

Elektoraspršenje – blagi način ionizacije u spektrometriji masa

KUI 06/2004
Prispjelo 22. siječnja 2003.
Prihvaćeno 14. listopada 2003.

N. Galić

Zavod za analitičku kemiju, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Strossmayerov trg 14, 10 000 Zagreb

Opisan je mehanizam elektoraspršenja, jednog od najblažih načina ionizacije u spektrometriji masa, kojim se pri atmosferskom tlaku ioni iz otopine prevode u ione u plinskoj fazi. Detaljno je objašnjeno nastajanje nabijenih kapljica uzorka na vrhu kapilare u ionizacijskoj komori te njihovo smanjivanje zbog isparavanja otapala i Coulombovog dijeljenja pri Rayleighovoj granici stabilnosti. Nastajanje iona u plinskoj fazi iz vrlo malih kapljica opisano je modelima ostatka naboja i isparavanja iona. Također je dan kraći pregled dosadašnjih saznanja o ovisnosti djelotvornosti elektoraspršenja o kemijskoj prirodi analita, kao i o odnosu između iona prisutnih u otopini i iona opaženih u spektru masa.

Ključne riječi: *Spektrometrija masa, elektoraspršenje, mehanizam, pregled*

Uvod

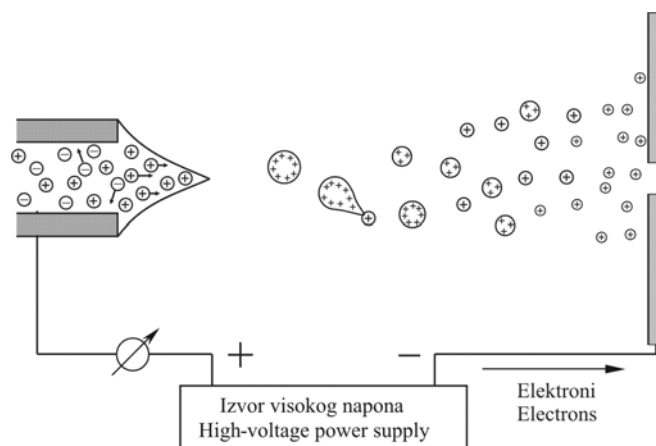
Spektrometrija masa upotrebljava se u analitičke svrhe od ranih četrdesetih godina prošlog stoljeća i od tada se skladno razvoju ostalih grana znanosti razvijala i ta tehnika. Danas se uz različite vrste analizatora mase primjenjuje i više različitih načina ionizacije. Izvori u spektrometriji masa mogu se podijeliti na one u kojima se najprije uzorak prevodi u plinsko stanje, a onda ionizira (udar elektroni, kemijska ionizacija itd.) i one u kojima se uzorak iz kondenzirane faze neposredno prevodi u ione (različite vrste desorpcije, ionizacija potpomognuta matricom, itd.).¹ Opis ionizacije potpomognute matricom uz desorpciju laserskim zračenjem (MALDI-a) može se naći u ref. 2. Takav način ionizacije prikladan je za prevođenje velikih molekula iz čvrste u plinsku fazu, pri čemu pretežito nastaju jednostruko nabijeni ioni.

Od posebnog je značaja ionizacija uzorka neposredno iz otopine budući da omogućuje analizu termički nestabilnih ili slabo hlapivih spojeva, kao i neposredno povezivanje tekućinske kromatografije i spektrometrije masa. U tu svrhu razvijena je tehnika termoraspršenja, koja je ograničena s obzirom na polarnost i hlapivost analita, kao i tehnika elektoraspršenja. Prvo uspješno povezivanje elektoraspršenja i spektrometrije masa opisao je John B. Fenn i za svoj je doprinos u analizi bioloških makromolekula maseno-spektroskopskim metodama dobio 2002. godine Nobelovu nagradu za kemiju.^{3–5} Važnost elektoraspršenja i njegov ogroman doprinos modernoj spektrometriji masa u njegovim je jedinstvenim karakteristikama. To je blagi način ionizacije, a omogućuje analizu kako malih tako i velikih molekula, nekovalentnih kompleksa, nenabijenih ili ionskih spojeva itd. Jedinstveno je svojstvo elektoraspršenja i u nastajanju višestruko nabijenih iona, tako da su opaženi primjerice ioni $[M+150H]^{150+}$, što omogućuje detekciju tvari velikih molekularnih masa i s analizatorima malih vrijednosti m/z .⁶ Smanjenjem brzine protoka analizirane otopine (mikro ili nanoelektoraspršenje) povećana je

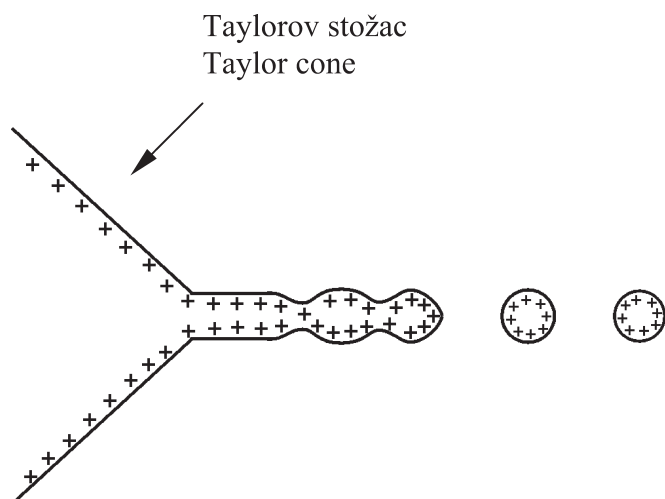
osjetljivost metode te su granice detekcije spuštene na red veličine atomola (10^{-18} mol). Zbog svih tih posebnih karakteristika kao i širokih mogućnosti primjene, mehanizam elektoraspršenja intenzivno je proučavan posljednjih desetak godina.

Mehanizam elektoraspršenja

Mehanizam elektoraspršenja objašnjen je u nekoliko preglednih radova^{7–15} i ukratko bi se mogao opisati na sljedeći način. Otopina koja sadrži analit uvodi se u metalnu kapilaru na koju se pri atmosferskom tlaku primjenjuje jako električno polje pod čijim utjecajem dolazi do odvajanja pozitivnog i negativnog naboja u otopini (slika 1). Kada je kapilara priključena na pozitivan kraj izvora napona, pozitivno nabijeni ioni putuju prema katodi i akumuliraju se na površini tekućine. Pri kritičnoj jakosti polja nastaje tzv. Taylorov stožac (slika 2), u kojem se kontinuirano proizvode kapljice obogaćene pozitivno nabijenim ionima koje pod



Slika 1 – Shematski prikaz elektoraspršenja¹¹
Fig. 1 – Schematic representation of electro-spray process¹¹



Slika 2 – Shematski prikaz stošca tekućine na vrhu kapilare¹¹
 Fig. 2 – Schematic representation of the liquid cone at the capillary tip¹¹

utjecajem gradijenta potencijala i tlaka putuju prema analizatoru spektrometra masa. Mijenjanjem polariteta moguće je proizvesti negativno nabijene kapljice. Budući da se elektroraspršenjem kontinuirano proizvodi struja, kako bi se izbjegla akumulacija naboja na kapilari i suprotnoj elektrodi odvija se redoks-proces.

Proces elektroraspršenja prikladno je podijeliti u tri faze: nastajanje kapljica, smanjenje kapljica i nastajanje iona u plinskoj fazi.

Nastajanje nabijenih kapljica na vrhu kapilare

Kao što je prikazano na slici 1, napon od 2–3 kV primjenjuje se na metalnu kapilaru, vanjskog promjera 0,2 mm, unutarnjeg promjera 0,1 mm, udaljenu 1–3 cm od veće, planarne suprotne elektrode. Jakost električnog polja E_c u prostoru oko vrha kapilare pri određenom potencijalu V_c može se procijeniti izrazom:

$$E_c = 2V_c / [r_c \ln(4d / r_c)], \quad (1)$$

gdje je r_c vanjski radijus kapilare i d udaljenost između elektroda.^{7,10} Pri uobičajenim je radnim uvjetima jakost električnog polja na vrhu kapilare reda veličine $10^6 - 10^7$ V m⁻¹. Pod utjecajem električnog polja dolazi do separacije naboja u tekućini, anioni migriraju prema metalnoj kapilari, a kationi prema katodi i akumuliraju se na površini tekućine. Pri određenoj jakosti polja dolazi do deformiranja meniskusa, odnosno stvaranja Taylorovog stošca. Pri dovoljno jakom polju Taylorov stožac postaje nestabilan i na njegovu se vrhu stvara tanka nit tekućine promjera nekoliko mikrometara čija je površina obogaćena pozitivnim ionima. Na određenoj udaljenosti nit postaje nestabilna te iz nje nastaju kapljice s viškom pozitivnih iona. Potrebna jakost električnog polja dana je izrazom:

$$E = (2 \gamma \cos 49^\circ / \epsilon_0 r_c)^{1/2}, \quad (2)$$

gdje je γ napetost površine tekućine, 49° polovina kuta Taylorovog stošca, ϵ_0 permitivnost vakuuma i r_c radijus kapilare.¹¹ Vrijednost primijenjenog potencijala ovisi o po-

vršinskoj napetosti otapala te je za vodu, dimetilsulfoksid, acetonitril odnosno metanol, vrijednost procijenjena na, redom, 4; 3; 2,5 odnosno 2,2 kV. Potrebna jakost električnog polja za vodu prelazi vrijednost jakosti polja potrebnog za izbijanje elektrona te se u prostor koji okružuje kapilaru umjesto N₂ ili Ar dodaje SF₆ ili velike količine O₂.

Zbog velike razlike u potencijalu između kapilare i suprotne elektrode na granici faza metal–otopina dolazi do oksidacije, primjerice nastajanje H⁺ iz vode, što je nužno za kontinuirano nastajanje kapljica iste polariteta, a na suprotnoj elektrodi odvija se redukcija. Drugim riječima, elektroraspršenje se može promatrati kao specijalna vrsta elektrolitske ćelije u kojoj se transport dijela naboja ne odvija kroz otopinu već kroz plinsku fazu, najprije preko nabijenih kapljica, a onda preko iona u plinskoj fazi. Koncentracija iona nastalih elektrolitskim procesom je $\approx 2 \cdot 10^{-6}$ mol dm⁻³ i može se detektirati, ali općenito ne utječe na detekciju drugih ionskih vrsta prisutnih u otopini. Treba napomenuti da u slučaju vodenih otopina promjene pH uzrokovane elektrokemijskom reakcijom vode mogu utjecati na izgled spektra masa, odnosno na zastupljenost protoniranih i višestruko protoniranih vrsta. Također je dokazano da se neki spojevi koji u otopini inače nisu ionizirani, mogu ionizirati elektrokemijskom oksidacijom ili redukcijom. Od posebnog su interesa radikal-kationi nastali iz polikličkih aromatskih ugljikovodika, koji se drugim metodom ne bi mogli prevesti u plinsku fazu. S druge strane elektrokemijske reakcije mogu interferirati u kvantitativnoj analizi iona metala kao što su Ag⁺, Cu²⁺ i Hg²⁺.¹¹

Smanjenje nabijenih kapljica nastalih elektroraspršenjem

Početna veličina nabijenih kapljica nastalih elektroraspršenjem ovisi o nekoliko parametara, kao što su brzina protoka otopine i svojstva otapala. Pri brzini protoka od 5 μL min⁻¹ i ukupnoj koncentraciji elektrolita ne većoj od 10⁻³ mol dm⁻³ postižu se najbolji uvjeti za visok prinos iona u plinskoj fazi. Osim toga nastaju kapljice uskog raspona veličina te se mogu smatrati monodisperznim. Radijus R i naboj q kapljica nastalih na izlazu iz kapilare mogu se procijeniti na temelju sljedećih izraza:

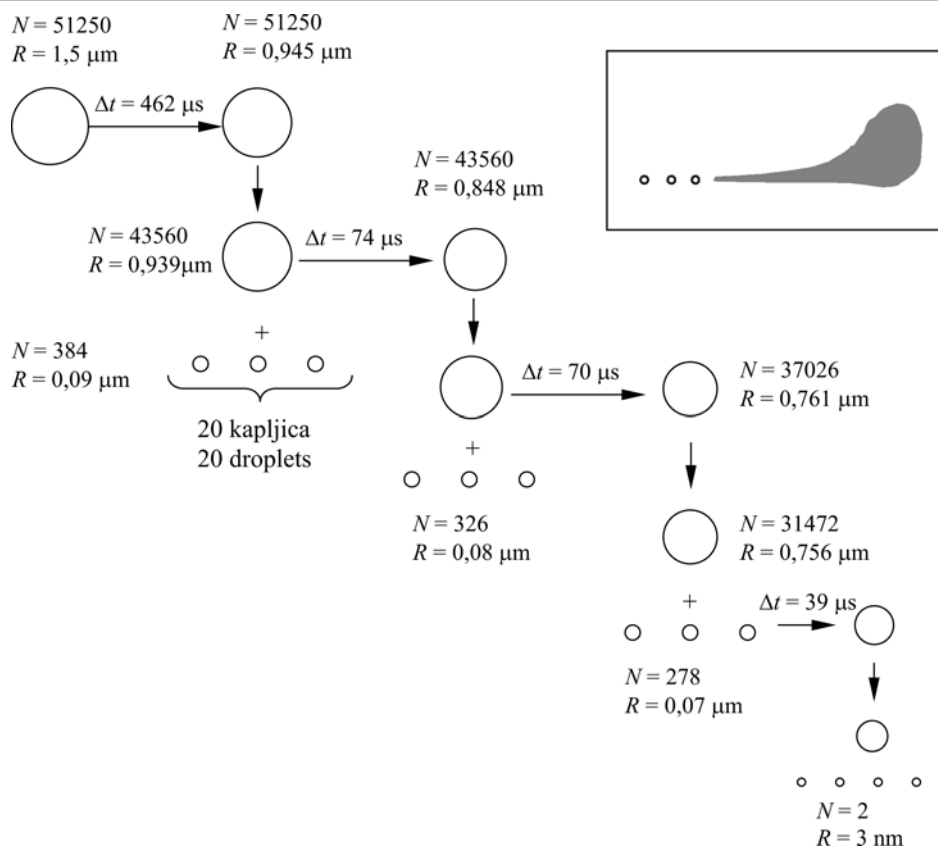
$$R \approx (V_f \epsilon / \kappa)^{1/3}, \quad (3)$$

$$q \approx 0,7 [8\pi (\epsilon_0 \gamma R^3)^{1/2}], \quad (4)$$

gdje je V_f brzina protoka otopine, κ provodnost otopine i ϵ permitivnost otopine.¹¹ Kako otapalo potpomognuto grijanjem isparava, smanjuje se veličina kapljica, ali naboj ostaje konstantan. Kada se sila elektrostatskog odbijanja izjednači s površinskom napetosti postiže se Rayleighova granica stabilnosti:^{7,9–11}

$$q = 8\pi(\epsilon_0 \gamma R^3)^{1/2}, \quad (5)$$

Unutar ≈ 100 μs radijus ishodne kapljice dovoljno je blizu Rayleighovoj granici, dolazi do Coulombova dijeljenja i nastajanja manjih kapljica potomaka koje nose oko 2 % mase i 15 % naboja kapljice pretka (slika 3). Daljnjim smanjivanjem kapljica potomka zbog isparavanja otapala proces dijeljenja se nastavlja dva do tri puta uz konstantno povećanje omjera pozitivnog naboja na površini kapljice i



Slika 3 – Shematski prikaz nastajanja kapljica predaka i kapljica potomaka¹¹ R = radijus kapljice, N = broj elementarnih naboja na površini kapljice, Δt = vrijeme potrebno za smanjivanje kapljice do veličine kad započinje proces Coulombova dijeljenja. U gornjem desnom uglu prikazano je nesimetrično dijeljenje jedne kapljice.

Fig. 3 – Schematic representation of time history of parent and offspring droplets¹¹ R = the droplet radius, N = the number of elementary charges on droplet surface, Δt = the time required for evaporative droplet shrinkage to the size when Coulomb fission occurs. The top right insert illustrates the uneven fission of one droplet.

sparenih iona elektrolita u unutrašnjosti. Ustanovljeno je da dolazi do nesimetričnog dijeljenja kapljice, odnosno kapljica pretka emitira nekoliko manjih kapljica, slično procesu koji se odvija na vrhu Taylorovog stošca. Nastale su kapljice približno monodisperzne, a njihov radijus iznosi oko jedne desetine radijusa kapljice pretka. Takvim nesimetričnim cijepanjem, u novije vrijeme nazvanim raspadom mlaza (jet fission), nastaju dvije vrste kapljica, velike, koje u sebi nose neželjene sparene ione elektrolita, i male, iz kojih nastaju ioni u plinskoj fazi.

Nastajanje iona u plinskoj fazi

Postoje dva modela kojima se objašnjava nastajanje iona u plinskoj fazi: model ostatka naboja (Dole, 1968)¹⁶ i model isparavanja iona (Iribarne i Thomson, 1976),^{17,18} oba predložena prije nego li je bila poznata shema cijepanja opisana u prethodnom poglavlju.

Prema modelu ostatka naboja stvara se iznimno mala kapljica, radijusa približno 1 nm, koja sadrži samo jedan ion. Isparavanjem posljednje molekule otapala nastaje ion u plinskoj fazi. Danas se smatra da velike molekule, mase barem preko 3300 Da, nastaju tim procesom.^{10,19}

Prema drugom modelu, iz kapljica radijusa približno 8 nm, sa suviškom od približno 70 elementarnih naboja, dolazi do isparavanja iona prije nego li kapljica dostigne Ray-

leighovu granicu i započne dijeljenje. Smatra se da mali ioni u plinskoj fazi pretežno nastaju tim mehanizmom.^{7,20,21}

Ovisnost intenziteta signala o analitu

Spektrometrijom masa uz elektroraspršenje kao način ionizacije mogu se detektirati različite vrste molekula, primjericke organske ili anorganske soli koje su nabijene u otopini, polarne neutralne vrste koje sadrže protone te nepolarne tvari koje podliježu oksidaciji odnosno redukciji. Otopina koja je podvrgnuta elektroraspršenju uz analit sadrži i produkte elektrokemijskih reakcija, nečistoće koje mogu potjecati iz različitih izvora (otapala obično sadrže oko 10^{-5} mol dm^{-3} Na^+) te često i elektrolit koji se dodaje uzorku kako bi se poboljšala desorpcija određene vrste. Kiselina se dodaje za povećanje prinosa iona $[\text{M}+\text{H}]^+$, a baze za povećanje prinosa iona $[\text{M}-\text{H}]^-$. Prisutnost elektrolita u velikim količinama kao i prisutnost površinski aktivnih tvari može zatamiti signal analita, što je jedan od glavnih nedostataka elektroraspršenja kao načina ionizacije u spektrometriji masa.¹⁰

Jedno je od ključnih pitanja da li relativan intenzitet signala u spektru masa reflektira relativnu zastupljenost analita prisutnih u otopini? Ovisnost intenziteta signala o analitu A^+ ovisi o njegovoj koncentraciji i faktoru odziva R_A :

$$I_A = R_A [A^+]. \quad (6)$$

Do razlike između faktora odziva za različite analite može doći zbog diskriminacije masa u analizatoru masa ili samog procesa elektrospršenja, o čemu će biti riječ u nastavku teksta.

Model isparavanja iona zasniva se na teoriji prijelaznog stanja.^{7,9} Koeficijent brzine emisije iona iz kapljice dana je sljedećim izrazom:

$$k = (k_B T / h) \exp(-\Delta G^\ddagger / RT), \quad (7)$$

gdje je k_B Boltzmanova konstanta, T temperatura kapljice, h Planckova konstanta, a Gibbsova energija aktivacije ΔG^\ddagger odnosi se na razliku Gibbsovih energija solvativiranog iona u plinskoj fazi i u nabijenoj kapljici. Kako bi opisali ovisnost intenziteta o koncentraciji, Tang i Kebarle²² predložili su model zasnovan na modelu isparavanja iona i na hipotezi da brzine isparavanja iona ovise o njihovoj koncentraciji u kapljici. Za analite A^+ i B^+ omjer intenziteta dan je izrazom:

$$I_A / I_B = k_A[A^+] / k_B[B^+]. \quad (8)$$

Prema tome, faktor odziva proporcionalan je brzini isparavanja iona. U kasnijem radu²³ isti su autori uveli i površinsku aktivnost iona budući da ioni isparavaju s površine kapljice te je intenzitet proporcionalan površinskoj koncentraciji iona:

$$I_A / I_B = K_{SA} k_A[A^+] / K_{SB} k_B[B^+], \quad (9)$$

gdje K_S predstavlja površinsku aktivnost. Međutim, taj model ne objašnjava ovisnost intenziteta o koncentraciji u širokom koncentracijskom području, te je 1997. godine Enke uveo model ravnotežne raspodjele.²⁴ Osnovna je postavka da ioni u plinskoj fazi potječu s površine kapljice. Površina koja je nabijena zbog viška iona istog naboja promatrana je kao jedna faza, a unutrašnjost kapljice kao druga faza. Ako je raspodjela iona između tih faza dovoljno brza, može se definirati ravnotežna konstanta. Pri niskim koncentracijama površina kapljice nije zasićena i svi ioni (npr. A^+ i B^+) lako dolaze na površinu neovisno o ravnotežnoj konstanti raspodjele K_A i K_B . Pri visokim koncentracijama površina je zasićena, dolazi do kompeticije različitih iona za mjesto na površini te će faktori odziva ovisiti o omjeru K_A/K_B . Površinski aktivne tvari davat će stoga najintenzivnije signale u spektru masa. Taj model neovisan je o načinu nastanka iona u plinskoj fazi jer je najvažniji korak raspodjela naboja pri nastajanju nabijenih kapljica još u Taylorovom stošću. Tijekom brzog procesa desolvatacije i dijeljenja kapljica ne dolazi do znatnije promjene u ionskom sastavu na površini kapljice. Treba napomenuti da bi intenzitet signala predviđen ovim modelom približno odgovarao sumi intenziteta svih signala koje analit ima u spektru masa.

Odnos između iona opaženih u plinskoj fazi i iona prisutnih u otopini

Ioni opaženi u spektru masa mogu se razlikovati od iona prisutnih u otopini zbog različitih kemijskih reakcija desolvativiranog iona i neutralnih plinova na putu do analizatora masa. Ti efekti uključuju reakcije ion–molekula, prijenos naboja i fragmentiranje iona. U svim slučajevima ioni u

spektru masa pokazuju različit oblik od onog kojeg su imali u otopini.²¹

Mali stabilni ioni alkalijskih metala (Li^+ , Na^+ , K^+ , Rb^+ , Cs^+) prevode se u plinsku fazu bez promjene. Višestruko nabijeni ioni metala jače su solvativirani te uklanjanje svih molekula otapala uzrokuje separaciju naboja, primjerice:

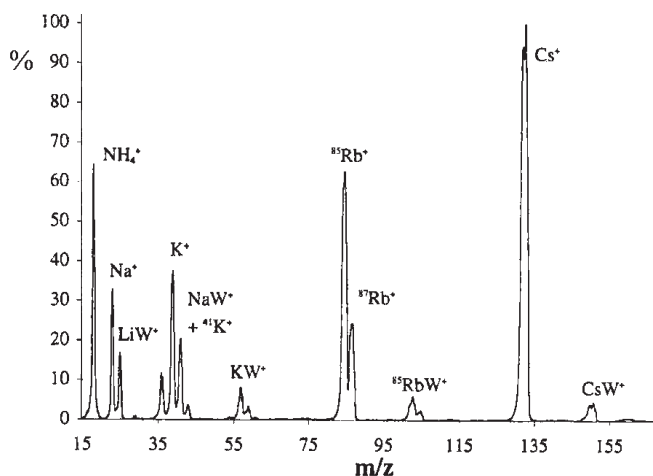


gdje je $M^{2+} = Mg^{2+}$, Ca^{2+} , Zn^{2+} .^{8,10} Kao sporedni produkti opaženi su i oblici $[M^{2+}X^-]^+$, gdje X predstavlja bilo koji negativno nabijeni ion.¹¹ Posebno su važne promjene u stupnju protoniranosti analita s bazičnim skupinama opažene u spektru masa u odnosu na stupanj protoniranosti u otopini. Prvi takav primjer pokazali su Fenselau i sur.²⁵ koji su detektirali protonirani protein iz bazične otopine, pH = 10, a kasnije je slično uočeno i na manjim molekulama kao što su aminokiseline²⁶ ili kafein.²⁷ Ionizacije pri kojima su u spektru masa opaženi protonirani ili deprotonirani ioni iz jako lužnatih, odnosno jako kiselih otopina, u kojima takvi ioni ne postoje u znatnijoj koncentraciji nazvane su ionizacije “wrong-way-round”.

Primjena elektrospršenja

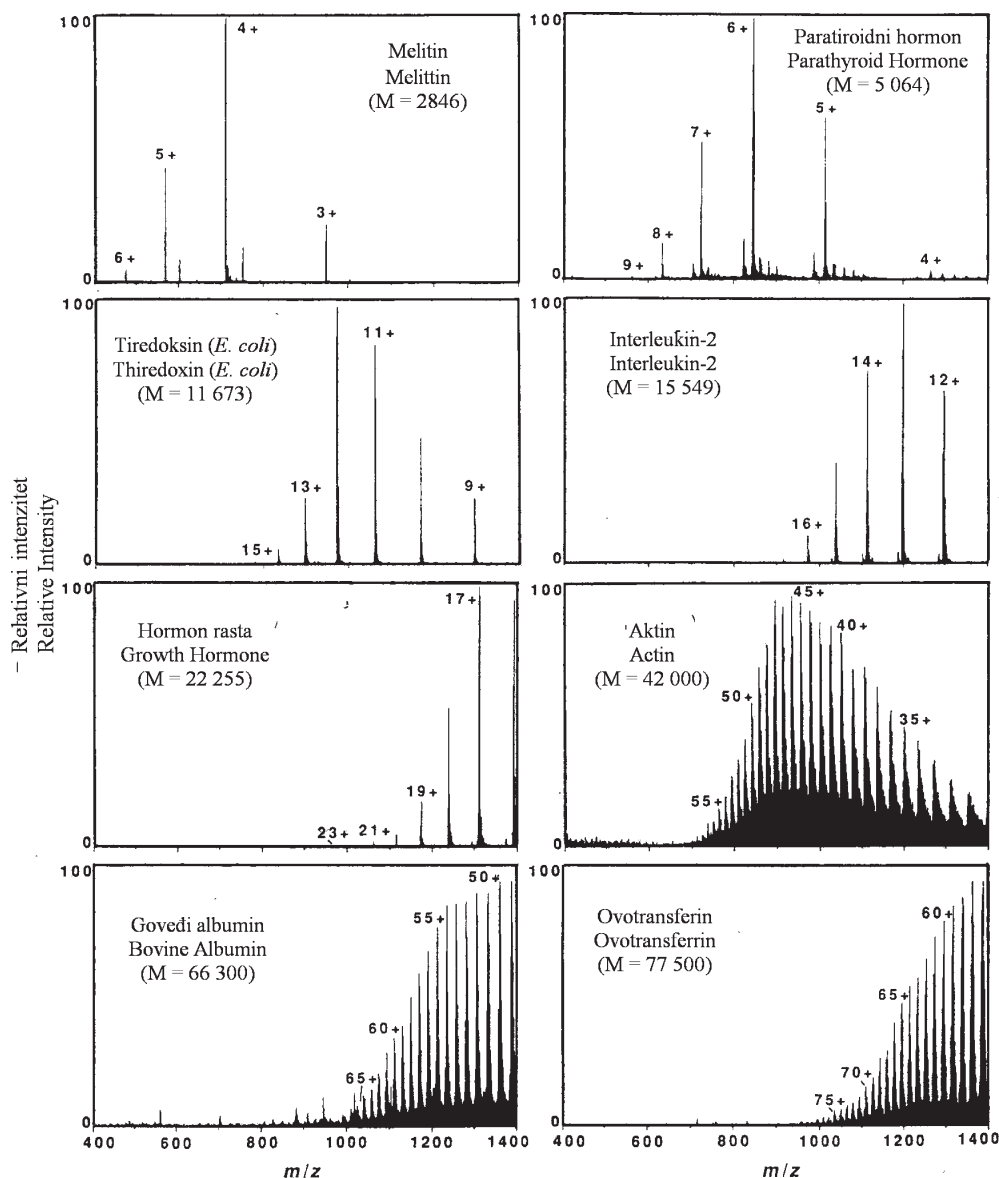
Spektrometrija masa uz elektrospršenje kao način ionizacije (ESI-MS) danas se primjenjuje za analizu različitih vrsta kemijskih spojeva. Od posebnog su interesa biomolekule (peptidi, proteini, lipidi, šećeri, nukleinske kiseline itd.).^{28,29} Gotovo rutinskim analizama određuju se primarne strukture peptida i proteina, a sve veći interes usmjeren je prema supramolekularnoj kemiji. Intenzivno su proučavani kompleksi DNA s različitim lijekovima, proteinima, oligonukleotidima; interakcije protein/protein, enzim/supstrat, enzim/inhibitor; supramolekularni metalni kompleksi te inkluzijski kompleksi s α - i β -ciklodekstrinima.³⁰

Na slici 4 prikazan je ESI-MS spektar vodene otopine natrijevog, kalijevog, rubidijevog i cezijevog klorida. Osim signala jednostruko nabijenih iona alkalijskih metala može se uočiti i signal pri $m/z = 18$, koji potječe od onečišćenja, iona $[NH_4]^+$. Također se mogu uočiti signali slabijeg inten-



Slika 4 – Intenziteti iona opaženi za $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ vodenu otopinu NaCl, KCl, RbCl, CsCl⁹

Fig. 4 – Ion intensities observed with $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ each of NaCl, KCl, RbCl, CsCl in aqueous solution⁹

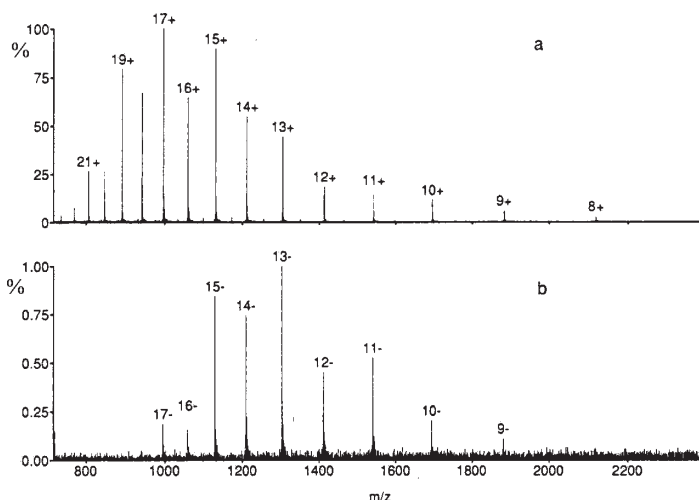
Slika 5 – ESI-MS spektri različitih peptida i proteina s M_r od 2 846 do 77 500¹⁵Fig. 5. – ESI-MS spectra for different peptides and proteins with M_r ranging from 2 846 to 77 500¹⁵

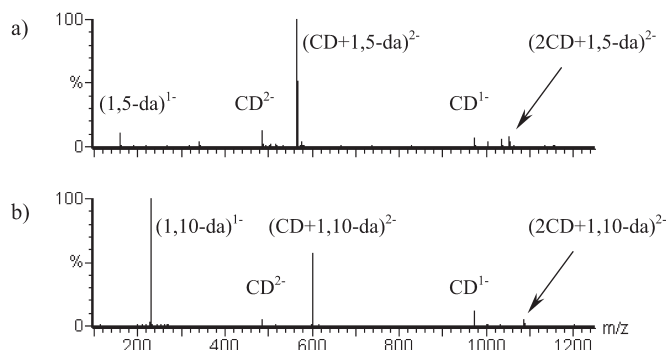
ziteteta koji odgovaraju hidratiziranim ionima alkalijskih metala $[M+H_2O]^+$.⁹

Slika 5 prikaz je nekoliko ESI-MS spektara različitih peptida i proteina relativnih molekularskih masa od 2 846 do 77 500, snimljenih u području vrijednosti m/z od 400 do 1 400. Nastajanje višestruko nabijenih iona omogućuje analizu velikih biomolekula i pri malim vrijednostima m/z .¹⁵

Primjer ionizacije “wrong way round” dan je na slikama 6a i 6b. Mogu se uočiti višestruko negativno nabijeni ioni mioglobina iz otopine $pH = 3,5$ iako je pri toj vrijednosti pH udio negativno nabijenih iona u otopini zanemariv.²⁵

Na slikama 7a i 7b prikazani su ESI-MS spektri inkluzijskih kompleksa α -ciklodekstrina s alifatskim α,ω -dikarboksilnim kiselinama. Primjeri su izabrani kako bi se uočila posljedica prisutnosti površinski aktivne tvari. Naime, što je dulji alifatski lanac, veća je površinska aktivnost dikarboksilne kiseline, te je i odgovarajući signal u spektru masa intenzivniji.³¹

Slika 6 – ESI-MS spektar mioglobina:²⁵ a) pozitivno nabijeni ioni, $pH = 3,5$, b) negativno nabijeni ioni, $pH = 3,5$ Fig. 6 – ESI-MS spectra of myoglobin:²⁵ a) positive ions, $pH = 3.5$, b) negative ions, $pH = 3.5$



Slika 7 – ESI-MS spektri ekvimolarnih smjesa ($4 \cdot 10^{-4}$ mol dm^{-3}) α -ciklodekstrina i α,ω -dikarboksilnih kiselina u vodi, pH = 9:³¹ a) α -ciklodekstrin + 1,5-dikarboksilna kiselina, b) α -ciklodekstrin + 1,10-dikarboksilna kiselina

Fig. 7 – ESI-MS spectra obtained for equimolar mixtures ($4 \cdot 10^{-4}$ mol dm^{-3}) of α -cyclodextrin and α,ω -dicarboxylic acids in water, pH = 9:³¹ a) α -cyclodextrin + 1,5-dicarboxylic acid, b) α -cyclodextrin + 1,10-dicarboxylic acid

Zaključak

Elektoraspršenje je blagi način ionizacije u spektrometriji masa, koji omogućuje prijenos iona iz otopine u plinsku fazu, a time i analizu kako malih iona tako i velikih, nehlapivih molekula kao što su proteini. Sam proces intenzivno je proučavan posljednjih desetak godina, izvedeni su neki opće prihvaćeni zaključci, ali još uvijek postoji niz neriješenih pitanja. Pogotovo su nedovoljno razumljive anomalije koje su opažene za mnoge jednostruko i višestruko nabijene ione, kada relativna zastupljenost u spektru masa ne odgovara njihovoj zastupljenosti u otopini. Također su nedovoljno razjašnjeni slučajevi u kojima su u spektru masa opaženi signali iona koji ne postoje u otopini.

ZAHVALA

Ovaj rad napravljen je u okviru znanstvenog projekta Ministarstva znanosti i tehnologije Republike Hrvatske, broj 119641, glavnog istraživača prof. dr. sc. Zlatka Meića.

Literatura References

1. E. de Hoffmann, V. Stroobant, *Mass Spectrometry Principles and Applications*, Wiley, Chichester, 2002, str. 11–61.
2. S. Kazazić, S. Pečur, D. Srzić, *Kem. Ind.* **48** (1999) 181.
3. M. Yamashita, J. B. Fenn, *J. Phys. Chem.* **88** (1984) 4451.
4. C. M. Whitehouse, R. N. Dreyer, M. Yamashita, J. B. Fenn, *Anal. Chem.* **57** (1985) 675.
5. J. B. Fenn, M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong, C. M. Whitehouse, *Science* **246** (1989) 64.
6. G. Wang, R. B. Cole, *Org. Mass Spectrom.* **29** (1994) 419.
7. P. Kebarle, L. Tang, *Anal. Chem.* **65** (1993) 972.
8. S. J. Gaskell, *J. Mass Spectrom.* **32** (1997) 677.
9. P. Kebarle, M. Peschke, *Anal. Chim. Acta* **406** (2000) 11.
10. R. B. Cole, *J. Mass Spectrom.* **35** (2000) 763.
11. P. Kebarle, *J. Mass Spectrom.* **35** (2000) 804.
12. J. Fernandez de la Mora, G. J. Van Berkel, C. G. Enke, R. B. Cole, M. Martinez-Sanchez, J. B. Fenn, *J. Mass Spectrom.* **35** (2000) 939.
13. A. T. Blades, M. G. Ikonou, P. Kebarle, *Anal. Chem.* **63** (1991) 2109.
14. M. G. Ikonou, A. T. Blades, P. Kebarle, *Anal. Chem.* **63** (1991) 1989.
15. R. D. Smith, J. A. Loo, C. G. Edmonds, C. J. Barinaga, H. R. Udseth, *Anal. Chem.* **62** (1990) 882.
16. M. Dole, L. L. Mack, R. L. Hines, R. C. Mobley, L. D. Ferguson, M. B. Alice, *J. Chem. Phys.* **49** (1968) 2240.
17. J. V. Iribarne, B. A. Thomson, *J. Chem. Phys.* **64** (1976) 2287.
18. B. A. Thomson, J. V. Iribarne, *J. Chem. Phys.* **71** (1979) 4451.
19. M. Gamero-Castaño, J. Fernandez de la Mora, *Anal. Chim. Acta* **406** (2000) 67.
20. M. Gamero-Castaño, J. Fernandez de la Mora, *J. Mass Spectrom.* **35** (2000) 790.
21. G. Wang, R. B. Cole, *Anal. Chim. Acta* **406** (2000) 53.
22. L. Tang, P. Kebarle, *Anal. Chem.* **63** (1991) 2709.
23. L. Tang, P. Kebarle, *Anal. Chem.* **65** (1993) 3654.
24. C. G. Enke, *Anal. Chem.* **69** (1997) 4885.
25. M. A. Kelly, M. M. Vestling, C. C. Fenselau, P. B. Smith, *Org. Mass Spectrom.* **27** (1992) 1143.
26. B. A. Mansoori, D. A. Volmer, R. K. Boyd, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **11** (1997) 1120.
27. S. Zhou, K. D. Cook, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **11** (2000) 961.
28. W. J. Griffiths, A. P. Jonsson, S. Liu, D. K. Rai, Y. Wang, *Biochem. J.* **355** (2001) 545.
29. A. Dell, H. R. Morris, *Science* **291** (2001) 2351.
30. C. A. Schalley, J. M. Rivera, T. Martin, J. Santamaría, G. Siuzdak, J. Rebek, Jr., *Eur. J. Org. Chem.* (1999) 1325.
31. V. Gabelica, N. Galić, E. De Pauw, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **13** (2002) 946.

SUMMARY

Electrospray – Soft Ionization in Mass Spectrometry

N. Galić

Aspects of the major processes by which ions in solution are converted to ions in the gas phase are given on the basis of information available in the articles on electrospray mass spectrometry (ESMS).^{1–14}

The solution containing the analyte is introduced with a weak flux (normally $1 - 10 \mu\text{l min}^{-1}$) in a capillary on which a high electric field is applied under atmospheric pressure (Figure 1). The field causes a separation of positive and negative charges in the solution. In the positive ion mode (when the capillary is the positive terminal), positive ions tend to move towards the counter-electrode and accumulate at the surface of the liquid at the capillary tip. At a critical field the meniscus at the tip deforms into a liquid cone, called a Taylor cone, which continuously produces droplets (Figure 2). The droplets' surfaces are enriched with positive ions for which there are no negative counterions in the droplet. Reversing the polarity of the power supply can generate negatively charged droplets instead. As electrospray produces a continuous current, redox processes must occur at the capillary and at the counter electrode to avoid charge accumulation. In other words, electrospray device can be viewed as a special type of electrolytic cell in which part of the ion transport does not occur through uninterrupted solution, but as charged droplets and later as ions in the gas phase.

Evaporation of solvent from the initially formed droplets, as they traverse a potential and a pressure gradient towards the analyzer of the mass spectrometer, leads to a reduction in size. The radius of the droplet decreases at constant charge until being close to Rayleigh limit, when the Coulombic repulsion between the charges overcomes the cohesive forces. This leads to the Coulomb fission of the droplet (Figure 3). Small offspring droplets have radii which are roughly one-tenth of the parent droplet radius. They carry away approximately 2 % of the parent mass and 15 % of the parent charge. As evaporation carries on, the daughter droplets undergo fission themselves.

Two different mechanisms have been proposed to account for the formation of desolvated ions in the gas phase from the small charged droplets. The charged residue model, proposed by Dole,¹⁵ assumes that the series of droplet fission events leads to the extremely small droplets containing only one ion. Molecules having masses above at least 3300 Da are produced via this mechanism.^{9,18} According to the ion evaporation model, proposed by Iribarne and Thomson,^{16,17} at an intermediate stage in the droplets' lifetime (prior to the Rayleigh limit) the electric field on the surface of the charged droplets is sufficiently high so that solvated ions may be emitted directly into the gas phase. It is now generally admitted that small ions are produced predominantly by this mechanism.^{6,19,20}

Of major concern to the mass spectrometrists is whether the relative intensities in the MS spectra reflect the relative abundances of the analytes present in solution. The intensity of the signal corresponding to the analyte depends on its concentration and on its response. The effect of the electrospray mechanism on the response of the analyte is described by Tang and Kebarle^{21,22} and G. Enke.²³ Only the key features are described in this paper.

The ions observed in the gas phase may be different from those present in the solution. Transfer of the ions from solution to gas phase without chemical change can occur only for very stable ions such as singly charged alkali ions. Very important changes can occur when the ions involved are protonated bases or deprotonated acids. The term "wrong-way-round ionization" has been used to describe the observation of protonated or deprotonated ions electrosprayed from solutions where such ions are not expected to exist in appreciable concentrations.^{24–27}

Laboratory of Analytical Chemistry,
Faculty of Science, University of Zagreb,
Strossmayerov trg 14, 10 000 Zagreb

Received January 22, 2003
Accepted October 14, 2003