



Doctoral Thesis

Ambient pressure mass spectrometry for ultrasensitive and spatially resolved analyses

Author(s):

Zhu, Liang

Publication Date:

2011

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-006835786> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

DISS. ETH NO. 19857

Ambient pressure mass spectrometry for ultrasensitive and spatially resolved analyses

A dissertation submitted to
ETH ZURICH

for the degree of
Doctor of Sciences

presented by
Liang ZHU

M. Sc. in Advanced Materials, Ulm University, Germany

born November 27th, 1981

JinTan, JiangSu, China P. R.

citizen of China

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. Renato Zenobi, examiner
Prof. Dr. Detlef Günther, co-examiner

Zurich, 2011

Summary

In this thesis, two ultrasensitive mass spectrometric techniques that share the idea of combining ambient pressure desorption and neutral post-ionization are presented, in order to develop suitable analytical tools for high throughput analysis and high spatial resolution molecular imaging. Firstly, using an ultrasonic nebulizer or by simply sampling exhaled breath, target compounds in complex matrices were delivered in the form of aerosols in open air, and then post-ionized in a novel extractive electrospray ionization (EESI) interface for mass spectrometry (MS) analysis. Rapid analysis of adulterated compounds in complex biofluids and real-time therapeutic drug monitoring (TDM) via exhaled breath were demonstrated and the analytical performance was validated. In the following chapters of the thesis, the outcome of optimizing a homemade nanoscale analytical instrument that couples near-field laser ablation as sampling and in-trap ionization is described. Besides the efforts to mend the experimental difficulties (e.g., low ionization efficiency) posed by the detecting mass spectrometer, a series of fundamental studies at the sampling interface (from the ambient ablation site to the vacuum of the mass spectrometer) were conducted. In-depth information concerning near-field laser ablation plume propagation, the evaluation of sampling efficiency, and the influence of sampling geometry was gained in view of better sampling performance.

1st. The ambient pressure ionization technique under study is extractive electrospray ionization (EESI), a modified ESI source, in which a separate nebulizer is used to pneumatically spray the target compounds in the form of an aerosol into an electrospray plume of pure solvent. As a result of the interactions between the neutral spray and the charged primary electrospray plume, EESI accomplishes electrospray-like ionization. The decoupling of sample introduction and neutral ionization simplifies the analytical procedure and renders EESI largely independent of matrix effects. Direct and robust detection of trace amount of chemicals in various complex biofluids using the EESI technique has been demonstrated. Unfortunately, the original dual-spray EESI method cannot handle rapid analysis of small sample aliquots. This is mainly attributed to the fact that the sample volume is too small for pneumatic nebulization. The solution to this was found by nebulizing a small aliquot with an ultrasonic transducer into the primary electrospray plume, where the EESI post-ionization took place. This new approach enabled the analysis of a small liquid aliquot directly, even in the case of complicated biological matrices. For instance, the level of melamine in raw milk was determined using ultrasound-assisted EESI-MS in less than 30 s without sample preparation. Moreover, by directly breathing into the EESI interface, both gaseous volatile compounds and non-volatile endogenous metabolites contained in breath aerosols was fingerprinted, demonstrating an experimentally convenient method for fast clinical diagnosis. In-vivo drug monitoring and pharmacokinetic measurement in a non-invasive, pain-free manner was demonstrated by EESI mass spectral measurements of a novel exhaled breath biomarker for valproic acid, a medication used to control epilepsy. An exponential clearance kinetics with a characteristic half-life between 7.0 and 10.5 hours was found. Moreover, a relationship between blood plasma levels of valproic acid and breath concentration of the metabolite, determined by EESI-MS, was validated. The use of the

EESI method in clinical trials holds great promise in personalized dosage adjustments during therapy by replacing routine blood or urine examination with a simple breath test.

2nd. In previous work, our group has already shown that near-field laser ablation (LA) products at atmospheric pressure can in principle be detected using an ion trap (IT)/time of flight (TOF) mass spectrometer, demonstrating the capability of chemical molecular analysis with a lateral resolution on the low μm scale. The ablated material, predominantly neutral molecules, was sampled through a hot transport line from the ambient laser ablation site into the MS system, followed by in-trap post-ionization under vacuum, ion storage, and finally mass spectrometric analysis. With the aim to address the issue of sensitivity of ambient near-field LA-MS while dealing with even smaller craters ($<1 \mu\text{m}$), several modifications of the existing instrument, such as a more advanced in-trap post-ionization configuration, were implemented. For instance, the original in-trap electron ionization source was replaced by a VUV Krypton lamp, which, however, produced similar mass spectra and detection sensitivity. Despite of the comparable sensitivity, our observations suggest that both photoionization and photoelectron impact ionization were taking place in this source, a process that could be potentially useful for ion trap mass spectrometers since elevated pressure that decreases the efficiency of heated filaments would no longer be an issue. Alternatively, an inline plasma ionization source was developed and intensively studied to characterize its sensitivity. This miniaturized dielectric barrier discharge source with a very small dead volume allows complete mixing of the reactive species in the low-temperature plasma with the neutral analytes being transported along the sampling line, thus ensuring a better efficiency while maintaining soft ionization conditions. Both polar and non-polar compounds can be directly detected in gaseous form with an extremely low background signal. For volatile compounds, preliminary measurements suggest an absolute sensitivity of $\sim 280 \text{ fmol}$, three orders of magnitude better than the original in-trap post-ionization scheme.

Furthermore, a detailed quantitative investigation of the near-field laser ablation plume propagation with and without a sampling capillary in the vicinity of the ablation site was launched. It was found that the near-field ablation plume travels as far as $\sim 30\text{-}40 \mu\text{m}$ vertically and that sampling of the plume was most efficient within a distance of $\sim 200 \mu\text{m}$ from the capillary inlet. Furthermore, we performed detailed measurements as well as computational fluid dynamics simulations of how the geometry and the aerodynamic flow provided by the sampling orifice affected the sampling efficiency and timing. Overall, it was found that, with a proper sampling geometry, vaporized neutral molecules from a single laser pulse can be efficiently directed to the inlet of the sampling capillary such that several % are available in a distribution of 1-10 ms after ablation for further MS analysis.

The knowledge obtained in this thesis provides further fundamental understanding of the near-field laser ablation plume propagation from molecular solids, and would apply to other related high spatial resolution laser ablation mass spectrometric methods. Additionally, the experimental results on the subject of instrumental modifications of post-ionization configuration coupled to ambient desorption open the way for improving high spatial resolution imaging and high-throughput mass spectrometric applications.

Zusammenfassung

In dieser Dissertation werden zwei ultrasensitive massenspektrometrische Techniken vorgestellt, welche die Ionisierung bei Normaldruck und die neutrale Nachionisation miteinander kombinieren, um die Entwicklung nützlicher analytischer Werkzeuge mit hohem Durchsatz und grosser räumlicher Auflösung für molekulare Bildgebung zu ermöglichen. Als erstes wurden Zielmoleküle in komplexen Matrizen, entweder mit Hilfe eines Ultraschallzerstäubers oder direkt aus dem Atem eines Probanden, als Aerosole mittels einer neuen Ionisierungstechnik namens extraktive Elektrospray-Ionisation (EESI) ionisiert, um mittels Massenspektrometrie (MS) analysiert werden zu können. Die Analyse von Verunreinigungen in komplexen Biofluiden sowie die Medikamentenüberwachung in Echtzeit im Atem konnte zuverlässlich validiert werden. In den folgenden Kapiteln dieser Dissertation werden die Resultate für die Optimierung eines selbst gebauten analytischen Instrumentes für den Nanobereich gezeigt, welches Nahfeld-Laserablation als Probenahme mit der Ionisation und der Analyse in einer Ionenfalle kombiniert. Zusätzlich zum Aufwand der durch die Optimierungsarbeiten mit dem Massenspektrometer nötig war (z.B. mangelhafte Ionisierungseffizienz), wurde eine Reihe grundlegender Versuche mit dem Proben-Interface (Übergang von Normaldruck in den Niederdruckbereich des Massenspektrometers) durchgeführt. Daraus resultierten neue Erkenntnisse über die Ausbreitung der durch die Nahfeld-Laserablation erzeugten Probenwolke, die Einschätzung der Effizienz der Probenahme sowie den Einfluss deren Geometrie, um eine bessere Probenahme zu ermöglichen.

1. Bei der EESI-Methode, welche eine Ionisierung bei Normaldruck erlaubt, handelt es sich um eine modifizierte Elektrospray Ionierungsquelle. Ein pneumatischer Zerstäuber versprüht die Probe als Aerosol in eine ESI-Wolke. Die neutralen Tröpfchen kollidieren dabei mit den geladenen Tröpfchen aus dem Elektrospray. Dabei werden die Probemoleküle der Reihe nach extrahiert, verdampft, ionisiert und zuletzt vom MS detektiert. Das Trennen vom Ort der Probeneinführung und der Ionisierung vereinfacht den analytischen Vorgang und macht EESI nahezu unabhängig von Matrixeffekten. EESI ermöglicht die direkte und robuste Detektion von Spuren in verschiedenen komplexen Biofluiden, was in mehreren Fällen gezeigt werden konnte. Leider ist die Technik mit diesen zwei Sprays nicht in der Lage mit Kleinstmengen flüssiger Proben umzugehen. Dies ist hauptsächlich auf die Tatsache zurückzuführen, dass zu kleine Probenmengen nicht direkt pneumatisch nebulisiert werden können. Gelöst wurde dieses Problem indem die Probe mit einem Ultraschallzerstäuber in die primäre Elektrospraywolke zersprüht und danach in einem EESI-Mechanismus ionisiert wurde. Diese Methode ermöglicht sogar die direkte Analyse von Kleinstmengen komplizierter biologischen Matrizen. So konnte zum Beispiel der Melamingehalt von frischer Milch ohne Probenvorbereitung in weniger als 30 Sekunden bestimmt werden. Ausserdem können beim Ausatmen in das EESI Interface sowohl flüchtige wie auch nichtflüchtige körpereigene Metaboliten, welche in der Gasphase von Atemaerosolen enthalten sind, detektiert werden, was eine experimentell einfache Methode für eine rasche klinische Diagnose darstellt. Mittels EESI konnte für einen neu entdeckten Biomarker von Valproinsäure (ein Medikament gegen Epilepsie) eine Methode entwickelt werden, welche auf nicht-invasive und

schmerzfreie Art sowohl die Medikamentenüberwachung als auch pharmakokinetische Untersuchungen ermöglicht. Dabei wurde ein exponentieller Abbau von Valproinsäure mit einer charakteristischen Zeit zwischen 7 und 10.5 Stunden gefunden. Zudem konnte ein Zusammenhang zwischen der Konzentration von Valproinsäure im Blut und der Konzentration des Metaboliten im Atem nachgewiesen werden. Die Verwendung von EESI in klinischen Untersuchungen ist sehr vielversprechend, gerade im Bereich der individuellen Dosierungsanpassung während Therapien. Das Ersetzen von Blut- und Urinproben durch einen einfachen Atemtest könnte die Belastung von Patienten deutlich senken.

2. Unsere Gruppe konnte bereits früher zeigen, dass Produkte einer Nahfeld-Laserablation bei Normaldruck, unter Verwendung einer Ionenfalle oder eines Flugzeitmassenspektrometers, grundsätzlich detektiert werden können, was eine chemische Analyse mit einer Auflösung im tiefen Mikrometerbereich ermöglicht. Dabei wurde das abgetragene Material, welches hauptsächlich aus neutralen Molekülen besteht, durch eine Transportkapillare vom Ort der Laserablation zum Massenspektrometer gebracht, wo es mittels Nachionisation in der Ionenfalle massenspektrometrisch analysiert werden konnte. Um die Sensitivität dieser Nahfeld-Laserablation Massenspektrometrie bei Normaldruck sowie bei kleineren Kratern ($<1 \mu\text{m}$) zu verbessern, wurden am existierenden Instrument mehrere Modifikationen vorgenommen, so zum Beispiel eine verbesserte Konfiguration für die Nachionisation in der Ionenfalle. Die existierende Ionisationsquelle wurde durch eine VUV Kryptonlampe ersetzt, was allerdings ähnliche Massenspektren und Detektionssensitivitäten ergab. Trotz der vergleichbaren Sensitivität lassen unsere Beobachtungen darauf schliessen, dass sowohl Photoionisation als auch Ionisation durch den photoelektrischen Effekt stattfinden. Dies könnte für Ionenfallen-Massenspektrometrie potentiell nützlich sein, indem das Durchbrennen erhitzter Filamente bei höherem Druck damit kein Problem mehr darstellen würde. Um den Flaschenhals der Nachionisation innerhalb der Ionenfalle umgehen zu können, wurde eine Plasmaionisationsquelle entwickelt und deren Sensitivität im Detail untersucht. Diese miniaturisierte dielektrische Barriereentladungs-Quelle mit einem sehr kleinen Totvolumen ermöglicht eine komplette Vermischung der reaktiven Spezies des Tieftemperaturplasmas mit den neutralen Analyten. Diese Vermischung erfolgt während des Transportes entlang der Kapillare, was eine bessere Effizienz sowie eine weiche Ionisation ermöglicht. Sowohl polare als auch apolare Stoffe können bei gleichzeitig tieferem Hintergrundsignal direkt detektiert werden. Im Falle flüchtiger Verbindungen lassen erste Messungen auf absolute Sensitivitäten um 280 fmol schliessen. Dies ist um drei Grössenordnungen besser als in der ursprünglichen Anordnung mit Nachionisations innerhalb der Ionenfalle.

Zusätzlich wurde eine detaillierte quantitative Untersuchung der Ausbreitung der Nahfeld-LA-Wolke mit und ohne Probenahme-Kapillare in der Nähe der Ablationsstelle durchgeführt. Dabei konnte gezeigt werden, dass sich die Nahfeld-LA-Wolke ungefähr 40 μm vertikal ausbreitet, und dass die Probenahme ungefähr 200 μm von der Ablationsstelle am effizientesten ist. Zusätzlich wurden detaillierte Messungen sowie rechnergestützte fluiddynamische Simulationen durchgeführt, um zu zeigen, wie die Geometrie und der aerodynamische Fluss der Probenahme-Kapillare sowie Effizienz und

das Timing der Probenahme beeinflusst wird. Insgesamt konnte gezeigt werden, dass mit einer optimalen Probenahme-Geometrie verdampfte neutrale Moleküle eines einzigen Laserpulses effizient in die Probenahme-Kapillare überführt werden können, sodass mehrere Prozent der Probe über einen Zeitraum von 1-10 ms verteilt für die weitere MS Analyse zur Verfügung stehen.

Die Erkenntnisse, welche in dieser Dissertation gewonnen wurden geben ein tieferes Verständnis der Ausbreitung der Nahfeld-Laserablations-Wolke von Feststoffen, welche auch für andere auf Laserablation beruhenden massenspektrometrischen Methoden gelten. Die experimentellen Resultate im Bereich der instrumentellen Verbesserungen der Nachionsations-Konfiguration ermöglichen die Verbesserung für hochauflösendes Imaging und massenspektrometrische Applikationen mit hohem Probendurchsatz.