



Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Kemijski odsjek

# PRIMJENA SPREGNUTOG SUSTAVA SPEKTROMETRIJA IONSKE POKRETLJIVOSTI-SPEKTROMETRIJA MASA U ANALIZI IZOMERA BIOLOŠKIH MOLEKULA

J. N. Dodds, E. S. Baker, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **30** (2019) 2185–2195.

David Klarić

**Kemijski seminar 1**

Poslijediplomski sveučilišni studij Kemija

Zagreb, 2020. godina.

## 1. UVOD

## 2. SPREGNUTI SUSTAV SPEKTROMETRIJA IONSKE POKRETLJIVOSTI-SPEKTROMETRIJA MASA

- Sudarni presjek (teorijska osnova spektrometrije ionske pokretljivosti)
- Instrumentacija (ionski izvori, sudarne ćelije, analizatori masa)
- Primjena spregnutih sustava IMS-MS; primjena u analizi izomera bioloških molekula

## 3. ZAKLJUČAK

## 4. LITERATURNI IZVORI

# 1. UVOD

- Spektrometrija ionske pokretljivosti – tehnika odjeljivanja iona u plinskoj fazi pod utjecajem djelovanja električnog polja
- Razvoj započinje 60-ih godina 20. stoljeća
- Spregom sa spektrometrijom masa (IMS-MS) povećava se analitička moć i područje primjene
- 2006. godina – prvi komercijalno dostupan IMS-MS instrument (Synapt HDMS – Waters Corporation)

## 2. SPREGNUTI SUSTAV IMS-MS

- Pokretljivost iona u sudarnim ćelijama (ispunjene inertnim sudarnim plinom) pod utjecajem djelovanja električnog polja
- Sudarni presjek,  $\Omega$  (engl. *Collision cross-section, CCS*) – mjerljiva veličina; uprosječuje sve geometrijske orijentacije i vrste interakcija
- Manje molekule, kompaktnije konformacije (manji sudarni presjeci) – brže gibanje
- Veće molekule, otvorenije konformacije (veći sudarni presjeci) – sporije gibanje

- $E = \frac{U}{L}$  → Izraz za jakost električnog polja
- $v_d = K \times E$  → Izraz za brzinu iona u smjeru upotrijebljenog električnog polja  
     ↳ Pokretljivost iona
- $K_0 = K \frac{p T_0}{p_0 T}$  → Izraz za reduciranu pokretljivost iona, standardni uvjeti
- $t_d = \frac{L}{v_d} = \frac{L^2 T_0 p}{K_0 p_0 T U}$  → Izraz za vrijeme koje ion provede u sudarnoj ćeliji
- $K_0 = \frac{3ze}{16N_0} \left( \frac{2\pi}{\mu k_B T} \right)^{1/2} \frac{1}{\Omega}$  → Mason-Schamp jednadžba\*, povezuje reduciranu pokretljivost iona sa sudarnim presjekom promatranog iona pomoću kinetičke teorije

\*izvedena pod pretpostavkom djelovanja slabog električnog polja!

# Sudarni presjek

- Sudarni presjek,  $\Omega$  ( $\text{\AA}^2$ ) nije intrinzično svojstvo molekule analita
- Doprinos sudarnog plina i eksperimentalnih uvjeta ( $T, E, p, E/N$ )
- Potencijalni analitički identifikator
- Izračun teorijskih vrijednosti sudarnih presjeka
- Primarna vrijednost (direktno mjerenje) ili sekundarna vrijednost (kalibracija pomoću standarda)

# Instrumentacija (ionski izvori)

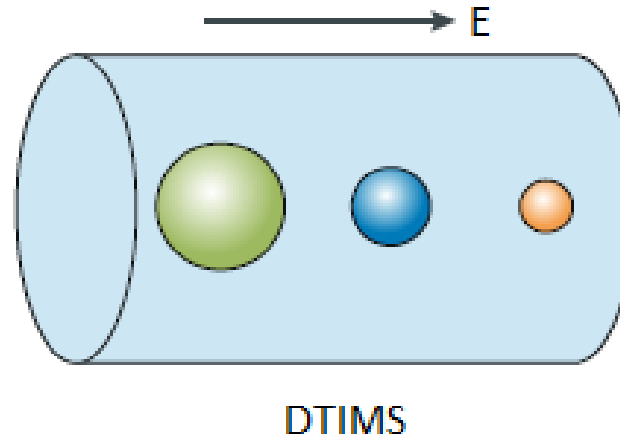
- Blagi načini ionizacije
- Ionizacija elektroraspršenjem (engl. *Electrospray ionization*, ESI); generiranje višestruko nabijenih iona
- Matricom potpomognuta ionizacija laserskom desorpcijom (engl. *Matrix assisted laser desorption ionization*, MALDI); generiranje jednostruko nabijenih iona
- Ionizacija laserskim raspršenjem (engl. *Laserspray ionization*, LSI); generiranje višestruko nabijenih iona

# Instrumentacija (sudarne ćelije)

- Sudarni plinovi ( $N_2$ , He, Ar,  $CO_2$ ,  $O_2$ )
  1. Vremenski – disperzivno odjeljivanje (platforme DTIMS i TWIMS)
  2. Prostorno – disperzivno odjeljivanje (platforma FAIMS)
  3. Ograničavanje iona i selektivno otpuštanje (platforma TIMS)

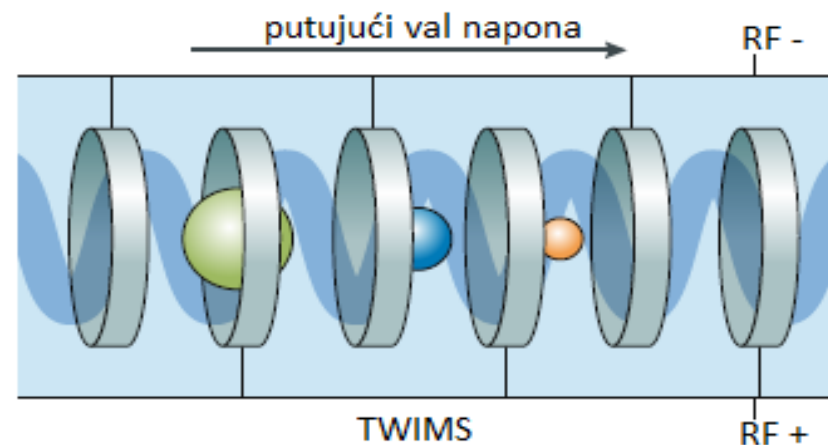


- Platforma DTIMS (engl. *Drift tube ion mobility spectrometry*)
- Stog jednako udaljenih prstenastih elektroda (Slika 1.)
- Plin nema usmjeren protok
- Djelovanje slabog i uniformnog električnog polja
- Direktno mjerenje sudarnih presjeka (Mason-Schamp jednadžba)



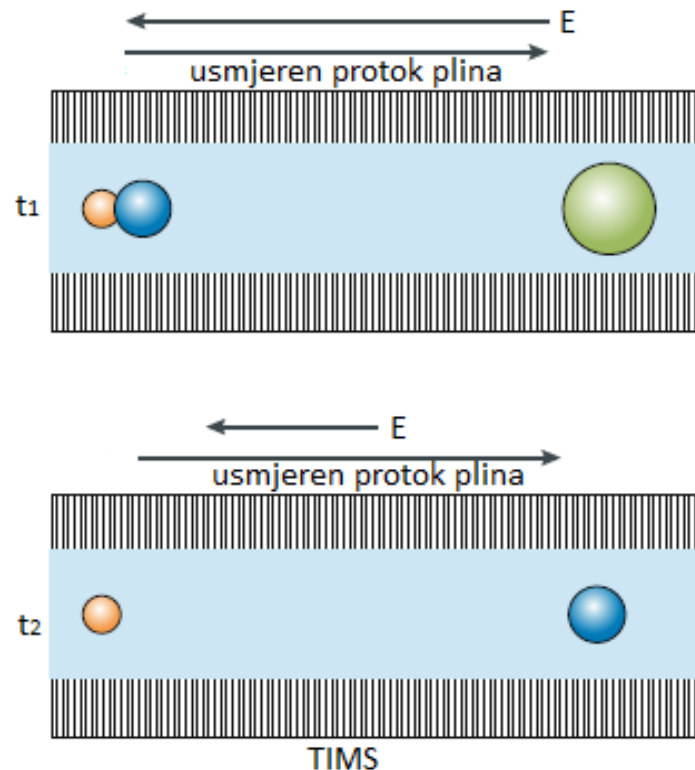
Slika 1. – Shematski prikaz odjeljivanja iona prema pokretljivosti u sudarnoj ćeliji DTIMS.<sup>1</sup>

- Platforma TWIMS (engl. *Traveling wave ion mobility spectrometry*)
- Stog prstenastih elektroda (Slika 2.)
- Primjena radiofrekventnog napona suprotnih faza na susjedne elektrode (fokusiranje iona)
- Primjena istosmjernog napona na setove elektroda (stvaranje barijera)
- Oscilirajuće električno polje (ne vrijedi Mason-Schamp jednadžba)
- Kalibracija standardima poznatih sudarnih presjeka



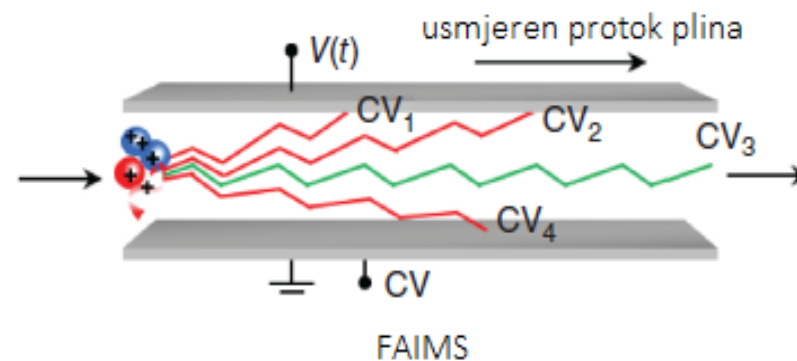
Slika 2. – Shematski prikaz odjeljivanja iona prema pokretljivosti u sudarnoj ćeliji TWIMS.<sup>1</sup>

- Platforma TIMS (engl. *Trapped ion mobility spectrometry*)
- Skup prstenastih elektroda podijeljen u tri regije
- Usmjeren protok plina prema detektoru uzrokuje gibanje iona
- Djelovanje električnog polja u suprotnom smjeru (Slika 3.)
- Mogućnost skeniranja; velika selektivnost (moć razlučivanja)



Slika 3. – Shematski prikaz odjeljivanja iona prema pokretljivosti u sudarnoj ćeliji TIMS.<sup>1</sup>

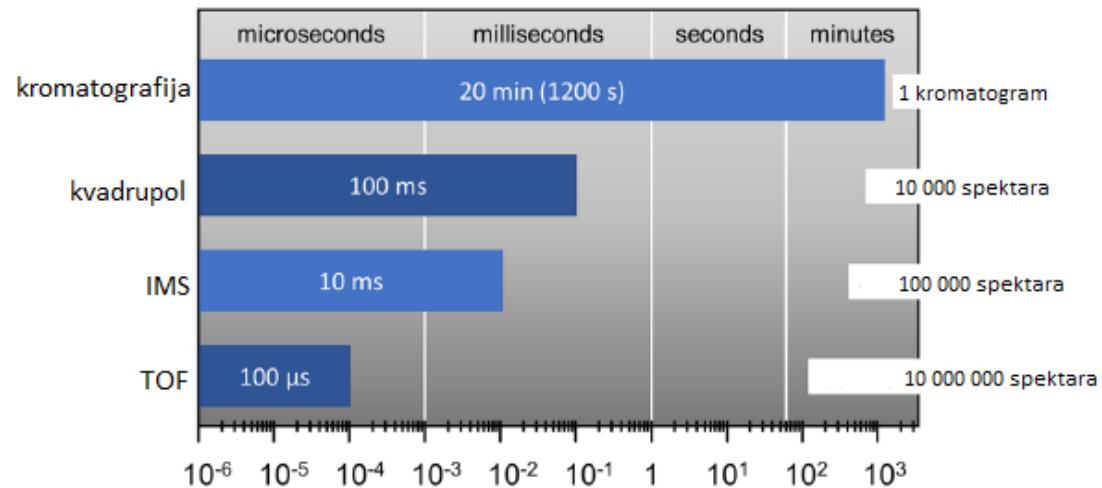
- Platforma FAIMS (engl. *Field asymmetric waveform ion mobility spectrometry*) i platforma DMS (engl. *Differential ion mobility spectrometry*)
- Razlika u geometriji elektroda
- Djelovanje asimetričnog električnog polja (nije moguć izračun vrijednosti sudarnih presjeka)
- Usmjeren protok plina prema detektoru (Slika 4.)
- Upotreba kompenzacijskog napona (engl. *Compensation voltage*)



Slika 4. – Shematski prikaz odjeljivanja iona prema pokretljivosti u sudarnoj ćeliji FAIMS/DMS.<sup>2</sup>

# Instrumentacija (analizatori masa)

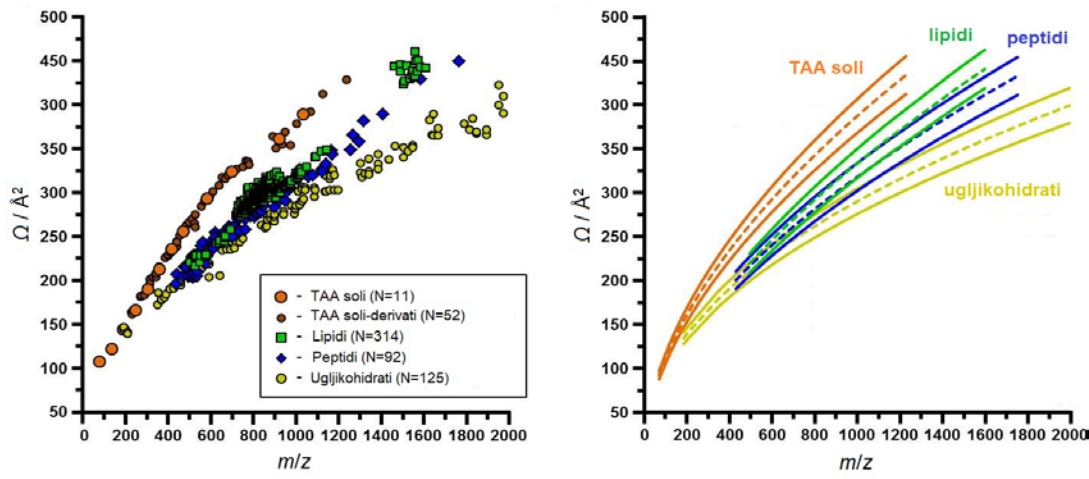
- Najčešće se koriste analizatori masa koji mjere vrijeme leta (engl. *Time of flight*, TOF)
- Kvadrupolni analizator masa kao dodatni filter masa



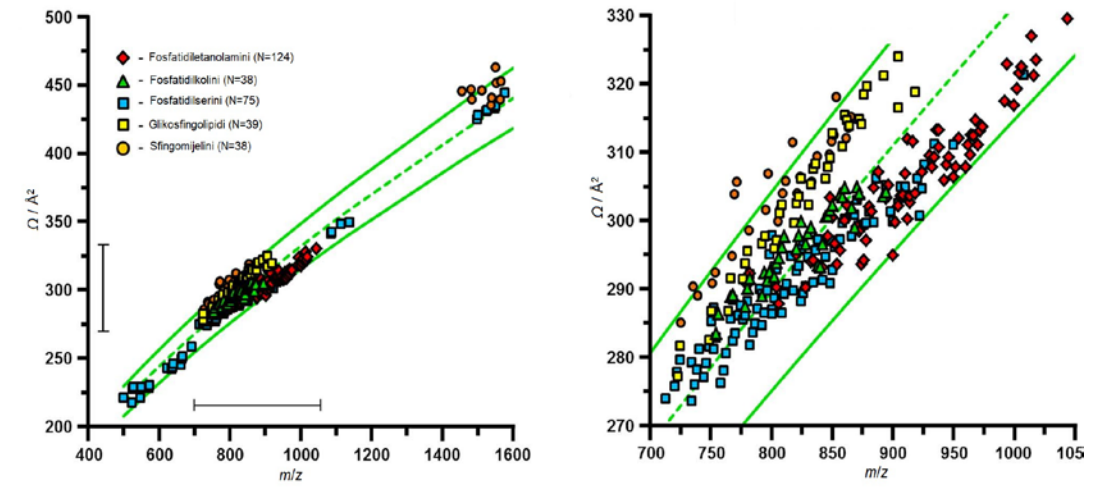
Slika 5. – Vremenski okviri akvizicije podataka za nekoliko dimenzija odjeljivanja i broj potencijalnih spektara nakon njihovog povezivanja.<sup>3</sup>

# Primjena spregnutih sustava IMS-MS

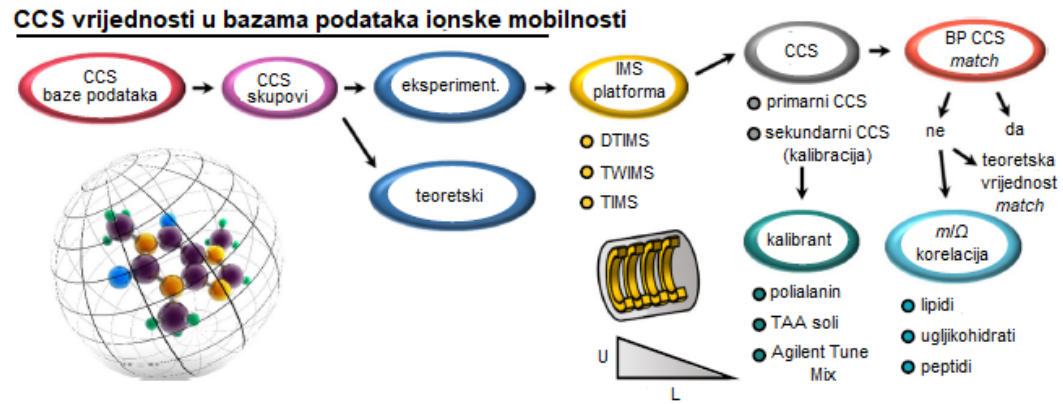
- Analiza bioloških molekula (proteomika, lipidomika, metabolomika, glikomika)
- Rezultati IMS eksperimenata (sudarni presjeci ili reducirane ionske mobilnosti) kao dodatni analitički identifikatori
- Primjena u ciljanoj i neciljanoj analizi
- Regije u IMS-MS konformacijskom prostoru kao rezultat korelacija između masa i ionskih pokretljivosti bioloških molekula (Slika 6., Slika 7.)
- Potreba za standardizacijom protokola za generiranje i interpretaciju rezultata IMS eksperimenata (Slika 8.)



Slika 6. – Grafički prikaz jedinstvenih regija koje zauzimaju skupine bioloških molekula u IMS-MS konformacijskom prostoru.<sup>4</sup>



Slika 7. – Grafički prikaz jedinstvenih regija koje zauzimaju glicerofosfolipidi i sfingolipidi unutar regije lipida u IMS-MS konformacijskom prostoru.<sup>4</sup>



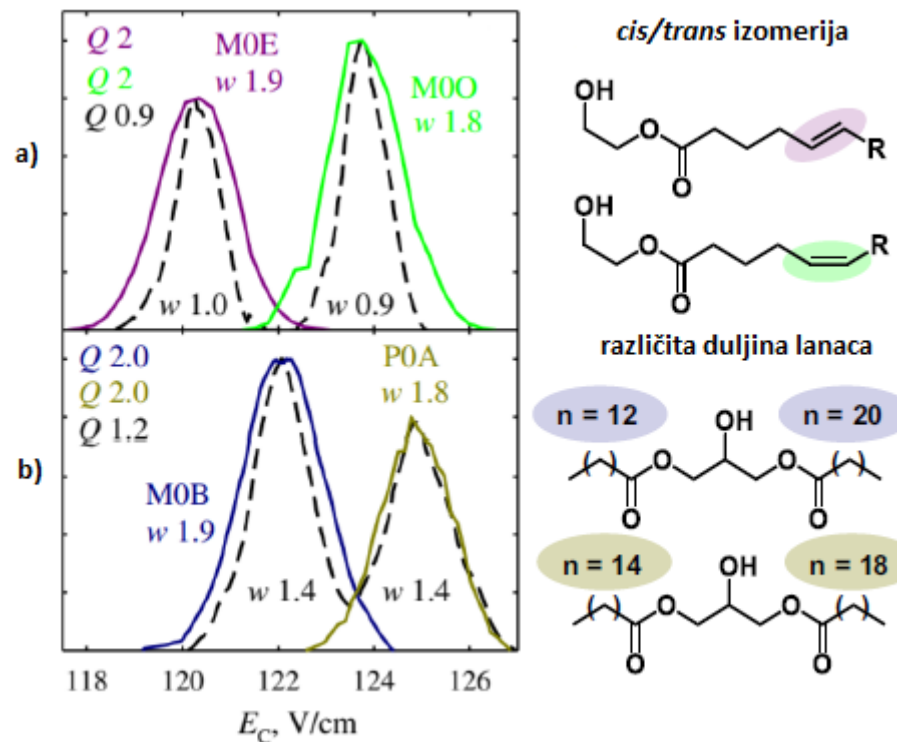
Slika 8. – Shematski prikaz stvaranja protokola za generiranje i interpretaciju vrijednosti sudarnih presjeka (CCS).<sup>5</sup>

- Karakterizacija lipida spektrometrijom masa – zahtjevan postupak
- Postojanje izomernih oblika pridonosi strukturnoj kompleksnosti
- Bowman i sur. uspješno odvojili 75 % od 19 izomernih parova diglicerida, triglicerida i fosfokolina (500 – 900 Da)

Ionski izvor	Sudarna ćelija	Analizator masa
ESI (+)	FAIMS	LIT

MOE : miristinska kiselina (14:0)  
elaidinska kiselina (18:1 [9E])  
MOO : miristinska kiselina (14:0)  
oleinska kiselina (18:1 [9Z])

MOB : miristinska kiselina (14:0)  
behainska kiselina (22:0)  
POA : palmitinska kiselina (16:0)  
arahidinska kiselina (20:0)

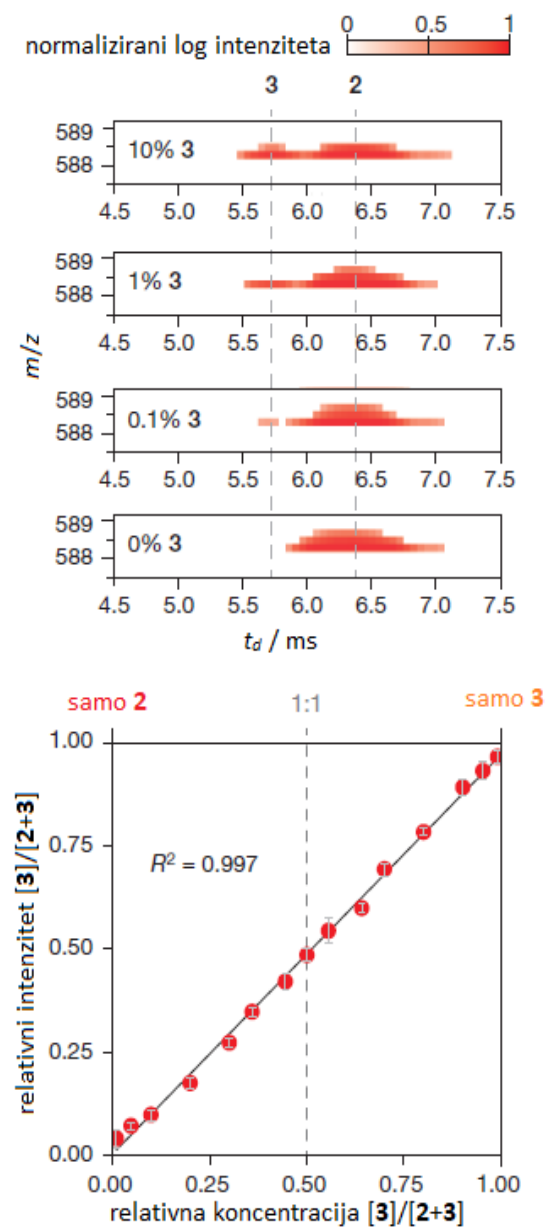
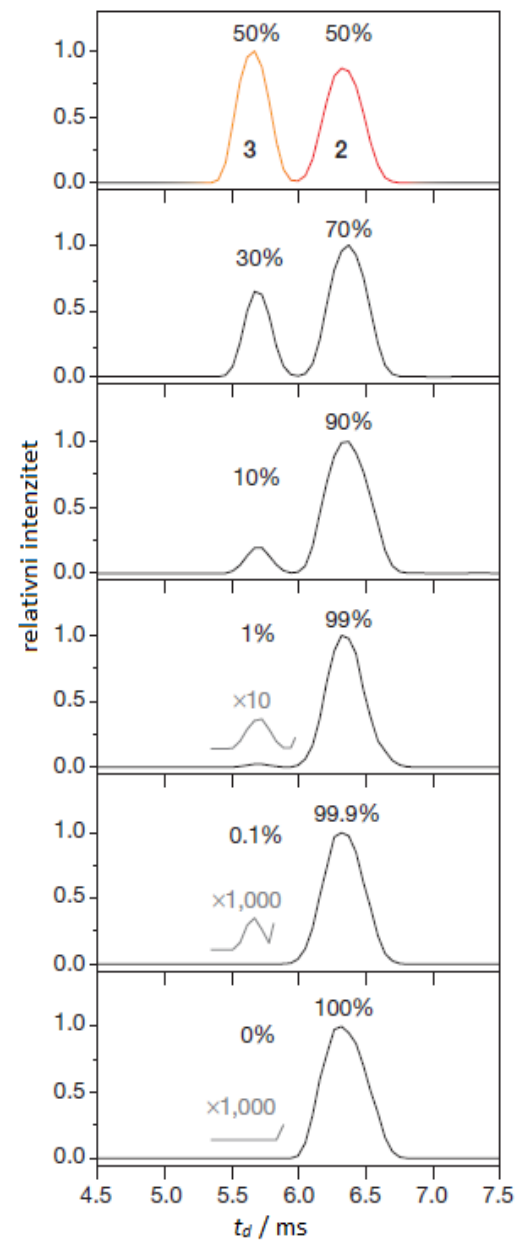
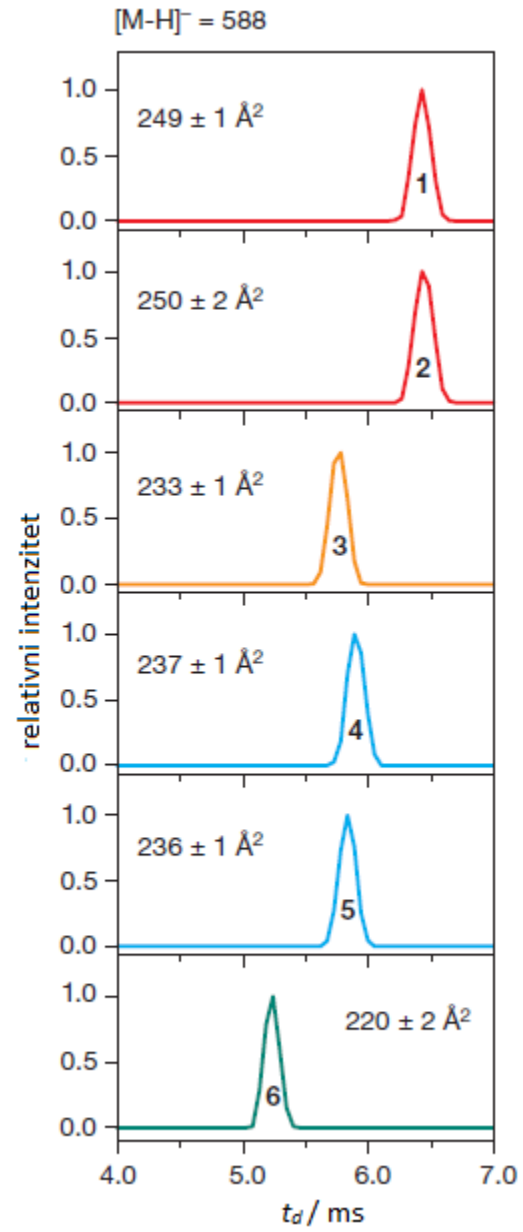
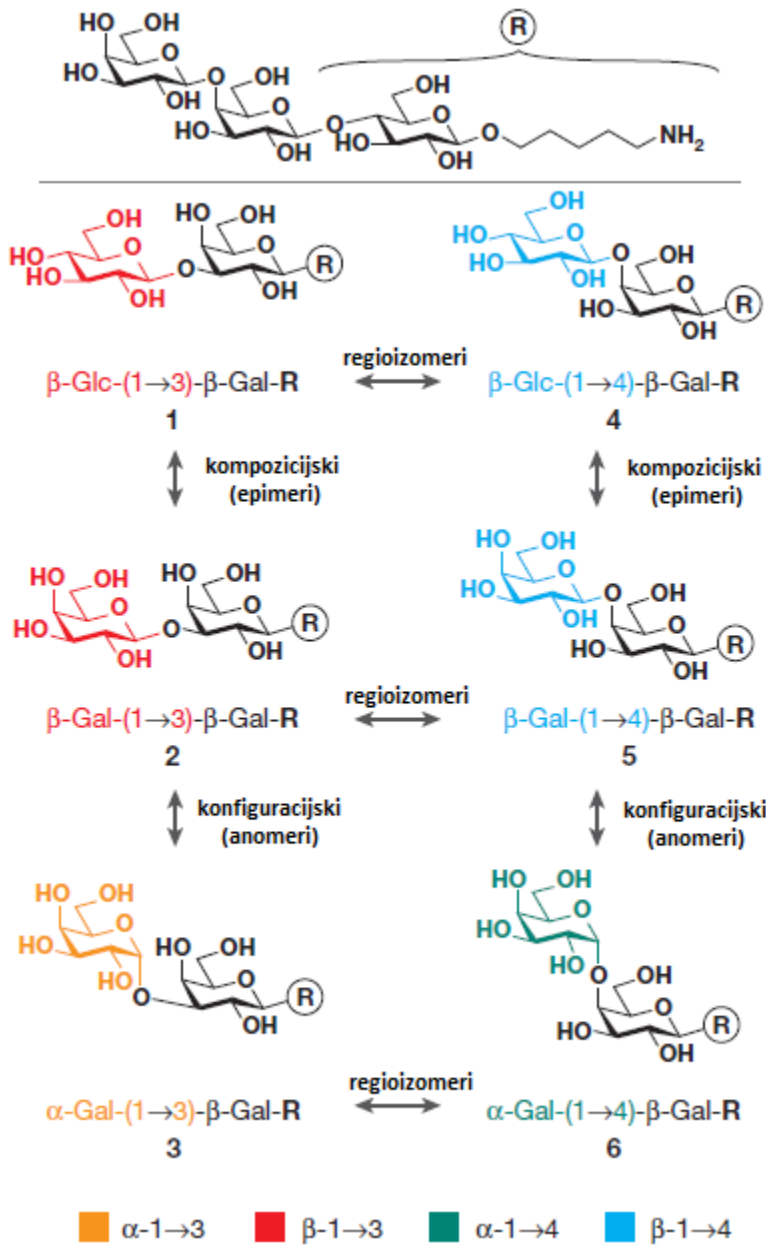


Slika 9. – FAIMS spektri ionske pokretljivosti odjeljivanja dva para izomera lipida.<sup>5</sup>



- Postojanje mnogih izomernih oblika glikana (strukturna raznolikost) – otežana karakterizacija
- Hoffman i sur. demonstrirali upotrebu IMS-MS spregnutih sustava u strukturnoj analizi šest sintetskih izomernih trisaharida (Slika 10.)
- Kompozicijski izomeri (epimeri, galaktopiranoza i glukopiranoza)
- Regioizomeri (1,3- i 1,4- glikozidna veza)
- Konfiguracijski izomeri ( $\alpha$  i  $\beta$  anomeri galaktopiranoze)
- Kvantitativno određivanje izomernih nečistoća; primjena u kontroli kvalitete prilikom sinteze ugljikohidrata (slika 11.)

Ionski izvor	Sudarna ćelija	Analizator masa
ESI (-)	TWIMS	QTOF

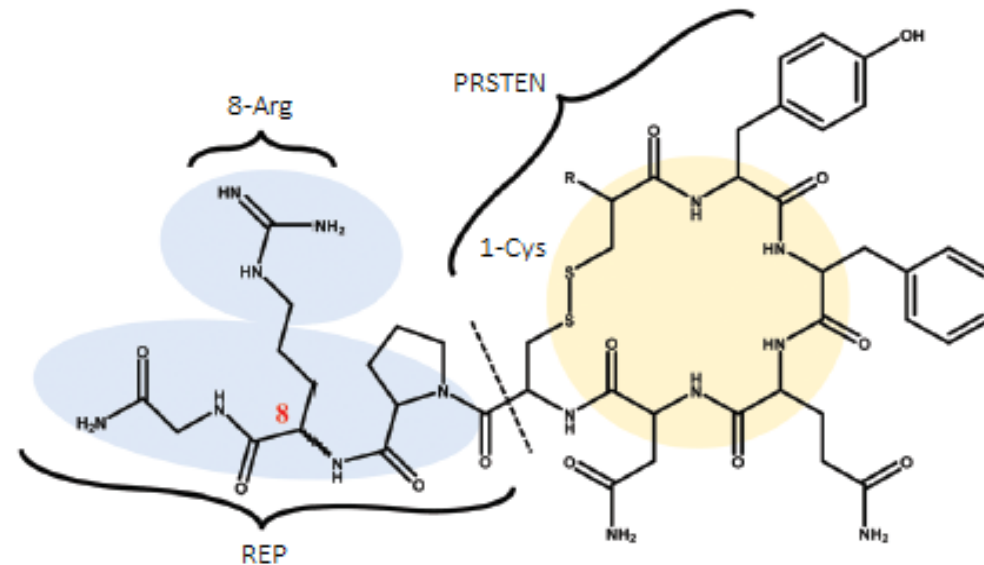


Slika 10. – Strukture i TWIMS spektri ionske pokretljivosti sintetiziranih trisaharida.<sup>6</sup>

Slika 11. – Relativna kvantifikacija anomera 2 i 3 u smjesi.<sup>6</sup>

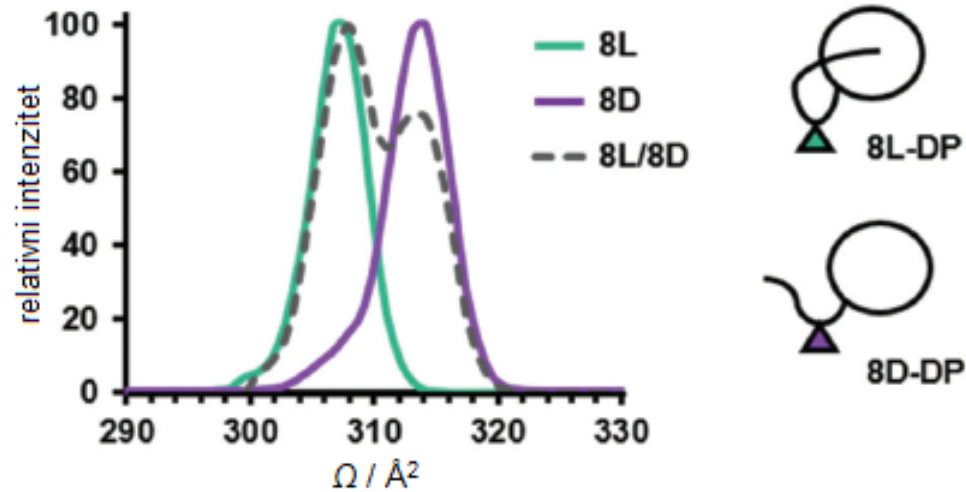
- McLean i sur. demonstrirali upotrebu IMS-MS spregnutih sustava u odjeljivanju diastereoizomera vazopresina i dezmpresina
- Vazopresin – prirodni nonapeptidni hormon; dezmpresin – sintetski derivat (Slika 12.)
- Ukupno četiri nonapeptida: 8L-VP, 8D-VP, 8L-DP, 8D-DP

Ionski izvor	Sudarna ćelija	Analizator masa
ESI (+)	DTIMS	QTOF

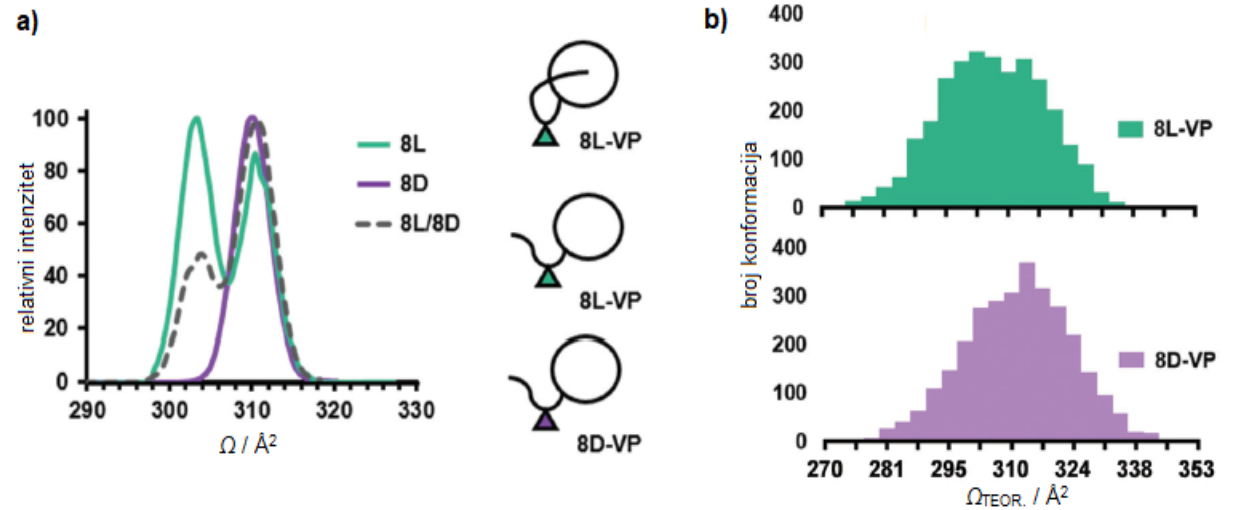


Slika 12. – Strukture vazopresina i dezmpresina.<sup>7</sup>

- 8L-DP (308 Å<sup>2</sup>) – kompaktnija konformacija; 8D-DP (314 Å<sup>2</sup>) – izduženija konformacija (Slika 13.)
- 8L-VP (303 i 310 Å<sup>2</sup>) – kompaktnija i izduženija konformacija; 8D-VP (310 Å<sup>2</sup>) – izduženija konformacija (Slika 14.)



Slika 13. – DTIMS spektri ionske pokretljivosti izomernih oblika dezmopresina.<sup>7</sup>



Slika 14. – DTIMS spektri ionske pokretljivosti izomernih oblika vaspresina te raspodjela broja teoretski dobivenih konformacija po teoretskim vrijednostima sudarnih presjeka.<sup>7</sup>

# 3. ZAKLJUČAK

- IMS daje uvid u strukturu iona analita
- Sprega sa MS povećava analitičku moć (karakterizacija po masi i po veličini)
- Inkorporacija u već postojeće LC/GC-MS sustave i protokole
- IMS kao filter za pojednostavljivanje spektara masa kompleksnih uzoraka - smanjenje pozadinskog šuma (matrica)
- Odvajanje izomernih oblika na temelju razlika u pokretljivostima
- Primjena u ciljanoj i neciljanoj analizi (sudarni presjeci ili reducirane ionske mobilnosti kao dodatni analitički identifikatori)

## 4. LITERATURNI IZVORI

1. E. Kalenius, M. Groessl, K. Rissanen, *Nat. Rev. Chem.* **3** (2019) 4–14.
2. R. A. Meyers (ur.), *Ion Mobility-Mass Spectrometry (Encyclopedia of Analytical Chemistry)*, Wiley, Hoboken, New Jersey, 2019, str 1.
3. J. C. May, J. A. McLean, *Anal. Chem.* **87** (2015) 1422–1436.
4. J. C. May, C. R. Goodwin, N. M. Lareau, K. L. Leaptrot, C. B. Morris, R. T. Kurulugama, A. Mordehai, C. Klein, W. Barry, E. Darland, G. Overney, K. Imatani, G. C. Stafford, J. C. Fjeldsted, J. A. McLean, *Anal. Chem.* **86** (2014) 2107–2116.
5. J. N. Dodds, E. S. Baker, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **30** (2019) 2185–2195.
6. J. Hofmann, H. S. Hahm, P. H. Seeberger, K. Pagel, *Nature* **526** (2015) 241–245.
7. S. T. Phillips, J. N. Dodds, B. M. Ellis, J. C. May, J. A. McLean, *Chem. Commun.* **54** (2018) 9398–9401.