



Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
Kemijski odsjek

David Klarić

**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.

**Kemijski seminar 1**

Poslijediplomski sveučilišni studij Kemija

Zagreb, 2020. godina.

# Sadržaj

<b>§ 1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>§ 2. SPREGNUTI SUSTAV SPEKTROMETRIJA IONSKE POKRETLJIVOSTI-SPEKTROMETRIJA MASA.....</b>	<b>2</b>
<b>2.1. Teorijska osnova spektrometrije ionske pokretljivosti.....</b>	<b>2</b>
<b>2.1.1. Sudarni presjek .....</b>	<b>4</b>
<b>2.2. Instrumentacija .....</b>	<b>6</b>
<b>2.2.1. Ionski izvori.....</b>	<b>7</b>
<b>2.2.2. Sudarne ćelije.....</b>	<b>8</b>
<b>2.2.3. Analizatori masa .....</b>	<b>13</b>
<b>2.3. Primjena spregnutih sustava IMS-MS.....</b>	<b>14</b>
<b>2.3.1. Primjena u analizi izomera bioloških molekula.....</b>	<b>18</b>
<b>§ 3. ZAKLJUČAK .....</b>	<b>27</b>
<b>§ 4. LITERATURNI IZVORI.....</b>	<b>28</b>

## § 1. UVOD

Spektrometrija ionske pokretljivosti (engl. *Ion mobility spectrometry*, IMS) je brza tehnika odjeljivanja čiji je razvoj započeo 60-ih godina 20. stoljeća, iako su njeni temelji postavljeni mnogo ranije kada su Sir Joseph John Thomson i Ernest Rutherford proučavali električnu vodljivost u plinovitim medijima.

Iako se spektrometrija ionske pokretljivosti isprva koristila kao samostalna tehnika za detekciju eksploziva te spojeva koji se koriste kao kemijsko oružje, danas je njena upotreba mnogo šira zahvaljujući mogućnosti povezivanja s nekim drugim tehnikama poput spektrometrije masa (engl. *Mass spectrometry*, MS). Ipak, spektrometrija ionske pokretljivosti se zbog svoje pouzdanosti nastavila koristiti i kao samostalna tehnika za detekciju eksploziva i narkotika u zračnim lukama.

Iako je spektrometrija ionske pokretljivosti sama po sebi izuzetna tehnika odjeljivanja iona u plinskoj fazi, povezivanjem sa spektrometrijom masa znatno se povećava njena analitička moć kao i područje primjene. Danas se spregnuti (vezani) sustav IMS-MS koristi za dobivanje strukturnih informacija o ionima malih molekula te o ionima makromolekula poput proteina, ugljikohidrata, lipida itd. Budući da se odjeljivanje odvija u plinskoj fazi osigurano je kratko trajanje analize što ovu tehniku čini kompatibilnom s tehnikama odjeljivanja u kondenziranoj fazi pa se često odjeljivanja tekućinskom kromatografijom ili kapilarnom elektroforezom provode prije IMS-MS analize. Rutinska upotreba spregnutih sustava IMS-MS kao zasebne analitičke tehnike započinje u posljednjih dvadesetak godina kada prvi komercijalni instrumenti postaju dostupni.<sup>1</sup>

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

Spektrometrija ionske pokretljivosti, ranije poznata i pod nazivima „ionska kromatografija“ te „plazma kromatografija“ je tehnika odjeljivanja iona u plinskoj fazi.<sup>2</sup> Ioni se odjeljuju na temelju njihove pokretljivosti unutar ćelija koje su ispunjene sudarnim plinom (koji je najčešće inertan) pod utjecajem djelovanja električnog polja. Upotrijebljeno električno polje prisiljava ione na gibanje kroz ćeliju pri čemu dolazi do kolizija s neutralnim molekulama plina što rezultira bržim gibanjem manjih i kompaktnijih molekula (manji sudarni presjeci) u usporedbi s većim molekulama koje se gibaju sporije (veći sudarni presjeci).<sup>1</sup>

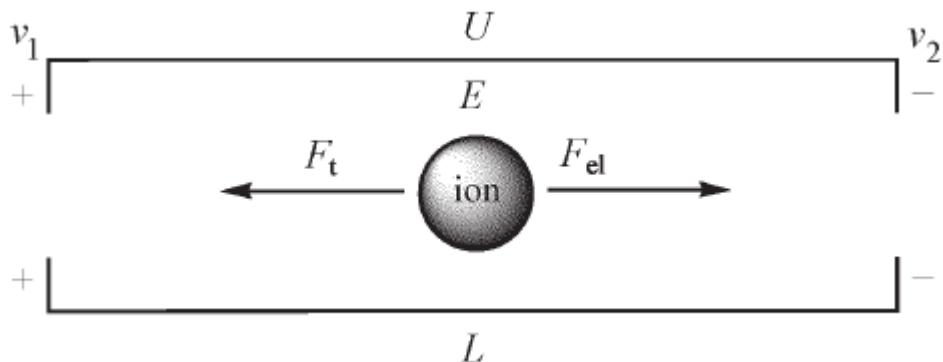
Općenito se spektrometrija ionske pokretljivosti upotrebljava kao dodatna dimenzija odjeljivanja, kao dodatna identifikacijska i karakterizacijska tehnika ili kao tehnika za strukturna određivanja pomoću koje se izvode zaključci o primarnoj ili o strukturama viših redova za neki određen analit. Mjerenja koja se izvode upravo u svrhu identifikacije, karakterizacije ili određivanja strukture svode se na preračunavanje vremena koje ion provodi unutar sudsarne ćelije ( $t_D$ ) u vrijednost sudarnog presjeka promatranog iona ( $\Omega$ ). Ona predstavlja fundamentalnu veličinu analita koja je usporediva između različitih mjerjenja.<sup>3</sup>

### 2.1. Teorijska osnova spektrometrije ionske pokretljivosti

Ioni se unutar ćelije (Slika 1.) nalaze pod utjecajem najčešće slabog i konstantnog električnog polja jakosti:

$$E = \frac{U}{L}$$

pri čemu je  $U$  razlika potencijala, a  $L$  označava duljinu sudsarne ćelije.



Slika 1. – Shematski prikaz djelovanja dvije suprotne sile na ion u sudarnoj ćeliji.<sup>4</sup>

Budući da na ione u ćeliji djeluje i suprotna sila trenja ( $F_t$ ) kao posljedica kolizija iona sa sudarnim plinom, postoji jednoliko gibanje iona u smjeru upotrijebljenog slabog električnog polja brzinom:

$$v_d = K \times E$$

pri čemu je  $K$  konstanta proporcionalnosti koja se naziva pokretljivost iona, a ona ovisi o učestalosti kolizija između iona analita i molekula sudarnog plina. Pokretljivost iona je ovisna o brojnosnoj gustoći plina, a prema tome povezana je s temperaturom i tlakom plina. Kako bi podatci o pokretljivosti iona dobiveni u različitim uvjetima i različitim instrumentima bili usporedivi potrebna je standardizacija pa se uvodi izraz za reduciranu pokretljivost iona ( $\text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$ ):

$$K_0 = K \frac{p T_0}{p_0 T}$$

pri čemu  $p_0$  odgovara tlaku od 101 000 Pa, a  $T_0$  temperaturi od 273,15 K.

Vrijeme koje ioni provedu unutar sudsarne ćelije dano je izrazom:

$$t_d = \frac{L}{v_d} = \frac{L^2 T_0 p}{K_0 p_0 T U}$$

Mnogi instrumenti mjere tzv. dolazno vrijeme ( $t_A$ ) koje je zbroj vremena koje ioni provedu unutar sudsarne ćelije ( $t_d$ ) i vremena izvan ćelije ( $t_0$ ):

$$t_A = t_d + t_0$$

Reducirana pokretljivost iona se pomoću kinetičke teorije povezuje sa sudarnim presjekom promatranog iona  $\Omega$  (engl. *Collision cross-section*, CCS) pomoću Mason-Schamp jednadžbe:

$$K_0 = \frac{3ze}{16N_0} \left( \frac{2\pi}{\mu k_B T} \right)^{1/2} \frac{1}{\Omega}$$

pri čemu  $e$  označava elementarni naboј elektrona/protona,  $z$  naboјni broj,  $N_0$  brojnosnu gustoću sudarnog plina pri tlaku  $p_0$  i temperaturi  $T_0$ ,  $\mu$  reducirani masu iona i sudarnog plina,  $k_B$  Boltzmanovu konstantu, a  $T$  eksperimentalnu temperaturu. Primarni rezultat mjerjenja je pokretljivost iona ( $K$ ), dok je eksperimentalna vrijednost sudarnog presjeka ( $\Omega$ ) izvedena iz tog rezultata Mason-Schamp jednadžbom.<sup>4</sup>

Važno je naglasiti da je Mason-Schamp jednadžba izvedena pod pretpostavkom djelovanja slabog električnog polja. Pokretljivost iona je u najvećoj mjeri konstantna unutar slabog električnog polja koje definira omjer  $E/N$  (reducirana jakost električnog polja) u iznosu od  $\sim 0,1$  do 10 Townsenda (Td). Za monoatomne ione gornja granica  $E/N$  iznosi oko 10 Td, dok za poliatomne ione iznosi oko 4 Td.<sup>2</sup>

### 2.1.1. Sudarni presjek

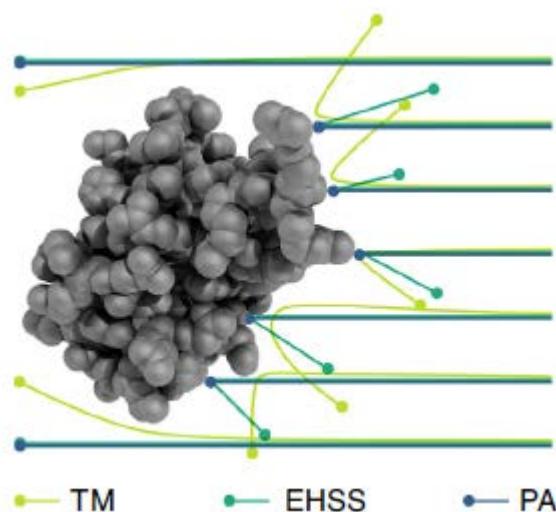
Odjeljivanje iona spektrometrijom ionske pokretljivosti temelji se na razlikama u strukturi (sudarni presjek,  $\Omega$ ) i u naboju ( $z$ ) analiziranih iona.

Ioni kompaktnijih konformacija doživljavaju manji broj kolizija s molekulama sudarnog plina u odnosu na ione otvorenijih (izduženijih) konformacija. Prema tome, kompaktnej ioni s manjim sudarnim presjecima imaju veću pokretljivost u odnosu na ione s otvorenijim konformacijama.<sup>2</sup>

Sudarni presjek ( $\Omega$ ) nije intrinzično svojstvo molekule nekog analita, već predstavlja mjerljivu veličinu koja uprosječuje sve geometrijske orientacije i vrste interakcija unutar eksperimentalnog vremena. Na sudarni presjek utječu doprinosi sudarnog plina i samog eksperimenta spektrometrije ionske pokretljivosti (temperatura, jakost električnog polja, tlak). Zbog toga je empirijska vrijednost sudarnog presjeka specifična za određeni sudarni plin kao i za vrijednosti parametara temperature, jakosti električnog polja i tlaka koji su korišteni

prilikom mjerjenja.<sup>3</sup> Pojednostavljeni, sudarni presjek je normalizirana mjera veličine u plinskoj fazi koja se obično bilježi u kvadratnim angstromima ( $\text{\AA}^2$ ).<sup>1</sup>

Sudarni presjeci mogu biti upotrijebljeni kao identifikatori strukture iona, a dobiveni podatci uspoređeni s onima koji su dobiveni nekim drugim tehnikama poput DOSY nuklearne magnetske rezonancije ili difrakcije rendgenskog zračenja na jediničnom kristalu.<sup>5</sup> Ipak, podatci koji su sadržani unutar sudarnih presjeka nisu dovoljni kako bi jednoznačno definirali strukturu molekule analita. Važnu ulogu u tumačenju IMS podataka ima molekularno modeliranje. Ovim pristupom se prilikom identifikacije nepoznatih analita računa teorijska vrijednost sudarnog presjeka nekog pretpostavljenog kandidata te se ona uspoređuje s eksperimentalno određenom vrijednosti sudarnog presjeka. Razvijeno je nekoliko metoda od kojih većina koristi Monte Carlo računalne algoritme. Neke od ovih metoda su jednostavnije, dok su neke složenije, a međusobne razlike proizlaze iz njihovih ishodišnih pretpostavki (Slika 2.). Najjednostavnijom metodom za računanje sudarnog presjeka se smatra metoda PA (engl. *The projection approximation*, PA). Njome se sudarni presjek računa uprosječivanjem svih mogućih orientacija prilikom rotiranja molekule. Ova metoda u potpunosti ignorira procese raspršenja molekula plina na molekulama analita. Metoda EHSS (engl. *The elastic hard sphere scattering*, EHSS) prilikom računanja sudarnih presjeka uzima u obzir proces raspršenja, no ignorira bilo kakve dalekometne interakcije. Pri računaju sudarnog presjeka ovom metodom uzima se radijvektor svakog atoma u obliku čvrste sfere. Ova metoda se smatra dobrom metodom za izračun sudarnih presjeka za veće molekule. Metoda TM (engl. *The trajectory method*, TM) se smatra pogodnijom metodom za izračun sudarnih presjeka manjih molekula budući da kratkometne interakcije i dugometne interakcije između molekula analita i sudarnog plina promatra eksplisitno pri čemu se radijusi atoma promatraju kao funkcije temperature te interakcijskih potencijala iona i sudarnog plina. Računanje sudarnih presjeka ovom metodom je višestruko dugotrajnije u odnosu na ostale spomenute metode.<sup>4,6</sup>



Slika 2. – Razlike između načina računanja teorijskih vrijednosti sudarnih presjeka korištenjem tri glavne metode.<sup>6</sup>

## 2.2. Instrumentacija

Iako se spektrometrija ionske pokretljivosti (IMS) u svojim počecima razvijala kao zasebna analitička tehnika izuzetnih mogućnosti ubrzo se javila potreba njenog povezivanja sa spektrometrijom masa (MS) kako bi se unutar jednog generiranog spektra dobili podatci o strukturi iona koji inače nisu bili dostupni analizom pomoću ovih tehnika u njihovim zasebnim izvedbama. Rutinska upotreba ovih vezanih sustava započinje 2006. godine nakon što tvrtka Waters Corporation predstavlja Synapt HDMS, prvi komercijalno dostupan IMS-MS instrument. Ubrzo nakon toga 2014. i 2016. godine tvrtke Agilent Technologies i Bruker Corporation predstavljaju svoje IMS-MS instrumente. Općenit način povezivanja ove dvije tehnike prikazan je na Slici 3. Ioni nastali u ionskim izvorima se analiziraju pomoću IMS i MS te naposlijetku detektiraju.



Slika 3. – Općenit način povezivanja spektrometrije ionske pokretljivosti i spektrometrije masa u vezani sustav.

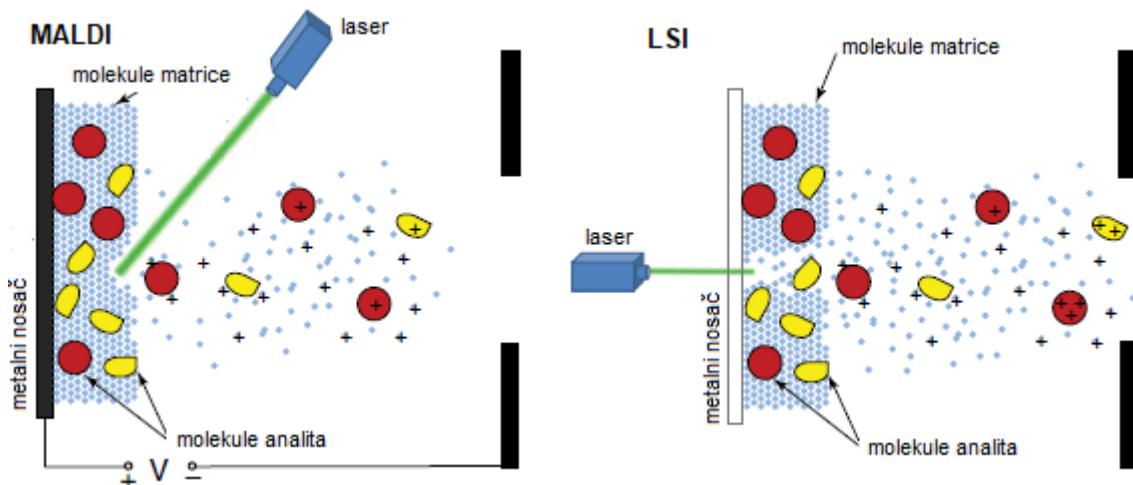
### 2.2.1. Ionski izvori

Prije nego što je analiziran IMS-MS tehnikom, analit mora biti ioniziran i doveden u plinsku fazu. Dvije najčešće ionizacijske tehnike su ionizacija elektroraspršenjem (engl. *Electrospray ionization*, ESI) i matricom potpomognuta ionizacija laserskom desorpcijom (engl. *Matrix assisted laser desorption ionization*, MALDI). Ovakve „blage“ tehnike ionizacije ne narušavaju strukturni integritet molekula analita tijekom ionizacijskog procesa i dovođenja u plinsku fazu.

Ionizacija elektroraspršenjem je najčešće korištena tehnika ionizacije u IMS-MS analizama. Radi se o blagoj i kontinuiranoj tehnici ionizacije koja najčešće generira višestruko nabijene ione. Budući da spektrometri masa mjere omjer mase i naboja iona ( $m/z$ ), činjenica da ESI generira višestruko nabijene ione uvelike proširuje raspon masa analita koje je na ovaj način moguće analizirati. Zbog toga je ova tehnika ionizacije pogodna za analizu proteina i ostalih biomolekula velikih masa, nekih nehlapivih i termolabilnih spojeva kao što su različiti polimeri te malih polarnih molekula.

Matricom potpomognuta ionizacija laserskom desorpcijom je blaga i pulsna tehnika ionizacije koja generira jednostruko nabijene ione. Analit se zajedno s odabranom organskom matricom nanosi na metalni nosač te se na smjesu nakon isparavanja otapala djeluje laserom (Nd:YAG ili CO<sub>2</sub> laser). Budući da se ioni analita generiraju djelovanjem lasera u pulsevima ova ionizacijska tehnika je pogodna za povezivanje s određenim IMS tehnikama kod kojih se paketi iona pulsno injektiraju u sudarne ćelije. Zbog karakterističnog načina pripreme uzorka za potrebe ionizacije MALDI nije pogodan za direktnu analizu tekućih uzorka poput eluata dobivenih tekućinskom kromatografijom.<sup>7,8</sup>

Ionizacija laserskim raspršenjem (engl. *Laserspray ionization*, LSI) je relativno nova ionizacijska tehnika koja pokazuje sličnost s MALDI ionizacijskom tehnikom, a svoju primjenu je također pronašla u IMS-MS analizama. Bitna razlika je da se ovom ionizacijskom tehnikom generiraju višestruko nabijeni ioni. Analit se zajedno s matricom nanosi na nosač na koji se ne primjenjuje nikakav napon, a laserska zraka potrebna za ionizaciju se transmitira kroz nosač što također čini razliku u odnosu na MALDI ionizacijsku tehniku (Slika 4.).<sup>8</sup>



Slika 4. – Shematski prikaz mehanizma rada MALDI i LSI ionizacijskih tehnika.<sup>8</sup>

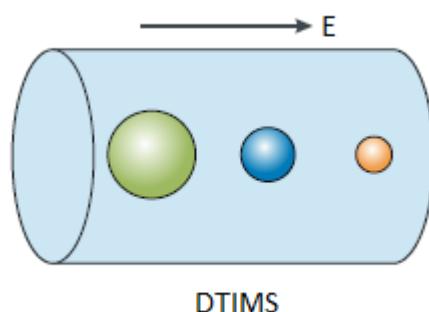
### 2.2.2. Sudarne ćelije

Sudarne ćelije (engl. *Drift tube*) postoje u svim veličinama i oblicima. One su ispunjene molekulama sudarnog plina s kojima ioni analita kolidiraju prilikom gibanja koje je uzrokovano utjecajem električnog polja. Najčešće korišteni sudarni plinovi su dušik i helij na koje otpada 95 % do 2015. prijavljenih vrijednosti sudarnih presjeka, a u manjoj mjeri se koriste argon, ugljikov dioksid, kisik itd.<sup>3</sup> Svaka IMS instrumentalna platforma, a samim time i vrsta sudarne ćelije, spada u jedan od tri koncepata odjeljivanja iona prema njihovoj pokretljivosti:

1. vremenski-disperzivno odjeljivanje
2. prostorno-disperzivno odjeljivanje
3. odjeljivanje koje se temelji ograničavanju iona i selektivnom otpuštanju<sup>9</sup>

Koncept vremenski-disperzivnog odjeljivanja temelji se na mjerenu vremenu koje je potrebno nekom pulsu (paketu) iona koji se aksijalno giba kroz električno polje sudarne ćelije za dolazak do detektora. Jedna od klasičnih izvedbi IMS instrumentalnih platformi koja koristi spomenuti koncept odjeljivanja iona je platforma DTIMS (engl. *Drift tube ion mobility spectrometry*, DTIMS). Unutrašnjost sudarnih ćelija DTIMS čini stog jednakog udaljenih prstenastih elektroda (Slika 5.). Kako bi se odijelili prema pokretljivosti u sudaru ćeliju se injektira paket iona na koje djeluje slabo i uniformno električno polje (konstantan gradijent napona). Ioni analita koji se kreću prema detektoru kolidiraju s molekulama sudarnog plina pri čemu plin nema usmjeren protok. Činjenica da na ione djeluje uniformno električno polje

omogućuje direktno povezivanje mjerenog vremena koje ion provede u sudarnoj ćeliji ( $t_d$ ), a samim time i ionske pokretljivosti ( $K$ ) sa sudarnim presjekom ( $\Omega$ ) putem kinetičke teorije plinova (Mason-Schamp jednadžba). Mogućnost računanja vrijednosti sudarnih presjeka je najveća prednost platforme DTIMS u odnosu na ostale IMS platforme. Sve ostale IMS platforme zahtijevaju korištenje standarda za kalibraciju koje čine ioni točno određenih vrijednosti sudarnih presjeka koje su prethodno dobivene mjerjenjima pomoću instrumentalnih platformi DTIMS.<sup>1,5,7-9</sup>

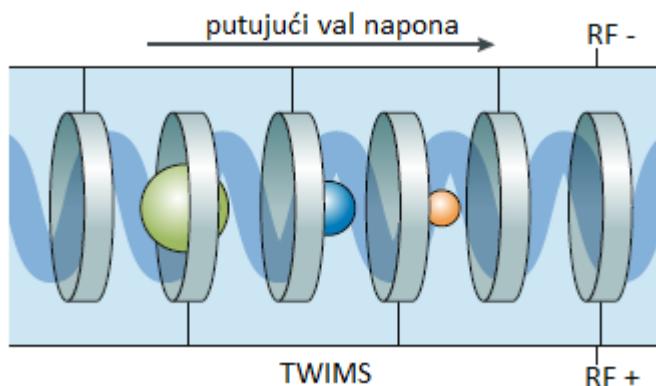


Slika 5. – Shematski prikaz odjeljivanja iona prema pokretljivosti u sudarnoj ćeliji DTIMS.<sup>5</sup>

Budući da se ioni u sudarnu ćeliju injektiraju pulsno (u paketima) ukupna osjetljivost je smanjena pa se tako samo 0,1 – 1 % iona generiranih u ionskom izvoru šalje u IMS sudarnu ćeliju.<sup>8</sup> Gubitak iona moguće je smanjiti upotrebom ionskih stupica (engl. *Ion trap*) na ulazu u sudarnu ćeliju kao i injektiranjem više paketa iona pri točno definiranim vremenima dok prethodno injektirani paket još uvijek biva analiziran u sudarnoj ćeliji.<sup>1,2</sup>

Drugi primjer IMS instrumentalne platforme koja koristi koncept vremenski-disperzivnog odjeljivanja jest platforma TWIMS (engl. *Traveling wave ion mobility spectrometry*, TWIMS). Slično kao i u prethodnom slučaju, sudarne ćelije ovih instrumenata čini stog prstenastih elektroda pri čemu se na susjedne elektrode primjenjuje radiofrekventni napon suprotnih faza kako bi se ioni fokusirali kroz središte ćelije i kako bi se spriječila njihova neutralizacija na stijenkama elektroda (Slika 6.). Na elektrode se uzastopno primjenjuje i istosmjerni napon koji uzrokuje aksijalno gibanje iona duž sudarne ćelije. Upotrebom istosmjernog napona na jedan set elektroda stvara se barijera koju ioni ne mogu prijeći sve dok se upotreba napona ne prebaci na idući set elektroda čime se ta barijera pomiče prema naprijed. Na ovaj način nastaju putujući valovi napona pri čemu pokretljiviji ioni brzo

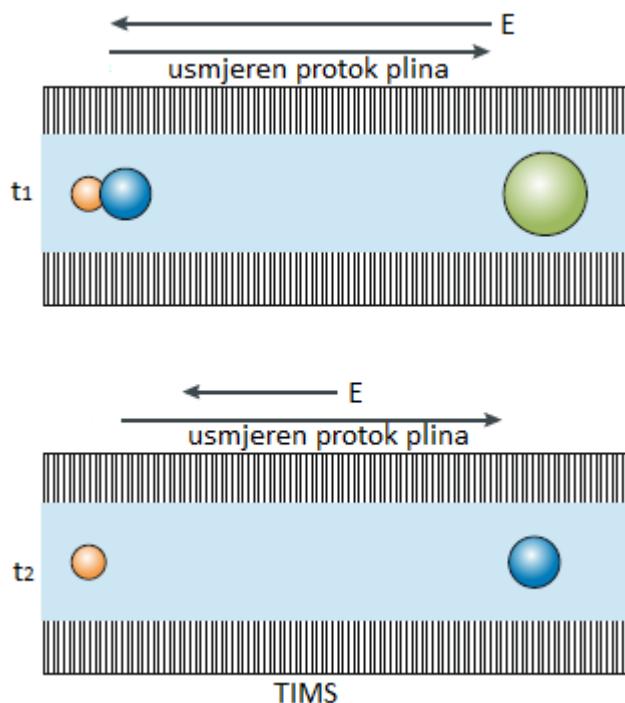
prolaze kroz ćeliju „surfajući“ na valu, a manje pokretljivi ioni zahtijevaju više valova kako bi dosegli kraj sudsarne ćelije. Kako se napon kojim se djeluje na ione konstantno mijenja (a samim time i jakost električnog polja oscilira) Mason-Schamp jednadžba ne vrijedi u slučaju platformi TWIMS. Kako bi eksperimenti provedeni pomoću instrumentalnih platformi DTIMS i TWIMS bili međusobno usporedivi, platforme TWIMS zahtijevaju kalibraciju standardima u kojima se nalaze ioni točno određenih vrijednosti sudsarnih presjeka i koji sa analitom imaju što sličnija fizikalna svojstva (poput mase, naboja, ion-dipol interakcija sa sudsarnim plinom).<sup>1,2,5,8</sup>



Slika 6. – Shematski prikaz odjeljivanja iona prema pokretljivosti u sudsarnoj ćeliji TWIMS.<sup>5</sup>

Instrumentalne platforme koje koriste koncept odjeljivanja koje se temelji na ograničavanju iona i selektivnom otpuštanju su relativno moderne. Ioni se zarobljavaju u stlačenom prostoru upotrebom radiofrekventnog napona i nakon toga selektivno otpuštaju na temelju razlika u njihovoj pokretljivosti. Ovakav princip je sličan konceptu selektivnog izbacivanja iona na temelju masa iz ionskih stupica spektrometara masa. Ovaj koncept odjeljivanja iona koriste instrumentalne platforme TIMS (engl. *Trapped ion mobility spectrometry*, TIMS). Ovakve platforme se sastoje od skupa prstenastih elektroda koje se dijele na tri regije: ulazni dio, analizator ionske pokretljivosti i izlazni dio. Ulagani i izlazni dio kontroliraju skretanje iona i njihovo fokusiranje dok analizator služi za akumulaciju i izbacivanje iona od interesa. Kod ovih instrumentalnih platformi sudsarni plin ima usmjeren protok i to prema detektoru što je velika razlika u usporedbi s dvije prethodno opisane IMS instrumentalne platforme. Gibanje iona prema detektoru je uzrokovan protokom sudsarnog plina dok na njih djeluje električno polje u suprotnom smjeru (Slika 7.). Na ovaj način ioni napreduju do pozicije u kojima su ove dvije suprotne sile u ravnoteži. Smanjivanjem jakosti

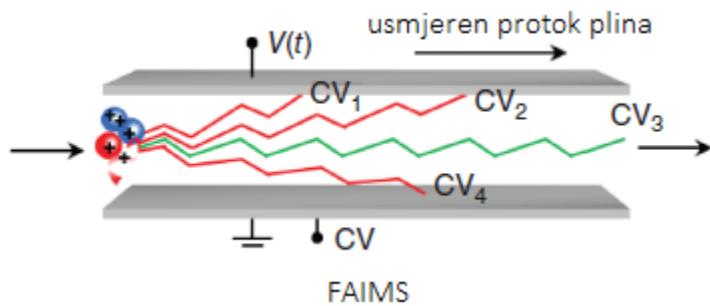
električnog polja usmjereni protok plina izbacuje ione specifičnih pokretljivosti iz analizatora prema detektoru (spektrometru masa). Budući da električno polje djeluje tako da ograničava gibanje iona, a ne usmjeravajući ga kao kod prethodno opisanih IMS platformi, u platformama TIMS se prvo izbacuju ioni većih sudarnih presjeka, a nakon toga ioni manjih sudarnih presjeka. Korištenjem platformi DTIMS i TWIMS moguće je promatrati sve ione korištenjem jednakih eksperimentalnih uvjeta. U slučaju platformi TIMS provode se skeniranja jer se zahtjeva promjena eksperimentalnih uvjeta kako bi se promatrali svi ioni. Zbog ovog je svojstva platforma TIMS visoko selektivna (velika moć razlučivanja). Ove instrumentalne platforme baš kao i platforme TWIMS zahtijevaju kalibraciju standardima poznatih ionskih pokretljivosti. Prednost ovakvih instrumentalnih platformi je njihova kompaktnost (5 – 10 cm).<sup>1,5,9,10</sup>



Slika 7. – Shematski prikaz odjeljivanja iona prema pokretljivosti u sudarnoj ćeliji TIMS.<sup>5</sup>

Primjer instrumentalnih platformi koje koriste koncept prostorno-disperzivnog odjeljivanja iona su FAIMS (engl. *Field assymetric waveform ion mobility spectrometry*) tj. DMS (engl. *Differential ion mobility spectrometry*) pri čemu se sudearne ćelije ove dvije platforme razlikuju samo u geometriji svojih elektroda (cilindrične odnosno planarne). Radi se o izuzetno malim sudsarim ćelijama koje zauzimaju površinu od svega nekoliko kvadratnih

centimetara. U njima djeluje asimetrično električno polje, a tok sudarnog plina je usmjeren aksijalno prema izlazu iz čelije (paralelno gibanju iona). Kako se ioni gibaju kroz čeliju na njih u jednom određenom duljem periodu djeluje slabo električno polje koje usmjerava ione ka jednoj od elektroda nakon čega se upotrebljava jače električno polje koje usmjerava ione ka suprotnoj elektrodi. Istovremeno se na elektrode upotrebljava istosmjerni tzv. kompenzacijski napon (engl. *Compensation voltage*, CV) koji usmjerava ione ka središnjem dijelu sudarne čelije i omogućuje im izlazak iz nje bez neutralizacije na stijenkama elektroda. Pri danoj vrijednosti kompenzacijskog napona samo ioni specifične pokretljivosti uspijevaju izaći iz sudarne čelije (Slika 8.). Skeniranjem kroz kompenzacijске napone moguće je odijeliti ione prema njihovoј pokretljivosti i dobiti cjeloviti spektar ionske pokretljivosti. Ovakav filterski način rada sudarnih čelija FAIMS/DMS je analogan kvadrupolnim analizatorima masa u spektrometrima masa. Ioni se u analizatore ionske pokretljivosti FAIMS/DMS injektiraju kontinuirano, a ne pulsno kao u slučaju platformi DTIMS, TWIMS i TIMS. Izračun vrijednosti sudarnih presjeka zbog upotrebe asimetričnog električnog polja u ovim sudarnim čelijama nije moguć. Upotreba sudarnih čelija FAIMS/DMS omogućuje postizanje visokih stupnjeva selektivnosti za razliku od onih sudarnih čelija u kojima se upotrebljavaju slaba električna polja.<sup>1,2,8</sup>



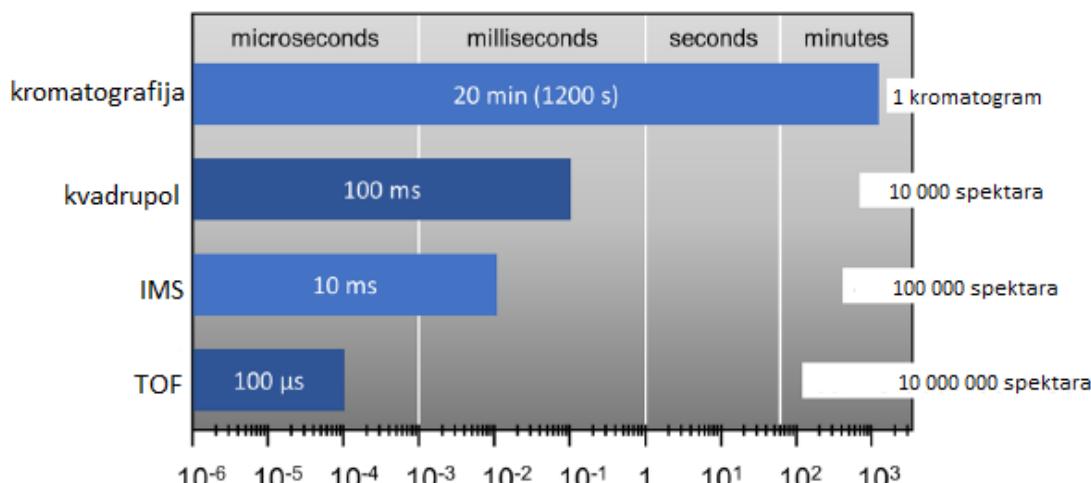
Slika 8. – Shematski prikaz odjeljivanja iona prema pokretljivosti u sudarnoj čeliji FAIMS/DMS.<sup>8</sup>

Do 2015. godine većina vrijednosti sudarnih presjeka dobivena je korištenjem instrumentalnih platformi DTIMS (87 %) i TWIMS (9 %), dok su u manjoj mjeri korištene ostale instrumentalne platforme (4 %). Budući da DTIMS još uvijek daje najveću preciznost prilikom mjerenja sudarnih presjeka te da je zbog direktnе veze između vrijednosti vremena provedenog u sudarnoj čeliji i vrijednosti sudarnog presjeka moguće određivati CCS

vrijednosti analita iz kompleksnih bioloških uzoraka, nije začuđujuće da su se upravo instrumentalne platforme DTIMS koristile u najvećoj mjeri.<sup>3</sup> U ovom seminarskom radu obrađene su IMS instrumentalne platforme koje se trenutno koriste u komercijalno dostupnim IMS-MS instrumentima proizvođača Agilent Technologies (DTIMS), Waters Corporation (TWIMS), Bruker Corporation (TIMS), Tofwerk (DTIMS) i Thermo Fisher Scientific (FAIMS).

### 2.2.3. Analizatori masa

Spektrometrija masa se rutinski upotrebljava nakon odjeljivanja spektrometrijom ionske pokretljivosti kako bi se odredile mase iona koji su prethodno odijeljeni na temelju njihovih pokretljivosti. Na Slici 9. prikazana je mogućnost sprezanja nekoliko dimenzija odjeljivanja čija se vremena akvizicije podataka razlikuju za jedan ili više redova veličine.



Slika 9. – Vremenski okviri akvizicije podataka za nekoliko dimenzija odjeljivanja i broj potencijalnih spektara nakon njihovog povezivanja.<sup>9</sup>

Instrumentalne platforme spektrometrije ionske pokretljivosti se najčešće povezuju s analizatorima masa koji mjere vrijeme leta (engl. *Time of flight*, TOF) u spregnute sustave zbog vremenskih okvira u kojima se generiraju podatci kod ova dva instrumenta. Dok spektrometrija ionske pokretljivosti generira spektre unutar nekoliko milisekundi, TOF generira spektre masa unutar stotinu mikrosekundi što znači da je unutar jednog IMS pulsa moguće generirati nekoliko stotina ili pak tisuća spektara masa. Kvadrupolni analizator masa

se često koristi kao dodatni filter masa u IMS-MS instrumentima. Ukoliko se nalazi prije sudarne ćelije može biti iskorišten za odabir iona prema masi prije odjeljivanja spektrometrijom ionske pokretljivosti. Ukoliko se kvadrupol nalazi nakon sudarne ćelije (QTOF konfiguracija) moguće je izolirati ione uskog raspona  $m/z$  vrijednosti prije fragmentacije (MS/MS eksperimenti). Isto tako je moguće fragmentirati sve ione koji napuštaju sudarnu ćeliju. Budući da se takva fragmentacija događa nakon odjeljivanja spektrometrijom ionske pokretljivosti fragmentni ioni mogu biti asignirani svojim prekursorskim ionima na temelju identičnih ionskih pokretljivosti. Iako se kod komercijalnih IMS-MS instrumenata najčešće susrećemo s TOF analizatorom masa (Agilent Technologies, Bruker Corporation, Waters Corporation, Tofwerk) postoje i instrumenti kod kojih se susrećemo s trostrukim kvadrupolnim analizatorom masa (QqQ), linearnom ionskom stupicom (engl. *Linear ion trap*, LIT) ili elektrostatskom ionskom stupicom tj. Orbitrap analizatorom masa (Thermo Fisher Scientific).<sup>2,5,7,8</sup>

### 2.3. Primjena spregnutih sustava IMS-MS

Uloga spregnutog sustava spektrometrija ionske pokretljivosti-spektrometrija masa u analizi bioloških molekula je u konstantnom porastu. Kompatibilnost spektrometrije ionske pokretljivosti s različitim kromatografskim tehnikama, tehnikama ionizacije analita, fragmentacijskim metodama i analizatorima masa čini ovu tehniku svestranim i moćnim alatom koji se primjenjuje u proteomici, lipidomici, metabolomici i glikomici gdje se zahtijeva velika osjetljivost analize kao i pouzdanost identifikacije analita. Upravo se iz tih razloga spektrometrija ionske pokretljivosti sve češće implementira u MS metode za ciljane i neciljane analize.

Kompleksna priroda uzoraka u proteomici zahtijeva višedimenzijska odjeljivanja prije analize spektrometrijom masa kako bi se osigurala potpuna pokrivenost analiziranog proteoma. Spektrometrija ionske pokretljivosti ima mogućnost otkrivanja kemijskih vrsta koje zbog svog niskog udjela u uzorku ne bi bile detektirane u MS spektrima. Spektri ionske pokretljivosti mogu biti iskorišteni zajedno s kromatografskim vremenima zadržavanja za mapiranje peptida u višedimenzijskom prostoru. Proteini sličnih ili jednakih masa poput proteinskih konformera mogu biti odvojeni pomoću IMS zbog razlika u strukturama koje zadobivaju u plinskoj fazi. Spregnuti sustavi IMS-MS se sve više koriste u metodama analize proteina „odozgor nadolje“ (engl. *Top-down*) i „odozdol nagore“ (engl. *Bottom-up*). Stalni

razvoj ionizacijskih tehnika je omogućio upotrebu ovih sustava u analizi intaktnih proteina i njihovih kompleksa budući da je moguće očuvati slabe interakcije smotanih proteina i nekovalentnih kompleksa.<sup>7,8</sup>

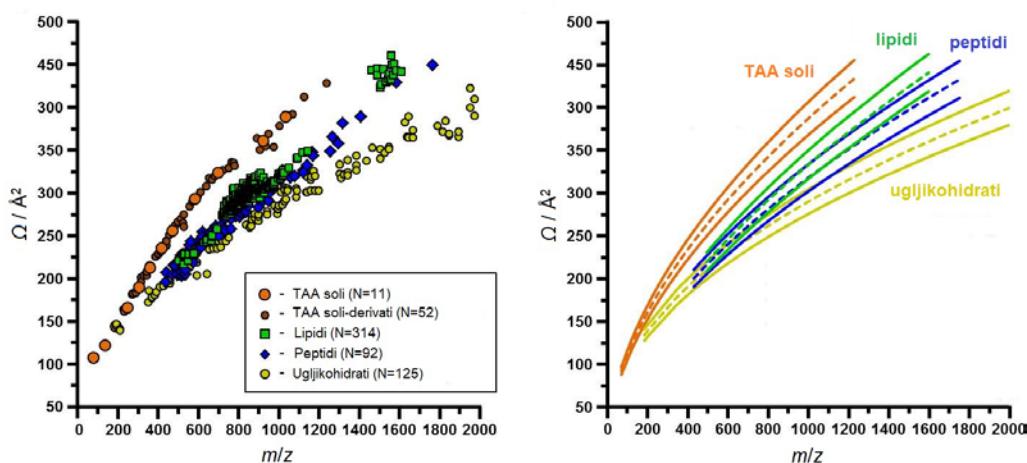
Analiza glikana (složenih ugljikohidrata) spektrometrijom masa je zahtjevan poduhvat jer je mogućnost postojanja izomernih oblika veoma velika. Izomeri ugljikohidrata se razlikuju prema svojoj primarnoj strukturi, poziciji hidroksilnih skupina, stereokemiji, vrsti glikozidne veze između građevnih jedinica itd. Iako se glikani prije MS analize odjeljuju tehnikama poput tekućinske ili plinske kromatografije te kapilarne eleketroforeze, zbog njihove strukturne sličnosti to ponekad ne daje dovoljno dobre rezultate. Upotreboru spektrometrije ionske pokretljivosti kao dodatne tehnike analiti se odjeljuju na temelju njihove veličine što uvelike pomaže pri analizi kompleksnih smjesa ugljikohidrata. U budućnosti je potrebno oformiti prikladne baze podataka koje bi sadržavale dragocjene informacije o sudarnim presjecima ugljikohidrata budući da se IMS-MS sve češće koristi u glikomici.<sup>8</sup>

Baš kao i ugljikohidrati, lipidi mogu postojati u izomernim oblicima ovisno o tome razlikuju li se prema primarnoj strukturi, duljini acilnih lanaca, poziciji acilnih lanaca, poziciji dvostrukih veza, *cis-trans* konfiguraciji na poziciji dvostrukе veze ili prema stereokemiji. Spregnuti sustavi IMS-MS omogućuju identifikaciju podskupina lipida (glicerofosfolipidi, sfingolipidi itd.), strukturnu analizu kompleksnih lipidnih uzoraka (npr. stanične membrane) te razlikovanje izomernih oblika lipida. Identifikacija lipida spektrometrijom masa zahtijeva snimanje spektara visoke rezolucije kao i eksperimente tandemne spektrometrije masa kako bi se dobio uvid u karakteristične načine fragmentacije. U slučajevima gdje se eksperimenti tandemne spektrometrije masa upotrebljavaju za identifikaciju lipida moguće je spektrometrijom ionske pokretljivosti povezati fragmentacijske spekture s prekursorskim ionima čime se postiže veća sigurnost prilikom identifikacije lipida. Za očekivati je skoru upotrebu informacija o sudarnim presjecima kao potencijalnih identifikatora u lipidomici.<sup>7,8</sup>

Metabolomika obuhvaća analizu širokog spektra bioloških molekula (ugljikohidrati, lipidi, hormoni, aminokiseline itd.) koje se uvelike razlikuju po svojim kemijskim svojstvima (polarnost, topljivost itd.). Dva su pristupa analize spektrometrijom masa u metabolomici: ciljana analiza (odabire se uzak spektar metabolita koji se kvantitativno određuju) te neciljana analiza koja zbog svog opsega može biti izuzetno komplikirana (analiziraju se svi analiti prisutni u uzorku). Za jednu  $m/z$  vrijednost koja je dobivena neciljanom analizom ponekad

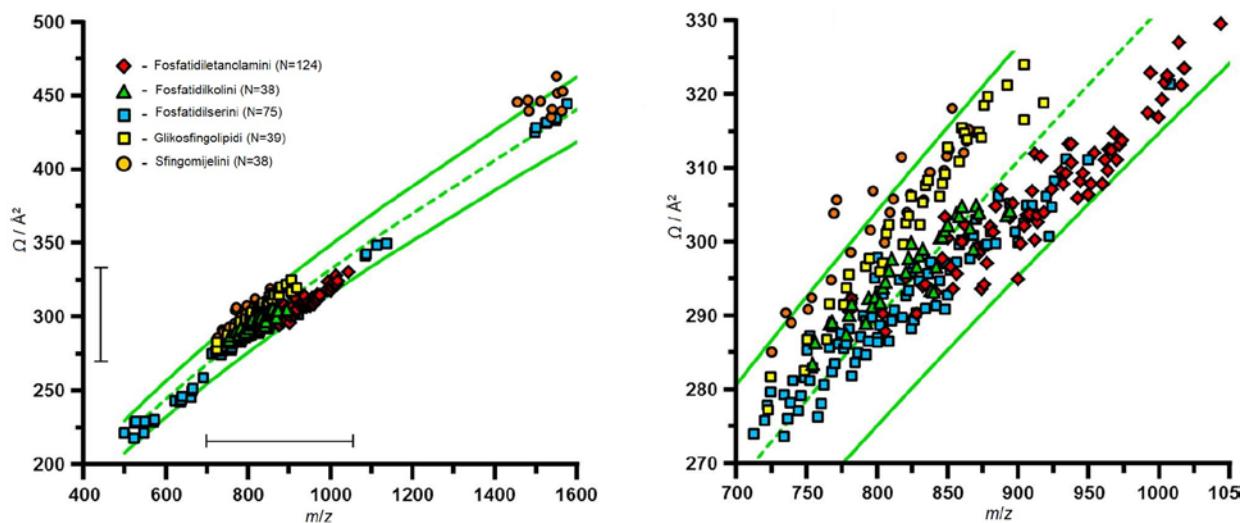
postoji nekoliko stotina potencijalnih kandidata u bazama podataka što znatno otežava identifikaciju. Budući da se u analizu unosi sudarni presjek kao dodatna veličina (identifikator) koja opisuje analit, IMS može pomoći u pouzdanijoj identifikaciji. U posljednje se vrijeme ulažu veliki napor i za stvaranje baza podataka s informacijama o sudarnim presjecima koje bi se koristile za brzu i pouzdanu kvalitativnu i kvantitativnu identifikaciju analita. One između ostalog uključuju i informacije o pesticidima, zagađivačima, ksenobioticima itd. Baš kao i u lipidomici IMS može pomoći pri povezivanju i identifikaciji fragmentacijskih puteva i prekursorskih iona u sklopu eksperimenata tandemne spektrometrije masa (ioni fragmenata i prekursorski ioni dijele jednaka  $t_d$  vremena). Takvi se podatci prilikom identifikacije mogu iskoristiti zajedno sa spektrima masa visoke rezolucije pri povezivanju nepoznatog analita s potencijalnim kandidatom u bazi podataka.<sup>7,8</sup>

Analiti se u neciljanoj analizi određuju pomoću nekoliko analitičkih identifikatora koji uključuju spekture masa visoke rezolucije, analizu izotopnih omjera, karakteristične fragmentacijske puteve itd. Ponekad se ovakvi identifikatori mogu podudarati kao što je često slučaj kod izomernih oblika. Informacije koje proizlaze iz IMS eksperimenata (sudarni presjeci ili reducirane pokretljivosti iona) mogu se iskoristiti kao dodatni analitički identifikatori ukoliko takve informacije već od ranije postoje u oformljenim bazama podataka koje su dobivene analizom standarda.<sup>1</sup> Međutim, baze podataka s informacijama o  $m/z$  vrijednostima i sudarnim presjecima često ne sadrže podatke za nepoznate analite. U ovakvim slučajevima moguće je utvrditi kojoj biološkoj skupini molekula nepoznati analit pripada prema dvodimenzijskim IMS-MS spektrima koji su generirani ekstrapoliranjem na osnovu ranije izmjerениh  $m/z$  i CCS vrijednosti. Primjer su dali Mclean i suradnici koji su predstavili bazu podataka 594 eksperimentalno određenih CCS vrijednosti kvartarnih amonijevih soli, lipida, peptida i ugljikohidrata. Spomenute tetraalkil amonijeve soli se inače koriste kao kalibranti u IMS-MS mjerjenjima jer nemaju tendenciju formiranja klastera. Primjećeno je da postoje korelacije između masa i ionskih pokretljivosti analita koji pripadaju istoj skupini bioloških molekula kao rezultat sličnosti u konformacijama koje zadobivaju u plinskoj fazi. Analiti koji pripadaju istoj skupini bioloških molekula tvore regije u IMS-MS konformacijskom prostoru (Slika 10.). Utvrđeno je da ugljikohidrati imaju najniže CCS vrijednosti s obzirom na  $m/z$  (najkompaktnije pakiranje u plinskoj fazi).



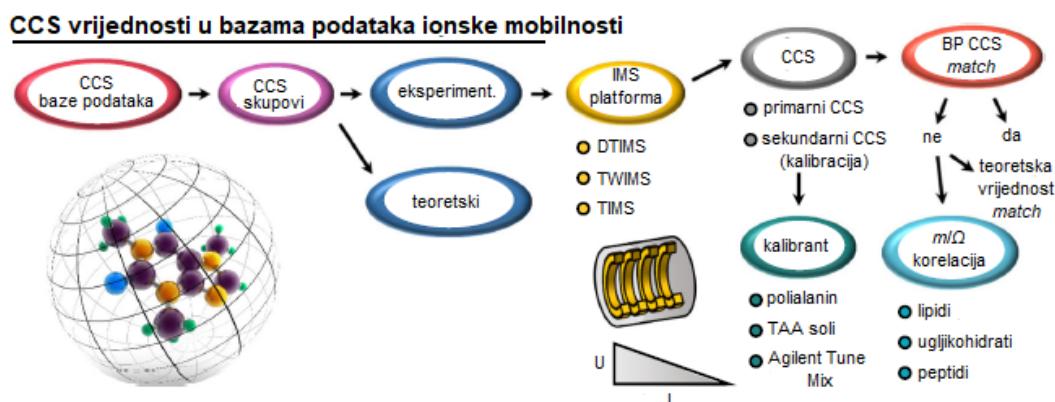
Slika 10. – Grafički prikaz jedinstvenih regija koje zauzimaju skupine bioloških molekula u IMS-MS konformacijskom prostoru.<sup>11</sup>

Također je utvrđeno je da podskupine lipida poput sfingolipida i glicerofosfolipida zauzimaju određene uže regije unutar ukupnog konformacijskog prostora koji zauzimaju lipidi, pri čemu je vidljivo da glicerofosfolipidi zadobivaju kompaktnije konformacije u usporedbi sa sfingolipidima (Slika 11.). Tendencija grupiranja biomolekula u odvojene regije IMS-MS konformacijskog prostora omogućuje bržu karakterizaciju kompleksnih bioloških uzoraka.<sup>11</sup>



Slika 11. – Grafički prikaz jedinstvenih regija koje zauzimaju glicerofosfolipidi i sfingolipidi unutar regije lipida u IMS-MS konformacijskom prostoru.<sup>11</sup>

Na Slici 12. je shematski prikazan tijek rada za stvaranje jedinstvenih protokola za generiranje i interpretaciju CCS vrijednosti u IMS-MS eksperimentima. U svrhu dobivanja CCS vrijednosti visokih reproducibilnosti koje bi se uspoređivale s vrijednostima iz baza podataka potrebno je provesti standardizaciju protokola.<sup>1</sup>



Slika 12. – Shematski prikaz stvaranja protokola za generiranje i interpretaciju vrijednosti sudarnih presjeka (CCS).<sup>1</sup>

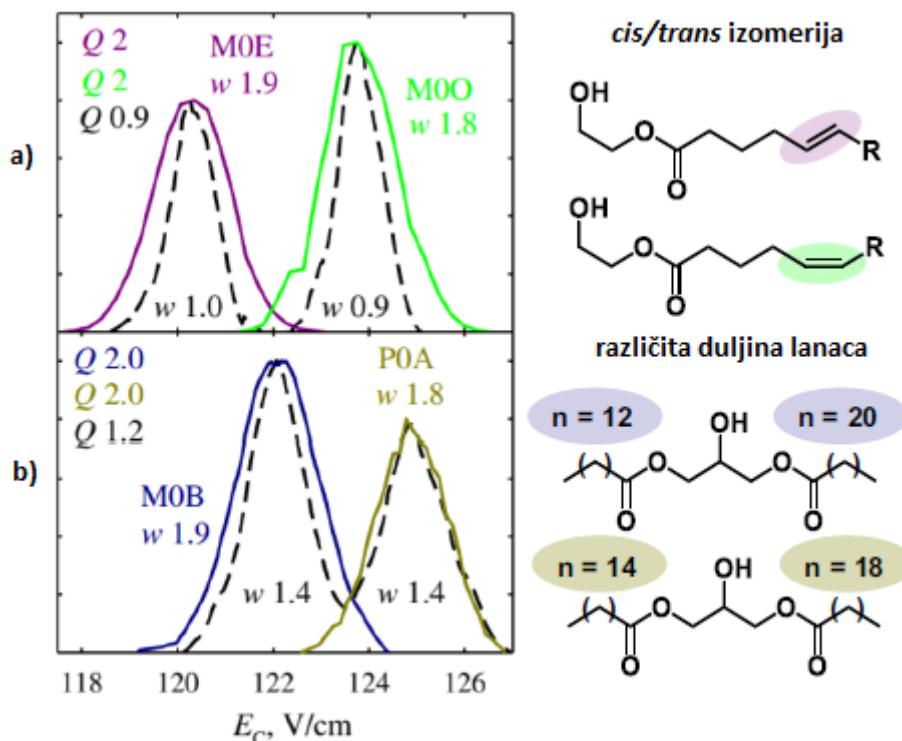
### 2.3.1. Primjena u analizi izomera bioloških molekula

Razlikovanje izomernih (izobarnih) analita unutar kompleksnih uzoraka spektrometrijom masa zahtjeva upotrebu fragmentacijskih metoda ili upotrebu kromatografskog odjeljivanja kao dodatak analizi spektrometrijom masa. Fragmentacijske metode često ne daju zadovoljavajuće rezultate u slučaju strukturno sličnih izomera poput lipida, aminokiselina, ugljikohidrata budući da su njihovi fragmentacijski spektri slični.

Spektrometrija ionske pokretljivosti poboljšava kapacitet spektara masa (engl. *Peak capacity*) u usporedbi sa samostalnom spektrometrijom masa, a uz to je i kompatibilna s drugim analitičkim tehnikama i metodama poput tekućinske kromatografije i tandemne spektrometrije masa. U tom kontekstu, IMS može biti upotrijebljena kao komplementarna tehnika odjeljivanja. Mogućnost brzog odjeljivanja analita prema strukturi i masi učinila je IMS-MS neprocjenjivom tehnikom u analizi izomernih oblika bioloških molekula.<sup>1,7</sup>

Karakterizacija lipida spektrometrijom masa zahtjevan je postupak zbog njihove strukturne raznolikosti. Jedan od uzroka je postojanje različitih izomernih oblika lipida koji pridonose njihovoј strukturnoj kompleksnosti poput geometrijskih izomera (*cis/trans*; E/Z izomerija), konstitucijskih izomera (lančani i razgranati), brojnih mogućih položaja

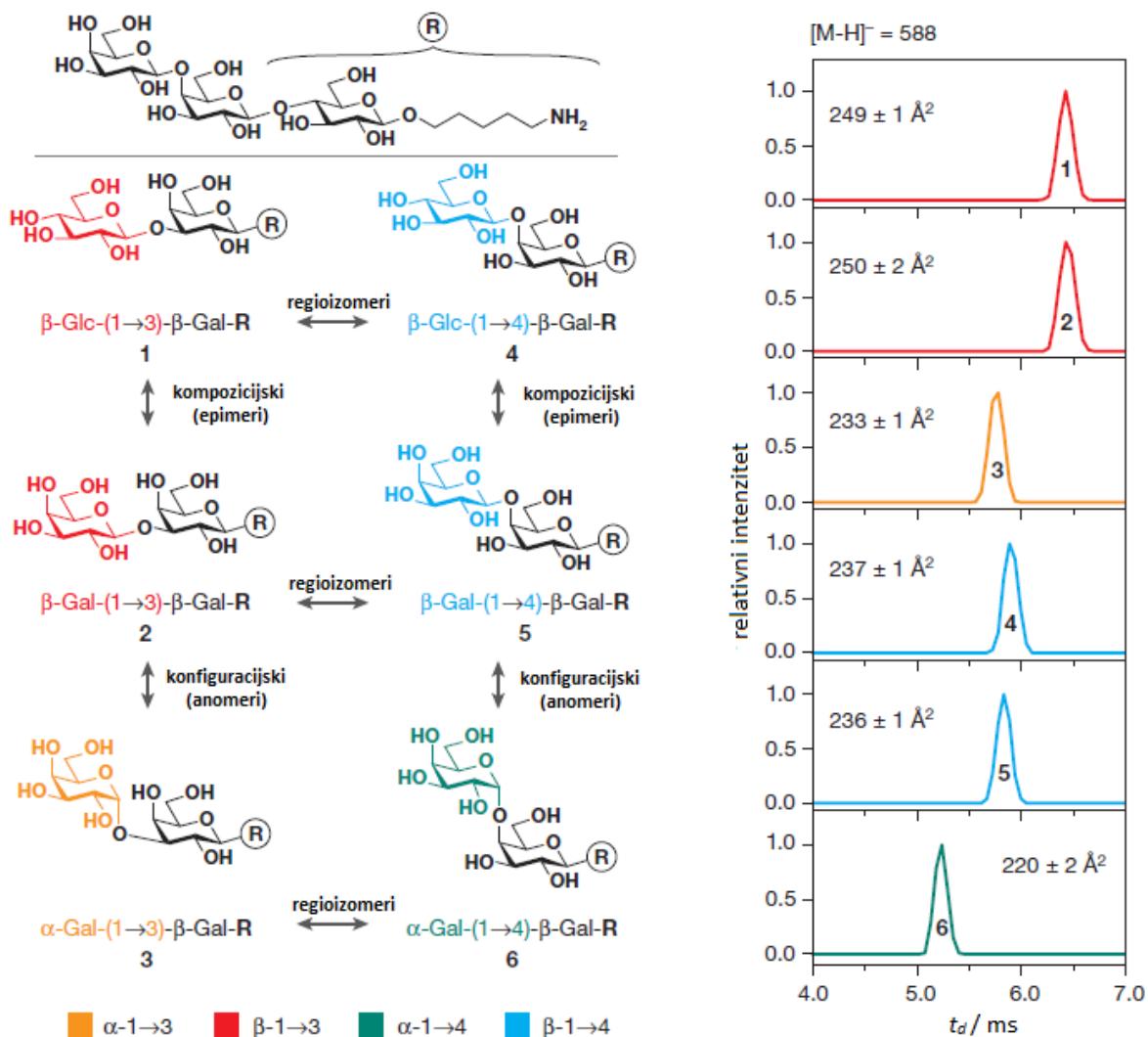
dvostrukih veza te stereokemijskih orijentacija koje lipidi mogu zadobiti.<sup>7</sup> Primjer uloge spektrometrije ionske pokretljivosti u odjeljivanju izomera lipida dali su Bowman i suradnici. Oni su spregnutim sustavom IMS-MS proveli odjeljivanje 5 izomernih parova diglicerida, 7 izomernih parova triglicerida i 7 izomernih parova fosfokolina čije su mase bile unutar raspona 500 – 900 Da. U sklopu korištene instrumentalne platforme nalazila se sudarna ćelija FAIMS sa linearnom ionskom stupicom kao analizatorom masa, dok se elektroraspršenje u pozitivnom načinu rada koristilo kao tehnika ionizacije. Proučavani izomeri su se razlikovali prema poziciji masne kiseline (transacilacija), prema duljini acilnih lanaca masnih kiselina, prema poziciji dvostrukih veza ili se pak radilo o geometrijskim izomerima. Uspješno su odijelili 75 % proučavanih izomernih parova, a sami izomeri su identificirani korištenjem standarda ili u nekim slučajevima korištenjem eksperimenata tandemne spektrometrije masa. Na Slici 13a. je prikazano uspješno odjeljivanje dva geometrijska izomera ( $m/z$  566,5). Diglycerid M0E se sastoji od miristinske kiseline (14:0) i elaidinske kiseline (18:1 [9E]), dok se M0O sastoji od miristinske kiseline (14:0) i oleinske kiseline (18:1 [9Z]). Uspješno odjeljivanje izomernog para ( $m/z$  624,6) čije se masne kiseline razlikuju u duljini acilnih lanaca je prikazano na Slici 13b. Diglycerid M0B koji se sastoji od miristinske kiseline (14:0) i behienske kiseline (22:0) je skoro potpuno odijeljen od P0A diglycerida koji se sastojao od palmitinske kiseline (16:0) i arahidinske kiseline (20:0).<sup>12</sup>



Slika 13. – FAIMS spektri ionske pokretljivosti odjeljivanja dva para izomera lipida.<sup>1</sup>

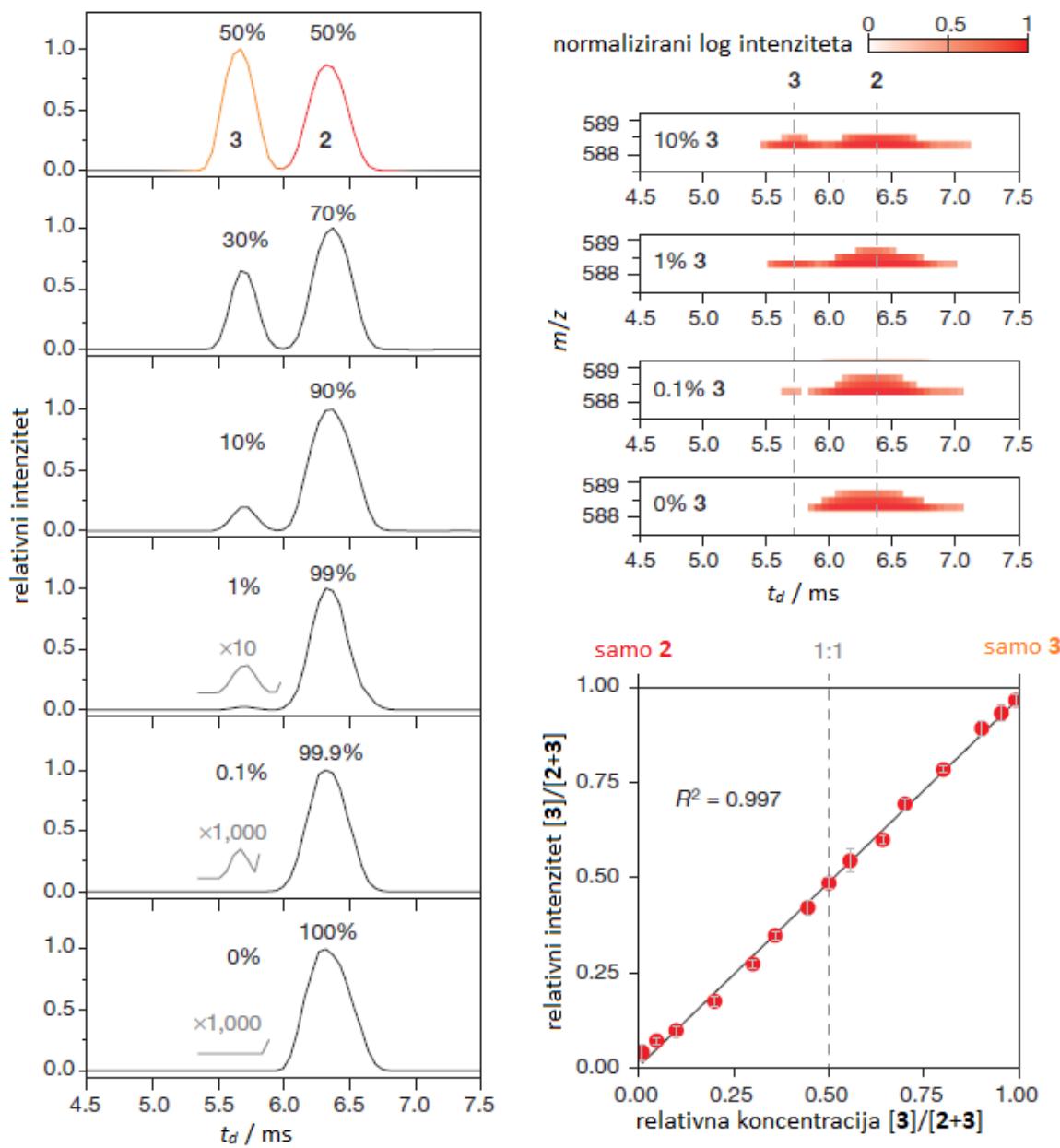
Strukturna raznolikost glikana čini njihovu karakterizaciju izuzetno zahtjevnom. Njihovu strukturu definiraju građevne jedinice (vrste monosaharida koji se često razlikuju samo po stereokemiji), pozicija glikozidne veze između građevnih jedinica (zbog postojanje više hidroksilnih skupina kod monosaharida koje mogu sudjelovati u stvaranju glikozidne veze), te stereokemija glikozidne veze (zbog postojanja  $\alpha$  i  $\beta$  anomera). Hofmann i suradnici su demonstrirali upotrebu IMS-MS spregnutih sustava u strukturnoj analizi ugljikohidrata na primjeru šest sintetiziranih izomernih trisaharida (Slika 14.). Ionizacija je provedena elektroraspršenjem u negativnom načinu rada budući da su najizraženije spektralne razlike unutar spektara ionske pokretljivosti uočene za deprotonirane ione  $[\text{M}-\text{H}]^-$  ( $m/z$  588). Korištena je sudarna ćelija TWIMS, a QTOF kao analizator masa. Kompozicijski izomeri (epimeri) **1 – 2** te **4 – 5** nisu odijeljeni IMS-MS spregnutim sustavom jer se razlikuju samo u orientaciji hidroksilnih skupina na četvrtom ugljikovom atomu (glukopiraniza i galaktopiraniza su dijastereoizomeri). Regioizomeri **1 – 4**, **2 – 5** te **3 – 6** mogu biti odvojeni na temelju CSS ( $t_d$ ) vrijednosti te je opaženo da trisaharidi koji posjeduju 1,4- glikozidne veze (**4, 5** i **6**) zadobivaju kompaktnije strukture u odnosu na one s 1,3- glikozidnim vezama (**1, 2** i **3**). Usporedbom spektara ionske pokretljivosti konfiguracijskih izomera ( $\alpha$  i  $\beta$  anomeri

galaktopiranoze) **2 – 3** i **5 – 6** utvrđeno je da trisaharidi koji sadrže  $\alpha$ -galaktopiranozu (**3** i **6**) zadobivaju kompaktniju strukturu u odnosu na one s  $\beta$ -galaktopiranozom (**2** i **5**).



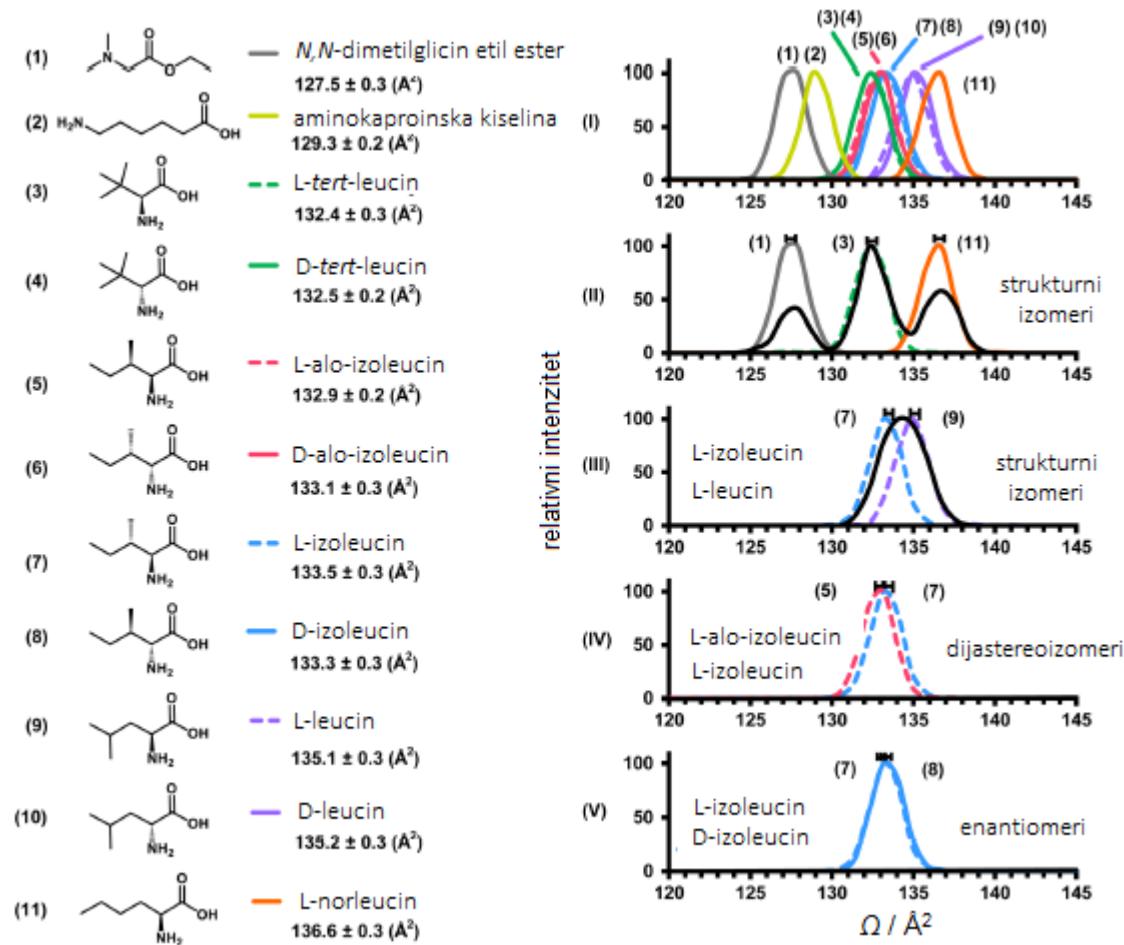
Slika 13. – Strukture i TWIMS spektri ionske pokretljivosti sintetiziranih trisaharida.<sup>13</sup>

Na primjeru smjese anomera **2** i **3** pokazano je da se izomerne nečistoće mogu odrediti kvantitativno (Slika 14.). Udio anomera **3** je postupno smanjivan te se u dvodimenzijskom IMS-MS spektru uočava signal čak i pri udjelu od svega 0,1 %. Utvrđena je i linearost odnosa relativnog intenziteta i koncentracije anomera **3**. Prema prikazanim podatcima može se zaključiti kako su IMS-MS spregnuti sustavi pogodni za strukturnu analizu kao i za kontrolu kvalitete prilikom sinteze ugljikohidrata.<sup>13</sup>

Slika 14. – Relativna kvantifikacija anomera 2 i 3 u smjesi.<sup>13</sup>

Iako je pokazano kako instrumentalne platforme s asimetričnim električnim poljem (FAIMS) postižu bolje rezultate prilikom odjeljivanja izomera, McLean i suradnici su istraživali korištenje spregnutih sustava IMS-MS sa sudarnim ćelijama DTIMS kako bi se kvantitativno usporedilo odjeljivanje 11 izomera empirijskim određivanjem njihovih sudarnih presjeka. Odabran je klasičan mali molekulski sustav leucina i izoleucina (131 Da). Ionizacija je provedena elektroraspršenjem u pozitivnom načinu rada, a kao analizator masa se koristio QTOF. Spektri ionske pokretljivosti ovih izomera (Slika 15.) snimljeni su individualno, a

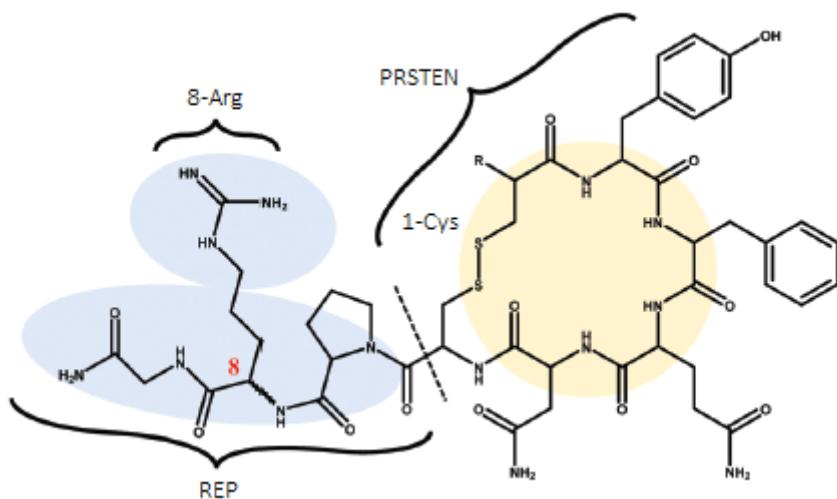
zatim su preklopljeni (spektri crne boje pokazuju njihov izgled u slučaju smjese odgovarajućih analita). Strukturni izomeri *N,N*-dimetilglicin etil ester (**1**), L-*tert*-leucin (**3**) i L-norleucin (**11**) mogu biti odijeljeni skoro u potpunosti (do bazne linije). Moć razlučivanja korištenog instrumenta nije dovoljno velika za odjeljivanje strukturnih izomera L-leucina (**9**) i L-izoleucina (**7**) koji su strukturno mnogo sličniji u odnosu na tri prethodno spomenuta analita. Vrijednosti sudarnih presjeka dijastereoizomera L-allo-izoleucina (**5**) i L-izoleucina (**7**) su nedovoljno različite za odjeljivanje ovih izomera u smjesi, dok se kod enantiomera L-izoleucina (**7**) i D-izoleucina (**8**) pikovi skoro u potpunosti poklapaju s razlikom sudarnih presjeka od samo  $0,2 \text{ \AA}^2$ . Razvijen je matematički model koji povezuje razlike između vrijednosti sudarnih presjeka izomera s moći razlučivanja instrumenta kako bi se predvidjela moć razlučivanja potrebna za odjeljivanje ukupno 55 izomernih parova leucin/izoleucin. Tim modelom je utvrđeno da je korištenim instrumentom (moć razlučivanja – 60) moguće odvojiti trećinu pikova proučavanih izomernih parova s razdvajanjem na polovici visine pika što se slaže s eksperimentalnim podatcima. Ovaj model predviđa da je potrebna moć razlučivanja od 2 000 za odjeljivanje stereoizomera s tim da enantiomeri poput L- i D-izoleucina možda uopće neće biti odjeljivi upotrebom sudarnih ćelija s uniformnim električnim poljem kao što su sudarne ćelije DTIMS.<sup>14</sup>



Slika 15. – Strukture proučavanih leucin/izoleucin izomernih oblika, iznosi eksperimentalno određenih vrijednosti sudarnih presjeka i njihovi preklopni DTIMS spektri ionskih pokretljivosti.<sup>14</sup>

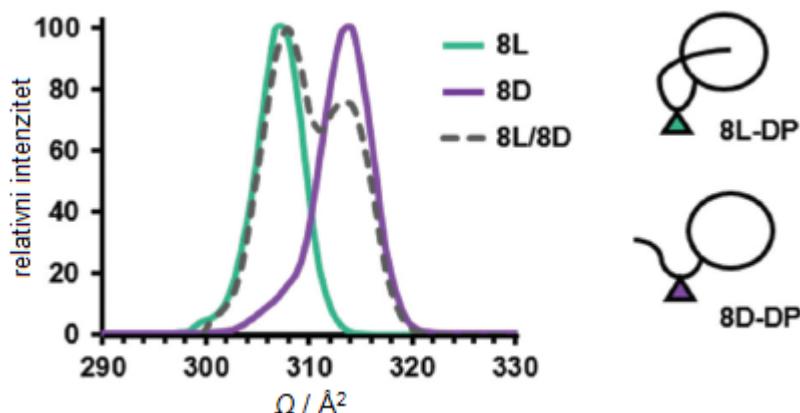
McLean i suradnici su u svom istraživanju demonstrirali upotrebu IMS-MS (DTIMS) spregnutih sustava u odjeljivanju dijastereoizomera dezmpresina i vazopresina na temelju makromolekulskih strukturnih razlika. Ionizacija je provedena elektroraspršenjem u pozitivnom načinu rada, a kao analizator masa korišten je QTOF. Snimljeni su pojedinačni spektri svih dijastereoizomera kao i spektri smjesa (1:1) odgovarajućih parova dijastereoizomera. Radi se o nonapeptidima kod kojih je šest aminokiselina povezano u prstenastu strukturu preko cistein-cistein disulfidnih mostova, a tri aminokiseline čine ogrankak, tzv. rep (Slika 16.). Dezmpresin (sintetski derivat) se od vazopresina (prirodni nonapeptidni hormon) razlikuje po nedostatku amino skupine na cisteinu (na poziciji 1) te D-stereokemiji arginina na poziciji 8 (arginin vazopresina posjeduje L-stereokemiju). U slučaju oba nonapeptida moguće je postojanje izomernih oblika ovisno o stereokemiji tog arginina

(D- ili L-) što rezultira postojanjem ukupno četiri nonapeptida (8L-VP, 8D-VP, 8L-DP i 8D-DP).



Slika 16. – Strukture vazopresina i dezmopresina.<sup>15</sup>

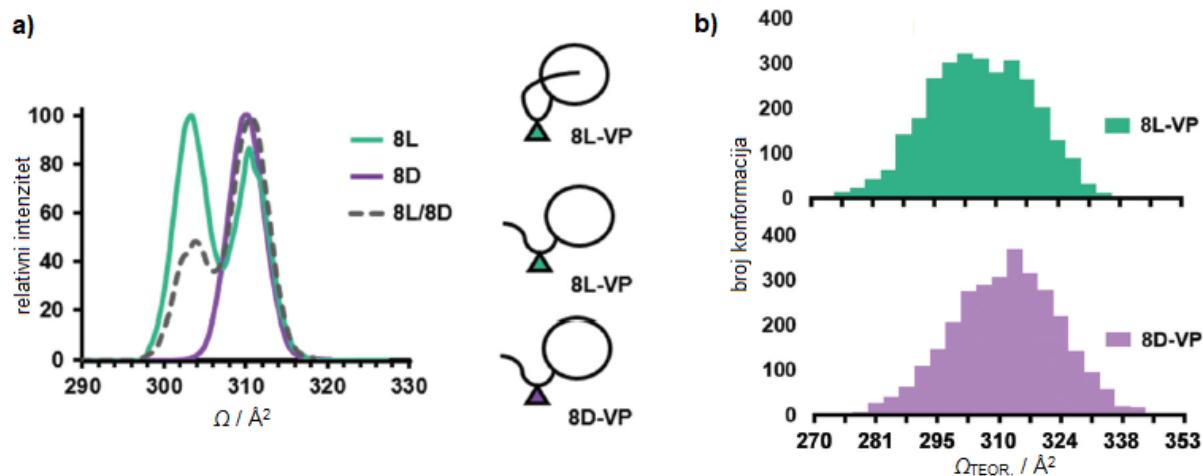
U slučaju dezmopresina utvrđena je razlika između sudarnih presjeka dvaju izomernih oblika (Slika 17.) te je pretpostavljeno da 8L-DP ( $308 \text{ \AA}^2$ ) zadobiva kompaktniju konformaciju pri čemu se repni dio nonapeptida smata unutar prstenastog dijela. Izomerni oblik 8D-DP zadobiva izduženiju konformaciju ( $314 \text{ \AA}^2$ ).



Slika 17. – DTIMS spektri ionske pokretljivosti izomernih oblika dezmopresina.<sup>15</sup>

Zanimljivo je da izomerni oblik vazopresina 8L-VP zadobiva i kompaktnu ( $303 \text{ \AA}^2$ ) i izduženu konformaciju ( $310 \text{ \AA}^2$ ). Sudarni presjek 8D-VP se slaže sa sudarnim presjekom izdužene konformacije 8L-VP ( $310 \text{ \AA}^2$ ) što ukazuje na sličnost u strukturi. Na postojanje obje

konformacije 8L-VP ukazuju i teorijski izračunate vrijednosti sudarnih presjeka kao što i teorijski izračunate vrijednosti sudarnih presjeka 8D-VP ukazuju na postojanje jedne konformacije (Slika 18.).<sup>15</sup>



Slika 18. – DTIMS spektri ionske pokretljivosti izomernih oblika vazopresina te raspodjela broja teorijski dobivenih konformacija po teorijski izračunatim vrijednostima sudarnih presjeka.<sup>15</sup>

## § 3. ZAKLJUČAK

Spektrometrija ionske pokretljivosti je tehnika odjeljivanja iona u plinskoj fazi pod utjecajem najčešće slabog električnog polja. Pokretljivost iona ovisi o njihovoj veličini, obliku i naboju, stoga IMS daje uvid u njihovu strukturu. Spregom ove tehnike sa spektrometrijom masa uvelike se povećava analitička moć koja nadilazi mogućnosti ovih tehnika u samostalnim oblicima pa je karakterizaciju analita moguće provesti u višedimenzijskom obliku. Kombiniranjem podataka o masi analita s podatcima o njegovoj pokretljivosti moguće je analit osim po masi okarakterizirati i po njegovoj veličini. Budući da se odjeljivanja spektrometrijom ionske pokretljivosti provode unutar nekoliko milisekundi ovu tehniku je moguće inkorporirati u već postojeće LC/GC-MS sustave i protokole. Spektrometrijom masa je ponekad izuzetno komplikirano detektirati ion od interesa u kompleksnom uzorku zbog pozadinskog šuma koji potječe od matrice uzorka. U ovakovom se slučaju IMS može upotrijebiti kao filter signala koji reducira kompleksnost spektra, a povećava omjer signala i šuma za ion (analit) od interesa. Ponekad se spektrometrijom masa uz dodatne fragmentacijske metode i kromatografske tehnike ne mogu identificirati izomerni oblici spojeva poput aminokiselina, lipida ili ugljikohidrata. Spektrometrija ionske pokretljivosti pruža komplementarnu separaciju izomernih oblika na temelju njihovih razlika u pokretljivostima što je jedna od glavnih tema ovog rada. Spregnuti sustavi IMS-MS su svoju upotrebu pronašli i u ciljanim i neciljanim analizama u sklopu proteomike, lipidomike, glikomike i metabolomike, pri čemu se informacije poput sudarnih presjeka i reduciranih ionskih pokretljivosti mogu iskoristiti kao dodatni analitički identifikatori. U budućnosti je nužno оформити pouzdane baze podataka s vrijednostima sudarnih presjeka, ali i provesti standardizaciju postupaka i protokola kako bi se ishodile vrijednosti sudarnih presjeka visoke reproducibilnosti.

## § 4. LITERATURNI IZVORI

1. J. N. Dodds, E. S. Baker, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **30** (2019) 2185–2195.
2. M. A. Ewing, M. S. Glover, D. E. Clemmer, *J. Chromatogr. A* **1439** (2016) 3–25.
3. J. C. May, C. B. Morris, J. A. McLean, *Anal. Chem.* **89** (2017) 1032–1044.
4. M. Rožman, D. Srzić, *Kem. Ind.* **54** (2005) 295–302.
5. E. Kalenius, M. Groessl, K. Rissanen, *Nat. Rev. Chem.* **3** (2019) 4–14.
6. V. Gabelica, E. Marklund, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **42** (2018) 51–59.
7. G. Paglia, G. Astarita (ur.), *Ion Mobility-Mass Spectrometry: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology)*, Vol. 2084, Humana, New York, 2020, str. 1.
8. R. A. Meyers (ur.), *Ion Mobility-Mass Spectrometry (Encyclopedia of Analytical Chemistry)*, Wiley, Hoboken, New Jersey, 2019, str 1.
9. J. C. May, J. A. McLean, *Anal. Chem.* **87** (2015) 1422–1436.
10. A. T. Kirk, A. Brohnhorst, C.-R. Raddatz, M. Allers, S. Zimmermann, *Anal. Bioanal. Chem.* **411** (2019) 6229–6246.
11. 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.
12. A. P. Bowman, R. R. Abzalimov, A. A. Shvartsburg, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **28** (2017) 1552–1561.
13. J. Hofmann, H. S. Hahm, P. H. Seeberger, K. Pagel, *Nature* **526** (2015) 241–245.
14. J. N. Dodds, J. C. May, J. A. McLean, *Anal. Chem.* **89** (2017) 952–959.
15. S. T. Phillips, J. N. Dodds, B. M. Ellis, J. C. May, J. A. McLean, *Chem. Commun.* **54** (2018) 9398–9401.