

mgr inż. Daniel Fochtman✉,

dr hab. Anna Wojakowska,

dr Łukasz Marczak

Pracownia Spektrometrii Mas, Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk, Poznań

https://doi.org/10.18388/pb.2021_530

✉ autor korespondujący: dfochtman@ibch.poznan.pl

Słowa kluczowe: spektrometria mas, mobilność jonowa, TIMS, FAIMS, multi-omika

Wykaz skrótów: CCS – przekrój kolizyjny (ang. *Collisional Cross-Section*); DDA – analiza zależna od danych (ang. *Data Dependent Analysis*); FAIMS – (ang. *High Field Asymmetric Waveform Ion Mobility Spectrometry*); HPLC – wysokosprawna chromatografia cieczowa (ang. *High-Performance Liquid Chromatography*); IMS – spektrometria mobilności jonów (ang. *Ion Mobility Spectrometry*); MS – spektrometria mas (ang. *Mass Spectrometry*); PASEF – (ang. *Parallel Accumulation-Serial Fragmentation*); PRM – śledzenie reakcji równoczesnych (ang. *Parallel Reaction Monitoring*); TIMS – spektrometria mobilności jonów pułapkowanych (ang. *Trapped Ion Mobility Spectrometry*); TWIMS – spektrometria mobilności jonów w fali kroczącej (ang. *Traveling Wave Ion Mobility Spectrometry*)

PODZIĘKOWANIA

Artykuł powstał podczas realizacji projektu OPUS-22 nr 2021/43/B/NZ7/02221 sfinansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki (DF, AW).

STRESZCZENIE

Spektrometria mas (ang. *mass spectrometry*, MS) jest techniką analityczną umożliwiającą identyfikację i ilościowe określenie zawartości badanych białek, metabolitów czy lipidów w próbce. Metoda ta posiada jednak swoje ograniczenia w stosunku do liczby cząsteczek, które w danym czasie jest w stanie zidentyfikować. Technika, która skutecznie może zwiększyć efektywność identyfikacji jest spektrometria mobilności jonów (ang. *ion mobility spectrometry*, IMS). Pozwala ona na rozdział jonów w trakcie pokonywania analizatora w gradencie pola elektromagnetycznego i przeciwnego naporu gazu, ze względu na ich mobilność. Rozdział prowadzony jest w połączeniu z analizą MS, a więc prowadzi do uzyskania dodatkowych danych, co wiąże się ze znaczną poprawą liczby identyfikowanych związków oraz ze zmniejszeniem rejestrowanego szumu. Alternatywnie, przy zachowaniu takiej samej liczby identyfikacji możliwe jest skrócenie czasu analizy. Należy jednak zwrócić szczególną uwagę na rodzaj zastosowanego analizatora IMS – jego konkretna implementacja dyktuje bowiem dalsze etapy analizy i możliwości detekcji jonów.

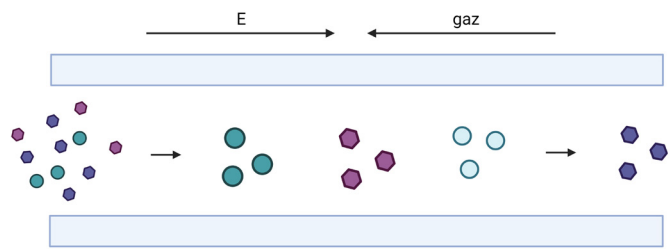
WPROWADZENIE

Spektrometria mas (ang. *mass spectrometry*, MS) jako technika analityczna umożliwia identyfikację i ilościowe określenie zawartości badanych związków – białek, metabolitów, czy lipidów w próbce. Analizy spektrometryczne złożonych mieszanin, w szczególności próbek biologicznych (m.in. płyny ustrojowe, ekstrakty tkankowe), zazwyczaj poprzedzone są rozdziałem badanej próbki na prostsze frakcje, celem redukcji jej złożoności. Wstępne frakcjonowanie analizowanego materiału może być osiągnięte poprzez odpowiednie przygotowanie próbki (np. chromatografię jonowymienną), co wiąże się jednak z częściową utratą badanych związków, ze względu na ograniczoną wydajność procesu frakcjonowania. Należy mieć na uwadze, że właściwe przygotowanie złożonej próbki do analizy MS jest zazwyczaj kosztowne, wysoce czasochłonne i wymaga każdorazowej analizy kolejno uzyskanych frakcji, co z kolei generuje duże ilości uzyskiwanych danych. Złotym standardem w przypadku rozdziału próbek biologicznych bezpośrednio przed analizą MS jest zastosowanie chromatograficznych technik sprzężonych, takich jak wysokosprawna chromatografia cieczowa (ang. *high-performance liquid chromatography*, HPLC). Chociaż zastosowanie technik chromatograficznych w znaczący sposób niweluje problem złożoności badanego materiału, często redukcja ta nie jest wystarczająca, gdy uwzględnimy czas potrzebny do poddania badanego związku analizie w trybie MS², tj. fragmentacji jonu macierzystego i analizie powstałych fragmentów. Dodatkowym wymiar rozdziału w postaci analizy mobilności jonów (ang. *ion mobility spectrometry*, IMS) stanowi potencjalne rozwiązanie problemu złożoności mieszanin w badaniach multi-omicznych oraz problemu rozróżniania jonów izomerycznych czy izobarycznych w MS. Choć historycznie IMS istnieje już od lat '60 ubiegłego wieku, dopiero na przełomie ostatnich lat rozwój techniczny i miniaturyzacja elektroniki pozwoliły efektywnie wykorzystać tę metodę spektrometryczną w badaniach biologicznych.

ANALIZATORY MOBILNOŚCI JONÓW

KOMORA DRYFOWA

Najprostszym analizatorem IMS jest tzw. „komora dryfowa” (ang. *drift tube*). Jony powstałe w źródle przemieszczają się przez ten analizator, a w przeciwnym kierunku do ich toru lotu przepływa obojętny gaz np. powietrze czy azot (Ryc. 1). Przyspieszenie cząstek w tym środowisku odbywa się w wyniku działania pola elektromagnetycznego (E). Efektywnie, obecność siły elektromotorycznej i stawiającego opór gazu prowadzi do rozdziału jonów na podstawie ich przekroju kolizyjnego (ang. *collisional cross-section*, CCS). Cząsteczki o niewielkim CCS będą w stanie opuścić komorę dryfową wcześniej niż cząsteczki o dużym CCS (ze względu na relatywnie mniejszy opór), co umożliwia ich

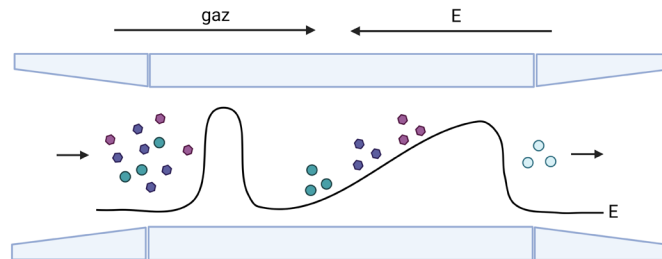


Rycina 1. Schematyczny rysunek komory dryfowej. Jony rozkładają się w analizatorze w zależności od ich przekroju kolizyjnego (CCS) oznaczonego kolorem: biały to jony o najniższym CCS, fioletowy – jony o średnim CCS, zielony – jony o największym CCS. Symbolem „E” oznaczono działanie pola elektromagnetycznego.

rozdziła niezależnie od analizy z wykorzystaniem spektrometrii mas. Prosta budowa tego analizatora umożliwiła jego zastosowanie w badaniach małych cząsteczek organicznych już w 1960 roku przez McDaniel’a i Martin’a [1]. Komory dryfowe można jednak uznać za mało praktyczne ze względu na ich rozmiary – mogą sięgać nawet do 3 metrów długości. To sprawia, że kontrola warunków środowiskowych pracy takiego analizatora jest utrudniona, a zmiany temperatury mogą prowadzić do znacznych wahań w oznaczanej mobilności [2-3]. Ponadto jony przekazywane są w postaci pakietów do dalszych etapów analizy. Ten fakt oznacza, że cykl pracy całego urządzenia jest słabo wykorzystany, a niektóre rodzaje analizatorów MS nie będą w stanie umożliwić detekcji z akceptowalną rozdzielczością. Czas, w którym pakiety jonów nie docierają do detektora jest więc tracony. Spektrometry mas połączone z komorą dryfową są oferowane komercyjnie przez Agilent Technologies Inc., m.in. w urządzeniu 6560 Ion Mobility LC/Q-TOF [4], przez firmę Tofwerk AG, jako IMS-TOF [5] oraz przez firmę Excellims w HPIMS-MS MC3100 [6].

TIMS

Trapped Ion Mobility Spectrometry (TIMS) to współczesna technika IMS łącząca charakterystyczne cechy pułapki jonów z komorą dryfową. W tym przypadku przepływ gazu i gradient pola elektromagnetycznego są zwrócone odwrotnie w stosunku do swojego ułożenia w komorze dryfowej. Strumień gazu umożliwia jonom przejście do końca analizatora, lecz ich ruch jest spowalniany lub całkowicie zatrzymywany przez gradient pola elektromagnetycznego, który jest niejednorodny na długości całego urządzenia (Ryc. 2). Najpierw jony zbierane są w postaci pakietu w pierwszej części analizatora. W odpowiednich odstępach czasu przekazywane są do kolejnej części, gdzie dochodzi do ich stopniowej elucji (uwalniania). Zmniejszenie siły pola elektromagnetycznego, powstrzymującego jony przed opuszczeniem TIMS, prowadzi do separacji jonów na podstawie ich mobilności. Tutaj natomiast, odwrotnie do rozdzielenia w komorze dryfowej, cząsteczki o największym CCS opuszczają analizator szybciej niż cząsteczki o mniejszym CCS. W ten sposób możliwe jest uzyskanie praktycznie 100% wydajności cyklu pracy urządzenia – rozdział jonów zachodzi w drugiej części analizatora w sposób ciągły, a jony które w tym czasie dopiero docierają do pierwszej części są gromadzone do późniejszej analizy. Analizator TIMS jest wyko-

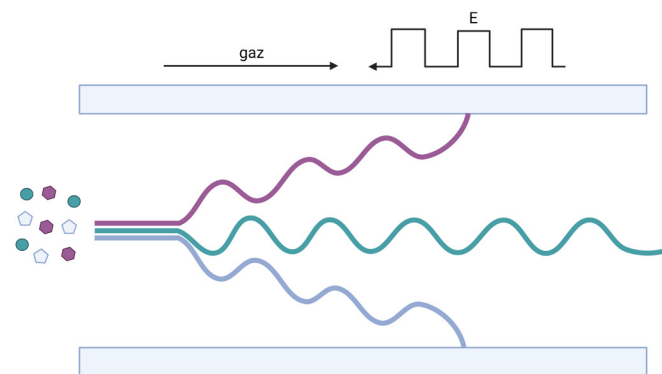


Rycina 2. Schematyczny rysunek analizatora TIMS. Jony rozkładają się w analizatorze w zależności od ich przekroju kolizyjnego (CCS) oznaczonego kolorem: zielony to jony o najniższym CCS, niebieski – jony o średnim CCS, fioletowy – jony o największym CCS. Symbolem „E” oznaczono działanie pola elektromagnetycznego.

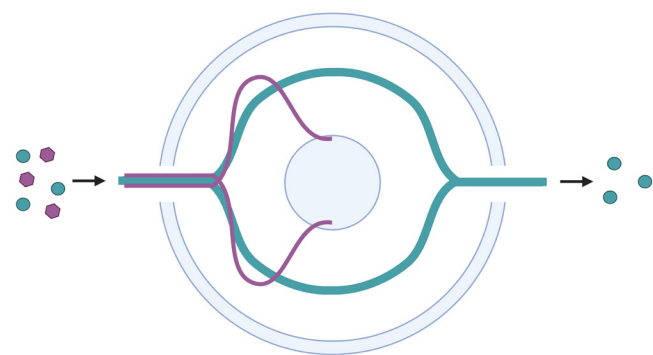
rzystywany w spektrometrach firmy Bruker, m.in. timsTOF Pro [7] oraz Pro2 [8], a także timsTOF Ultra [9].

FAIMS

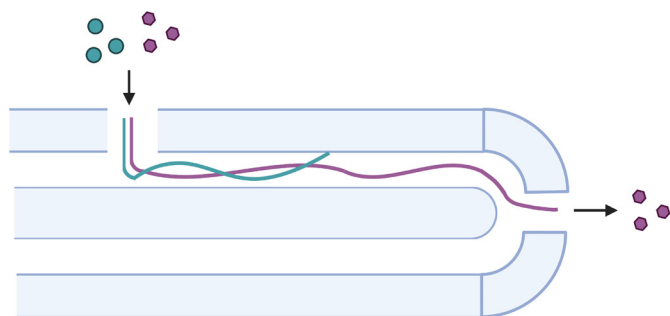
FAIMS (ang. *High Field Asymmetric Waveform Ion Mobility Spectrometry*) wykorzystuje zachowanie jonów w zmiennym polu magnetycznym do rozdzielenia na podstawie ich mobilności. Choć ułożenie przeciwstawnych sił naporu gazu i siły elektromagnetycznej w analizatorze FAIMS jest analogiczne do TIMS, FAIMS rozdziela jony poprzez zmianę siły elektromagnetycznej w czasie. Prowadzi to do oscylacji jonów w trakcie ich drogi przez analizator (Ryc. 3, 4 i 5). Jeżeli mobilność danego jonu nie jest odpowiednio dobrana do parametrów pracy FAIMS (szczególnie dotyczy to napięcia kompensacyjnego), nie będzie on w stanie opuścić urządzenia i trafić do detektora. W ten sposób jedynie jony o mobilności odpowiadającej zadanym parametrom mogą potencjalnie zostać wykryte. FAIMS rozważać można jako rodzaj analizatora o działaniu „filtrującym”, gdyż część jonów, które mogłyby zostać poddane analizie zostają utracone w trakcie ich rozdzielenia. Mimo to, takie działanie prowadzi do zwiększenia stosunku sygnału do szumu i podnosi czułość analizy [10]. FAIMS jako metoda analizy mobilności może w praktyce zostać zaadaptowana w ramach wielu konfiguracji przestrzennych, które różnią się geometrią elektrod, a co za tym idzie - swoimi właściwościami. W ten sposób, możliwe jest wykorzystanie



Rycina 3. Schematyczny rysunek liniowego analizatora FAIMS. Jony przedostają się przez analizator w zależności od ich przekroju kolizyjnego (CCS) oznaczonego kolorem: zielony to droga pokonywana przez jony o CCS dopasowanym do warunków pracy analizatora, fioletowy i biały – to droga pokonywana przez jony o CCS niedopasowanym do warunków pracy analizatora. Symbolem „E” oznaczono działanie pola elektromagnetycznego.

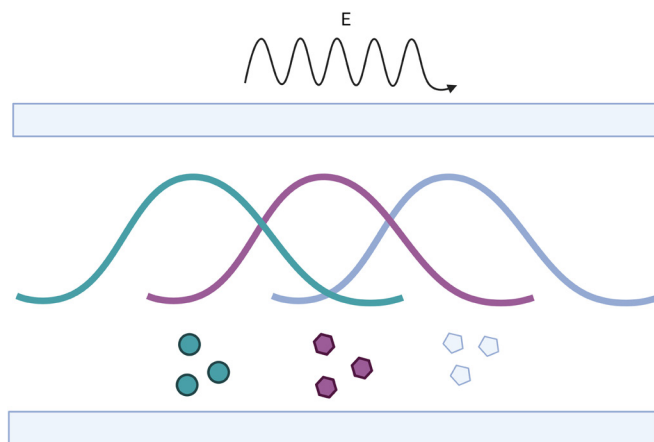


Rycina 4. Schematyczny rysunek cylindrycznego analizatora FAIMS. Jony przedostają się przez analizator w zależności od ich przekroju kolizyjnego (CCS) oznaczonego kolorem: zielony to droga pokonywana przez jony o CCS dopasowanym do warunków pracy analizatora, fioletowy – to droga pokonywana przez jony o CCS niedopasowanym do warunków pracy analizatora.



Rycina 5. Schematyczny rysunek kopułowego analizatora FAIMS. Jony przedostają się przez analizator w zależności od ich przekroju kolizyjnego (CCS) oznaczonego kolorem: fioletowy to droga pokonywana przez jony o CCS dopasowanym do warunków pracy analizatora, zielony – to droga pokonywana przez jony o CCS niedopasowanym do warunków pracy analizatora.

analizatora o konfiguracji liniowej (Ryc 3), cylindrycznej (Ryc. 4), czy kopułowej (Ryc. 5). Szczegółowy opis działania i charakterystyki FAIMS o różnych konfiguracjach przestrzennych można znaleźć w pracy Kolakowskiego i Mestera [10]. Analizator FAIMS oferowany jest jako moduł przez ThermoScientific pod nazwą „FAIMS Pro” i „FAIMS Pro Duo”, który można sparować ze spektrometrami m.in. serii Exploris [11-12]. Analizator FAIMS „SelexION” można połączyć ze spektrometrami firmy SCIEX [13]. Ponadto, producentem analizatora „UltraFAIMS” jest firma Owlstone Medical, a analizator łączyć można ze spektrometrami firm ThermoScientific, Bruker, Agilent i Waters [14]. Analizatory FAIMS są też oferowane przez firmę Heartland



Rycina 6. Schematyczny rysunek liniowego analizatora TWIMS. Jony rozkładają się w analizatorze w zależności od ich przekroju kolizyjnego (CCS) oznaczonego kolorem: biały to jony o najniższym CCS, fioletowy – jony o średnim CCS, zielony – jony o największym CCS. Symbolem „E” oznaczono działanie pola elektromagnetycznego.

Mass Spectrometry np. jako moduł dla spektrometrów firmy ThermoScientific [15].

TWIMS

Traveling Wave Ion Mobility Spectrometry, czyli separacja TWIMS opiera się na przepływie jonów w zmiennym polu magnetycznym, tak jak FAIMS (Ryc. 6), jednakże w tym przypadku oscylacje jonów nie odbywają się w osi Y analizatora, a w jego osi X. Ponadto w tej sytuacji nie jest koniecznym wykorzystanie dodatkowego przepływu obojętnego gazu. Oscylacje jonów wywołane są zmianą ich przyspieszenia przy przechodzeniu przez analizator, a określenie mobilności staje się możliwe ze względu na różnorodną „bezwładność” jonów [16]. Nie obserwuje się więc tutaj jednostajnego przepływu jonów tak jak ma to miejsce w innych analizatorach. W TWIMS jony nie są tracone przy ich rozdziale, a jedynie grupowane w pakiety, które opuszczają analizator w różnych odstępach czasu. Prowadzi to do tych samych problemów dotyczących cyklu pracy następujących po IMS analizatorów MS jak ma to miejsce w przypadku komory dryfowej. Ze względu na charakterystykę działania TWIMS możliwe jest stosowanie geometrii innych niż liniowa, np. analizatorów kolistych [17]. Analizator TWIMS dostępny jest w ramach serii „SYNAPT XS” (w konfiguracji liniowej) i „SELECT” (w konfiguracji kolistej) oferowanej przez firmę Waters [18-19].

Tabela 1. Porównanie charakterystycznych cech poszczególnych typów analizatorów mobilności jonów.

Cecha	Komora dryfowa	TIMS	FAIMS	TWIMS
Producent	Agilent Technologies, Tofwerk, Exellims	Bruker	ThermoScientific, SCIEX, Owlstone Medical, Heartland Mass Spectrometry	Waters
Geometria	liniowa	liniowa	liniowa, cylindryczna, kopułowa	liniowa, kolista
Maksymalny cykl pracy analizatora MS przy połączeniu z danym analizatorem IMS	niski	blisko 100%	blisko 100%	niski
Przybliżona zdolność rozdzielcza [20]	50–60	100–200	~130	30–40
Postać jonów po opuszczeniu analizatora IMS	pakiet	pakiet	ciągły strumień jonów	pakiet

PORÓWNANIE ANALIZATORÓW IMS

Podsumowując, poszczególne implementacje technologiczne analizatorów mobilności jonowej różnią się swoimi charakterystycznymi cechami. Wybrane cechy tego typu zestawiono w Tabeli 1.

ZASTOSOWANIE IMS W BADANIACH MULTI-OMICZNYCH

PROTEOMIKA

W badaniach proteomicznych wykorzystujących technikę spektrometrii mas jednym z najbardziej popularnych podejść analitycznych jest tzw. „*bottom-up DDA*” (ang. *Data Dependent Analysis*). Podejście to zakłada, że analizowane białka w pierwszej kolejności poddawane są trawieniu enzymatycznemu do peptydów, a następnie uzyskana złożona mieszanina rozdzielana jest chromatograficznie i poddawana analizie MS. By umożliwić określenie sekwencji aminokwasów, z których składa się dany peptyd, jest on poddawany fragmentacji i analizowany w trybie MS². W trybie DDA jedynie jony o najwyższej intensywności są poddawane fragmentacji. Na podstawie uzyskanych widm masowych, w odniesieniu do wybranych baz peptydowych i przy wykorzystaniu odpowiednich algorytmów bioinformatycznych, można określić obecność i względną ilość danych białek w próbce. Ponieważ w DDA do fragmentacji wybierane są jony o najwyższej intensywności, to peptydy pochodzące od białek występujących w próbce w dużej ilości są wielokrotnie poddawane analizie. Prowadzi to do uzyskania redundantnych widm MS², potencjalnym kosztem widm odpowiadających peptydom pochodzącym od białek o niewielkim stężeniu (tzw. białek niskokopijnych). Dlatego DDA w niektórych analizach może charakteryzować się słabym pokryciem proteomu, szczególnie jeśli nie zastosowano metod przygotowania próbki prowadzących do zmniejszenia jej złożoności.

Potencjalnym rozwiązaniem wyżej opisanego problemu jest wykorzystanie dodatkowego wymiaru separacji jonów, jakim jest analiza IMS. Rozdział jonów ze względu na ich mobilność może prowadzić do fragmentacji peptydów, które w standardowej analizie DDA zostałyby pominięte. Daje to możliwość uzyskania znacznie lepszego pokrycia proteomu – w zależności od możliwości rozdzielczych zastosowanej techniki IMS. Przykładowo, w przypadku analiz z wykorzystaniem FAIMS liczba identyfikowanych białek znakowanych izotopowo dla próbek małych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych była większa nawet o >100% w porównaniu z analizą bez zastosowania FAIMS [21]. W innych analizach ludzkich linii komórkowych, zwiększenie liczby zidentyfikowanych białek wynosiło około 15% dla komórek K562 [22]. Ze względu na unikatowe działanie techniki FAIMS jako „filtra jonów”, jej zastosowanie w celowanych analizach proteomicznych typu PRM (ang. *Parallel Reaction Monitoring*) wiąże się z redukcją szumu od 13% do nawet 86% [23]. Jako, że analizy celowane mogą w przyszłości pełnić istotną rolę w badaniach próbek klinicznych, bardzo istotnym parametrem jest dolna granica oznaczalności LLOQ (ang. *Lower Limit Of Quantification*). Wykorzystanie FAIMS w porównaniu ze standardową analizą PRM pozwoliło zmniejszyć LLOQ dla białka HER2 nawet o 66%

[23]. Wykorzystanie analizatora TIMS wiąże się z zastosowaniem metody PASEF (ang. *Parallel Accumulation-Serial Fragmentation*), w której jony są akumulowane w pierwszej części analizatora, a następnie wybrane grupy jonów o danej mobilności są „seryjnie” poddawane fragmentacji [24]. W ten sposób analiza IMS zsynchronizowana jest z analizą MS, co pozwala na uzyskanie praktycznie 100% cyklu pracy. Cykl pracy oznacza w tym przypadku stosunek czasu jaki poświęcany jest na analizę MS w stosunku do czasu trwania całej analizy. Parametr ten jest istotny, gdyż dyktuje on możliwość identyfikacji w analizach połączonych np. z rozdziałem chromatograficznym, gdzie czas na wykrycie danego składnika mieszaniny jest ograniczony. Jeśli uzyskanie maksymalnej liczby identyfikowanych białek nie jest konieczne, wykorzystanie PASEF w badaniach proteomicznych pozwala na uzyskanie 10-krotnie wyższej szybkości analizy przy zachowaniu takiej samej czułości [25]. Analiza wielu frakcji jonów w fazie gazowej (tj. jonów o mobilności mieszczącej się w konkretnym przedziale) z wykorzystaniem TIMS umożliwia zwiększenie liczby identyfikowanych białek i peptydów kolejno o ~19% i ~30% w porównaniu z analizą próbki bez frakcjonowania [26]. Należy przy tym zauważyć iż frakcjonowanie TIMS nie wiąże się ze zmniejszoną dokładnością identyfikacji. W przypadku analiz IMS-MS z zastosowaniem TWIMS, pokrycie proteomu może być większe o nawet 60% w porównaniu ze standardową analizą [27]. Ponadto, przypisane dodatkowo identyfikacje stanowią przede wszystkim białka o niskiej intensywności, co może wynikać z dokładniejszego pomiaru jonów prekursorowych peptydów charakterystycznych dla tych białek. Przy wykorzystaniu odpowiednich algorytmów możliwe jest dostosowanie zmiany przyspieszenia jonów w analizatorze TWIMS, a co za tym idzie zwiększenie liczby identyfikacji o dodatkowe 40% w stosunku do standardowej analizy TWIMS [28].

METABOLOMIKA

W analizach metabolomicznych wykorzystanie IMS cechuje się podobnymi zaletami jak te opisane w przypadku analiz proteomicznych. W szczególności, IMS poprawia stosunek sygnału do szumu, co wiąże się ze zwiększeniem liczby anotowanych związków (porównując do standardowej analizy MS) [29]. Znajomość wartości eksperymentalnych CCS stanowi dodatkowy wymiar danych, który po integracji z informacjami na temat stosunku masy do ładunku (*m/z*) pozwala na dokładniejsze przypisanie widm masowych do odpowiadających im wzorów strukturalnych. Co więcej, analizy metabolomiczne oparte o tzw. „czas dryfu” (ang. *drift time*) (tj. czas przejścia jonów przez analizator IMS) charakteryzują się mniejszym rozrzutem niż analizy oparte jedynie o czas retencji [30]. W niektórych przypadkach wykorzystanie IMS może zastąpić rozdział chromatograficzny, przy zachowaniu podobnych lub nawet lepszych parametrów analizy [31]. W takiej sytuacji możliwe jest też pominięcie skomplikowanych procedur przygotowania próbki i rozdziałów chromatograficznych, które mogą być zastąpione przez bezpośredni nastrzyk analitu.

Choć wysokorozdzielcza spektrometria mas pozwala na rozróżnienie izobarów poszczególnych związków, identyfikacja izomerów często nie jest jednoznacznie moż-

liwa. Związki izomeryczne należy w pierwszej kolejności rozdzielić chromatograficznie, a dopiero później poddać analizie MS. Jednak ze względu na znaczne podobieństwo w strukturze izomerów, wymagany jest ich długotrwały rozdział chromatograficzny. IMS stanowi więc unikatową metodę, w której identyfikacja izomerów na podstawie ich mobilności staje się możliwa, bez dodatkowego nakładu czasu. Takie podejście posiada jednak swoje limity – rozróżnianie izomerów jest możliwe jedynie przy wykorzystaniu odpowiednich analizatorów IMS, a ponadto konieczne jest wykorzystanie metod celowanych, tj. zbieranie widm MS² tylko dla wybranego zakresu mobilności [32]. Aktualnie analiza w pełnym zakresie nie pozwalałaby na uzyskanie akceptowalnej rozdzielczości. Mimo to, np. przy wykorzystaniu cyklicznego analizatora Waters SELECT IMS-MS możliwe było przeanalizowanie poszczególnych izomerów dla wielu związków z grupy flawonoidów [33]. W analizie złożonej mieszaniny metabolitów fazy II, IMS została wykorzystana jako technika pomocnicza do standardowego LC-MS/MS celem poprawy jakości identyfikacji flawonoidów [34]. Badania składu chemicznego produktów naturalnych mogą charakteryzować się większą liczbą identyfikacji oraz lepszymi jakościowo widmami MS² przy zastosowaniu IMS, w porównaniu z analizą bez IMS [35]. W przypadkach gdzie celem badania jest uwzględnienie chiralności nawet bezpośrednie zastosowanie IMS często nie umożliwi rozróżnienia poszczególnych form. Badania metabolitów chiralnych pozostają jednak atrakcyjne ze względu na ich znaczące różnice w aktywności biologicznej. Wykorzystanie dodatkowych właściwości takich związków pozwala na ich wydajny rozdział z wykorzystaniem IMS. Przykładowo, metabolity wielokrotnie skompleksowane np. z jonami metali mogą charakteryzować się diametralnie różną mobilnością, a więc ich identyfikacja staje się zasadna w stosunku do ich analizy bez kompleksowania. Przy zastosowaniu takiego mechanizmu badania form chiralnych m.in. witaminy D oraz androsteronu z wykorzystaniem IMS mogły zostać znacznie skrócone, w porównaniu ze standardowym rozdziałem chromatograficznym [36-37]. Wykorzystywanie procesów kompleksowania cząsteczek organicznych z metalami lub ich polimeryzacji czy uwadniania jest zagadnieniem złożonym, szczególnie gdy celem jest znalezienie kompleksów o znacząco różnej mobilności dla poszczególnych form chiralnych. W procesie przygotowania i optymalizacji takich metod mogą jednak być pomocne narzędzia bioinformatyczne do modelowania mobilności jonów [37].

LIPIDOMIKA

Wykorzystanie IMS w analizie lipidów pochodzących z próbek biologicznych daje, analogicznie do analiz metabolomicznych, możliwość anotacji większej liczby związków niż w przypadku standardowych analiz MS. Informacje na temat CCS dla lipidów pozwalają na ich dokładniejszą identyfikację, nawet w porównaniu do wielokrotnej analizy MS tej samej próbki przygotowanej wieloma metodami. Przykładowo, wykorzystanie analizatora TIMS dało możliwość zidentyfikowania nawet trzykrotnie większej liczby glicerofosfolipidów, w odniesieniu do wyników analiz MS bez mobilności jonów uzyskanych w łączonym badaniu wykorzystującym 8 różnych protokołów izolacji tej klasy lipidów [38]. W porównaniu z analizą standardowej próbki

lipidów przez 31 niezależnych laboratoriów, analiza TIMS umożliwiła uzyskanie czterokrotnie wyższej liczby zidentyfikowanych glicerofosfolipidów. Taka zależność nie jest jednak właściwa dla wszystkich klas lipidów. Sfingolipidy, których wydajna izolacja jest złożona, były zidentyfikowane w znacznie większej liczbie po zastosowaniu dedykowanej dla tej klasy lipidów metody przygotowania próbki, niż gdy wyizolowano je w sposób standardowy i analizowano z wykorzystaniem TIMS.

Warto jednak zauważyć, że w porównaniu z analizą małych cząstek organicznych, lipidy, ze względu na swoją łańcuchową strukturę, charakteryzują się obecnością licznych izomerów, których rozdział przez IMS może stanowić wydajną metodę analizy. Rodzaj obserwowanej izomerii odgrywa tutaj znaczną rolę – zdolność rozdzielcza dla izomerów Sn-pozycyjnych jest znacznie mniejsza niż dla izomerów konfiguracyjnych *cis/trans* czy izomerów konstytucyjnych, ze względu na umiejscowienie wiązania podwójnego [39]. Tak jak opisano wcześniej, stosowanie zaawansowanych metod kompleksowania cząsteczek z jonami metali może wpłynąć na znaczną zmianę mobilności lipidów, dzięki czemu rozdział izomerów staje się wydajniejszy [40]. Dalszy rozwój technologii i poprawa zdolności rozdzielczych w analizatorach IMS może w przyszłości pozwolić na zdecydowaną poprawę pokrycia lipidomu dla próbek biologicznych.

UWARUNKOWANIA ANALIZ MOBILNOŚCI JONÓW

ŁĄCZENIE IMS Z ANALIZATORAMI MAS

Choć analiza IMS może być prowadzona jako samodzielna technika analityczna, jest ona najczęściej dodatkowo łączona z analizatorami mas. Zastosowanie analizatorów działających w oparciu o inne właściwości fizykochemiczne jonów niż sama ich mobilność prowadzi do uzyskania wielowymiarowej przestrzeni danych, a jak opisano powyżej, ma to pozytywny wpływ na jakość i ilość uzyskiwanych identyfikacji. Jednakże łączenie wielu technik analitycznych wymaga dopasowania ich kompatybilności, szczególnie pod kątem cyklu pracy. Ma to wyjątkowe znaczenie w przypadku analizatorów IMS, na których wyjściu uzyskuje się pakiety jonów np. przy zastosowaniu komory dryfowej, czy TWIMS. Ustalanie rozkładu mas dla takich pakietów jest złożone, gdyż wymaga bardzo wysokiej szybkości pracy analizatora MS. Standardowo, IMS łączone jest więc z wysokorozdzielczymi analizatorami czasu przelotu (ang. *Time-of-Flight*, TOF), których zakres dynamiczny jest bardzo szeroki i pulsacyjne dostarczanie jonów nie musi wiązać się z utratą sygnału. Z drugiej jednak strony, analizatory innego typu, takie jak Orbitrap charakteryzują się znacznie większą rozdzielczością niż TOF, szczególnie w niskim zakresie mas, a warunki środowiskowe mają niewielki wpływ na parametry ich pracy (TOF – analizator mierzący czas przelotu jonu po jego przyspieszeniu w polu elektrycznym, pozwala określić wartość *m/z* jonów ze względu na ich różną energię kinetyczną; Orbitrap jest rodzajem pułapki jonowej wylapującej jony w ruchu orbitalnym, prąd pochodzący od uwieczonych jonów jest wykrywany i przekształcany w widmo masowe poprzez zastosowanie transformaty Fouriera). Ponieważ analizatory Orbitrap nie są jednak w stanie przeanalizować pakietów z akceptowalną rozdzielczością,

historycznie ich połączenie z IMS wiązało się z bardzo niskim cyklem pracy rzędu 1%, podczas gdy dla analizatorów typu TOF mógł on wynosić nawet 25% [41]. Ciągły rozwój technologiczny pozwolił obecnie na stworzenie m.in. analizatora IMS opartego o pułapkowanie jonów, takiego jak TIMS, którego cykl pracy wynosi teoretycznie nawet 100%. Warto jednak zauważyć, iż elucja jonów z analizatora TIMS prowadzona jest pulsacyjnie, stąd zastosowanie TOF nadal jest uzasadnione. Badania z wykorzystaniem FAIMS nie są obciążone problemami związanymi z analizą pakietów jonów i dlatego może on być swobodnie łączony np. z analizatorami kwadrupolowymi czy typu Orbitrap. Jak opisano wcześniej, FAIMS można traktować jak „filtr jonów”, a więc wszystkie jony których mobilność nie jest dopasowana do parametrów pracy FAIMS zostają odrzucone. Choć wiąże się to ze znaczną poprawą stosunku sygnału do szumu, to część potencjalnie mierzalnego sygnału zostaje bezpowrotnie utracona. Mając powyższe na uwadze, znajomość technicznych możliwości połączenia różnych typów analizatorów IMS i MS jest więc kluczowa, gdy celem jest uzyskanie maksymalnie dużej liczby identyfikacji i analizy ilościowej opartej o wysokiej jakości widma MS.

WZBOGACANIE GAZÓW UŻYWANYCH W ANALIZATORACH IMS

Analiza mobilności jonów najczęściej opiera się na wykorzystaniu neutralnego gazu, którego przepływ stanowi siłę przeciwną do gradientu pola elektromagnetycznego. Oddziaływanie jonów z obojętnymi cząsteczkami spowalnia ich ruch, a więc działanie analizatora IMS w dużej mierze jest zależne od tego jaki gaz zastosowano. Ze względów praktycznych w tej roli wykorzystuje się zwykle powietrze lub czysty azot. Warto jednak zauważyć, że inne gazy, ich mieszanki lub pary substancji lotnych również mogą być użyte, a często prowadzi to do poprawy działania analizatora. Przykładowo, w badaniu rozdziału kortykosteronu i 21-deoksokortyzolu mieszanina dwutlenku węgla z powietrzem w stosunku 55:45 umożliwiła uzyskanie lepszego rozdziału niż było to możliwe przy zastosowaniu jedynie czystego powietrza czy dwutlenku węgla [42]. Nie jest to jednak zależność uniwersalna, stąd w tym samym badaniu rozdział pomiędzy kwasem cytrynowym a izocytrynowym nie był już możliwy. Gazy używane w IMS są obojętne, ale mogą się różnić swoją polarnością, a więc oddziaływania między gazem a rozdzielanymi izomerami również będą się różnić. Jeśli interakcje pomiędzy formami izomerycznymi są wystarczająco zmienne, prowadzi to do poprawy zdolności rozdzielczych analizatora. Stosowanie par substancji lotnych stanowi kolejną technikę w separacji związków o zbliżonej strukturze. Ta metoda wykorzystuje zjawisko grupowania się cząsteczek lotnego „modyfikatora” zawartego w gazie wraz z substancją badaną. Wiązanie się z parami substancji organicznych może być selektywnie preferowane w zależności od izomeru, stąd poprawa zdolności rozdzielczej IMS jest oczekiwana. Na przykład, korzystając z niewielkich ilości chiralnego modyfikatora jakim jest 2-butanol, możliwe było rozdzielenie enancjomerów metioniny czy tryptofanu [43]. Mając więc na uwadze konkretne zastosowanie, optymalizacja składu gazu i jego dodatków może poprawiać lub wręcz umożliwiać działanie analizatorów IMS.

PODSUMOWANIE

Wykorzystanie analizy mobilności jonów w badaniach multi-omicznych stanowi dodatkowy wymiar separacji, co wiąże się ze znaczną poprawą w jakości i ilości identyfikowanych związków. Współczesne metody IMS charakteryzują się znaczną zdolnością rozdzielczą i mogą osiągać cykl pracy nawet na poziomie 100%. Ponadto podnoszą one stosunek sygnału do szumu dla badanych związków. Rozdział na podstawie mobilności jonów odbywa się w przeciągu milisekund, co w porównaniu ze standardowymi rozdzielaczami chromatograficznymi stanowi znaczne przyspieszenie. Nie jest też wymagane specjalne przygotowanie próbki, a analiza IMS jest bezpośrednio połączona z MS, dlatego nie musi wiązać się z utratą większych ilości analizowanego materiału. Z drugiej strony, nie każdy analizator posiada te same właściwości i jego wykorzystanie wymaga wiedzy na temat możliwości technicznych oraz optymalizacji warunków jego pracy. W niektórych przypadkach zdolności rozdzielcze nawet najnowocześniejszych analizatorów IMS nie są wystarczające by uzyskać zadowalające wyniki. Mimo to, możliwe jest zaawansowane modyfikowanie warunków pracy analizatora celem uzyskania akceptowalnych rezultatów. Dlatego też, szczególnie wraz z rozwojem zaawansowanych technik MS, IMS stanowić będzie istotne narzędzie w analizie białek, metabolitów, czy lipidów.

PIŚMIENNICTWO

- McDaniel EW, Martin DW (1960) Drift Tube-Mass Spectrometer for Studies of Thermal-Energy Ion-Molecule Reactions. Technical Report No. 3; AFOSR-TN-60-661; Project No. A-251; Georgia Inst. of Tech., Atlanta. Engineering Experiment Station
- Karpas Z, Berant Z, Shahal O (1989) Effect of Temperature on the Mobility of Ions. *J Am Chem Soc* 111: 6015-6018
- Tabrizchi M (2004) Temperature Effects on Resolution in Ion Mobility Spectrometry. *Talanta* 62: 65-70
- 6560 Ion Mobility QTOF LC/MS | Agilent. <https://www.agilent.com/en/product/liquid-chromatography-mass-spectrometry-lc-ms/lc-ms-instruments/quadrupole-time-of-flight-lc-ms/6560-ion-mobility-lc-q-tof> (accessed 2024-01-29)
- IMS-TOF - Analysis of isomers, protein conformers, and lipids. TOFWERK. <https://www.tofwerk.com/products/ims-tof/> (accessed 2024-01-29)
- Compact Ion Mobility MS MC3100 | Excellims. <https://excellims.com/products/Compact-ion-mobility-mass-spectrometry-MC3100> (accessed 2024-01-29)
- Bruker Daltonik GmbH. TimsTOF Pro. The new standard for high speed, high sensitivity shotgun proteomics. http://bruker.poznan.pl/wp-content/uploads/2018/12/brochure_timsTOF_Pro.pdf (accessed 2023-12-19)
- timsTOF Pro 2. <https://www.bruker.com/pl/products-and-solutions/mass-spectrometry/timstof/timstof-pro-2.html> (accessed 2024-01-29)
- timsTOF SCP. <https://www.bruker.com/pl/products-and-solutions/mass-spectrometry/timstof/timstof-scp.html> (accessed 2024-01-29)
- Kolakowski BM, Mester Z (2007) Review of Applications of High-Field Asymmetric Waveform Ion Mobility Spectrometry (FAIMS) and Differential Mobility Spectrometry (DMS). *The Analyst* 132: 842
- Thermo Fisher Scientific Inc. Reveal What Matters with Effortless Selectivity. Thermo Scientific FAIMS Pro Interface., 2019
- Thermo Fisher launches new differential ion mobility interface. *Analytical Science News*. <https://analyticalscience.wiley.com/do/10.1002/was.0110287/> (accessed 2024-02-08)

13. Sciex. A New Dimension in Selectivity. SCIE X SelexION Differential Mobility Spectrometry, 2022
14. Edge A, Toutoungi D Owlstone Medical. An Introduction to Ion Mobility Spectrometry with ultraFAIMS
15. FAIMS Pre-Separation Stages for Greater Specificity. Heartland Mass Spectrometry, 2017
16. Shvartsburg AA, Smith RD (2008) Fundamentals of Traveling Wave Ion Mobility Spectrometry. *Anal Chem* 80: 9689–9699
17. Giles K, Ujma J, Wildgoose J, Pringle S, Richardson K, Langridge D, Green MA (2019) Cyclic Ion Mobility-Mass Spectrometry System. *Anal Chem* 91: 8564–8573
18. SYNAPT XS High Resolution Mass Spectrometer | Waters. https://www.waters.com/waters/en_US/SYNAPT-XS-High-Resolution-Mass-Spectrometer/nav.htm?locale=-&cid=135020928 (accessed 2024-02-09)
19. SELECT SERIES Cyclic IMS ion mobility mass spectrometer | Waters. https://www.waters.com/waters/en_US/SELECT-SERIES-Cyclic-IMS-ion-mobility-mass-spectrometer/nav.htm?locale=-&cid=135021297 (accessed 2024-02-09)
20. Dodds JN, May JC, McLean JA (2017) Correlating Resolving Power, Resolution and Collision Cross Section: Unifying Cross Platform Assessment of Separation Efficiency in Ion Mobility Spectrometry. *Anal Chem* 89: 12176–12184
21. Montero-Calle A, Garranzo-Asensio M, Rejas-González R, Feliu J, Mendiola M, Peláez-García A, Barderas R (2023) Benefits of FAIMS to Improve the Proteome Coverage of Deteriorated and/or Cross-Linked TMT 10-Plex FFPE Tissue and Plasma-Derived Exosomes Samples. *Proteomes* 11: 35
22. Hebert AS, Prasad S, Belford MW, Bailey DJ, McAlister GC, Abbatiello SE, Huguet R, Wouters E R, Dunyach J-J, Brademan DR, Westphall MS, Coon JJ (2018) Comprehensive Single-Shot Proteomics with FAIMS on a Hybrid Orbitrap Mass Spectrometer. *Anal Chem* 90: 9529–9537
23. Sweet S, Chain D, Yu W, Martin P, Rebelatto M, Chambers A, Cecchi F, Kim Y J (2022) The Addition of FAIMS Increases Targeted Proteomics Sensitivity from FFPE Tumor Biopsies. *Sci Rep* 12: 13876
24. Meier F, Park MA, Mann M (2021) Trapped Ion Mobility Spectrometry and Parallel Accumulation–Serial Fragmentation in Proteomics. *Mol Cell Proteomics MCP* 20: 100138
25. Brzhozovskiy A, Kononikhin A, Bugrova AE, Kovalev GI, Schmit P-O, Kruppa G, Nikolaev EN, Borchers CH (2022) The Parallel Reaction Monitoring-Parallel Accumulation–Serial Fragmentation (Prm-PASEF) Approach for Multiplexed Absolute Quantitation of Proteins in Human Plasma. *Anal Chem* 94: 2016–2022
26. Guergues J, Wohlfahrt J, Stevens SM Jr (2022) Enhancement of Proteome Coverage by Ion Mobility Fractionation Coupled to PASEF on a TIMS–QTOF Instrument. *J Proteome Res* 21: 2036–2044
27. Shliaha PV, Bond NJ, Gatto L, Lilley KS (2013) Effects of Traveling Wave Ion Mobility Separation on Data Independent Acquisition in Proteomics Studies. *J Proteome Res* 12: 2323–2339
28. Haynes SE, Polasky DA, Dixit SM, Majmudar JD, Neeson K, Ruotolo BT, Martin BR (2017) Variable-Velocity Traveling-Wave Ion Mobility Separation Enhancing Peak Capacity for Data-Independent Acquisition Proteomics. *Anal Chem* 89: 5669–5672
29. Dwivedi P, Schultz AJ, Herbert HH (2010) Metabolic Profiling of Human Blood by High-Resolution Ion Mobility Mass Spectrometry (IM-MS). *Int J Mass Spectrom* 298: 78–90
30. Paglia G, Williams JP, Menikarachchi L, Thompson JW, Tyldesley-Worster R, Halldórsson S, Rólfsson O, Moseley A, Grant D, Langridge J, Palsson BO, Astarita G (2014) Ion Mobility Derived Collision Cross Sections to Support Metabolomics Applications. *Anal Chem* 86: 3985–3993
31. Groessl M Resolving Isomeric Metabolites Using High Resolution IMS-MS. TOFWERK. <https://www.tofwerk.com/resolving-isomeric-metabolites-using-high-resolution-ims-ms/> (accessed 2024-02-13)
32. Werres T, Leonhardt J, Jäger M, Teutenberg T (2019) Critical Comparison of Liquid Chromatography Coupled to Mass Spectrometry and Three Different Ion Mobility Spectrometry Systems on Their Separation Capability for Small Isomeric Compounds. *Chromatographia* 82: 251–260
33. de Bruin CR, Hennebelle M, Vincken J-P, de Bruijn WJC (2023) Separation of Flavonoid Isomers by Cyclic Ion Mobility Mass Spectrometry. *Anal Chim Acta* 1244: 340774
34. Chalet C, Hollebrands B, Janssen H-G, Augustijns P, Duchateau G (2018) Identification of Phase-II Metabolites of Flavonoids by Liquid Chromatography-Ion-Mobility Spectrometry-Mass Spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 410: 471–482
35. Carnevale Neto F, Clark TN, Lopes NP, Linington RG (2022) Evaluation of Ion Mobility Spectrometry for Improving Constitutional Assignment in Natural Product Mixtures. *J Nat Prod* 85: 519–529
36. Oranzi N R, Polfer NC, Lei J, Yost RA (2018) Influence of Experimental Conditions on the Ratio of 25-Hydroxyvitamin D3 Conformers for Validating a Liquid Chromatography/Ion Mobility-Mass Spectrometry Method for Routine Quantitation. *Anal Chem* 90: 13549–13556
37. Chouinard CD, Cruzeiro VWD, Roitberg AE, Yost RA (2017) Experimental and Theoretical Investigation of Sodiated Multimers of Steroid Epimers with Ion Mobility-Mass Spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom* 28: 323–331
38. Vasilopoulou CG, Sulek K, Brunner A-D, Meitei NS, Schweiger-Hufnagel U, Meyer SW, Barsch A, Mann M, Meier F (2020) Trapped Ion Mobility Spectrometry and PASEF Enable In-Depth Lipidomics from Minimal Sample Amounts. *Nat Commun* 11: 331
39. Tu J, Zhou Z, Li T, Zhu ZJ (2019) The Emerging Role of Ion Mobility-Mass Spectrometry in Lipidomics to Facilitate Lipid Separation and Identification. *TrAC Trends Anal Chem* 116: 332–339
40. Zandkarimi F, Brown LM (2019) Application of Ion Mobility Mass Spectrometry in Lipidomics. *Adv Exp Med Biol* 1140: 317–326
41. Poltash ML, McCabe JW, Shirzadeh M, Laganowsky A, Russell DH (2020) Native IM-Orbitrap MS: Resolving What Was Hidden. *Trends Anal Chem* 124: 115533
42. Kaszycki JL, La Rotta A, Colsch B, Fenaille F, Dauly C, Kamleh A, Wu C (2019) Separation of Biologically Relevant Isomers on an Orbitrap Mass Spectrometer Using High-Resolution Drift Tube Ion Mobility and Varied Drift Gas Mixtures. *Rapid Commun Mass Spectrom* 33: 3–10
43. Dwivedi P, Wu C, Hill HH (2006) Gas Phase Chiral Separations By Ion Mobility Spectrometry. *Anal Chem* 78: 8200–8206

Ion Mobility Mass Spectrometry in Multi-omics Studies

Daniel Fochtman✉, Anna Wojakowska, Łukasz Marczak

Laboratory of Mass Spectrometry, Institute of Bioorganic Chemistry Polish Academy of Sciences, Poznań, Poland

✉corresponding author: dfochtman@ibch.poznan.pl

Key words:

ABSTRACT

Mass spectrometry (MS) as an analytical technique enables the identification and quantitative determination of proteins, metabolites, or lipids in a studied sample. However, this method has limitations regarding the number of molecules that can be identified at a given time. To increase the number of identifications, the application of ion mobility spectrometry (IMS) can be employed. This technique allows the separation of ions based on their mobility while traversing the analyser in a gradient of an electromagnetic field and opposing gas pressure. The separation is performed in conjunction with MS analysis, adding another dimension to the analysis, resulting in a significant improvement in the number of identified compounds and a reduction in noise. Alternatively, while maintaining the same number of identifications, analysis can be performed in a shorter time period. It is crucial to pay special attention to the type of IMS analyser used, as its specific implementation dictates further stages of analysis and ion detection capabilities.

