency of the mesh (89 %).

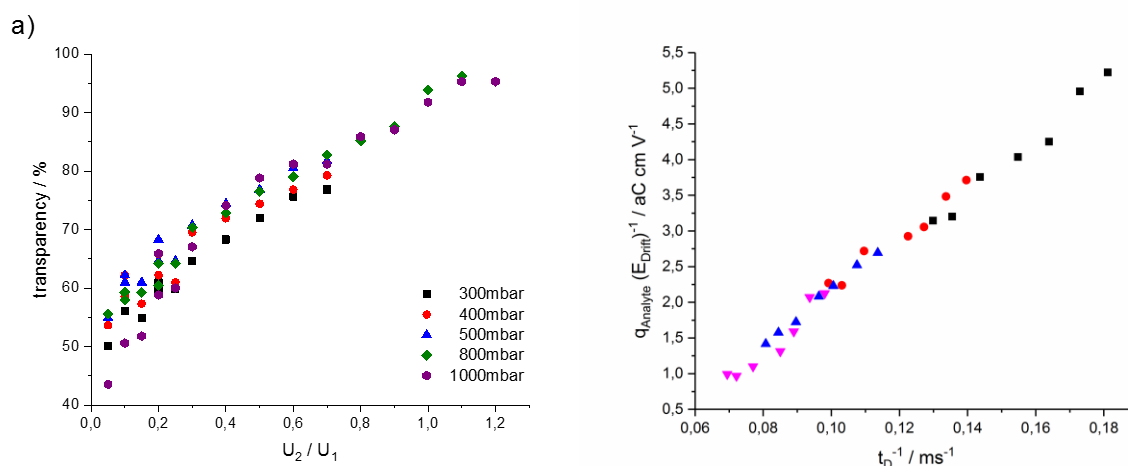


Fig. 6 a) Electrical transparency of the counter electrode (mesh) as a function of the ratio U_2/U_1 at different pressures ($I_{\text{CAP}} = \text{const.}$) and b) characterization of losses in the drift tube, peak areas of different ammonium salts (q_{Analyte}) divided by the electric field strength in the drift tube (E_{Drift}) plotted against the inverse drift time (t_D) of TBAB (black), THAB, (red), TOAB (blue), TKAB (pink) – solvent flow 20 $\mu\text{l}/\text{min}$, sheath gas flow 1200 ml/min, drift gas flow 500 ml/min

The second highest contribution to the loss of charge is the migration of ions by diffusion out of the hypothetical cylinder above the Faraday plate during their passage through the drift tube and their subsequent discharge at the drift tube walls. A possible quantification of this effect was already proposed by Shamlouei and Tabrizchi [19]. They found a linear relationship between the analyte current divided by the drift field (I/E) and the inverse drift time ($1/t_D$). In their work, the I/E vs. $1/t_D$ values of 10 different substances formed a single curve. In the present work, this linear relation was also observed, measuring the signal intensities of four surfactants (Fig. 6b). The signal intensity decreases by a factor of 5.5 with the drift time, signifying a corresponding increase of the losses.

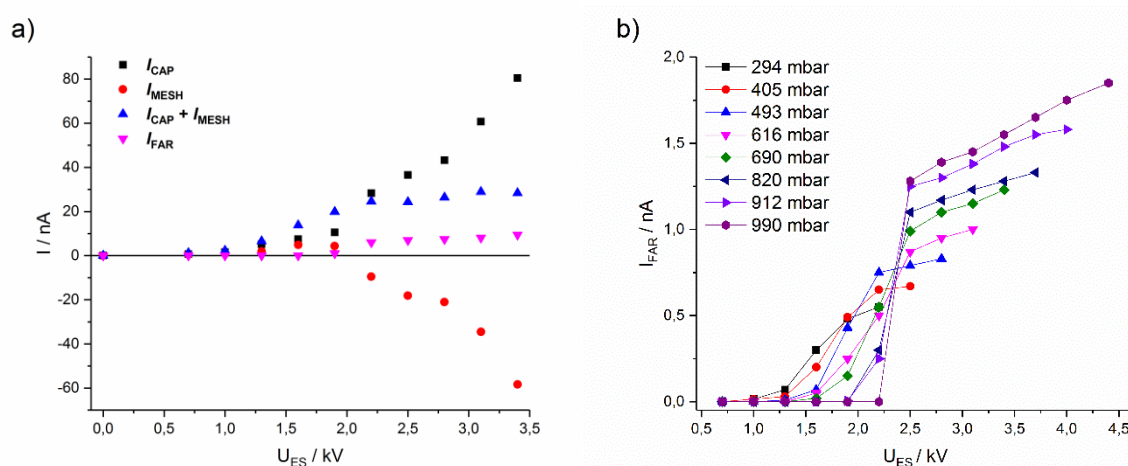


Fig. 7 a) Representation of the major sources of current generation and loss in dependence of the voltage U_{ES} , b) $I_{\text{FAR}}-U_{\text{ES}}$ curves at different pressures – solvent flow 20 $\mu\text{l}/\text{min}$, sheath gas flow 1200 ml/min, drift gas flow 500 ml/min

In the following, the results about the U_{ES} and pressure investigations of the ESI-IM spectrometer will be presented. The $I-U_{\text{ES}}$ curves measured at the Faraday plate in the IM spectrometer exhibits a

qualitatively different shape (Fig. 7), in comparison to the simple capillary-plate experiment presented before (Fig. 4a). The shape of the $I_{\text{FAR}}-U_{\text{ES}}$ curves is found to be qualitatively reconstructed by the U_{ES} dependence of the sum $I_{\text{CAP}} + I_{\text{MESH}}$ (Fig. 7a, blue upright triangles). I_{CAP} is the current generated at the electrospray capillary (Fig. 7a, I_{CAP} , black squares) and I_{MESH} is the discharge current of the main source of losses (counter electrode (mesh), Fig. 7a, I_{MESH} , red circles). The other sources of loss, especially the diffusion in the drift tube, reduce the height of the resulting $I-U_{\text{ES}}$ curves but do not alter its shapes. It can be concluded that the decreasing ion transparency at the inlet mesh for increasing U_{ES} results in a reduction of the current measured at the Faraday plate, despite of a steep increase of I_{CAP} .

Three segments can be identified in the curves presented in Fig. 7b. At high pressures, the slope of the curves is close to zero up to a threshold. Above this threshold, the slope of the $I-U_{\text{ES}}$ curves increase steeply before returning to a small value again.

In Fig. 7b, the pressure dependence of the $I-U_{\text{ES}}$ curve recorded at the Faraday detector is shown. Multiple effects are observed:

- a) At low pressures, a rise in the curve is already observed for small voltages U_{ES} .
- b) The voltage threshold increases with the pressure.
- c) The slope of I above the threshold is steeper at higher pressures.
- d) The current levels reached at constant U_{ES} (e.g. 2.5 kV) have larger values at higher pressures.
- e) The maximal possible I level before the onset of corona discharge is increasing with pressure, as does the U_{ES} voltage necessary to reach it.

The causes of the effects described are connected with each other. In order to illustrate this, some of these effects will be discussed below. In part, effect a) can be attributed to the higher shear forces exerted by the sheath gas on the solvent at lower pressures ($pV = \text{const.}$), while additionally, the electrical pressure needed for the formation of the Taylor cone ($\Delta p = \Delta p_E$) decreases. Effect e) can be explained by the fact that the number of charges generated in the electrospray capillary is largely unaffected by the pressure and grows with increasing voltage (see Fig. 5a). Higher charge densities lead to more efficient dispersion due to Coulomb explosions (Rayleigh limit is reached sooner) and hence, an increased current of released ions. The maximum U_{ES} voltage applicable without discharges at a particular pressure is limited by the Paschen curve.

An interesting observation is the increased current measured at higher pressures when comparing the curves at constant U_{ES} (effect d), e.g. at 2.5 kV). Since only free ions are detected in the IM spectrometer, the reason for the larger currents at higher pressures can only be a change in the state of the spray resulting in a higher efficiency of ion release from the spray droplets. This change is probably due to the less efficient evaporation of the spray droplets at reduced pressures. Therefore, the Rayleigh limit is reached less frequently by the droplets compared to atmospheric pressure. As a consequence, the Coulomb explosion leading to highly charged progeny droplets takes places less often as well. The less efficient evaporation can be explained by two effects. One the one hand, the vapor pressure of the solvent hardly changes in the range of 300-1000 mbar. On the other hand, the droplet becomes colder due to the heat needed for evaporation. At atmospheric pressure, thermal energy is reabsorbed during collisions with surrounding gas molecules (N_2). The energy exchange depends on two factors, namely the temperature of the surroundings and the collision frequency. While the temperature of the surroundings remains constant during the pressure change, the collision

frequency and therefore the absorbed heat decreases proportionally to the pressure. Thus, the thermalization of the droplets and thus the evaporation of the droplets is more efficient at higher pressures.

A possible cause of the differences in the $I-U_{ES}$ curves recorded in the capillary-plate setup and in the IM spectrometer is the nature of the species detected. In the capillary-plate experiment, a wide variety of charged species, such as solvated cluster ion and charged micro- and nano-droplets, is detected. At the Faraday plate of the IM spectrometer, on the other hand, only free desolvated ions are measured. The IM spectrometer is therefore ideally suited to characterizing the release of ions in ESI.

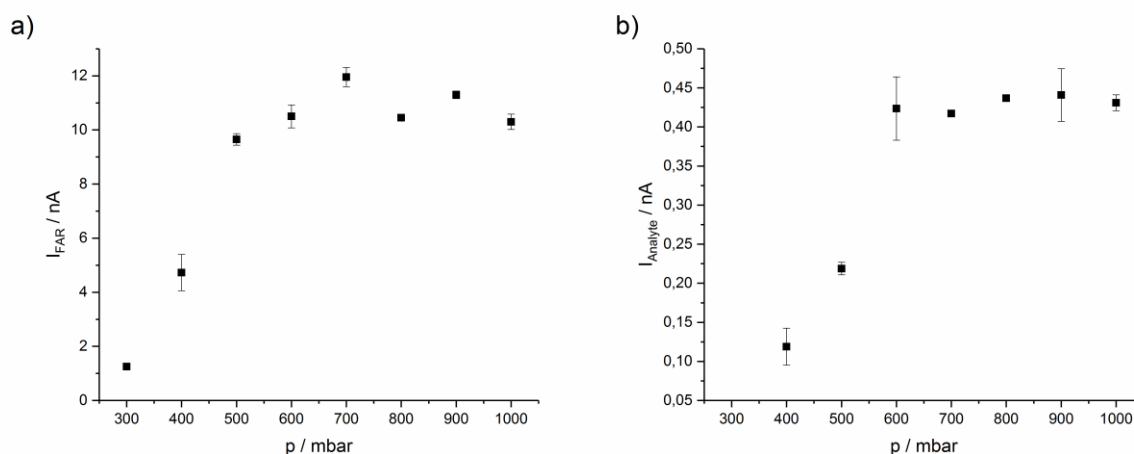


Fig. 8 a) I_{FAR} and b) TBA^+ ion signal as a function of the pressure – solvent flow 20 $\mu\text{l}/\text{min}$, $U_{ES} = 2\text{-}2.3$ kV, $I_{CAP} = \text{const.}$, sheath gas flow 1200 ml/min, drift gas flow 500ml/min

In order to characterize the pressure dependence of the ESI-IM spectrometer, the signal intensity of the solvent cluster ions (Fig. 8a) as well as the signal intensity of the TBA^+ ions (Fig. 8b) were measured as a function of the pressure. The following experimental conditions were established to ensure the results were independent of the generation and transmission of the ions: $I_{CAP} = \text{const.}$, $U_2/U_1 = \text{const.}$, $E/N = \text{const.}$ and therefore also $t_D = \text{const.}$ A signal decrease below 500 mbar is observed for the I_{FAR} as well as for the TBA^+ ions. Due to the experimental conditions chosen, this decline of the signal intensity cannot be explained by a change of the ion transparency of the spectrometer at reduced pressures. It is more plausible to assume a change in the state of the spray, and therefore the ion release, to be the underlying cause. But the thermalization effect cannot be the unique reason because this effect should cause a continuous drop of intensity over the whole pressure range.

Analytical application of the subambient ESI-IM spectrometer

A significant advantage of an IM spectrometer operated at subambient pressure is that the same values of E/N , and therefore the same drift times, employed at atmospheric pressure can be achieved at lower voltages (e.g. half the voltage U_{IMS} at 500 mbar). This is interesting regarding the safety as well as the cost (high voltage power supply costs vs. cost of a single stage membrane pump).

On the other hand, the lower number of generated ions in ESI at reduced pressures can be balanced by a more efficient transfer of the ions from the ESI source to the Faraday detector (see $I/E-1/t_D$ dependence [19]). Thus, the reduced sensitivity at reduced pressure can be compensated by a

reduction of the drift time at higher voltages. Two approaches are the variation of the voltage of the desolvation tube at constant E/N in the drift tube and a variation of the overall voltage of the desolvation and drift tubes.

An application of the first approach is demonstrated in Fig. 9 for the signal caused by promazine ions at a pressure of 800 mbar. The voltage of the desolvation tube was increased by 50 %. The IM spectra (Fig. 9a) show an increase of the intensity of the promazine peak at a drift time of 7.5 ms. The drift time itself remains unchanged as the ratio E/N in the drift tube was kept constant. The dependence of the intensity of the promazine ion signal on the voltage of the desolvation tube is plotted in Fig. 9b. This intensity increases by a factor of two in the voltage range investigated. Thus, the loss of spray current can largely be balanced.

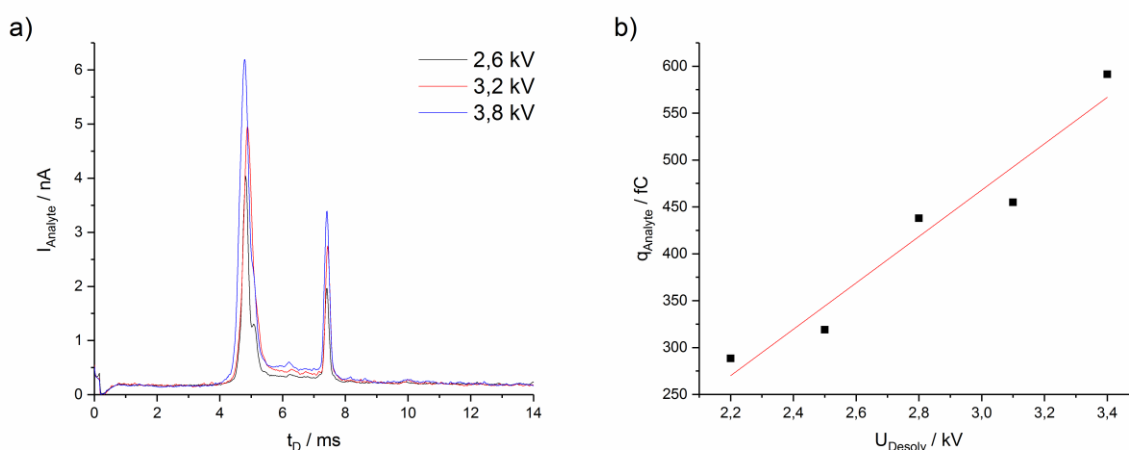


Fig. 9 Variation of the voltage of the desolvation tube U_{Desolv} at constant U_{ES} , a) IM spectra and b) signal intensity of promazine ions ($10 \mu\text{M}$) as a function of the voltage U_{Desolv} (coefficient of determination $R^2 = 0.94$) – $p = 800 \text{ mbar}$, solvent flow $20 \mu\text{l}/\text{min}$, $U_{\text{ES}} = 2.4 \text{ kV}$, $I_{\text{CAP}} = \text{const.}$, sheath gas flow $1200 \text{ ml}/\text{min}$, drift gas flow $500 \text{ ml}/\text{min}$

Additionally, the influence of a variation of the overall voltage was investigated. The IM spectra of arginine recorded at different overall voltages at a pressure of 500 mbar are shown in Fig. 10a.

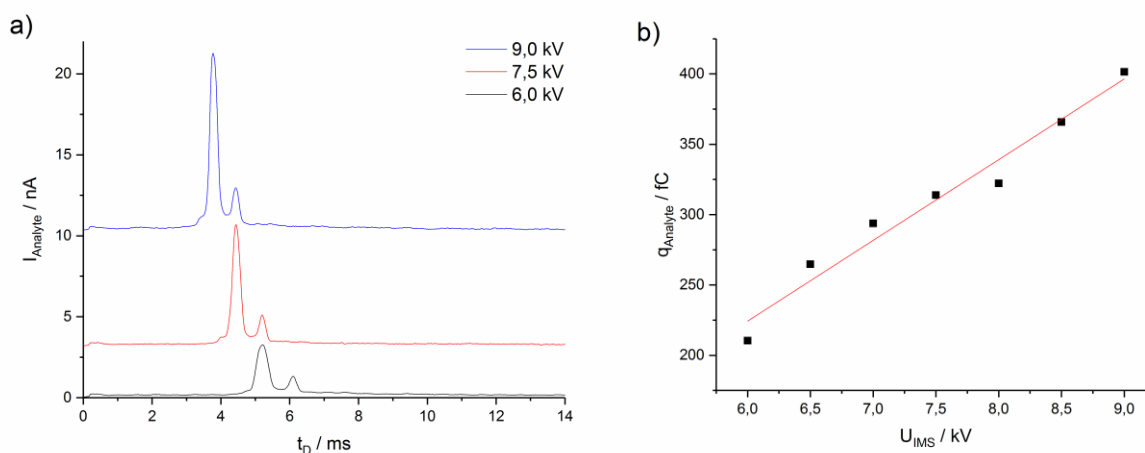


Fig. 10 Variation of the overall voltage U_{IMS} of desolvation and drift tube at constant U_{ES} , a) IM spectra and b) signal intensity of arginine ions ($100 \mu\text{M}$) as a function of the voltage U_{IMS} at 500 mbar ($R^2 = 0.97$)

– solvent flow 40 $\mu\text{l}/\text{min}$, $p = 500 \text{ mbar}$, $U_{\text{ES}} = 2.5 \text{ kV}$, $I_{\text{CAP}} = \text{const.}$, sheath gas flow 1200 ml/min, drift gas flow 500 ml/min

The observations include the reduction of the drift time as well as an increase in the signal intensity of the arginine ions. The latter is shown quantitatively in Fig. 10b. The intensity of the arginine ion signal rises linearly and increases by a factor of two in the voltage range investigated. Therefore, both approaches can be used to balance the loss of spray current.

As an assessment of the sensitivity of the subambient pressure ESI-IM spectrometer, the limits of detection (LOD) of promazine were determined for three pressures (500 mbar, 600 mbar and 1000 mbar) and at different E/N . In Fig. 11 the IM spectra of promazine and its concentration curve at a pressure of 500 mbar are shown.

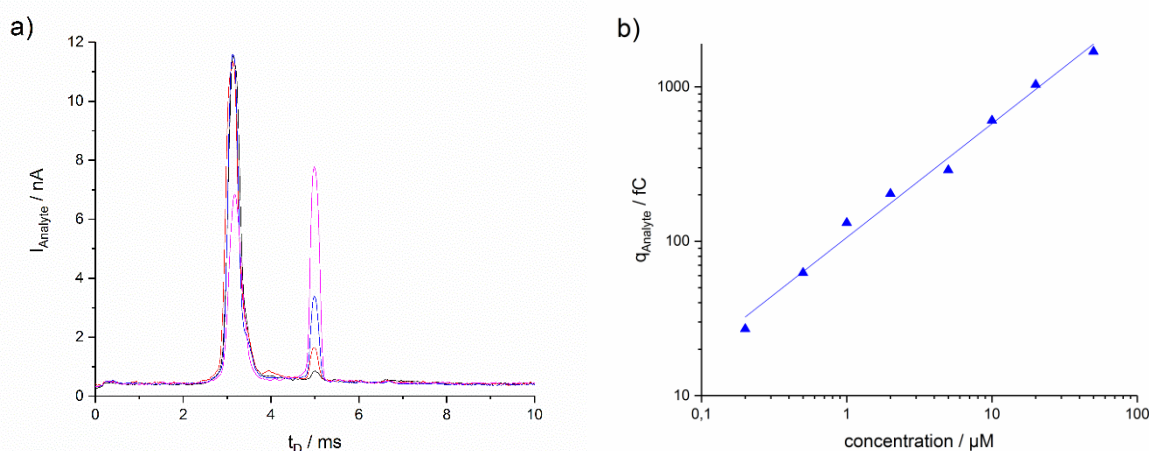


Fig. 11 Determination of the LOD of promazine a) IM spectra at 500 mbar and b) concentration curve of promazine at 5.7 Td (blue, 500 mbar, $R^2 = 0.99$) - solvent flow 20 $\mu\text{l}/\text{min}$, sheath gas flow 1200 ml/min, drift gas flow 500 ml/min

At atmospheric pressure, an LOD of 500 nM ($E/N = 4.1 \text{ Td}$) and a linear range of two orders of magnitude were determined for promazine. The LOD determined at lower pressure and higher E/N are lower, e.g. 200 nM at 500 mbar and $E/N = 5.7 \text{ Td}$ and 100 nM at 600 mbar and $E/N = 5.8 \text{ Td}$. The ratio of the LOD at 500 mbar and 600 mbar corresponds to the decrease of the intensity of TBA^+ at 500 mbar in Fig 8.

Conclusions

The concept of an ESI-IM spectrometer operated in the subambient pressure range exhibits a number of advantages over atmospheric pressure spectrometers. These include the reduction of the spectrometer voltage resulting in cost advantages as well as increased safety. The cost advantages have to be balanced against the cost of a single stage membrane pump. The experiments for the characterization of the sheath gas assisted electrospray revealed a decrease of the maximum electrospray current as well as a decrease in the onset threshold at reduced pressures. The reduction of the electrospray current can be largely balanced by an increase of the transmission efficiency using the same voltages employed at atmospheric pressure. Thus, sensitivities are similar to those achieved

in the ESI-IM spectrometer operated at atmospheric pressure. A disadvantage, however, is the slightly lower long-term stability of the electrospray. A transition to nanoESI sources could potentially yield higher ionization efficiencies at even lower pressures. In combination with a yet higher transmission efficiency of the spectrometer, detection limits could further be decreased.

References

1. Gieniec J, Cox HL, Teer D, Dole M (1972) In: 20th Annu. Conf. MS Allied Top. Dallas, pp 276–280
2. Wittmer D, Chen YH, Luckenbill BK, Hill HH (1994) Electrospray Ionization Ion Mobility Spectrometry. *Anal Chem* 66:2348–2355. doi: 10.1021/ac00086a021
3. Tang K, Page JS, Marginean I, et al (2011) Improving Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Sensitivity Using a Subambient Pressure Ionization with Nanoelectrospray (SPIN) Interface. *J Am Soc Mass Spectrom* 22:1318–1325. doi: 10.1007/s13361-011-0135-7
4. Marginean I, Page JS, Tolmachev A V., et al (2010) Achieving 50% Ionization Efficiency in Subambient Pressure Ionization with Nanoelectrospray. *Anal Chem* 82:9344–9349. doi: 10.1021/ac1019123
5. Page JS, Tang K, Kelly RT, Smith RD (2008) Subambient Pressure Ionization with Nanoelectrospray Source and Interface for Improved Sensitivity in Mass Spectrometry. *Anal Chem* 80:1800–1805. doi: 10.1021/ac702354b
6. Lenguito G, Fernandez Garcia J, Fernandez de la Mora J, Gomez A (2010) Multiplexed Electrospray for Space Propulsion Applications. 46th AIAA/ASME/SAE/ASEE Jt Propuls Conf & Exhib. doi: 10.2514/6.2010-6521
7. Alonso-Matilla R, Fernández-García J, Congdon H, Fernández de la Mora J (2014) Search for liquids electrospraying the smallest possible nanodrops in vacuo. *J Appl Phys* 116:224504. doi: 10.1063/1.4901635
8. Garoz D, Bueno C, Larriba C, et al (2007) Taylor cones of ionic liquids from capillary tubes as sources of pure ions: The role of surface tension and electrical conductivity. *J Appl Phys* 102:64913. doi: 10.1063/1.2783769
9. Romero-Sanz I, de la Mora JF (2004) Energy distribution and spatial structure of electrosprays of ionic liquids in vacuo. *J Appl Phys* 95:2123. doi: 10.1063/1.1639947
10. Aguirre-de-Carcer I, de la Mora JF (1995) Effect of Background Gas on the Current Emitted from Taylor Cones. *J Colloid Interface Sci* 171:512–517. doi: 10.1006/jcis.1995.1210
11. Marginean I, Page JS, Kelly RT, et al (2009) Effect of pressure on electrospray characteristics. *Appl Phys Lett* 95:184103. doi: 10.1063/1.3258494
12. Loeb L, Kip A, Hudson G, Bennett W (1941) Pulses in negative point-to-plane corona. *Phys. Rev.*
13. Zühlke M, Riebe D, Beitz T, et al (2015) An electrospray ionization-ion mobility spectrometer as detector for high- performance liquid chromatography. *Eur J mass Spectrom* 21:391–402. doi: 10.1255/ejms.1367
14. Tang X, Bruce JE, Hill HH (2006) Characterizing Electrospray Ionization Using Atmospheric Pressure Ion Mobility Spectrometry. *Anal Chem* 78:7751–7760. doi: 10.1021/ac0613380
15. Fernández de la Mora J (2007) The Fluid Dynamics of Taylor Cones. *Annu Rev Fluid Mech* 39:217–243. doi: 10.1146/annurev.fluid.39.050905.110159
16. Dettmer-Wilde K, Engewald W (2014) Practical Gas Chromatography. doi: 10.1007/978-3-642-54640-2

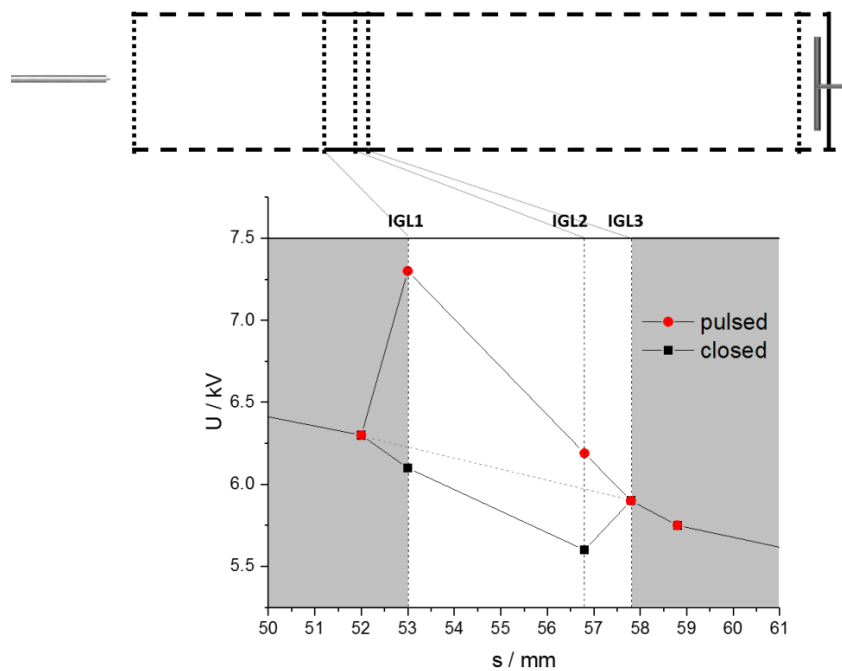
17. Jackson GS, Enke CG (1999) Electrical equivalence of electrospray ionization with conducting and nonconducting needles. *Anal Chem* 71:3777–3784. doi: 10.1021/ac9902244
18. Tabrizchi M, Khayamian T, Taj N (2000) Design and optimization of a corona discharge ionization source for ion mobility spectrometry. *Rev Sci Instrum* 71:2321. doi: 10.1063/1.1150618
19. Shamlouei HR, Tabrizchi M (2008) Transmission of different ions through a drift tube. *Int J Mass Spectrom* 273:78–83. doi: 10.1016/j.ijms.2008.03.005

3.5 Ein alternatives Ionentor mit Hochfeld-Pulsschaltung für die ESI IM-Spektrometrie

“An alternative field switching ion gate for ESI-Ion Mobility Spectrometry”

Zühlke, M.; Zenichowski, K.; Riebe, D.; Beitz, T.; Löhmannsröben, H.-G.

Int. J. Ion Mobil. Spec. **2017**, 20 (3), 67-73



Die Publikation beinhaltet folgende Kapitel:

In dieser Publikation werden die Charakterisierung der beiden verwendeten Ionentordesigns (BNG, FSIG) und deren Performancevergleich, sowie die mögliche Anwendung des FSIG im Bereich der Peptidanalytik präsentiert.

Beitrag des Autors zur Publikation:

Grundlage dieser Publikation bildete ein im Rahmen der Zusammenarbeit mit den Kollegen T. Beitz und K. Zenichowski entwickeltes Ionentormodul mit drei Folien. Nach diesem Vorbild wurden zwei der drei Folien mit gepulsten Spannungsversorgungen versehen, sodass das neuartige Ionentordesign (FSIG) entstand. Die Messungen mit dem ESI IM-Spektrometer mit beiden Ionentordesigns führte ich durch und nahm die Auswertung mit allen Berechnungen vor. Fernerhin war ich an der Diskussion zu den Ergebnissen maßgeblich beteiligt und bereitete alle Bilder für das Paper vor und schrieb in enger Zusammenarbeit mit den Koautoren einen maßgeblichen Teil der Publikation.

Manuscript of

M. Zühlke et al., *Int. J. Ion Mobil. Spec.* **2017**, 20 (3), 67-73

Received: 15 August 2017 • Accepted: 12 September 2017 • Published online: 17 September 2017

Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2017

An alternative field switching ion gate for ESI-ion mobility spectrometry

M. Zühlke, K. Zenichowski, D. Riebe, T. Beitz, H.-G. Löhmannsröben

Universität Potsdam, Physikalische Chemie, Karl-Liebknecht-Str. 24-25, 14476 Potsdam

Abstract

In electrospray ionization (ESI)-ion mobility spectrometry, continuously generated ions must be desolvated in a first tube before short ion pulses are introduced into a second (drift) tube. Both tubes are separated by an ion-gate. The resolving power of the resulting drift time spectrum is strongly influenced by the design of the ion gate. In the case of the Bradbury-Nielsen gates typically used, an orthogonal field between oppositely charged, parallel wires blocks ions from entering the drift tube. However, the blocking field also distorts the entering ion cloud. One alternative, which eliminates these effects and therefore enables a potentially higher resolving power, is already known for spectrometers with small ionization volumes, where ions are formed between two electrodes and subsequently transferred into the drift tube by a high voltage pulse. Based on this setup, we introduce an alternative ion gate design for liquid samples, named field switching ion gate (FSIG). The continuous flow of ions generated by ESI is desolvated in the first tube and introduced into the space between two electrodes (repeller and transfer electrodes). A third (blocking) electrode prevents the movement of ions into the drift tube in the closed state. Ions are transferred during the open state by pulsing the voltages of the repeller and blocking electrodes. First results demonstrate an increase of the resolving power by 100 % without intensity losses and further changes in the spectrometer setup. The parameters of the FSIG, such as electrode voltages and pulse width, are characterized allowing the optimization of the spectrometer's resolving power.

Keywords

Ion mobility spectrometry, Electrospray ionization, field switching ion gate, resolving power, peptide

1. Introduction

One important parameter characterizing an analytical method is the resolving power which is defined in ion mobility (IM) spectrometry as the ratio of the drift time t_D to the full width of the peaks at half maximum (FWHM, $w_{0.5}$). In IM spectrometry, the resolving power is influenced by physical processes such as the diffusion in the drift tube, or has technical reasons such as a broad starting distribution of the ions. Currently, most commercially available IM-spectrometers have resolving powers between 30 and 60 [1]. Improving the resolving power of IM-spectrometers has been an ongoing task over the past decades. There were several attempts to describe the dependence of the optimum resolving power on different parameters. One of the latest descriptions was given by Kirk et al. [2] (see Eq. 1).

$$R_{\text{opt}} = \left(\frac{e}{24\sqrt{3} \ln 2 \cdot k_B T K} \cdot \frac{l_D^2}{(w_{\text{inj}}^2 + w_{\text{amp}}^2)^{1/2}} \right)^{1/3} \quad (1)$$

Here, e is the elementary charge and k_B is the Boltzmann constant. The optimum resolving power R_{opt} depends on the drift length l_D , the ion mobility K , the temperature of the drift gas T , and the width of the injected ion packet w_{inj} , as well as the width contribution added by the non-zero rise time of the signal amplifier w_{amp} . The temperature dependence of the resolving power for fully desolvated ions was investigated by Tabrizchi et al. [3]. Extending the drift length l_D to increase t_D and/or increasing drift voltage U_D to minimize the FWHM has been extensively studied by Siems et al. and Dugourd et al. [4, 5]. Another factor of major importance for the resolving power is the initial width of the ion packet w_{inj} injected into the drift tube. Its lower value is limited, since the injected number of ions is connected to the detection limit, depending on the underlying technique and hardware of ion injection.

If the spectrometer contains a preceding desolvation tube for the ions, an ion-gate usually controls the entry of ions into the drift region. Two classical ion gate designs can generally be found, namely the Tyndall-Powell (TP) and the Bradbury-Nielsen ion gates (BNG). The BNG design has parallel wires in one layer. Neighbouring wires are on different potentials when the ion gate is closed and on the same potential when it is open [6]. The Tyndall-Powell-design is based on two parallel layers of wires. The potential of the first layer can be pulsed above or below the potential of the second one to open or to close the ion gate [7]. Both designs exhibit similar characteristics in terms of electric field distortions and minimal widths of entering ion packets [8], resulting in limited resolving powers. In later investigations by Langejuergen et al. [9] a three-grid-design was used. In this setup only the middle grid is pulsed, shielding electric field changes from other parts of the spectrometer.

A different approach is to extract the ions directly out of continuous ionization sources with small ionization volumes (e.g. radioactive beta-emitters or electron guns). This is called field switching (FS) shutter. In these setups, the ions can be transferred into the drift tube by a transient potential gradient towards the drift tube, allowing a much higher resolving power compared to BNG or TP ion gates. Using high-voltage pulses up to 2 kV and injection times down to 5 μs , Kirk et al. demonstrated experimental resolving powers of 183 [9]. Later, Kirk et al. [10] reached a resolving power of 250 by increasing the length of the drift tube from 10 cm to 15 cm and the electric field strength from 133 V/mm to 163 V/mm. Further signal processing via peak deconvolution enabled even higher resolving powers of up to 425. Unfortunately, the principle of immediate ion injection from the source into the drift tube cannot be applied to all types of ionization sources. The electrospray-ionization (ESI) source, for example, generates a continuous spray of charged micro/nano-droplets. All droplets have to

completely evaporate and release their analyte ions before entering the drift tube. Therefore, a high temperature desolvation tube is placed in front of the drift tube, preventing the use of the aforementioned pulsing of the entire ionization region. Thus, BNGs are normally placed between desolvation and drift tube in ESI-IM spectrometer. Chen et al. combined the FS method with the BNG in order to improve the peak height [11]. They reported a 10-fold increase in the ion peak height without any loss of resolving power. One alternative ion gate is the above mentioned three-grid-design, with which a resolving power of $R = 100$ in the ESI-IM spectrometer was reached [12].

In this work, a new alternative ion gate concept is presented and characterized, termed the field switching ion gate (FSIG). The FSIG is based on a FS shutter in a three-grid setup and is applicable to continuous large-volume ionization sources like ESI. Compared to the BNG design, ion packet distortions (pull back effects during switching cycles) are avoided, enabling shorter opening cycles and the field homogeneity in the drift tube is preserved. Both qualities enable significantly higher peak resolving powers for our home-built IM spectrometers, without further changes in their hardware. The following results reveal the functionality and benefits of the FSIG via a systematic parameter characterization.

2 Methods

IM spectrometers. Two home-built ESI-IM spectrometers, differing only in the incorporated ion gate, were used. Details about the spectrometer design were already published earlier [13]. A brief summary is presented here: The spectrometers consist of a 50 mm desolvation tube (stack of stainless steel ring electrodes: OD = 47.5 mm, ID = 23 mm, thickness = 2.54 mm, repeating unit = 3.23 mm) and a 100 mm drift tube (stack of stainless steel ring electrodes: OD = 47.5 mm, ID = 28 mm, thickness = 2.54 mm, repeating unit = 3.23 mm). Desolvation and drift tube were kept at 160°C and 140°C, respectively.

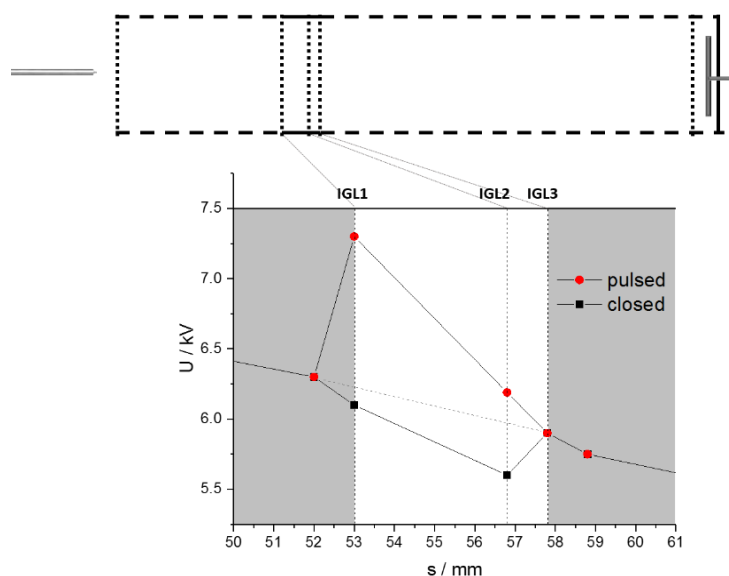


Fig. 1 Schematic drawing of distances (s), relative to the inlet of the ESI-IM spectrometer and applied voltages (U) for open (red circles) and closed (black squares) state of the three-layer FSIG design. The different slopes indicate the respective electric field gradients

The electrospray source is axially aligned to the flight direction of the ions in the IM spectrometer. The tip of the source with an inner diameter $ID = 50 \mu\text{m}$ is centered in a distance of 5 mm to the entrance grid of the desolvation tube. For all measurements, the applied voltages at the ESI source and first ring electrode of the desolvation tube were 13 kV and 9 kV, respectively. The resulting current at the Faraday plate is amplified (Physimetron, rise time = 37 μs , custom) and fed to an oscilloscope (Handyscope, HS3, TiePie engineering). The IM spectra were recorded at a frequency of 20 Hz and eight measurements were averaged. Nitrogen 5.0 (Air Liquide) was used as drift gas at atmospheric pressure with a flow rate of 0.7 l/min. The solvent flow rate was set to 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ for all measurements.

One IM spectrometer is equipped with a classical BNG, while the second is equipped with the FSIG. The FSIG consists of three mesh grids with a grid diameter of 23 mm. The first and second ion gate layers (IGL1 and IGL2) are mounted on a 3.8 mm PEEK spacer. IGL2 and IGL3 are separated via a 1.0 mm Teflon spacer. While the voltages applied on the first grid (IGL1) and the second grid (IGL2) can be pulsed (pulse duration t_{PD}), the voltage of the third grid is constant, ensuring a homogenous field in the drift tube. The typically applied voltages at the grids in the FSIG are shown in figure 1. The voltage difference in flight direction between IGL2 and IGL3 in the closed state of the ion gate is -300 V. In the open state the typically pulsed voltages are $\Delta U_{\text{IGL1}} = 1.2 \text{ kV}$ and $\Delta U_{\text{IGL2}} = 0.6 \text{ kV}$.

Chemicals. HPLC-grade acetonitrile was purchased from Carl Roth. Water was purified in a Milli-Q Advantage A10. Tetrabutylammonium bromide (TBAB, $\text{N}(\text{C}_4\text{H}_9)_4\text{Br}$, > 98%) was acquired from Sigma Aldrich. The peptides were synthesized by the company 'Peptides & Elephants' (> 95%) via solid phase synthesis. The freeze-dried peptide samples were solved in an acetonitrile-water mixture (8:2, v/v). The amino acid sequence for individual peptides is given as one letter code in the following.

3 Results

In this work, an alternative ion gate design (see above) was developed and characterized to improve the resolving power of the ESI-IM spectrometer. For a better comparison of the differences between the BNG and FSIG, the configuration of the remaining spectrometer was not changed. As a well-known instrument standard in IM-spectrometry, TBAB was used for the characterization. It dissociates into a stable ion (TBA^+) that is insensitive to contaminants in the buffer gas [14]. Thus, changes in the IM-spectra are the results of differences in the two ion-gate designs.

3.1. Characterization of the Bradbury-Nielsen ion gate (BNG)

The performance of the BNG-based ESI-IM spectrometer was characterized at constant temperature ($T = 140 \text{ }^\circ\text{C}$) and drift voltage ($U_{\text{Drift}} = 5.9 \text{ kV}$). The pulse amplitude of the voltage between the two oppositely charged wires of the BNG was $\pm 70 \text{ V}$ in the closed state. The shortest opening time of the BNG still producing a signal in the IM spectrum is 100 μs . The corresponding resolving power of the TBA^+ peak (10 μM) is 51, but its intensity is only three times the noise level. Increasing the opening time to 150 μs enhances the TBA^+ intensity while the resolving power remains constant. A further increase of the opening time leads to a continuous decrease of the resolving power down to 33 at 400 μs and a nearly linear increase of the peak intensity (Fig 2a). The plateau of the resolving power at opening times between 100-150 μs is due field inhomogeneities in the BNG design (see above). This is

an effect already described in the literature [8]. A good compromise between resolving power and intensity is an opening time of 200 μs which was used for measuring the calibration curve of TBAB. It exhibits linearity over more than two orders of magnitude (Fig. 2b). A limit-of-detection (LOD) of 250 nM was achieved for TBAB.

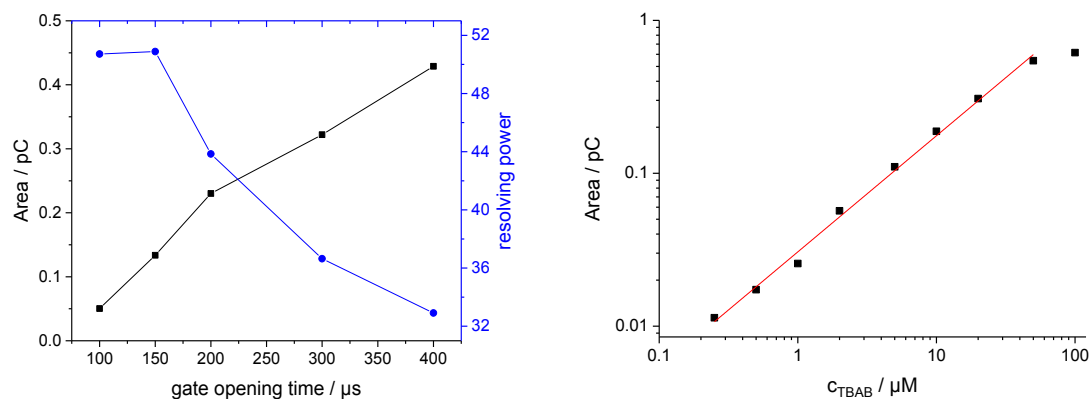


Fig. 2 Characterization of the Bradbury-Nielsen ESI-IM spectrometer, a) area (black squares) and resolving power (blue circles) of the TBA⁺ Peak (10 μM TBAB) in dependence of the opening time of the ion gate, b) calibration curve of TBAB at 200 μs opening time of BNG

3.2 Characterization of the field switching ion gate (FSIG)

One major aim of the FSIG design is to eliminate field inhomogeneities encountered with the BNG. Therefore, the third FSIG grid (IGL3), forming the entrance of the drift tube, is kept at a constant potential during the complete ion gate switching cycle. This grid shields the drift tube from transient voltage changes of grids IGL1 and IGL2. The second aim is based on the analogous principle in IM spectrometry of ionizing gaseous analytes in a small volume between two electrodes (repeller and entrance grid), for example by means of radioactive sources (or electron guns). A high-voltage (HV) pulse at the repeller electrode transfers the ions through the entrance grid into the drift tube. By using very short pulses ($t_{\text{PD}} < 5 \mu\text{s}$) peaks of very high resolving power can be generated [9].

The ESI source generates a continuous ion current. Within the spectrometer, the ions formed are desolvated in a desolvation tube. Subsequently, they are transferred into the space between the two electrodes ILG1 and ILG3 of the FSIG in its closed state. In order to provide a suitable potential gradient for filling the gate and simultaneously keeping it closed with respect to the drift tube, a further electrode (IGL2) is inserted in the immediate proximity of IGL3. In the closed state, IGL2 has a potential of typically a few hundred volts below the IGL3 voltage. In its open state, a transient and synchronous rise of the voltages at IGL1 and IGL2 transfers the ions between IGL1 and IGL3 into the drift tube. Below, the most important gate parameters, namely the pulse voltage amplitude as well as its temporal width are characterized.

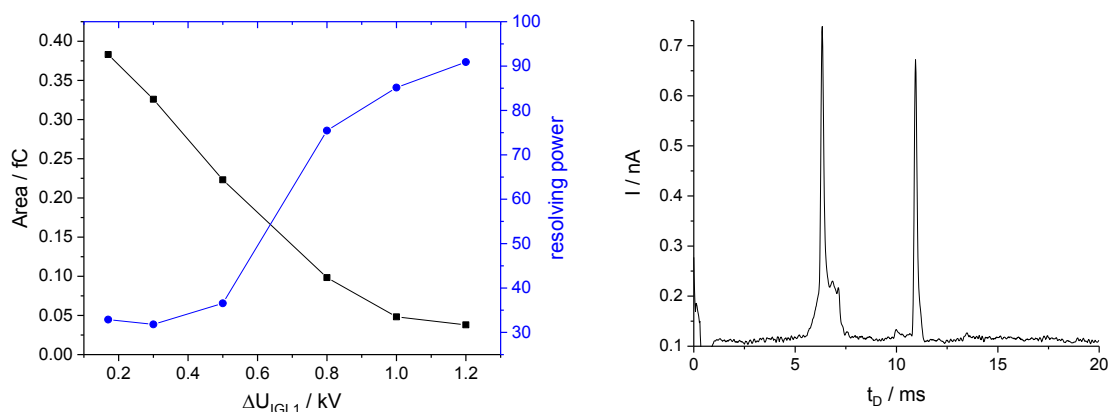


Fig. 3 a) Characterization of the FSIG ESI-IM spectrometer showing peak area (black squares) and resolving power (blue circles) for 10 μ M TBAB in dependence of pulse voltage ΔU_{IGL1} . ΔU_{IGL2} is adjusted to provide for a linear potential gradient in the ion gate region. b) IM spectrum of 10 μ M TBAB at $\Delta U_{IGL1} = 0.80$ kV and $\Delta U_{IGL2} = 0.44$ kV. Pulse width $t_{PD} = 400$ μ s for all measurements

In a first step, the optimal potential difference between IGL1 and IGL3 was investigated with constant pulse voltages and width. It was found experimentally that a lower potential gradient between IGL1 and IGL3 (200 V) compared to the one in the desolvation tube results in high intensities in the IM spectrum because the ions are decelerated and the ion discharge rate is reduced. However, increasing the potential differences between IGL1 and IGL3 to 700 V decreases the intensity because more ions are discharged. The potential difference was set to 200 V for all subsequent experiments.

The pulse amplitude (ΔU_{IGL1}) at the IGL1 is of particular importance for the peak resolving power. It was varied between 0.17 kV and 1.20 kV (Fig. 3a). The voltage pulse (ΔU_{IGL2}) at IGL2 was adjusted in order to keep a linear potential gradient between IGL1 and IGL3. From Fig. 3a, two coupled, but opposite trends can be observed, namely an increase of peak resolving power at the cost of intensity for an increasing pulse voltage ΔU_{IGL1} . A similar behaviour was already observed in studies of corona discharge-IM spectrometry [15]. There, the peak intensity was found to depend on the ratio of the field strength behind the ion transparent counter electrode, divided by the field strength in front of it. The counter electrode is functionally equivalent to the inlet grid IGL3. Therefore, we must consider the ratio of field strengths behind and in front of IGL3. The ratio is lowered by an increase in ΔU_{IGL1} , which explains the observed intensity loss. At the same time, the resolving power R increases from 30 to > 90. The TBAB spectrum in Fig. 3b represents a good compromise between signal intensity and resolving power, showing a TBA^+ ion peak at 11 ms with a resolving power of 80. Here, pulse voltage ΔU_{IGL1} and pulse width t_{PD} are set 0.8 kV and 400 μ s, respectively.

Based on these optimal settings for ΔU_{IGL1} , the influence of the pulse voltage at IGL2 (ΔU_{IGL2} , Fig. 4a) and the pulse duration (t_{PD} , Fig. 4b) were investigated. The variation of ΔU_{IGL2} results in a nearly constant resolving power but a strong influence on the intensity of the TBA^+ peak. The intensity passes a maximum at $\Delta U_{IGL2} = 0.50$ kV. Its position is affected by the product of the ion transparencies through grids IGL2 and IGL3, through which the ions are traveling during the ejecting voltage pulse (open state). The individual transparency of each gate is a function of the electric field strength before and after each grid, as stated above [15]. The transparency of the grids used has already been published [16]. In that paper, the transparency of one grid was calculated from current measurements at the grid. The

transparency of each of the two grids (IGL2 and IGL3) was determined independently from the electric field strength ratios and their product was calculated. Then, the maximum of this transparency function was fitted to the measured peak areas. The result is shown as a black dotted line in Fig. 4a. On the one hand, an increase of ΔU_{IGL2} leads to a reduction of the field strength before IGL2 and on the other hand to an increase between IGL2 and IGL3. The field strength after IGL3 (in the drift tube) is not influenced. Accordingly, the transparency of IGL2 increases with increasing ΔU_{IGL2} , while that of IGL3 decreases, resulting in the observed maximum (Fig. 4a).

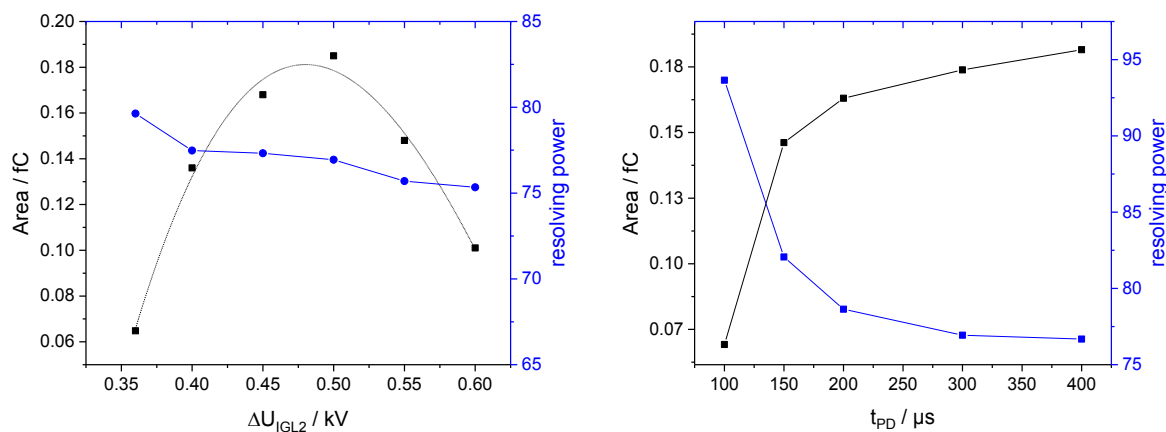


Fig. 4 a) Characterization of the middle layer pulse height ΔU_{IGL2} at constant $\Delta U_{\text{IGL1}} = 0.80$ kV and pulse width $t_{\text{PD}} = 400$ μs with calculated transparencies of IGL2 und IGL3 (black dotted line), b) Influence of the pulse width t_{PD} at $\Delta U_{\text{IGL2}} = 0.50$ kV on 10 μM TBA⁺ peak area (black squares) and resolving power (blue circles)

Long pulses, e.g. $t_{\text{PD}} = 400$ μs , ensure that all ions in the space between IGL1 and IGL3 are transferred into the drift tube, irrespective of the amplitude of the voltage pulse. Rough estimations suggest that all TBA⁺ ions in the ion gate region have passed IGL3 after approximately 250 μs . This finding is consistent with the observed intensity and resolving power plateaus at pulse widths > 250 μs . On the one hand, a reduction of the pulse duration below this width decreases the intensity, but on the other hand yields higher resolving powers, e.g. $R = 94$ at a pulse duration $t_{\text{PD}} = 100$ μs (Fig. 4b).

According to equation 1, the maximal resolving power of the TBA⁺ peak in our FSIG IM-spectrometer is $R_{\text{opt}} = 115$ for the parameters $T = 423$ K, $l_{\text{D}} = 100$ mm, $w_{\text{inj}} = t_{\text{PD}} = 50$ μs and $w_{\text{amp}} = 52$ μs (calculated from the rise time of the amplifier assuming a Gaussian response). The maximal resolving power observed for the classical BNG in our spectrometer was 51 using a gate opening time of 150 μs (Fig. 2a). For the FSIG, a resolving power of $R = 106$ (signal-to-noise ratio (SNR) = 9) was determined from a Gaussian fit to the TBAB spectrum (Fig. 5a). It was recorded using the pulse width $t_{\text{PD}} = 50$ μs and pulse voltages of $\Delta U_{\text{IGL1}} = 1.2$ kV and $\Delta U_{\text{IGL2}} = 0.95$ kV, leading to a nonlinear potential gradient between IGL1 and IGL3.

Since the theoretically predicted resolving power is nearly reached, the new FSIG design obviously eliminates the main source of field inhomogeneities in the BNG-type IM spectrometer and enables a

1.5x to twofold increase of the resolving power at nearly the same sensitivity. There are two reasons for the better performance of the FSIG compared to the BNG. First, the shielding of the drift tube improves the field homogeneity. Secondly, the injection time w_{inj} could be further reduced (down to 50 μs), increasing the resolving power according to equation 1. This is based on an effective transfer of the ions into the drift region by the high electric fields in the ion gate region of the FSIG ($E_{pulsed,FSIG} \approx 500 \text{ V/mm}$) and a lack of any pull-back effects after reclosing the gate. The smaller electric field gradient in front of the BNG ($E_{BNG} \approx 60 \text{ V/mm}$) and the spread of the orthogonal blocking field into the drift tube lead to a larger, minimal gate opening time of about 100 μs .

The detection sensitivity of the FSIG IM spectrometer was characterized by measuring a calibration plot of the analyte TBAB (Fig. 5b) analogously to the quantitative BNG characterization. As gate parameters, the already reported trade-off values between resolving power and intensity, $\Delta U_{IGL1} = 0.8 \text{ kV}$, $\Delta U_{IGL2} = 0.5 \text{ kV}$ and a pulse duration $t_{PD} = 200 \mu\text{s}$ were used. The linear range of the calibration plot comprises two orders of magnitude in the double logarithmic representation. This value is similar to the calibration plot of the BNG spectrometer (Fig. 2b). An LOD of 200 nM was determined. Therefore, the sensitivities of both gate designs are found to be nearly equal (BNG: 250 nM in Fig. 2b; FSIG: 200 nM in Fig. 5b).

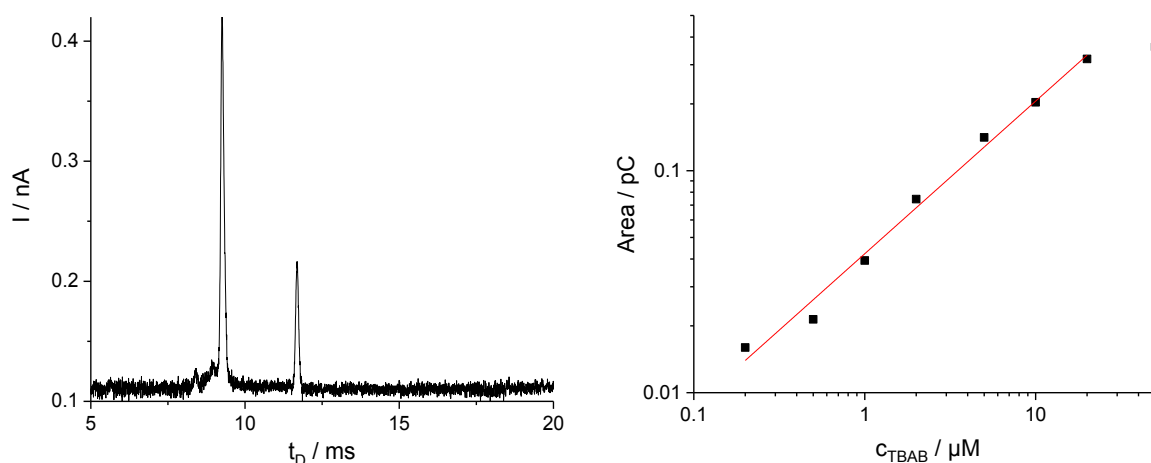


Fig. 5 a) IM-spectrum with FSIG design of the TBA^+ with a resolving power $R = 106$ ($\Delta U_{IGL1} = 1.20 \text{ kV}$, $\Delta U_{IGL2} = 0.95 \text{ kV}$, $t_{PD} = 50 \mu\text{s}$); b) calibration curve of TBAB, $R^2 = 0.99$ ($\Delta U_{IGL1} = 0.80 \text{ kV}$, $\Delta U_{IGL2} = 0.50 \text{ kV}$, $t_{PD} = 200 \mu\text{s}$)

3.3 Application to peptides

As an application of the FSIG IM spectrometer, several doubly-protonated peptides, e.g. SIINFEKL ($m/z = 482.3$), EMGRAPLDL ($m/z = 501.3$) and RAKFKQLL ($m/z = 502.3$), were investigated with regard to resolving power and sensitivity. The IM spectrum of the peptide RAKFKQLL is shown in Fig. 6a. The peak at 12 ms can be assigned to the doubly-charged peptide ion. Its resolving power is $R = 69$. The peak profiles obtained when using a BNG ($R = 35$, black trace) and an FSIG (red trace) are compared in the inset of figure 6a. The FWHM of the RAKFKQLL peak obtained with the FSIG is significantly smaller

than the corresponding FWHM of the BNG. The resolving power is improved twofold when the new ion gate is used.

Apart from the resolving power, the detection sensitivity was of interest. Fig. 6b shows calibration curves of the three peptides, which can be assigned to the acidic, neutral and basic peptides. Their detection limits are between 2-10 μM . The poorer detection limit of 10 μM was obtained for EMGRAPLDL, which has an excess of acidic amino acids and is thus less ionizable. The other two peptides have a lower detection limit with LOD = 2 μM .

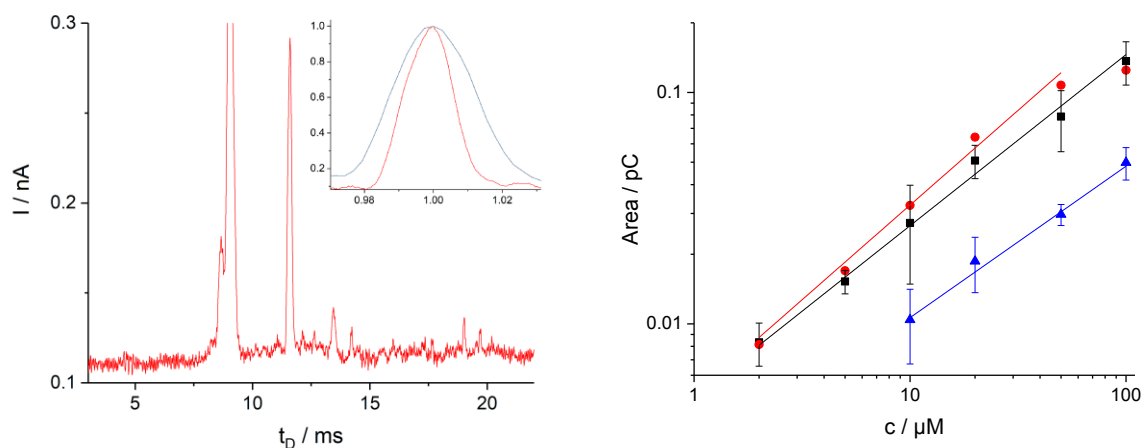


Fig. 6 a) IM-spectrum with FSIG design of the peptide RAKFKQLL with a resolving power of $R = 69$, Inset: Comparison of the peak profiles of RAKFKQLL using BNG (blue) and FSIG (red), b) calibration curve of representatives for basic (EMGRAPLDL - blue), neutral (SIINFEKL - red) and acid peptides (RAKFKQLL - black), average of threefold determination ($\Delta U_{\text{IGL1}} = 0.17$ kV, $\Delta U_{\text{IGL2}} = 0.35$ kV, $t_{\text{PD}} = 400$ μs), all peptides are doubly-protonated

4 Conclusions

The classical Bradbury-Nielsen ion gate design limits the IM spectrometer resolving power for one main reason. Its orthogonal blocking field, in the closed state, introduces field inhomogeneities in the drift tube, distorting the ion package traveling towards the detector, especially in the close vicinity of the ion gate. Since the closed gate potential is pulling back nearby ions, the minimal opening time for a BNG is limited, restricting the maximally achievable resolving power as described by Eq. 1.

We could show that replacing the BNG with the FSIG design strongly reduces these effects and increases the resolving power by a factor of two without any loss in sensitivity. Thus, the IM peak of the standard TBAB reached an optimal resolving power of $R = 106$ for the FSIG compared to $R = 51$ for the BNG. Besides TBAB, several peptides were investigated. Thus, a resolving power of up to $R = 92$ was obtained for the peptide SIINFEKL in our stand-alone ESI-IM spectrometer at an LOD of 2 μM . Higher resolving powers increase the peak capacity and permit the detection of mixtures of peptides in the ESI-IM spectrometer without pre-separation. An additional advantage of the FSIG is its simpler manufacturing by using three sturdy mesh grids compared to the more delicate wires used in the BNG. However, instead of the BNG electronics, two high voltage switches are needed to operate the FSIG.

References

1. Cottingham K (2003) Ion mobility spectrometry rediscovered. *Anal Chem* 75:435 A-439 A.
2. Kirk AT, Zimmermann S (2015) An analytical model for the optimum drift voltage of drift tube ion mobility spectrometers with respect to resolving power and detection limits. *Int J Ion Mobil Spectrom* 18:129–135. doi: 10.1007/s12127-015-0176-x
3. Tabrizchi M (2004) Temperature effects on resolution in ion mobility spectrometry. *Talanta* 62:65–70. doi: 10.1016/S0039-9140(03)00401-6
4. Siems WF, Wu C, Tarver EE, et al (1994) Measuring the Resolving Power of Ion Mobility Spectrometers. *Anal Chem* 66:4195–4201. doi: 10.1021/ac00095a014
5. Dugourd P, Hudgins RR, Clemmer DE, Jarrold MF (1997) High-resolution ion mobility measurements. *Rev Sci Instrum* 68:1122–1129. doi: 10.1063/1.1147873
6. Bradbury NE, Nielsen RA (1936) Absolute values of the electron mobility in hydrogen. *Phys Rev* 49:388–393. doi: 10.1103/PhysRev.49.388
7. Tyndall AM (1938) *The Mobility of Positive Ions in Gases*. Cambridge University Press, Cambridge
8. Kirk AT, Zimmermann S (2014) Bradbury-Nielsen vs. Field switching shutters for high resolution drift tube ion mobility spectrometers. *Int J Ion Mobil Spectrom* 17:131–137. doi: 10.1007/s12127-014-0153-9
9. Kirk AT, Allers M, Cochems P, et al (2013) A compact high resolution ion mobility spectrometer for fast trace gas analysis. *Analyst* 138:5200–7. doi: 10.1039/c3an00231d
10. Kirk AT, Zimmermann S (2015) Pushing a compact 15cm long ultra-high resolution drift tube ion mobility spectrometer with $R = 250$ to $R = 425$ using peak deconvolution. *Int J Ion Mobil Spectrom* 18:17–22. doi: 10.1007/s12127-015-0166-z
11. Chen C, Tabrizchi M, Wang W, Li H (2015) Field Switching Combined with Bradbury-Nielsen Gate for Ion Mobility Spectrometry. *Anal Chem* 87:7925–7930. doi: 10.1021/acs.analchem.5b01737
12. Reinecke T, Thoben C, Zimmermann S, et al (2016) A compact high resolution electrospray ionization ion mobility spectrometer. *Talanta* 150:1–6. doi: 10.1016/j.talanta.2015.12.006
13. Zühlke M, Riebe D, Beitz T, et al (2015) An electrospray ionization-ion mobility spectrometer as detector for high- performance liquid chromatography. *Eur J Mass Spectrom (Chichester, Eng)* 21:391–402. doi: 10.1255/ejms.1367
14. Eiceman GA, Nazarov EG, Stone JA (2003) Chemical standards in ion mobility spectrometry. *Anal Chim Acta* 493:185–194. doi: 10.1016/S0003-2670(03)00762-1
15. Tabrizchi M, Khayamian T, Taj N (2000) Design and optimization of a corona discharge ionization source for ion mobility spectrometry. *Rev Sci Instrum* 71:2321. doi: 10.1063/1.1150618
16. Zühlke M, Zenichowski K, Riebe D, et al (2017) Subambient pressure electrospray ionization ion mobility spectrometry. *Int J Ion Mobil Spectrom* 20:47–56. doi: 10.1007/s12127-017-0215-x

4 Diskussion und Ausblick

In dieser Arbeit wurde ein selbstgebautes ESI IM-Spektrometer als HPLC-Detektor für den Flussratenbereich des Laufmittels von 200 bis 1500 $\mu\text{l}/\text{min}$ entwickelt und dessen Vorteile gegenüber bisherigen HPLC-Detektoren sowie weitere Anwendungen gezeigt. Basis für diesen hohen Flussratenbereich war die Weiterentwicklung einer Ionisationsregion im T-Zylinderdesign von Kurnin.⁵¹ Mit hohen ESI-Potentialen und Mantelgasunterstützung konnten stabile ESI IM-Spektren für verschiedene Laufmittelzusammensetzungen (bis zu 90%-Wasseranteil) sowie -flussraten beobachtet werden. Während eines HPLC-Trennungsgangs konnten somit verschiedene Laufmittel, Pufferlösungen (bis zu 10 mM) und Gradienten zum Einsatz kommen. Ein weiterer Vorteil des neuartigen Detektors sind die orthogonalen Trennmechanismen von IM-Spektrometrie und HPLC. Koeluiierende Komponenten des Gemischs können in der Driftregion getrennt werden, sodass kurze Gesamttrennzeiten erreicht werden können. Aus den entstandenen 2D-Diagrammen lassen sich die Driftzeiten der Komponenten ermitteln und unter Berücksichtigung der verwendeten Parameter in die stoffspezifische Ionenmobilitäten umrechnen, die zur schnellen Identifizierung der Komponenten dient. Durch vorab ermittelte Kalibriergeraden konnten auch Einzelsubstanzen in komplexen Gemischen quantifiziert werden. Die hohe Leistungsfähigkeit des neuen HPLC-Detektors wurde am Beispiel der Untersuchung komplexer Mischungen (24 Pestizide, 18 Aminosäuren) demonstriert.

Das ESI IM-Spektrometer wurde anschließend für die qualitative und quantitative Echtzeitüberwachung einer mehrstufigen chemischen Reaktion eingesetzt. Die Identifizierung aller beteiligten Edukte, Zwischenprodukte und Produkte gelang über eine Driftzeit zur Massen-Ladungs-Korrelation. Die quantitative Überwachung des Reaktionsverlaufs wurde sowohl nach Vortrennung über eine HPLC-Säule als auch ohne Vortrennung erreicht. Ohne Vortrennung konnte durch Berücksichtigung der Ladungskonkurrenz bei ESI ein erweitertes Kalibrierverfahren entwickelt werden. Dieses gestattete erstmals in der IM-Spektrometrie die Quantifizierung einer dreistufigen Synthese mit Bestimmung der Ausbeute und Kinetik in Echtzeit.

Mit dem Ziel der Verbesserung der Hochspannungssicherheit des ESI IM-Spektrometers wurde die Druckabhängigkeit (300 - 1000 mbar) bei gleichzeitiger Verringerung der elektrischen Feldstärke überprüft ($E/N = \text{konstant}$). Bei geringen Drücken konnte anhand von Streulichtbildern des ESI-Sprays und Strom-Spannungs($I-U$)-Kurven bereits bei geringen Potentialdifferenzen U_{ESI} das Einsetzen von ESI festgestellt werden. Am Faraday-Detektor im IM-Spektrometer wurden hingegen bei geringen Drücken nur schwache Stromstärken beobachtet. Die Verluste konnten durch die Erhöhung von E/N ausgeglichen werden, sodass gleiche Nachweisgrenzen bei 500 mbar und bei 1 bar erreicht wurden.

Eine weitere Idee zur Entwicklung des Spektrometers war die Einführung eines neuartigen Ionentor-Designs. Das sogenannte *field-switching ion gate* (FSIG) konnte im Vergleich zum ursprünglich verwendeten Bradbury-Nielsen-Design im Durchschnitt IM-Peaks mit gleicher Intensität bei Verdopplung der Auflösung zeigen. Gerade bei flexiblen Molekülen, wie z.B. Peptiden, konnten somit schmale IM-Peaks detektiert werden. Somit könnte sich die Möglichkeit der Detektion von Peptidmischungen ohne HPLC-Vortrennung eröffnen. Neben den genannten Vorteilen gibt es jedoch auch Herausforderungen, die eine weitere Entwicklung des ESI IM-Spektrometers erfordern. Im folgenden Teil werden daher die wichtigsten Ergebnisse der vorgestellten fünf publizierten wissenschaftlichen Arbeiten einzeln und abschließend kritisch als Gesamtheit diskutiert.

4.1 Diskussion der wissenschaftlichen Schwerpunkte

Das ESI IM-Spektrometer als HPLC-Detektor

Die Grundlage der gesamten Arbeit war die Entwicklung eines eigenen ESI IM-Spektrometers, welches für den Flussratenbereich des Laufmittels zwischen 200 und 1500 $\mu\text{l}/\text{min}$ optimiert wurde. Eine Erhöhung der Flussrate verursacht zwei gegensätzliche Trends im ESI-Prozess. Einerseits führt sie zu einem Anstieg des ESI-Stroms (vgl. Gleichungen 2-13 und 2-19) und zur Erhöhung der Anzahl der Elektrolysereaktionen innerhalb der ESI-Kapillare, sodass verstärkt Ionen gebildet werden. Andererseits werden die Durchmesser, der beim ESI-Prozess entstehenden geladenen Tropfen größer, deren Abtropffrequenz erhöht (vgl. Gleichung 2-22) und die Ladung im Tropfen gesenkt (vgl. Gl. 2-3). Überwiegt der zweite beschriebene Trend, werden in kurzer Zeit viele geladene vorwiegend große Tropfen gebildet. Bei axialer Ausrichtung der ESI-Kapillare auf den Eingang des IM-Spektrometers würden demnach die großen Tropfen in die Desolvatationsregion des Spektrometers gelangen. Ab einer gewissen Tropfengröße können diese nicht mehr vollständig desolvatisiert werden, sodass die geladenen Flüssigkeitscluster zu verschiedenen Driftzeiten den Faraday-Detektor erreichen. Dies führt zu Störpeaks im IM-Spektrum, die die Auswertung erschweren. Das primäre Ziel in diesem Teil der Arbeit war demnach die effektive Überführung der freien Ionen und kleineren Tropfen in das IM-Spektrometer bei gleichzeitiger Abtrennung der größeren Flüssigkeitscluster.

Dafür wurde die Ionisationsregion im T-Zylinderdesign nach Kurnin *et al.* weiterentwickelt.⁵¹ In seinem wissenschaftlichen Artikel wird von einer ESI-Quelle, welche orthogonal zum Eingang des IM-Spektrometers in der Mitte einer zylinderförmigen Ionisationsquelle positioniert war, berichtet. Mit diesem Aufbau konnten Lösungsmittelflussraten bis zu 300 $\mu\text{l}/\text{min}$ erreicht werden. Auf dieser Grundlage konnte in der vorliegenden Arbeit durch Hinzufügen eines Mantelgases um die ESI-Kapillare und erhöhten ESI-Potentialen eine effektivere Zerstäubung und damit Flussraten bis zu 1500 $\mu\text{l}/\text{min}$ erreicht werden. Die bis dato höchste Flussrate eines ESI IM-Spektrometers ohne Trennung des Lösungsmittelflusses betrug 500 $\mu\text{l}/\text{min}$.⁵⁰

In der MS und der IM-Spektrometrie wird ESI normalerweise im sogenannten Conejet-Modus (vgl. Abb. 2.2-4) verwendet. Dieser zeichnet sich durch eine hohe Stabilität und eine möglichst geringe Tropfengrößenverteilung aus. Der Conejet-Modus entsteht durch das Anlegen eines bestimmten Potentials zwischen ESI-Kapillare und Gegenelektrode (vgl. Abb. 2.2-4). Meist werden metallische Kapillaren, Netze oder Platten als Gegenelektroden eingesetzt. In dieser Arbeit wurde jedoch eine zylinderförmige Gegenelektrode verwendet, in dessen Mitte sich die ESI-Kapillare befindet. Dadurch bildete sich ein sehr stabiler Multijet-Modus unterhalb der Corona-Grenzspannung aus. Für eine effektive Überführung der freien Ionen und kleineren Tropfen in das IM-Spektrometer war demnach eine umfassende Charakterisierung des ESI-Sprays durch Strom- und Streulichtmessungen erforderlich.

Die Streulichtaufnahmen des ESI-Sprays (Abb. 4.1-1 - links) zeigten, dass bei Erhöhung des Laufmittelflusses ein intensiver Jet in der Mitte des Spraykegels des Multijets entsteht. Das feinere Spray mit den kleineren Tropfen und freien Ionen befindet sich hingegen in den Außenbereichen des Kegels. Die großen Lösungsmittelcluster können somit unterstützt von den hohen Mantelgasströmen am Eingang des IM-Spektrometers vorbeigeführt werden, während die kleinen Cluster und freien Ionen effektiv ins Spektrometer überführt werden. Um einen stabilen Multijet über alle Flussraten zu erhalten,

musste bei Erhöhung der Flussraten auch das Potential zwischen ESI-Kapillare und Gegenelektrode erhöht werden. Somit verschob sich auch die Grenzspannung zwischen ESI und Korona-Grenzspannung mit steigenden Flussraten zu höheren Werten (Abb. 4.1-1 - rechts). Konnte bei Spannungen zwischen ESI-Kapillare und Gegenelektrode bei 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ schon bei 4 kV eine Lichtbogenentladung und ein hoher Stromabfluss an der ESI-Quelle beobachtet werden, wurde dies bei 1200 $\mu\text{l}/\text{min}$ erst bei 6 kV festgestellt. Bis zu diesem Zeitpunkt hatte niemand in der IM-Spektrometrie ohne Flussraten-splittung in diesem Flussratenbereich ein ESI-Spray erzeugt bzw. die Flussratenabhängigkeit der Koronaentladung für die hohen Flussraten untersucht.

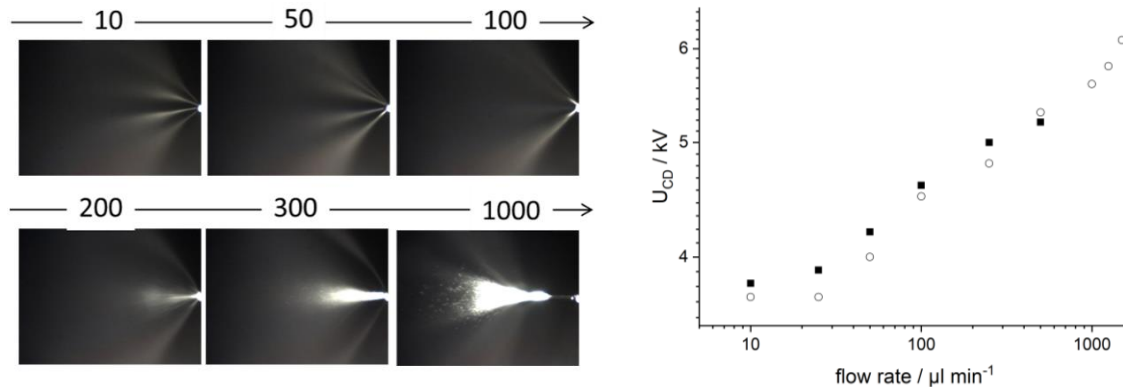


Abb. 4.1-1 - links: Streulichtaufnahmen des ESI-Sprays (Seitenansicht) bei unterschiedlichen Durchflussraten in $\mu\text{l}/\text{min}$; rechts: Grenzspannung für das Einsetzen der Koronaentladung U_{CD} in Abhängigkeit vom Lösungsmittelfluss mit (hohle Kreise) und ohne Mantelgas (ausgefüllte Vierecke)

Die Intensität mehrerer Analyten (z.B. TBAB und Arginin) blieb mit diesem Aufbau über einen breiten Flussratenbereich (200 -1500 $\mu\text{l}/\text{min}$) konstant. Somit konnten bei einer typischen HPLC-Flussrate von 300 $\mu\text{l}/\text{min}$ gute Nachweisgrenzen von 50 nM für Promazin im positiven Modus und 1 μM für 1,3-Dinitrobenzol im negativen Modus detektiert werden. Bei weiteren Untersuchungen wurde die Verwendung von Laufmittelgradienten bzw. Salzzusätzen im Laufmittel überprüft. Es wurden Wassergehalte von bis zu 90% und Elektrolytkonzentrationen bis zu 10 mM mit diesem Aufbau ohne erhebliche Intensitätsverluste realisiert. Die ersten Trennungen gering komplexer Gemische (5 und 12 Substanzen) konnten gezeigt werden. Diese im Rahmen der Doktorarbeit erste publizierte wissenschaftliche Arbeit legt somit die Eignung des ESI IM-Spektrometers als HPLC-Detektor dar.

HPLC ESI IM-Spektrometer: Charakterisierung, Datenverarbeitung und Anwendung

Die Anwendung des ESI IM-Spektrometers als HPLC-Detektor wurde nun anhand zweier ausgewählter komplexer Mischungen (24 Pestizide, 18 Aminosäuren) gezeigt. Um möglichst komplexe Mischungen zu trennen, braucht man eine hohe Peakkapazität. Hierfür sind die orthogonalen Trennmechanismen von HPLC und IM Spektrometrie von Vorteil. Eine hohe Orthogonalität wird erreicht, wenn beide Mechanismen nach unterschiedlichen, möglichst nicht in Zusammenhang stehenden, Stoffeigenschaften ein Gemisch auftrennen. Bei einem IM-Spektrometer ist die Ionenmobilität bzw. der Diffusionsquerschnitt das Hauptkriterium für die Driftzeit der Analyt-Ionen. Auf der HPLC-Säule hingegen ist die Wechselwirkung mit dem Säulenmaterial entscheidend für die Verweildauer eines Analyten auf der Säule. In dieser Arbeit wurde unter anderem eine C18 Umkehrphasensäule verwendet, in der die Polarität eines Analyten die Wechselwirkung mit der Säule bestimmt. Analyten,

die aufgrund ähnlicher Polarität nicht vollständig auf der Säule getrennt wurden (Koelution), konnten durch ihre unterschiedliche Ionenmobilität im IM-Spektrometer separiert detektiert werden.

Für das Beispiel der Pestizidmischung (Abb. 4.1-2) wurden Peakkapazität der einzelnen Trennmetho- den von 59.0 für die HPLC und 7.3 für das IM-Spektrometer erreicht. Durch die hohe Orthogonalität der Trennmetho- den ergibt sich zusammen somit eine effektive Gesamtpeakkapazität von 240 für die Pestizidtrennung mit dem HPLC ESI IM-Spektrometer. Aus diesem Grund konnte eine Gesamtzeit für die Trennung der 24 Pestizide von ca. 18 min mithilfe des HPLC ESI IM-Spektrometers erreicht werden. Mit einem klassischen UV-Spektrometer würde ein Chromatogramm ähnlich dem des Gesamt- ionenstroms (total ion current - TIC) im oberen Teil des Bildes von Abb. 4.1-2 entstehen. Dort lassen sich aufgrund von Koelutionen nur 20 Peaks erkennen. Die koeluiierenden Pestizide wurden jedoch in der Driftregion im IM-Spektrometer getrennt. Beispielhaft ist dies für die Pestizide 3, 4 und 5 an einem IM-Spektrum bei einer Retentionszeit von 1,85 min gezeigt (Abb. 4.1-2 - rechts). Über ihre spezifische Ionenmobilität bzw. Driftzeit lassen sich die Analyt-Ionen bei der Trennung zusätzlich identifizieren. In dieser Arbeit konnte somit die Trennung komplexer Gemische mit dem HPLC ESI IM-Spektrometer und dessen Vorteile demonstriert werden.

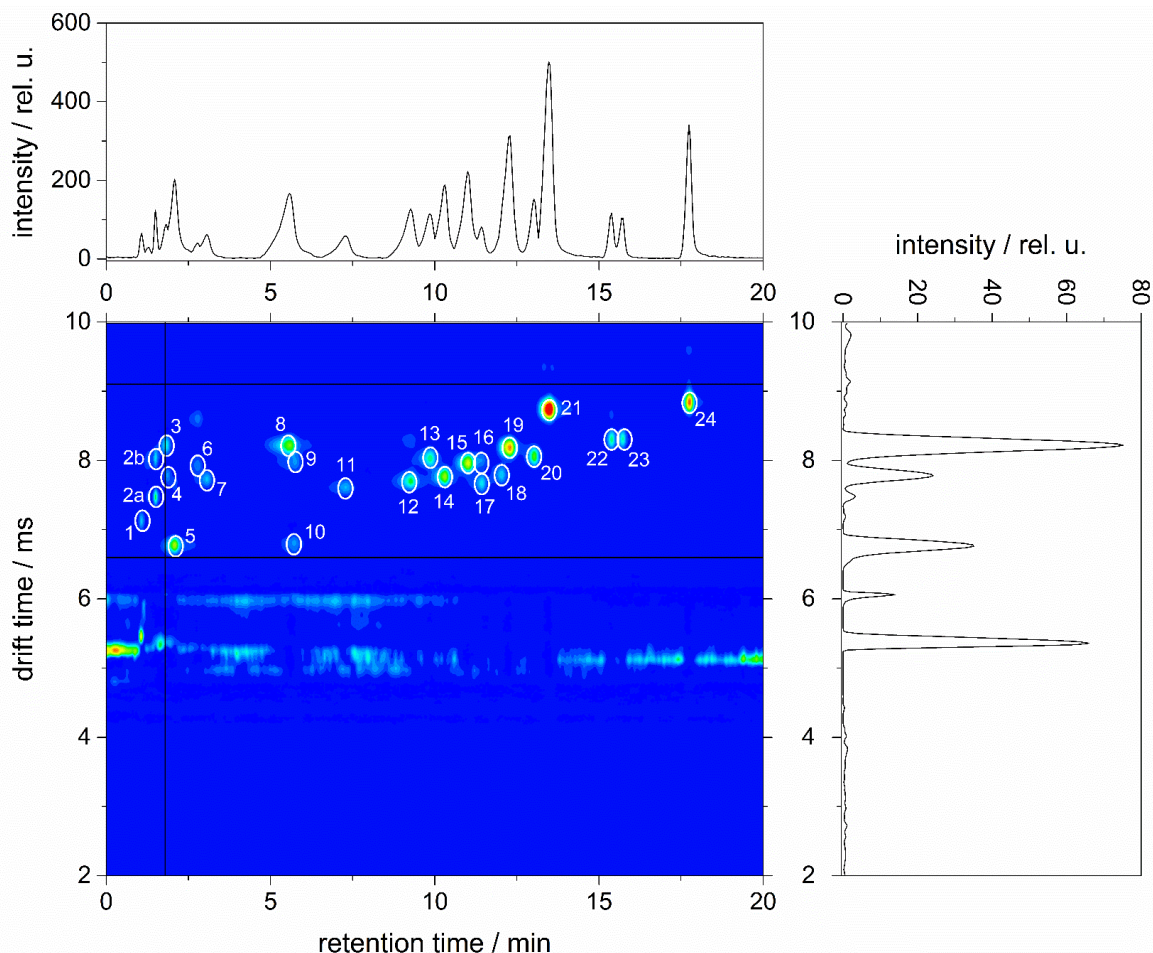


Abb. 4.1-2 - 2D-Darstellung einer HPLC-IM-spektrometrischen Trennung eines Gemisches von 24 Pestiziden mit TIC-Chromatogramm ($t_D = 6-9$ ms, obere Spur) und IM-Spektrum (rechte Spur) bei einer Retentionszeit von 1,85 min (die Zuordnung der Zahlen zu den Pestiziden ist im Originalartikel zu finden).

Echtzeit-Reaktionsmonitoring einer organischen Mehrstufenreaktion mit ESI-IM-Spektrometrie

Das ESI IM-Spektrometer wurde anschließend für die qualitative und quantitative Echtzeitüberwachung einer chemischen mehrstufigen Reaktion eingesetzt. Eine dreistufige chemische Reaktion, die aus der Sequenz einer Williamson-Synthese, einer Hydrierung und einer *N*-Alkylierung besteht, wurde zur Demonstration gewählt. Bei allen drei Reaktionstypen konnten alle Edukte, Zwischenprodukte und Produkte mit einer Driftzeit zur Massen-Ladungs-Korrelation identifiziert werden. Substanzen mit ähnlichen strukturellen Einheiten zeigten dabei einen linearen Driftzeit zu Massen-Ladungs-Zusammenhang. Dieser ist auf die Mason-Schamp-Gleichung (vgl. Gleichung 2-32) zurückzuführen. Bei konstanter Temperatur, Gasdichte, Gaszusammensetzung, elektrischen Feldstärke und Ladung des Ions hängt die Ionenmobilität bzw. die Driftzeit nur noch von dem Diffusionsquerschnitt und der Wurzel der reduzierten Masse des Analyt-Ions und des Driftgases ab. Bei strukturähnlichen Molekülen nimmt der Diffusionsquerschnitt jedoch im gleichen Maße wie die Masse zu, sodass ein linearer Zusammenhang von Driftzeit zur Masse pro Ladung resultiert.

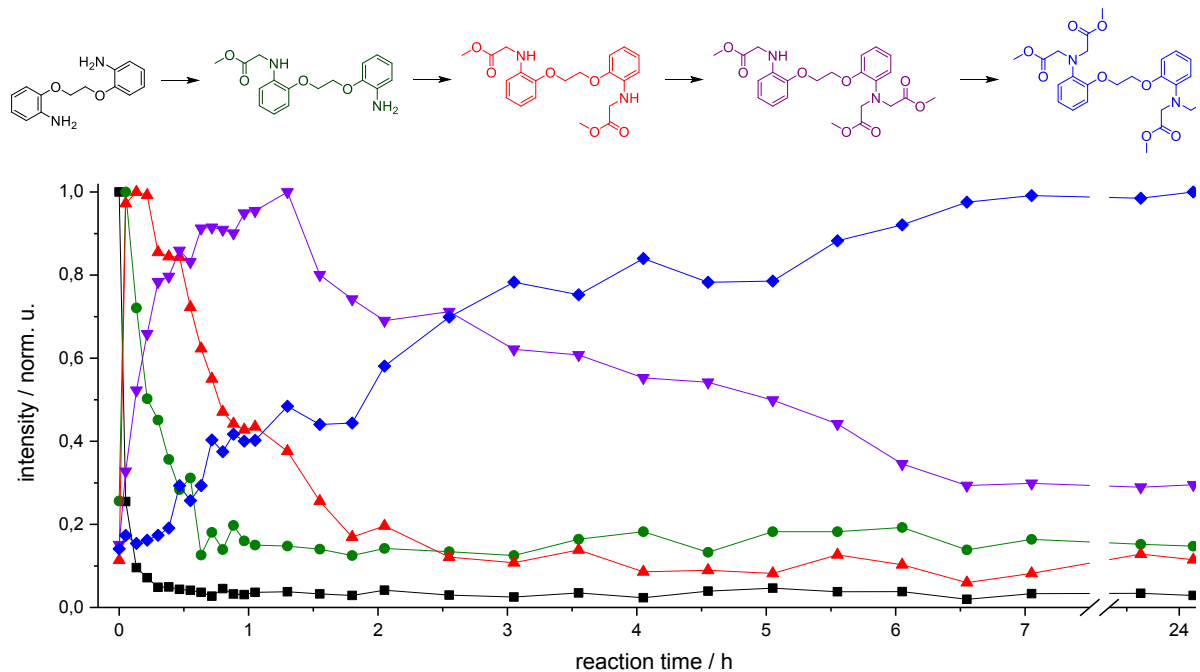


Abb. 4.1-3 - Intensitätsverläufe der Komponenten der schrittweisen *N*-Alkylierung zum 1,2-bis(aminophenoxy)ethan-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid methylester (BAPTA-AM) über die Reaktionszeit

Das Reaktionsmonitoring der chemischen Reaktionen basierte sowohl auf einfachen intensitätsbasierten als auch auf aufwendigeren konzentrationsbasierten Messungen. In Abb. 4.1-3 ist ein Beispiel für die Echtzeit-Überwachung der Intensitäten der verschiedenen Spezies einer *N*-Alkylierung gezeigt. Diese diente der Ermittlung des reaktionsbestimmenden Schritts und des Reaktionsendes. Um den Einfluss von Konkurrenzreaktionen beim ESI-Prozess auszuschließen, musste der Verlauf dieser Auftragung durch ESI IM-spektrometrische Messungen mit vorheriger HPLC-Trennung bestätigt werden. Ohne HPLC-Vortrennung müssen beim ESI-Prozess mehrere Analyten gleichzeitig ionisiert werden. Die Konzentration der Ladungen in einem Tropfen beim ESI sind jedoch begrenzt (vgl. Gleichung 2-3). Dadurch verringert sich die Anzahl an zu Verfügung stehenden Ladungen pro Analyt und es kommt zu sogenannten Konkurrenzreaktionen der beteiligten Analyten, um die begrenzte Anzahl der Ladungen. Lassen sich die beteiligten Analyten unterschiedlich gut ionisieren, könnten gut

ionisierbare Analyten die Ladungszahl im Tropfen stark minimieren, sodass Substanzen mit schlechter Ionisierbarkeit mit verminderter Intensität detektiert werden könnten. Durch die Separierung der Substanzen über eine HPLC-Vortrennung können diese Ladungskonkurrenzreaktionen nicht mehr stattfinden. In dem verwendeten Beispiel konnte der Verlauf der Graphen in Abb. 4.1-3 mit den Ergebnissen mit HPLC-Vortrennung bestätigt werden. Demnach konnte direkt aus den intensitätsbasierten Daten der letzte Schritt der Alkylierung als langwierigster und damit reaktionsbestimmender Schritt und 7 h als Ende der Reaktion ermittelt werden.

Die konzentrationsbasierten Messungen sollten die Ermittlung quantitativer Aussagen (Kinetik, Reaktionsordnung und Ausbeute) aus dem Reaktionsverlauf ermöglichen. Die Intensitäten der Einzelkomponenten im IM-Spektrum (Edukte, Produkte) mussten dafür in Konzentrationen überführt werden. Aus diesem Grund wurden Kalibrationsgeraden der Einzelkomponenten mit dem HPLC ESI IM-Spektrometer bei denselben HPLC- und IM-Parametern durchgeführt, die auch für die Proben aus dem Reaktionsmonitoring verwendet wurden. Die Intensität einer Komponente aus einer Probe aus dem Reaktionsmonitoring, konnte demnach über die Kalibrationsgerade direkt in eine Konzentration umgerechnet werden. Ohne HPLC-Vortrennung hingegen mussten die Ladungskonkurrenzreaktionen bei ESI berücksichtigt werden. Dafür wurde eine erweiterte Kalibrationsmethode entwickelt. Für die Kalibrationsmethode mussten die Intensitäten der Einzelkomponenten im IM-Spektrum bei verschiedenen Konzentrationsverhältnisse der beiden Einzelkomponenten zueinander ermittelt werden. Die Flächen unter den IM-Peaks der Komponenten wurden anschließend ins Verhältnis zur Summe beider Flächen gesetzt. Aus den Flächenverhältnissen wurden Korrekturfaktoren berechnet, die die Intensitätsunterdrückung der einen Komponente durch die andere berücksichtigt. Über die Korrekturfaktoren konnte dann die tatsächliche Konzentration eines Analyten in den Realproben errechnet werden, sodass ein quantitatives Echtzeit-Monitoring der Reaktion ohne HPLC-Vortrennung gelang. Erstmals wurde somit in dieser Arbeit eine dreistufige Reaktion qualitativ und quantitativ in Echtzeit überwacht und Kinetiken, Ausbeuten, Reaktionsende, reaktionsbestimmender Schritt und optimale Startbedingungen aus den IM-Spektren abgeleitet.

ESI-IM-Spektrometer im intermediären Druckbereich

Im zweiten Teil der Doktorarbeit wurden verschiedene Wege untersucht, das IM-Spektrometer weiterzuentwickeln. Eine Möglichkeit ist die Reduzierung des Druckes in den intermediären Druckbereich (300 bis 1000 mbar) mit dem Ziel der Verbesserung der Hochspannungssicherheit des Spektrometers. Hierbei wurde parallel zum Druck bzw. zur Gasdichte N , auch die elektrische Feldstärke E reduziert, sodass E/N konstant blieb. Wird hingegen nur N reduziert wird und E bleibt konstant könnte der Anwendungsbereich für große Moleküle (z.B. Peptide) erweitert werden, da die Driftzeiten der Peptid-Ionen und damit deren Verluste reduziert werden. Die Reduzierung des Druckes im Spektrometer reduzierte jedoch auch den Umgebungsdruck des ESI-Sprays, weshalb eine umfassende Charakterisierung des Sprays im intermediären Druckbereich vorgenommen werden musste. Ziel war es hierbei ein stabiles ESI-Spray bei reduziertem Druck zu erzeugen, das in möglichst intensive Peaks resultiert.

Mit einer orthogonal zu einer planaren Gegenelektrode ausgerichteten ESI-Quelle und einer Flussrate von 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ wurden Streulichtbilder des Sprays mithilfe einer EMCCD-Kamera aufgenommen. Bei Atmosphärendruck konnte so ein Taylor-Konus bei einem ESI-Potential $U_{\text{ESI}} = 3.7 \text{ kV}$ beobachtet

werden. Durch die Reduzierung des Umgebungsdrucks des ESI-Sprays war der Taylor-Konus bereits bei geringeren U_{ESI} zu erkennen. Der Grund für diesen Zusammenhang ist komplex und soll im Folgenden näher erläutert werden. Bei einem konstanten Radius der ESI-Kapillare und einem konstanten Abstand zur Gegenelektrode gilt nach Gleichung 2-1, dass U_{ESI} direkt proportional zur elektrischen Feldstärke an der Spitze der ESI-Kapillare E_c ist. Ändert man demnach U_{ESI} , wird E_c im gleichen Maß verändert. Der elektrostatische Druckes $p_E = \frac{1}{2} \epsilon_0 E_c^2$ wäre hierbei direkt proportional zu U_{ESI} . Wird der Umgebungsdruck des ESI-Sprays bei ansonsten konstanten Parametern verringert, steigt die Druckdifferenz zwischen dem Flüssigkeitsinneren und dem Umgebungsdruck auf $\Delta p > 0$ an. Nach Gleichung 2-16 muss damit der Formfaktor $a_1 < 0$ sein, damit eine positive Oberflächenspannung resultiert.⁷³ Es entsteht ein langgezogener Meniskus, der zur Sprayachse hin gekrümmt ist.

$$E_c = \frac{2U_{\text{ESI}}}{r_c \ln(4d_{\text{ce}}/r_c)} \quad 2-1$$

$$\frac{1}{2} \epsilon_0 E_c^2 = \frac{\gamma}{r \cdot \tan \alpha} \quad 2-15$$

$$\frac{\Delta p}{\gamma} = -0,524826 a_1 \quad 2-16$$

Um bei reduzierten Umgebungsdruck wieder die energetisch günstigste Form eines ideal-konischen Taylor-Konus zu erreichen, muss auch der Drucks der leitenden Flüssigkeit verringert werden bis $\Delta p = 0$ ist (vgl. 2.2). Dies kann nach Marginean zum Beispiel durch eine Verringerung des elektrostatischen Druckes p_E geschehen.¹³⁰ Ist $\Delta p = 0$ erreicht, gilt die Gleichung 2-15. Diese Gleichung kann nun die Aussage von Marginean stützen. Die Form des Taylor-Konus wird in 2-15 über den Term $r \cdot \tan \alpha$ beschrieben. Eine Formänderung durch den reduzierten Umgebungsdruck würde sich in dieser Gleichung in einer Vergrößerung dieses Terms äußern. Aus diesem Grund müsste sich bei konstanter Oberflächenspannung die elektrische Feldstärke E_c und damit U_{ESI} verkleinern, damit die Bedingungen für einen idealen Taylor-Konus ($\Delta p = 0$) weiterhin erfüllt bleiben. Bei geringerem Druck wird somit schon bei geringeren Potentialdifferenzen an der ESI-Kapillare der Taylor-Konus erreicht.

Der reduzierte Umgebungsdruck hat außerdem Einfluss auf die Verdunstung der geladenen Tropfen. Die Verdunstung ist Voraussetzung für die Coulomb-Explosionen und die Bildung von Tochtertröpfchen bzw. der freien Ionen am Ende einer Kaskade von Tropfenzerfällen. Sie wird über den Sättigungsdampfdruck der verdunstenden Flüssigkeit definiert. Wird der Umgebungsdruck minimiert, hat dies eine verlangsamte Verdunstung der Tropfen zur Folge. Dies ist einerseits darauf zurückzuführen, dass sich der Dampfdruck des Lösungsmittels im Druckbereich von 300-1000 mbar kaum (-0,5 %) ändert. Der entsprechende Zusammenhang zwischen dem Dampfdruck p bei Anliegen eines Druckes Δp und dem Dampfdruck p^* , wenn kein zusätzlicher äußerer Druck einwirkt, kann durch die Gleichung 4-1 mithilfe des molaren Volumens V_m beschrieben werden.¹³¹

$$\ln \frac{p}{p^*} = \frac{V_m}{RT} \Delta p \quad 4-1$$

Andererseits wird bei der Verdampfung des Lösungsmittels der Tropfen durch die aufzubringende Verdampfungswärme kälter. Bei Normaldruck wird thermische Energie durch Stöße mit Gasmolekülen (N_2) der Umgebung zugeführt. Die Energieübertragung hängt von zwei Faktoren ab: der Umgebungstemperatur und der Stoßfrequenz. Während die Umgebungstemperatur bei reduziertem Druck

konstant bleibt, nehmen die Stoßfrequenz und damit die Wärmezufuhr proportional zum Druck ab, d.h. bei einer Reduktion des Druckes von 1000 auf 333 mbar um 1/3. Bei höherem Druck erfolgt also eine effizientere Thermalisierung der durch Verdunstung abkühlenden Tropfen. Fisenko et al.⁹⁴ zeigten für den Druckbereich von 27 - 107 mbar, dass die Verdunstungskühlung eines Tropfen-Gas-Gemischs mit fallendem Druck zunimmt. Eine Druckminimierung hat demnach folgenden Einfluss auf das Elektrospray: (1) ESI kann bei geringen U_{ES} stattfinden, (2) die Verdunstungskühlung bei den Tropfen wird verstärkt, (3) die Geschwindigkeit der Kaskade von Tropfenzerfällen somit verlangsamt und daher (4) die Freisetzung der Ionen aus den Tropfen erschwert.

Im IM-Spektrometer bedeutet eine Verringerung des Drucks bzw. der Gasdichte N eine Abnahme der Zahl der Stöße von Ionen und Driftgasmolekülen.¹³² Wird die elektrische Feldstärke E um den gleichen Faktor wie N verringert, resultiert ein konstantes Verhältnis E/N und die Driftzeiten der Ionen bleiben bei Druckvariation unverändert. Die Intensitäten der Strommessungen am Faraday-Detektor am Ende des IM-Spektrometers I_{FAR} sind bei konstantem E/N hauptsächlich auf die Einflüsse der Druckvariation beim ESI-Prozess zurück zu führen und eignen sich daher für eine Charakterisierung des Sprays.

Die oben aufgeführten Einflüsse (1-4) zur Druckabhängigkeit von ESI decken sich mit den Beobachtungen der Strommessungen im Kapillar-Platten-Aufbau, sowie im ESI IM-Spektrometer. In Abb. 4.1-4 a und b kann bei geringeren Umgebungsdrücken schon für kleine ESI-Potentiale U_{ES} ein Strom an der Gegenelektrode I_{TIC} bzw. am Faraday-Detektor I_{FAR} beobachtet werden. Die ESI-Offsetspannung (E_{on}) nimmt demnach mit sinkendem Umgebungsdruck ab.

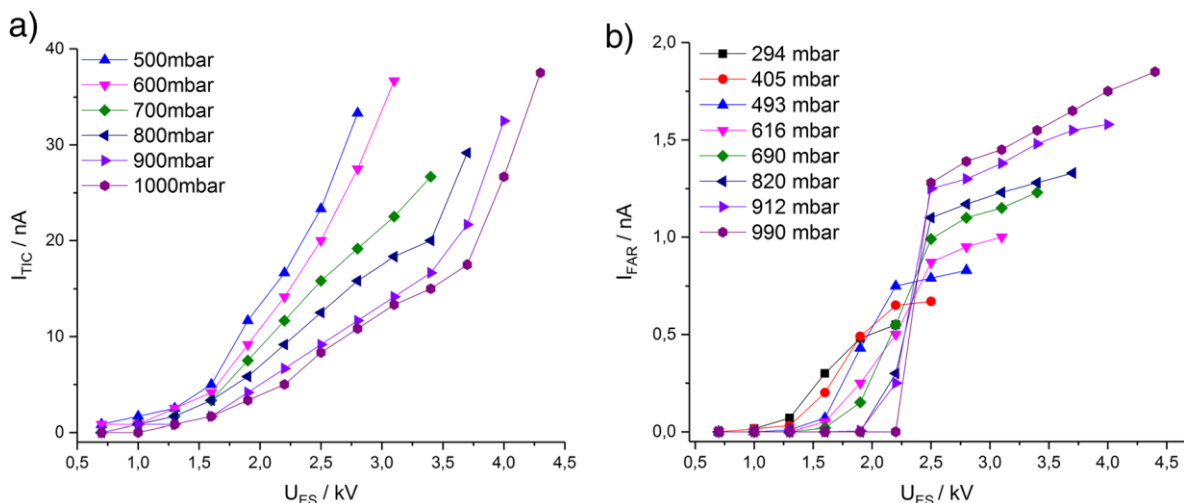


Abb. 4.1-4 - (a) Gesamtionenstrom an der Gegenelektrode I_{TIC} im Kapillar-Platten-Aufbau und (b) induzierter Strom in den Faradaydetektor I_{FAR} am Ende des IM-Spektrometers bei unterschiedlichen Drücken in Abhängigkeit vom ESI-Potential U_{ES} , Lösungsmittelfluss 20 $\mu\text{l}/\text{min}$, Mantelgasstrom 1200 ml/min, Driftgasstrom 500 ml/min

Für die Stärke der Strommessungen wurden jedoch unterschiedliche Trends zwischen I_{TIC} und I_{FAR} bei Variation von U_{ES} festgestellt. Während der Gesamtionenstrom mit steigender U_{ES} kontinuierlich über alle Drücke zunahm (4.1-4 a), konnte für I_{FAR} nach einer druckabhängigen Schwellenspannung ein starker Anstieg des Stroms beobachtet werden (4.1-4 b). Die maximalen Intensitäten von I_{FAR} sind bei höheren Drücken größer als bei kleineren. Bei I_{TIC} hingegen ist kein klarer Trend zwischen Druck und maximaler Intensität zu erkennen. Dies ist auf die verstärkte Verdunstungskühlung der Tropfen bei reduziertem Umgebungsdruck zurück zu führen. Werden bei I_{TIC} an der Gegenelektrode alle beim ESI-

Prozesses freigesetzten Ladungen erfasst, gelangen nur die kleineren geladenen Tropfen und freien Ionen zum Faraday-Detektor am Ende des IM-Spektrometers. Ist die verlangsamte Geschwindigkeit der Kaskade von Tropfenzerfällen bei reduziertem Druck für die Messungen von I_{TIC} also irrelevant, hat sie großen Einfluss auf die Intensität von I_{FAR} . Große geladene Tropfen haben eine höhere Anzahl an Stößen mit den Driftgasmolekülen als kleine und werden daher stärker seitlich zur Driftichtung abgelenkt und werden an Bauteilen des IM-Spektrometers entladen. Die abgegebene Ladung kann somit nicht mehr zur Intensität von I_{FAR} beitragen. Die Verdunstungskühlung ist bei kleinen Drücken stärker, sodass mehr große geladene Tropfen ins Spektrometer gelangen und die maximale Intensität von I_{FAR} für kleine Drücke geringer war. Mögliche Verlustquellen für die Tropfen im IM-Spektrometer, wie das Einlassnetz, wurden ermittelt und so erstmals eine vollständige Ionenverlustbilanz für ein IM-Spektrometer in diesem Druckbereich durchgeführt.

Wird bei einer Verringerung der Gasdichte N die elektrische Feldstärke E im IM-Spektrometer hingegen konstant gehalten, führt dies zu einer Verringerung der Ionenverluste im IM-Spektrometer. Gerade Moleküle mit großem Diffusionsquerschnitt und damit hohen Driftzeiten, wie z.B. Peptide oder Polymere, könnten durch die verringerten Kollisionen mit den Driftgasmolekülen bei niedrigeren Driftzeiten detektiert werden. Die Ionenverluste bei geringen Drücken konnten durch erhöhte E/N kompensiert werden. So wurden ähnliche Nachweisgrenzen bei 500 mbar und 1 bar erhalten. In diesem Teil der Arbeit wurde demnach die Zugänglichkeit der ESI IM-Spektrometrie zu niedrigen Innendrücken und damit zu einer erhöhten Spannungssicherheit gezeigt.

Ein alternatives Ionentor mit Hochfeld-Pulsschaltung für die ESI IM-Spektrometrie

Eine andere Weiterentwicklungsmöglichkeit des ESI IM-Spektrometers mit dem Ziel der Erhöhung der Auflösung war die Einführung eines alternativen Ionentordesign mit Feldschaltung (*field-switching ion gate* - FSIG, Abb. 4.1-5). Der Wechsel des Ionentordesigns vom klassischen Bradbury-Nielsen-Ionentor (BNG) zu unserem neuen Ionentordesign verdoppelte die Auflösung auf $R > 100$ für den IM-Peak des Standards TBAB bei gleichbleibender Sensitivität.

Grund für die verbesserte Auflösung waren die möglichen kürzeren Pulszeiten des FSIG im Vergleich zum BNG. Beim BNG bestimmt die Höhe der elektrischen Feldstärke der Desolvationsregion die Geschwindigkeit der Überführung der Ionen in die Driftregion. Die Feldstärke der Desolvationsregion ist jedoch konstant, weshalb eine Verringerung der Toröffnungszeit zu einem Verlust an Ionen bzw. Intensität der IM-Peaks führt. Bei sehr kurzen Pulszeiten befindet sich zusätzlich ein Teil der Ionen zu nah an den Drähten des BNG. Schalten diese nach Ablauf der Toröffnungszeit in die Sperrspannung zurück, entstehen Feldinhomogenitäten, die die Ionen in der Driftregion ablenken können. Breite und wenig intensive IM-Peaks wären das Resultat. Die hohen Pulsspannungen beim FSIG hingegen resultierten in hohen elektrischen Feldstärken in der Ionentorregion und führen zu einer extrem schnellen Überführung der Ionen in die Driftregion. Durch die elektrisch abgeschirmte Driftregion beim FSIG hat der Spannungspuls beim Schließen des Ionentors keinen Einfluss mehr auf die Ionen in dieser Region. Es resultierten intensive IM-Peaks mit geringen Halbwertsbreiten.

Zur Demonstration des höheren Auflösungsvermögens wurde das IM-Spektrum des Peptids RAKFKQLL dargestellt. Die Auflösung des Peptidpeaks ist $R = 68$. Der Vergleich der Peakprofile bei Verwendung eines BNG und eines FSIG zeigt für beide Designs eine gute Gaußform, jedoch ist die Halbwertsbreite beim FSIG nur halb so breit. Exemplarisch wurden insgesamt drei Peptide als Vertreter für saure,

neutrale und basische Peptide untersucht. Erstmals wurden Auflösungen um $R = 90$ und LODs bis $2 \mu\text{M}$ für Peptide bei einem stand-alone IM-Spektrometer detektiert.

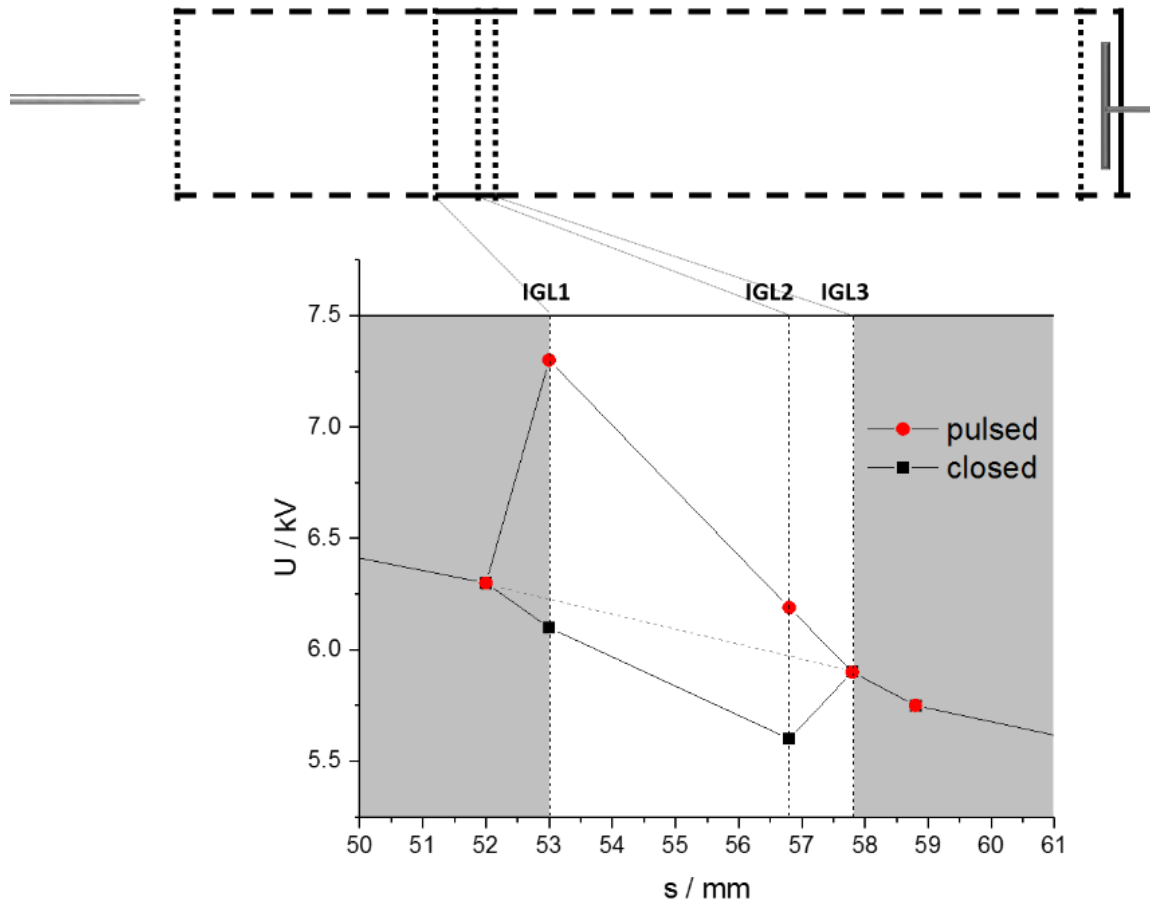


Abb. 4.1-5 - Schematische Darstellung des ESI-IM Spektrometers mit dem Drei-Gitter-Ionentor-Design mit Pulsschaltung. Die angelegten Spannungen (U) werden in Abstand (s) zum Einlass des Spektrometers im gepulsten und geschlossenen Modus für die Ionengitter (IG) gezeigt. Die Steigung der angezeigten Linien präsentiert die Stärke des elektrischen Feldes in den Regionen im Spektrometer.

4.2 Zusammenfassende Diskussion und Ausblick

Das im Rahmen dieser Doktorarbeit entstandene und weiterentwickelte ESI IM-Spektrometer zeichnet sich durch eine gute Nachweisempfindlichkeit bis in den nanomolaren Bereich, der Trennung von Isomeren und schnellen Detektionszeiten < 20 ms aus. Die einzigartige zylinderförmige Ionisationsregion mit hohen ESI-Spannungen und mantelgasunterstützter ESI führt zu einem stabilen Multijet-Spraymodus, der hohe Toleranzen gegenüber Veränderungen der gesprühten Flüssigkeit ermöglicht. Dazu gehören HPLC-Parameter, wie die Zusammensetzung des Lösungsmittels (10-90% Wasseranteil zu organischem Lösungsmittel), die Höhe der Flussrate (200 bis 1500 $\mu\text{l}/\text{min}$) und der Zusatz von Salzen (bis zu 10 mM). Demnach sind in der HPLC übliche Trennläufe mit Pufferzusätzen und der Einsatz von Gradienten mit dem ESI IM-Spektrometer als Detektor verwendbar. Außerdem ermöglicht ESI die Ionisation eines breiten Probenspektrums. Die allein in dieser Arbeit untersuchten Stoffgruppen waren: Pestizide, Antibiotika, Neuroleptika, Aminosäuren, Peptide, Polymere, Zucker und Tenside.

Die beiden orthogonalen Trennmechanismen von HPLC und IM-Spektrometer ergeben eine effektive Gesamtpeakkapazität von 240. Die Komponenten von Mischungen geringer Komplexität können somit schnell getrennt und über ihre Driftzeit in Echtzeit identifiziert werden. Eine mögliche Anwendung des Detektors könnte die schnelle Erkennung von Fremdstoffen oder ungewollten Bestandteilen in einer komplexen Matrix sein. Erfolgreich getestet wurde diese Anwendung bereits durch unseren damaligen Projektpartner KNAUER an einem Beispiel einer Pestizidbelastung in einer Honigmatrix. Durch einen Abgleich der 2D-Spektren der HPLC-IM-Daten der Honigmatrix mit und ohne Pestizidbelastung, das sogenannte „Map Matching“, konnten zusätzliche Peaks bei der belasteten Probe festgestellt werden. Vorherige Vergleichsmessungen mit den reinen Pestiziden führten zu einer schnellen Identifizierung, dass es sich um ein Pestizid und zusätzlich um welches Pestizid es sich handelte.

Ein weiteres Anwendungsfeld des ESI IM-Spektrometers ergibt sich bei der Unterstützung der Methodenentwicklung für einen stand-alone HPLC-Trennungsgang. Bei einer stand-alone HPLC-Trennung sollten alle Komponenten eines Gemisches vollständig auf der Retentionszeitachse getrennt werden. Die dabei ungewollten Koelutionen könnten durch die zweite Trenndimension des IM-Spektrometers schnell erkannt und die verwendete Methode (Lösungsmittelgradient, Anfangslösungsmittelzusammensetzung) zügig angepasst werden. Dies könnte die Zeit für eine Methodenentwicklung für eine stand-alone HPLC-Trennung minimieren. Die Identifizierung der Komponenten über die Driftzeit kann zusätzlich, gerade bei unbekanntem Gemischen, den Prozess der Methodenentwicklung erheblich beschleunigen. Über die chemische Struktur des identifizierten Stoffs kann auf die Molekül-Säulen-Wechselwirkung zurückgeschlossen werden und anschließend die Methode gezielt angepasst werden.

Weiterhin könnten komplexe isomere Gemische durch die HPLC ESI IM-Spektrometrie analysiert werden. Die verschiedenen Stoffklassen im Gemisch würden aufgrund ihrer unterschiedlichen Polarität auf der HPLC-Säule und die Isomere aufgrund ihrer sich unterscheidenden Diffusionsquerschnitte im IM-Spektrometer getrennt werden. Die möglichen Anwendungen des Spektrometers als HPLC-Detektor werden jedoch durch eine geringe Auflösung $R = 40-50$ und die fehlende Sensitivität des ESI IM-Spektrometers für größere Moleküle ($M > 1000$ Da) eingeschränkt. Ansätze zur Lösung beider Einschränkungen konnte jedoch im Rahmen dieser Arbeit gefunden werden und werden im Folgenden dargestellt.

Je größer der Diffusionsquerschnitt eines Ions ist, umso wahrscheinlicher kommt es zu Zusammenstößen der Ionen mit den Driftgasmolekülen im IM-Spektrometer. Eine verstärkte Anzahl an Kollisionen zwischen Ionen und Driftgasmolekülen äußert sich in einer größeren Driftzeit, einer höheren Halbwertsbreite und verstärkten diffusionsbedingten Ionenverlusten aufgrund der Entladung der Ionen an der Spektrometerinnenwandung. Diese Einflüsse führen zu einer verminderten Sensitivität des IM-Spektrometers für Ionen mit großer Diffusionsquerschnitte. Um zu geringeren Driftzeiten und damit zu weniger Zusammenstößen zwischen Ionen und Driftgasmolekülen zu gelangen kann zum Beispiel der Quotient aus elektrischer Feldstärke zur Gasdichte E/N im IM-Spektrometer erhöht werden. Die Verringerung des Druckes im Spektrometer in den intermediären Druckbereich wurde unter anderem deshalb untersucht. Die Verringerung des Druckes bei gleichbleibender Feldstärke führte zu einer geringen Anzahl an Zusammenstößen der Ionen mit den neutralen Gasmolekülen in Drift- und Desolvationsregion. Dies führt zu einer verlangsamten Desolvation der geladenen Tropfencluster im ESI. Die mit der Druckreduktion einhergehende Reduktion des Elektrospraystroms führt zu einer geringen Ionisation der Moleküle, die jedoch durch eine effizientere Überführung der Ionen aufgrund der Erhöhung von E/N ausgeglichen werden konnte. Die verlangsamte Desolvation könnte wiederum durch die Verwendung von nanoESI-Quellen kompensiert werden. Kleinere Kapillarradien führen zu kleineren Starttropfendurchmessern und verkürzen damit die Zeit der Kaskade von Tropfenzerfällen. Mithilfe dieser Publikation könnte eine stabile ESI im intermediären Druckbereich gezeigt und durch den Parameter der Druckvariation im IM-Spektrometer die Sensitivität auf einen breiteren Massenbereich erweitert werden.

Die Auflösung der IM-Peaks hingegen konnte durch den Wechsel des Ionentors erheblich verbessert werden. Von anfänglich $R = 40-50$ für das klassisch verwendete BNG konnte die Auflösung im Rahmen der Arbeit durch das alternative Ionentor mit Hochfeld-Pulsschaltung (FSIG) auf $R = 80-100$ erhöht werden. Dies resultiert in einer theoretischen Verdopplung der Peakkapazität des IM-Spektrometers, die ihrerseits zu einer starken Erhöhung der effektiven Peakkapazität eines HPLC ESI IM-Spektrometers mit FSIG führen könnte. Ein weiterer Vorteil des FSIG ist die einfache Herstellung der drei robusten Netze im Vergleich zu den filigranen Drähten, die für das BNG verwendet werden. Bisher wurden jedoch beide Weiterentwicklungen (FSIG und Druckreduktion) nur für Flussraten im unteren $\mu\text{l}/\text{min}$ -Bereich und mit axial ausgerichteter ESI-Quelle getestet. Der Einsatz für den Flussratenbereich zwischen 200-1500 $\mu\text{l}/\text{min}$ war jedoch im zeitlichen Rahmen der Arbeit nicht mehr möglich.

Fernab der Verwendung als HPLC-Detektor konnte im Rahmen der Arbeit das ESI IM-Spektrometer als stand-alone Methode erstmalig für die quantitative und qualitative Echtzeitanalyse einer chemischen dreistufigen Reaktion eingesetzt werden. Die qualitative Analyse kann über vorher gemessene Referenzproben oder über die Driftzeit zur Massen-Ladungs-Korrelation in Echtzeit stattfinden. Für die quantitative Analyse wurde eine neue erweiterte Kalibrationsmethode eingeführt, die über Korrekturfaktoren die Ladungskonkurrenzreaktionen (siehe 4.1) beim ESI-Prozess berücksichtigt. Überprüft wurden die Ergebnisse der Kalibrationsmethode über Messungen mit HPLC-Vortrennung, um Konkurrenzreaktionen während des ESI-Prozesses ausschließen zu können. Die Ergebnisse zeigten für die gering komplexe Probe eine gute Übereinstimmung. Ist jedoch das Aufstellen einer Matrix zur Ermittlung der Korrekturfaktoren für ein Zweikomponentensystem noch überschaubar, kann das Aufstellen einer Matrix größerer Mehrkomponentensysteme aufwendig werden. Für hochkomplexe Proben aus einer Reaktionsmischung könnte daher eine schnelle Vortrennung über eine HPLC die bessere Wahl sein.

Die Proben aus der chemischen Reaktion für die ESI IM-spektrometrischen Untersuchungen wurden mithilfe einer Spritze entnommen. Würde die Probenahme z.B. über ein Schlauchsystem oder eine ähnliche Konstruktion direkt mit dem Reaktor verbunden sein, wäre auch ein Online-Monitoring einer chemischen Reaktion mit dem (HPLC) ESI IM-Spektrometer umsetzbar. Bei einer Kommerzialisierung des Gerätes könnten so zukünftig Synthesen mit einem schnellen und preiswerten Tool überwacht werden. Die direkte Bestimmung der Ausbeute, der Reaktionskinetik und des reaktionsbestimmenden Schrittes wäre somit online möglich. Ansätze zu diesem Thema zeigte bisher nur die Firma *Excellims*, die weltweit das einzige kommerziell erhältliche HPLC ESI IM-Spektrometer (IA3100 HPIMS for HPLC) produzieren. Dieses Gerät ist laut eigenen Angaben des Herstellers jedoch auf den unter $\mu\text{l}/\text{min}$ -Bereich beschränkt und besitzt eine Auflösung von 70.¹³³

Im Vergleich zu diesem kommerziell erhältlichen Gerät wurde unter anderem im Rahmen dieser Arbeit gezeigt, dass der Flussratenbereich von 200 bis 1500 $\mu\text{l}/\text{min}$ und Auflösungen zwischen 80-100 mit einem ESI IM-Spektrometer als HPLC-Detektor möglich sind. Mithilfe der Umsetzung eines IM-Spektrometers mit neuem Ionentordesign (FSIG) bzw. der Betrieb im intermediären Druckbereich könnte eine erhebliche Verbesserung bei der Trennung und Detektion komplexer biologischer Mischungen zeigen und weist auf das bisher noch nicht genutzte Potential des Spektrometers hin. Das schon sehr breite Probenspektrum könnte darüber hinaus durch die Verwendung einer anderen Atmosphärenionisationsmethode (vgl. Abschnitt 2.) könnte zusätzlich erweitert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde somit ein schneller, preiswerter und leistungsstarker HPLC-Detektor entwickelt, der verschiedene Einsatzmöglichkeiten besitzt und mögliche Weiterentwicklungen bereithält.

I. Literaturverzeichnis

- (1) Keller, T.; Miki, A.; Regenscheit, P.; Dirnhofer, R.; Schneider, A.; Tsuchihashi, H. Detection of designer drugs in human hair by ion mobility spectrometry (IMS). *Forensic Sci. Int.* **1998**, *94* (1–2), 55–63.
- (2) Roehl, J. E. Environmental and Process Applications for Ion Mobility Spectrometry. *Appl. Spectrosc. Rev.* **1991**, *26* (1–2), 1–57.
- (3) Dwivedi, P.; Schultz, A. J.; Hill Jr., H. H. Metabolic Profiling of Human Blood by High Resolution Ion Mobility Mass Spectrometry (IM-MS). *Int. J. Mass Spectrom.* **2010**, *298* (1–3), 78–90.
- (4) Ewing, G. J.; Atkinson, D. a; Eiceman, G. A. A critical review of ion mobility spectrometry for the detection of explosives and explosive related compounds. *Talanta* **2001**, *54* (3), 515–529.
- (5) Vautz, W.; Nolte, J.; Fobbe, R.; Baumbach, J. I. Breath analysis-performance and potential of ion mobility spectrometry. *J. Breath Res.* **2009**, *3* (3), 36004.
- (6) Vautz, W.; Zimmermann, D.; Hartmann, M.; Baumbach, J. I.; Nolte, J.; Jung, J. Ion mobility spectrometry for food quality and safety. *Food Addit. Contam.* **2006**, *23* (11), 1064–1073.
- (7) Eiceman, G. A.; Karpas, Z.; Hill, H. H.; Jr. *Ion Mobility Spectrometry, Third Edition*; 2013.
- (8) St. Louis, R. H.; Hill Jr., H. H.; Eiceman, G. A. Ion Mobility Spectrometry in Analytical Chemistry. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **1990**, *21* (5), 321–355.
- (9) Hill Jr., H. H.; Simpson, G. Capabilities and limitations of ion mobility spectrometry for field screening applications. *F. Anal. Chem. Technol.* **1997**, *1* (3), 119–134.
- (10) Vautz, W.; Mauntz, W.; Engell, S.; Baumbach, J. I. Monitoring of Emulsion Polymerisation Processes using Ion Mobility Spectrometry-A Pilot Study. *Macromol. React. Eng.* **2009**, *3* (2–3), 85–90.
- (11) Wu, C.; Siems, W. F.; Klasmeier, J.; Hill Jr., H. H. Separation of isomeric peptides using electrospray ionization/high-resolution ion mobility spectrometry. *Anal. Chem.* **2000**, *72* (2), 391–395.
- (12) Asbury, G. R.; Hill Jr., H. H. Evaluation of ultrahigh resolution ion mobility spectrometry as an analytical separation device in chromatographic terms. *J. Microcolumn Sep.* **2000**, *12* (3), 172–178.
- (13) Dwivedi, P.; Wu, C.; Matz, L. M.; Clowers, B. H.; Siems, W. F.; Hill Jr., H. H. Gas-Phase Chiral Separations by Ion Mobility Spectrometry. *Anal. Chem.* **2006**, *78* (24), 8200–8206.
- (14) Hill Jr., H. H. Ion mobility spectrometry. *Anal. Chem.* **1990**, *62* (23), 1201–1209.
- (15) Rutherford, E. The Velocity and Rate of Recombination of the Ions of Gases exposed to Röntgen Radiation. *Philos. Mag.* **1897**, *44* (270), 422–440.
- (16) Langevin, P. M. L'ionisation des gaz. *Ann Chim Phys.* **1903**, *28*, 289–384.
- (17) Loeb, L. B. The Mobilities of Electrons in Air. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1923**, *9* (10), 335–340.
- (18) Grindley, G. C.; Tyndall, A. M. LXXII. The mobility in air of ions produced in another gas. *Philos. Mag. Ser. 6* **1924**, *48* (286), 711–719.
- (19) Tyndall, A. M.; Grindley, G. C. The Mobility of Ions in Air. Part I. Negative Ions in Moist Air. *Proc. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.* **1926**, *110* (754), 341–358.
- (20) Tyndall, A. M.; Grindley, G. C. The Mobility of Ions in Air. Part II. Positive Ions of Short Age. *Proc. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.* **1926**, *110* (754), 358–364.

- (21) Tyndall, A. M.; Phillips, L. R. The Mobility of Ions in Air. Part III. Air Containing Organic Vapours. *Proc. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.* **1926**, *111* (759), 577–591.
- (22) Bradbury, N. The Absolute Values of the Mobilities of Gaseous Ions. *Phys. Rev.* **1931**, *38* (10), 1905–1906.
- (23) Haynes, R. M. Mass-Spectrometric Study of Ions at Near-Atmospheric Pressure. III. The Alpha Radiolysis of Methane. *J. Chem. Phys.* **1966**, *45* (11), 3899.
- (24) Good, A.; Durden, D. A.; Kebarle, P. Ion–Molecule Reactions in Pure Nitrogen and Nitrogen Containing Traces of Water at Total Pressures 0.5–4 torr. Kinetics of Clustering Reactions Forming $H+(H_2O)_n$. *J. Chem. Phys.* **1970**, *52* (1), 212.
- (25) Mason, E.; Schamp, H. W. Mobility of Gaseous Ions in Weak Electric Fields. *Ann. Phys.* **1958**, *4*, 233–270.
- (26) Ellis, H. W.; Pai, R. Y.; McDaniel, E. W.; Viehland, L. A.; Mason, E. A. Transport properties of ions in gaseous ions over a wide energy range. *At. Data Nucl. Data Tables* **1976**, *17*, 177–210.
- (27) Mason, E. A.; McDaniel, E. W. *Transport Properties of Ions in gases*; John Wiley & Sons, Inc: Weinheim, FRG, 1988.
- (28) Cohen, M. J.; Karasek, F. W. Plasma Chromatography - A New Dimension for Gas Chromatography and Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. Sci.* **1970**, *8*, 330–337.
- (29) Karasek, F.; Hill Jr., H. H.; Kim, S. Qualitative Studies of Trace Constituents by Plasma Chromatography. *Anal. Chem.* **1971**, *43* (11), 1441–1447.
- (30) Keller, R. A.; Metro, M. M. Plasma Chromatography. *Sep. Purif. Methods* **1974**, *3* (1), 207–244.
- (31) Wernlund, R. F.; Carroll, D. I.; Kilpatrick, D.; Cohen, M. J. Apparatus and methods for measuring ion mass as a function of mobility, 1974.
- (32) Baim, M.; Hill Jr., H. H. Tunable selective detection for capillary gas chromatography by ion mobility monitoring. *Anal. Chem.* **1982**, *54* (1), 38–43.
- (33) Spangler, G. E.; Carrico, J. P. Membrane inlet for ion mobility spectrometry (plasma chromatography). *Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys.* **1983**, *52* (2–3), 267–287.
- (34) Eiceman, G. A.; Leasure, C. S.; Vandiver, V. J.; Rico, G. Flow characteristics in a segmented closed-tube design for ion-mobility spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **1985**, *175* (C), 135–145.
- (35) Rokushika, S.; Hatano, H.; Hill Jr., H. H. Ion mobility spectrometry in carbon dioxide. *Anal. Chem.* **1986**, *58* (2), 361–365.
- (36) Cumeras, R.; Figueras, E.; Davis, C. E.; Baumbach, J. I.; Gràcia, I. Review on Ion Mobility Spectrometry. Part 1: current instrumentation. *Analyst* **2015**, *140* (5), 1376–1390.
- (37) Wittmer, D.; Chen, Y. H.; Luckenbill, B. K.; Hill Jr., H. H. Electrospray Ionization Ion Mobility Spectrometry. *Anal. Chem.* **1994**, *66* (14), 2348–2355.
- (38) Eiceman, G. A.; Anderson, G. K.; Danen, W. C.; Ferris, M. J.; Tjee, J. J. Laser Desorption and Ionization of Solid Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Air With Analysis by Ion Mobility Spectrometry. *Anal. Lett.* **1988**, *21* (4), 539–552.
- (39) Dole, M. Molecular Beams of Macroions. *J. Chem. Phys.* **1968**, *49* (5), 2240.
- (40) Yamashita, M.; Fenn, J. B. Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme. *J. Phys. Chem.* **1983**, *434* (125), 4451–4459.
- (41) Awad, H.; Khamis, M. M.; El-Aneed, A. Mass Spectrometry, Review of the Basics: Ionization. *Appl. Spectrosc. Rev.* **2015**, *50* (2), 158–175.

- (42) Shumate, C. B.; Hill Jr., H. H. Coronaspray nebulization and ionization of liquid samples for ion mobility spectrometry. *Anal. Chem.* **1989**, *61* (6), 601–606.
- (43) Clemmer, D. E.; Hudgins, R. R.; Jarrold, M. F. Naked protein conformations: cytochrome c in the gas phase. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117* (40), 10141–10142.
- (44) Hoaglund, C. S.; Valentine, S. J.; Sporleder, C. R.; Reilly, J. P.; Clemmer, D. E. Three-dimensional ion mobility/TOFMS analysis of electrosprayed biomolecules. *Anal. Chem.* **1998**, *70* (11), 2236.
- (45) Wu, C.; Siems, W. F.; Asbury, G. R.; Hill, H. H. Electrospray ionization high-resolution ion mobility spectrometry-mass spectrometry. *Anal. Chem.* **1998**, *70* (23), 4929–4938.
- (46) Wyttenbach, T.; Kemper, P. R.; Bowers, M. T. Design of a new electrospray ion mobility mass spectrometer. *Int. J. Mass Spectrom.* **2001**, *212* (1–3), 13–23.
- (47) Taraszka, J. A.; Counterman, A. E.; Clemmer, D. E. Gas-phase separations of complex tryptic peptide mixtures. *Fresenius. J. Anal. Chem.* **2001**, *369* (3–4), 234–245.
- (48) Srebalus Barnes, C. A.; Hilderbrand, A. E.; Valentine, S. J.; Clemmer, D. E. Resolving isomeric peptide mixtures: A combined HPLC/ion mobility-TOFMS analysis of a 4000-component combinatorial library. *Anal. Chem.* **2002**, *74* (1), 26–36.
- (49) Lee, D.; Wu, C.; Jr, H. H. Detection of carbohydrates by electrospray ionization-ion mobility spectrometry following microbore high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **1998**, *822*, 1–9.
- (50) Tadjimukhamedov, F. K.; Stone, J. a.; Papanastasiou, D.; Rodriguez, J. E.; Mueller, W.; Sukumar, H.; Eiceman, G. A. Liquid chromatography/electrospray ionization/ion mobility spectrometry of chlorophenols with full flow from large bore LC columns. *Int. J. Ion Mobil. Spectrom.* **2008**, *11* (1–4), 51–60.
- (51) Kurnin, I. V.; Kayumov, A. A.; Muradymov, M. Z.; Krasnov, N. V.; Samokish, A. V. Coupling of liquid chromatograph with ion-mobility spectrometer. *Int. J. Ion Mobil. Spectrom.* **2013**, *16* (3), 169–176.
- (52) Hinterberger, F. *Physik der Teilchenbeschleuniger und Ionenoptik*; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2008; Vol. 2.
- (53) Gross, J. H. *Massenspektrometrie*; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2013.
- (54) Masiá, A.; Suarez-Varela, M. M.; Llopis-Gonzalez, A.; Picó, Y. Determination of pesticides and veterinary drug residues in food by liquid chromatography-mass spectrometry: A review. *Anal. Chim. Acta* **2016**, *936*, 40–61.
- (55) Larance, M.; Lamond, A. I. Multidimensional proteomics for cell biology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2015**, *16* (5), 269–280.
- (56) Kebarle, P.; Verkerk, U. H. Electrospray: From ions in solution to ions in the gas phase, what we know now. *Mass Spectrom. Rev.* **2009**, *28* (6), 898–917.
- (57) Loeb, L.; Kip, A.; Hudson, G.; Bennett, W. Pulses in negative point-to-plane corona. *Phys. Rev.* **1941**, *60*, 714.
- (58) Van Berkel, G. J.; Kertesz, V. Using the Electro Electrochemistry spray Ion Source. *Anal. Chem.* **2007**, *79* (15), 5510–5520.
- (59) Konermann, L.; Ahadi, E.; Rodriguez, A. D.; Vahidi, S. Unraveling the Mechanism of Electrospray Ionization. *Anal. Chem.* **2013**, *85* (1), 2–9.
- (60) Ganan-Calvo, A. M. The surface charge in electrospraying: its nature and its universal scaling laws. *J. Aerosol Sci.* **1999**, *30* (7), 863–872.

- (61) Ikonomou, M. G.; Blades, a T.; Kebarle, P. Electrospray mass spectrometry of methanol and water solutions suppression of electric discharge with SF₆ gas. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1991**, *2* (6), 497–505.
- (62) Van Berkel, G.; Zhou, F. Characterization of an Electrospray Ion Source as a Controlled-Current Electrolytic Cell. *Anal. Chem.* **1995**, *67* (17), 2916–2923.
- (63) Jackson, G. S.; Enke, C. G. Electrical equivalence of electrospray ionization with conducting and nonconducting needles. *Anal. Chem.* **1999**, *71* (17), 3777–3784.
- (64) Fernández de la Mora, J.; Van Berkel, G. J.; Enke, C. G.; Cole, R. B.; Martinez-Sanchez, M.; Fenn, J. B. Electrochemical processes in electrospray ionization mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **2000**, *35* (8), 939–952.
- (65) Holleman, A.; Wiberg, N.; Wiberg, E. *Lehrbuch der Anorganischen Chemie*; De Gruyter: Berlin, Boston, 2008.
- (66) Tang, L.; Kebarle, P. Effect of the conductivity of the electrosprayed solution on the electrospray current. Factors determining analyte sensitivity in electrospray mass spectrometry. *Anal. Chem.* **1991**, *63* (23), 2709–2715.
- (67) Taylor, G. I.; McEwan, A. D. The stability of a horizontal fluid interface in a vertical electric field. *J. Fluid Mech.* **1965**, *22* (1), 1.
- (68) Taylor, G. Disintegration of Water Drops in an Electric Field. *Proc. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.* **1964**, *280* (1382), 383–397.
- (69) Adrian G. Bailey. *Electrostatic Spraying of Liquids*; Research Studies Press, Taunton, Somerset England, 1988.
- (70) Ijsebaert, J. C.; Geerse, K. B.; Marijnissen, J. C. M.; Lammers, J. W.; Zanen, P. Electrohydrodynamic atomization of drug solutions for inhalation purposes. *J. Appl. Physiol.* **2001**, *91* (6), 2735–2741.
- (71) Hartman, R. P. a.; Brunner, D. J.; Camelot, D. M. a.; Marijnissen, J. C. M.; Scarlett, B. Electrohydrodynamic Atomization in the Cone–Jet Mode Physical Modeling of the Liquid Cone and Jet. *J. Aerosol Sci.* **1999**, *30* (7), 823–849.
- (72) Meesters, G. M. H.; Vercoulen, P. H. W.; Marijnissen, J. C. M.; Scarlett, B. Generation of micron-sized droplets from the Taylor cone. *J. Aerosol Sci.* **1992**, *23* (1), 37–49.
- (73) Fernández de la Mora, J. The Fluid Dynamics of Taylor Cones. *Annu. Rev. Fluid Mech.* **2007**, *39* (1), 217–243.
- (74) Cutler, P. H.; Feuchtwang, T. E.; Kazes, E.; Chung, M.; Miskovsky, N. M. Response to “A note on the Taylor cone.” *J. Phys. D Appl. Phys.* **1986**, *19*, L13–L18.
- (75) Kebarle, P. A brief overview of the present status of the mechanisms involved in electrospray mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **2000**, *35* (7), 804–817.
- (76) Zeleny, J. Instability of electrified liquid surfaces. *Phys. Rev.* **1917**, *10* (1), 1–6.
- (77) Cloupeau, M. Recipes for use of EHD spraying in cone-jet mode and notes on corona discharge effects. *J. Aerosol Sci.* **1994**, *25* (6), 1143–1157.
- (78) Cloupeau, M.; Prunet-Foch, B. Electrohydrodynamic spraying functioning modes: a critical review. *J. Aerosol Sci.* **1994**, *25* (6), 1021–1036.
- (79) Jaworek, A.; Krupa, A. Generation and characteristics of the precession mode of EHD spraying. *J. Aerosol Sci.* **1996**, *27* (1), 75–82.

- (80) Marginean, I.; Nemes, P.; Vertes, A. A stable regime in electrosprays. *Phys. Rev. E - Stat. Nonlinear, Soft Matter Phys.* **2007**, *76* (2), 1–6.
- (81) Hines, R. L. Electrostatic atomization and spray painting. *J. Appl. Phys.* **1966**, *37* (7), 2730–2736.
- (82) Smith, D. P. H. The Electrohydrodynamic Atomization of Liquids. *IEEE Trans. Ind. Appl.* **1986**, *IA-22* (3), 527–535.
- (83) Michelson, D. *Elektrostatic Atomisation*; Institute of Physics Publishing: New York, 1990.
- (84) Bruins, A. P.; Covey, T. R.; Henion, J. D. Ion spray interface for combined liquid chromatography/atmospheric pressure ionization mass spectrometry. *Anal. Chem.* **1987**, *59* (22), 2642–2646.
- (85) Lefebvre, A. H.; McDonell, V. G. *Atomization and Sprays*; CRC Press: Boca Raton, 1989.
- (86) Marijnissen, J. C. M.; GRACE, J. C. M. A Review of liquid atomization by electrical means. *J. Aerosol Sci.* **1994**, *25* (6), 1005–1019.
- (87) Mutoh, M.; Kaieda, S.; Kamimura, K. Convergence and disintegration of liquid jets induced by an electrostatic field. *J. Appl. Phys.* **1979**, *50* (5), 3174–3179.
- (88) Nemes, P.; Marginean, I.; Vertes, A. Spraying mode effect on droplet formation and ion chemistry in electrosprays. *Anal. Chem.* **2007**, *79* (8), 3105–3116.
- (89) Rayleigh, L. F. R. S. On the equilibrium of liquid conducting masses charged with electricity. *Philos. Mag.* **1882**, *14* (87), 184–186.
- (90) Smith, J. N.; Flagan, R. C.; Beauchamp, J. L. Droplet evaporation and discharge dynamics in electrospray ionization. *J. Phys. Chem. A* **2002**, *106* (42), 9957–9967.
- (91) Gomez, A.; Tang, K. Charge and fission of droplets in electrostatic sprays. *Phys. Fluids* **1994**, *6* (1), 404–414.
- (92) Peschke, M.; Verkerk, U. H.; Kebarle, P. Features of the ESI mechanism that affect the observation of multiply charged noncovalent protein complexes and the determination of the association constant by the titration method. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2004**, *15* (10), 1424–1434.
- (93) Gorbatschew, S. W. Über den Dampfdruck von Tropfen. *Kolloid-Zeitschrift* **1935**, *73* (3), 263–267.
- (94) Fisenko, S. P.; Wang, W. N.; Wuled Lenggoro, I.; Okyuama, K. Evaporative cooling of micron-sized droplets in a low-pressure aerosol reactor. *Chem. Eng. Sci.* **2006**, *61* (18), 6029–6034.
- (95) Iribarne, J. V.; Thomson, B. A. On the evaporation of small ions from charged droplets. *J. Chem. Phys.* **1976**, *64* (6), 2287–2294.
- (96) Thomson, B. A.; Iribarne, J. V. Field induced ion evaporation from liquid surfaces at atmospheric pressure. *J. Chem. Phys.* **1979**, *71* (11), 4451.
- (97) Winger, B. E.; Light-Wahl, K. J.; Ogorzalek Loo, R. R.; Udseth, H. R.; Smith, R. D. Observation and implications of high mass-to-charge ratio ions from electrospray ionization mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1993**, *4* (7), 536–545.
- (98) Tolić, L. P.; Anderson, G. A.; Smith, R. D.; Brothers II, H. M.; Spindler, R.; Tomalia, D. A. Electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometric characterization of high molecular mass Starburst™ dendrimers. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* **1997**, *165–166*, 405–418.
- (99) Gamero-Castaño, M.; Fernandez De La Mora, J. Kinetics of small ion evaporation from the

- charge and mass distribution of multiply charged clusters in electrosprays. *J. Mass Spectrom.* **2000**, 35 (7), 790–803.
- (100) Fernandez De La Mora, J. Electrospray ionization of large multiply charged species proceeds via Dole's charged residue mechanism. *Anal. Chim. Acta* **2000**, 406 (1), 93–104.
- (101) Kaltashov, I. a; Mohimen, A. Estimates of protein surface areas in solution by electrospray ionization mass spectrometry. *Anal. Chem.* **2005**, 77 (16), 5370–5379.
- (102) Hogan, C. J.; Carroll, J. A.; Rohrs, H. W.; Biswas, P.; Gross, M. L. Charge Carrier Field Emission Determines the Number of Charges on Native State Proteins in Electrospray Ionization. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130 (22), 6926–6927.
- (103) Ali, I.; Marenduzzo, D.; Yeomans, J. M. Ejection dynamics of polymeric chains from viral capsids: effect of solvent quality. *Biophys. J.* **2008**, 94 (11), 4159–4164.
- (104) McDaniel, E. W.; Mason, E. A. *The mobility and diffusion of ions in gases*; Wiley-VCH: New Jersey, 1973.
- (105) Shamlouei, H. R.; Tabrizchi, M. Transmission of different ions through a drift tube. *Int. J. Mass Spectrom.* **2008**, 273 (1–2), 78–83.
- (106) Eiceman, G. A.; Nazarov, E. G.; Stone, J. A. Chemical standards in ion mobility spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **2003**, 493 (2), 185–194.
- (107) Eiceman, G. A.; Karpas, Z. *Ion Mobility Spectrometry*, second.; CRC Press, 2005.
- (108) Karpas, Z. Ion mobility spectrometry of aliphatic and aromatic amines. *Anal. Chem.* **1989**, 61 (7), 684–689.
- (109) Viidanoja, J.; Sysoev, A.; Adamov, A.; Kotiaho, T. Tetraalkylammonium halides as chemical standards for positive electrospray ionization with ion mobility spectrometry/mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2005**, 19 (21), 3051–3055.
- (110) Kaur-Atwal, G.; O'Connor, G.; Aksenov, A. A.; Bocos-Bintintan, V.; Paul Thomas, C. L.; Creaser, C. S. Chemical standards for ion mobility spectrometry: A review. *Int. J. Ion Mobil. Spectrom.* **2009**, 12 (1), 1–14.
- (111) Fernández-Maestre, R.; Harden, C. S.; Ewing, R. G.; Crawford, C. L.; Hill, H. H. Chemical standards in ion mobility spectrometry. *Analyst* **2010**, 135 (6), 1433.
- (112) Giles, K.; Pringle, S. D.; Worthington, K. R.; Little, D.; Wildgoose, J. L.; Bateman, R. H. Applications of a travelling wave-based radio-frequency-only stacked ring ion guide. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2004**, 18 (20), 2401–2414.
- (113) Shvartsburg, A. A.; Smith, R. D. Fundamentals of traveling wave ion mobility spectrometry. *Anal. Chem.* **2008**, 80 (24), 9689–9699.
- (114) Fernandez-Lima, F. Trapped Ion Mobility Spectrometry: past, present and future trends. *Int. J. Ion Mobil. Spectrom.* **2016**, 19 (2–3), 65–67.
- (115) Mochalski, P.; Rudnicka, J.; Agapiou, A.; Statheropoulos, M.; Amann, A.; Buszewski, B. Near real-time VOCs analysis using an aspiration ion mobility spectrometer. *J. Breath Res.* **2013**, 7 (2), 1–11.
- (116) Vidal-De-Miguel, G.; Macía, M.; Cuevas, J. Transversal modulation ion mobility spectrometry (TM-IMS), a new mobility filter overcoming turbulence related limitations. *Anal. Chem.* **2012**, 84 (18), 7831–7837.
- (117) Intra, P.; Tippayawong, N. An overview of differential mobility analyzers for size classification of nanometer-sized aerosol particles. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* **2008**, 30 (2), 243–256.

- (118) Kurulugama, R. T.; Nachtigall, F. M.; Lee, S.; Valentine, S. J.; Clemmer, D. E. Overtone Mobility Spectrometry: Part 1. Experimental Observations. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2009**, *20* (5), 729–737.
- (119) Buryakov, I. A.; Krylov, E. V.; Nazarov, E. G.; Rasulev, U. K. A new method of separation of multi-atomic ions by mobility at atmospheric pressure using a high-frequency amplitude-asymmetric strong electric field. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process.* **1993**, *128* (3), 143–148.
- (120) Borsdorf, H.; Eiceman, G. A. Ion Mobility Spectrometry: Principles and Applications. *Appl. Spectrosc. Rev.* **2006**, *41* (4), 323–375.
- (121) Khayamian, T.; Jafari, M. Design for electrospray ionization-ion mobility spectrometry. *Anal. Chem.* **2007**, *79* (8), 3199–3205.
- (122) Borsdorf, H.; Baldeweg, S.; Löper, F.; Höhnisch, M.; Petrich, R.; Mayer, T. The correlation of odors in the environment with ion mobility spectra patterns. *Int. J. Ion Mobil. Spectrom.* **2015**, *18* (1–2), 1–7.
- (123) Spangler, G. E.; Collins, C. I. Reactant ions in negative ion plasma chromatography. *Anal. Chem.* **1975**, *47* (3), 393–402.
- (124) Tabrizchi, M.; Khayamian, T.; Taj, N. Design and optimization of a corona discharge ionization source for ion mobility spectrometry. *Rev. Sci. Instrum.* **2000**, *71* (6), 2321.
- (125) Bradbury, N. E.; Nielsen, R. A. Absolute values of the electron mobility in hydrogen. *Phys. Rev.* **1936**, *49* (5), 388–393.
- (126) Tyndall, A. M. *The Mobility of Positive Ions in Gases*; Cambridge University Press: Cambridge, 1938.
- (127) Knight, A. K. *Advanced Detection Technology for ion mobility and mass spectrometry*, University of Arizona, 2006.
- (128) Yoon, O. K.; Zuleta, I. A.; Robbins, M. D.; Barbula, G. K.; Zare, R. N. Simple Template-Based Method to Produce Bradbury-Nielsen Gates. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2007**, *18* (11), 1901–1908.
- (129) Eiceman, G. A.; Vandiver, V. J.; Chen, T.; Rico-Martinez, G. Electrical Parameters in Drift Tubes for Ion Mobility Spectrometry. *Instrum. Sci. Technol.* **1989**, *18* (3–4), 227–242.
- (130) Marginean, I.; Page, J. S.; Kelly, R. T.; Tang, K.; Smith, R. D. Effect of pressure on electrospray characteristics. *Appl. Phys. Lett.* **2009**, *95* (18), 184103.
- (131) Atkins, P.; De Paula, J. *Atkins' Physical chemistry*, 10th ed.; Oxford University Press: Oxford, 2014.
- (132) Tabrizchi, M.; Rouholahnejad, F. Comparing the effect of pressure and temperature on ion mobilities. *J. Phys. D. Appl. Phys.* **2005**, *38* (6), 857–862.
- (133) William J. Warren, Anthony J. Midey, Adam M. Graichen, C. W. *Rapid Separation and Detection of Amino Acids by HPLC-HPIMS*; 2015.

II. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1-1 - Zahl der Publikationen in verschiedenen analytischen Bereichen pro Jahr (Quelle: isi web of knowledge).....	1
Abb. 2.1-1 - Übersicht der gängigen Ionisationsmethoden in der IM-Spektrometrie inklusive möglicher Ionisationsgleichungen - Ionisationsmethoden sind von links nach rechts nach Größe der zugänglichen Moleküle sortiert	4
Abb. 2.2-1– Schematischer Aufbau bei einer Elektrosprayionisation im positiven Modus (adaptiert aus ^{56,58}), U_{ESI} - Potential zwischen ESI-Kapillare und Gegenelektrode, I_{ESI} - Strom, der durch den ESI-Prozess abfließt, I_{EXT} - Strom, der über die Flüssigkeitszufuhr abfließt, I_F - Strom, der durch die Entladung der Anionen an der Kapillarwandung induziert wird, I_{TOT} - Strom, der durch die Spannungsquelle bereit gestellt wird	5
Abb. 2.2-2 - Stromkreislauf der elektrochemischen Teilprozesse bei ESI, Teilprozesse werden als funktionale Blöcke dargestellt - adaptiert von ⁶³	6
Abb. 2.2-3 - links: Wirkende Kräfte beim Taylor-Konus, rechts: Beschreibung der Form des Taylor-Konus mithilfe des Krümmungsradius des Flüssigkeitsmeniskus α und dem Radius des Meniskus r , beides adaptiert von ^{70,71} ...	9
Abb. 2.2-4 - Modifizierte schematische Darstellung unterschiedlicher Spraymodi nach Cloupeau ^{77,78} und Jaworek ⁷⁹ bei steigender elektrischer Feldstärke - Erläuterung der römischen Ziffern im Text	11
Abb. 2.2-5 - Schematische Darstellung des Zerfallsprozesses des Jets in Tropfen - adaptiert von ⁸⁷	13
Abb. 2.2-6 - Kaskade des Tropfenzerfalls für geladene Wassertropfen, die durch NanoESI erzeugt wurden. ⁹² ..	14
Abb. 2.2-7 - Zusammenfassung der verschiedenen Modelle zur Freisetzung von Ionen bei ESI: (a) IEM, (b) CRM, (c) CEM ⁵⁹	15
Abb. 2.3-1 - Schematischer Aufbau eines ESI-Ionenmobilitätsspektrometers mit direkter Probenzufuhr, unidirektionalem Strömungssystem und orthogonal ausgerichteter ESI-Quelle in der Ionisationsregion.....	20
Abb. 2.3-2 - Schematische Darstellung der zwei gängigsten Designs von Ionentoren in der IM-Spektrometrie (oben) ^{125,126} mit passendem Schema für die elektrische Schaltung im offenen und geschlossenen Zustand, beim Tyndall-Powell-Design sind zwei Schaltungen für den geschlossenen Zustand bekannt, sie sind mit 1 und 2 im Schema gekennzeichnet.....	22
Abb. 4.1-1 - links: Streulichtaufnahmen des ESI-Sprays (Seitenansicht) bei unterschiedlichen Durchflussraten in $\mu\text{l}/\text{min}$; rechts: Grenzspannung für das Einsetzen der Koronaentladung U_{CD} in Abhängigkeit vom Lösungsmittelfluss mit (hohle Kreise) und ohne Mantelgas (ausgefüllte Vierecke)	103
Abb. 4.1-2 - 2D-Darstellung einer HPLC-IM-spektrometrischen Trennung eines Gemisches von 24 Pestiziden mit TIC-Chromatogramm ($t_D = 6-9$ ms, obere Spur) und IM-Spektrum (rechte Spur) bei einer Retentionszeit von 1,85 min (die Zuordnung der Zahlen zu den Pestiziden ist im Originalartikel zu finden).	104
Abb. 4.1-3 - Intensitätsverläufe der Komponenten der schrittweisen N-Alkylierung zum 1,2-bis(aminophenoxy)ethane- N,N,N',N' -tetraacetic acid methylester (BAPTA-AM) über die Reaktionszeit.....	105
Abb. 4.1-4 - (a) Gesamtionenstrom an der Gegenelektrode I_{TIC} im Kapillar-Platten-Aufbau und (b) induzierter Strom in den Faradaydetektor I_{FAR} am Ende des IM-Spektrometers bei unterschiedlichen Drücken in Abhängigkeit vom ESI-Potential U_{ES} , Lösungsmittelfluss 20 $\mu\text{l}/\text{min}$, Mantelgasstrom 1200 ml/min, Driftgasstrom 500 ml/min.....	108
Abb. 4.1-5 - Schematische Darstellung des ESI-IM Spektrometers mit dem Drei-Gitter-Ionentor-Design mit Pulsschaltung. Die angelegten Spannungen (U) werden in Abstand (s) zum Einlass des Spektrometers im gepulsten und geschlossenen Modus für die Ionengitter (IG) gezeigt. Die Steigung der angezeigten Linien präsentiert die Stärke des elektrischen Feldes in den Regionen im Spektrometer.	110

III. Abkürzungs- und Symbolverzeichnis

α	Öffnungswinkel des Taylor-Konus [°]
A	Fläche [m ²]
ACN	Acetonitril
AD	Außendurchmesser
APCI	Chemische Ionisation bei Atmosphärendruck
APLI	Laserionisation bei Atmosphärendruck
APPI	Photoionisation bei Atmosphärendruck
AS	Aminosäuren
c	Konzentration [mol l ⁻¹]
CEM	Kettenauswurfmodell (chain ejection model)
CCS	Diffusionsquerschnitt
CRM	Modell des geladenen Rückstands (charged residue model)
D	Diffusionskoeffizient [m ² s ⁻¹]
d_d	Tropfendurchmesser [m]
d_{hd}	Tropfendurchmesser eines hängenden Tropfens [m]
d_{jet}	Durchmesser eines Flüssigkeitsstrahls [m]
d_{xy}	Distanz zwischen X und Y [m]
DMA	Differentieller Mobilitätsanalysator
DTIMS	Driftzeit IM Spektrometer
e	Elementarladung [C]
ϵ_r	Relative Permittivität [1]
ϵ_0	Permittivität des Vakuums [F m ⁻¹]
E_x	Elektrische Feldstärke von X [V m ⁻¹]
EMCCD	Ladungskopplung-Elektronen-Vervielfachung (electron multiplying charge-coupled)
ES	Elektrospray
ESI	Elektrosprayionisation

f	Beschreibt die Trennung der übertragenen Ionen beim Übergang in die Gasphase
F	Faraday-Konstante [As mol^{-1}]
FAB	Fast Atom Bombardement
FAIMS	Asymmetrische Hochfeld IM Spektrometer (high field asymmetric IMS)
F_{Cou}	Coulomb-Kraft zwischen zwei gleich geladenen Ionen [N]
f_d	Abtropffrequenz [Hz]
FWHM	Halbwertsbreite
γ	Oberflächenspannung [N m^{-1}]
g	Gravitationskonstante [$\text{m}^3 \text{kg}^{-1} \text{s}^{-2}$]
GC	Gaschromatographie
h	Dicke [m]
$[\text{H}^+]_{\text{elec}}$	Konzentration der beim elektrochemischen Prozess entstehenden Protonen [mol L^{-1}]
I_x	Intensität/Stromstärke von X [A]
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (high performance liquid chromatography)
ID	Innendurchmesser
IEM	Ionenverdampfungsmodell (Ion Evaporation Model)
IM	Ionenmobilität
IMS	Ionenmobilitätspektrometer
IMMS	Ionenmobilitätsmassenspektrometrie
IR	Infrarot
J	Teilchenstromdichte [$\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$]
κ	Leitfähigkeit [m S^{-1}]
K / K_0	Ionenmobilität / reduzierte Ionenmobilität [$\text{m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$]
k_B	Boltzmann-Konstante [J K^{-1}]
l	Länge [m]
LC	Flüssigchromatographie
LOD	Nachweisgrenze (limit of detection)

LP	Niederdruck (low pressure)
m	Masse [g]
M	Molmasse [g mol ⁻¹]
M_z	Molmassenzahl [dimensionslos]
MALDI	Matrixunterstützte Laserdesorption und -ionisation
MS	Massenspektrometrie / Massenspektrometer
n_i	molares Äquivalent für die Produktion von 1 Mol Elektrolyse [dimensionslos]
N	Gasdichte [kg m ⁻³]
N_A	Avogadro-Konstante [mol ⁻¹]
N_{AS}	Anzahl an Aminosäuren im Peptid
NMR	Kernspinresonanz
Ω_D	Diffusionsquerschnitt [m ²]
O	Orthogonalität
σ	Flächenladungsdichte [C m ⁻²]
\emptyset	Durchmesser [m]
OD	Außendurchmesser (outer diameter)
OMS	Oberton Mobilitätsspektrometer
Δp	Druckdifferenz zwischen leitender Flüssigkeit und Gegendruck des umgebenden Gases [dimensionslos]
p	Druck / Partialdruck [Pa]
ρ	Dichte [kg m ⁻³]
q_x	Ladung von X [C]
[q]	Konzentration der überschüssigen Ladungen im Tropfen [mol L ⁻¹]
r_x	Radius von X [m]
R	allgemeinen Gaskonstanten [kg m ² s ⁻² mol ⁻¹ K ⁻¹]
R	Auflösung (Resolution) [dimensionslos]
S	Entropie [J K ⁻¹]

S / N	Signal zu Rauschen [dimensionslos]
SHE	Standardwasserstoffelektrode
T	Temperatur [K]
t_D	Driftzeit [s]
t_R	Retentionszeit [s]
TIC	Totalionenstrom
TIMS	Ionenfallen-Mobilitätsspektrometer (Trapped IMS)
TMIMS	Transversal Modulations- Ionenmobilitätsspektrometer
U_{CD}	Grenzspannung zur Koronaentladung [V]
ΔU_{ESI}	Spannung zwischen ESI-Quelle und Gegenelektrode [V]
U_{ESI}	Spannung/Potential an der ESI-Quelle [V]
UV	Ultraviolett
V	Volumen [L]
V_m	Molares Volumen [$m^3 mol^{-1}$]
v_D	Driftgeschwindigkeit [$m s^{-1}$]
v_f	Lösungsmittelfluss [$L s^{-1}$]
w_b	Halbwertsbreite [s]
X_n	Peakkapazität [dimensionslos]
z_x	Ladungszahl [dimensionslos]

IV. Danksagungen

Es gibt eine Menge Menschen, denen ich für ihren Beitrag zu meiner Doktorarbeit danken möchte. Es sind Menschen, die mich in meiner Arbeit unterstützt haben, Menschen mit denen ich konstruktiv meine Ergebnisse diskutieren konnte und die mir frische Impulse gegeben haben, indem sie kritisch nachhakten. Diese Menschen sind genauso wichtig, wie diese, die mich fernab bzw. vor der Doktorarbeitszeit unterstützt und mir Zeit gegeben haben, mich dieser Aufgabe zu widmen. Demnach gilt mein erster Dank meiner Familie, meinen Freunden und insbesondere in der letzten Zeit meiner Arbeit vielen lieben Dank an meine kleine Familie fürs Rücken freihalten.

An der Universität geht mein erstes Dankeschön an meinen Doktorvater, Prof. Dr. Hans-Gerd Löhmannsröben. Dieses Dankeschön umfasst einerseits die Möglichkeit von Beginn bis zum Ende meiner Doktorarbeit durchgängig in Projekten dazu gelernt zu haben. Andererseits umfasst es die Freiheit in meinem Interessengebiet der „Physikalische Chemie“ auch fernab des eigentlichen Kernthemas der Arbeitsgruppe, der optischen Spektroskopie, ziemlich frei forschen zu können. Darüber hinaus bedanke ich mich für die wissenschaftliche Unterstützung, genauso wie in die Einsicht in die Verhandlungsführung mit potentiellen Projektpartnern. Selbstverständlich bin ich für die Übernahme des Gutachtens meiner Arbeit dankbar.

Für die Übernahme der weiteren Gutachten zu meiner Arbeit möchte ich außerdem Frau Dr. Ursula Telgheder und Herrn Prof. Dr.-Ing. Stefan Zimmermann herzlich danken.

Besonders großen Dank möchte ich dem Arbeitsgruppenteil der „Ionenmobilitätsspektrometrie“ aussprechen. Allen voran ist hier mein ständiger Rat- und Impulsgeber, sowie Berater und Antreiber Dr. Toralf Beitz zu nennen. Zusammen mit Dr. Daniel Riebe sind beide für mich das perfekte Team gewesen, von denen ich seit meiner Zeit als studentische Hilfskraft im 3. Semester, während meiner Bachelor- und Masterarbeit profitieren konnte. Während Daniel mir das nötige Improvisationstalent im Labor beibringen konnte, schaffte es Toralf mit immer neuen Ideen das Arbeitspensum konstant hoch zu halten ;-). Von beiden und von meinem ehemaligen Kollegen Karl Zenichowski lernte ich die nötige wissenschaftliche Praxis im Büro und Labor, die kritische Auseinandersetzung mit eigenen Daten und vieles was ich bestimmt vergesse aufzuzählen, dafür einen herzlichen Dank.

Weiterhin möchte ich mich bei einer Vielzahl an Kolleg*innen und ehemaligen Auszubildenden bedanken, die mich bei meiner Arbeit im Labor unterstützt haben: Pia Brinkmann, Stefan Mies, Manuela Zenichowski, José Villatoro, Alexander Erler, Hans Mathé, Franziska Rau und Amadeus Lehmann. Ohne euch wäre diese Arbeit nie so umfangreich geworden. Für die handwerkliche Unterstützung bei vielen selbst gebauten Teilen, einer Vielzahl an Reparaturen bzw. Weiterentwicklungen im Aufbau möchte ich gerne Stefan Kleinschmidt und Gennadiy Ronis meinen Dank aussprechen.

Für die tolle Arbeitsatmosphäre, für jeden kleinen Scherz auf dem Flur, für jedes gemeinsame Bier und für jede süße Leckerei in der Küche kann ich nur der gesamten Arbeitsgruppe der Physikalischen Chemie danken. Hervorheben möchte ich dabei mein Büro „Das Heim für Klugscheißer“, in dem es keinen Tag ohne lebenswichtigen Kaffee und einem mehr oder weniger guten Witz gab.

Vielen herzlichen Dank euch allen!

V. Eidesstattliche Versicherung

Hiermit versichere ich an Eides statt, die vorliegende Dissertation selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt zu haben. Alle Ausführungen, die wörtlich oder sinngemäß übernommen wurden, sind als solche gekennzeichnet. Die eingereichte schriftliche Fassung entspricht der auf dem elektronischen Speichermedium.

Ich versichere, dass diese Arbeit noch nicht an anderer Stelle zur Erlangung des Doktorgrades eingereicht worden ist.

Golm, den 26. Feb. 2018

Martin Zühlke