

# Primjena desorpcije i ionizacije elektroraspršenjem u spektrometriji masa

## Desorption electrospray ionization application in mass spectrometry

Nenad Benčić<sup>1</sup>, Mario Cindrić<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Pliva Istraživanje i razvoj, Pliva, Zagreb

<sup>2</sup> Institut "Ruđer Bošković",  
Zavod za molekularnu medicinu, Zagreb

Primljeno: 19. 11. 2008.

Prihvaćeno: 13. 1. 2009.

**SAŽETAK.** Desorpcija i ionizacija elektroraspršenjem (DESI) tehnika je ionizacije uzorka kod koje se kao detektor najčešće upotrebljava spektrometar masa. Koristi se kao ionski izvor pri atmosferskom tlaku za ionizaciju plinova, tekućina i krutina pri ambijentalnim uvjetima. Zbog svojih karakteristika, a u sprezi sa spektrometrijom masa, svrstava se u visokofrekventne instrumentalne tehnike, što joj osigurava široku analitičku primjenu u analizi peptida i proteina, identifikaciji mikroorganizama, molekularnom oslikavanju bioloških tkiva, detekciji droga i eksploziva iz otisaka prstiju, identifikaciji metabolita, zagađenju namirnica i otkrivanju prirodnih spojeva.

**Ključne riječi:** desorpcija i ionizacija elektroraspršenjem (DESI), ionski izvor, spektrometrija masa

**ABSTRACT.** Desorption electrospray ionization (DESI) is an ionization technique for analysis in mass spectrometry. It is used as ion source at atmospheric pressure for ionization of gases, liquids and solids at ambient conditions. Because of its characteristics, when coupled to mass spectrometer, as a high throughput instrumental technique, it can be applied for various analytical purposes such as peptide and protein analysis, microorganism identification, biological tissues imaging, detection of drugs and explosives in latent fingerprints, metabolite identification, food pollutants monitoring and natural compounds characterization.

**Key words:** Desorption electrospray ionization (DESI), ion source, mass spectrometry

Adresa za dopisivanje:

\* Dr. sc. Mario Cindrić,  
Institut "Ruđer Bošković",  
Zavod za molekularnu medicinu,  
Laboratorij za sistemsku biomedicinu,  
Planinska 1, 10 000 Zagreb  
e-mail: mcindric@irb.hr

<http://hrcak.srce.hr/medicina>

## UVOD

Spektrometrija masa (MS) instrumentalna je analitička tehnika kojom se može odrediti elementarna kompozicija uzorka ili molekule. Može se koristiti i kao tehnika koja omogućava kvantifikaciju u većini slučajeva prethodno potpuno određenih kemijskih struktura. Princip rada MS-a sastoji se od desorpcije i ionizacije spojeva, analize njihovog omjera mase i naboja u analizatoru masa te detekcije i obrade podataka<sup>1</sup>. Ionizacija uzoraka može se provoditi pod vakuumom ili pri atmosferskom tlaku. Jedna od novijih tehnika za ionizaciju uzoraka pri atmosferskom tlaku jest desorpcija i ionizacija elektroraspršenjem, za koju koristimo međunarodno prihvaćenu skraćenicu DESI<sup>2</sup>.

## VRSTE IONSKIH IZVORA

Ionski izvori služe za ionizaciju kemijskih spojeva. U spektrometriji masa uzorak nakon ionizacije ulazi u analizator masa. Postoji više različitih izvedbi ionskih izvora. Neke od njih su:

1. Desorpcija poljem (engl. *Field desorption*, FD)
2. Desorpcija i ionizacija elektroraspršenjem (engl. *Desorption electrospray ionization*, DESI)
3. Direktna analiza u realnom vremenu (engl. *Direct analysis in real time*, DART)
4. Ionizacija elektroraspršenjem (engl. *Electrospray ionization*, ESI)
5. Fotoionizacija pri atmosferskom tlaku (engl. *Atmospheric pressure photoionization*)
6. Ionizacija električkim pražnjenjem (engl. *Glow discharge*)
7. Induktivno spregnuta plazma (engl. *Inductively coupled plasma*, ICP)
8. Ionizacija elektronima (engl. *Electron ionization*, EI)
9. Ionizacija prihvatom iona (engl. *Ion-attachment ionization*)
10. Ionizacija iskrom (engl. *Spark ionization*)
11. Kemijska ionizacija (engl. *Chemical ionization*, CI)
12. Kemijska ionizacija pri atmosferskom tlaku (engl. *Atmospheric pressure chemical ionization*, APCI)
13. Matricom pomognuta laserska desorpcija i ionizacija (engl. *Matrix-assisted laser desorption/ionization*, MALDI)
14. Matricom pomognuta laserska desorpcija i ionizacija elektroraspršenjem (engl. *Matrix-assisted laser desorption electrospray ionization*, MALDESI)
15. Mikrovalno inducirana plazma (engl. *Microwave induced plasma*)
16. Ionizacija termoraspršenjem (engl. *Thermospray ionization*)
17. Udar ubrzanim atomima (engl. *Fast atom bombardment*, FAB)
18. Ionizacija nadzvučnim raspršenjem (engl. *Sonic spray ionization*)

Jedna od novijih tehnika za ionizaciju uzoraka pri atmosferskom tlaku jest desorpcija i ionizacija elektroraspršenjem (DESI). Tehnika DESI može se koristiti u raznim granama analitike poput analize peptida i proteina, intaktnih mikroorganizama, u slikovnom prikazu tkiva, identifikaciji metabolita, zagađenju namirnica bakterijama, detekciji kvarenja mesa, određivanju zagađivača na ljudskoj koži, detekciji eksploziva i otkrivanju prirodnih spojeva.

## DESORPCIJA I IONIZACIJA ELEKTROASPRŠENJEM

Desorpcija i ionizacija elektroraspršenjem (engl. *Desorption electrospray ionization*, DESI) je tehnika ionizacije površinskog sloja uzorka koja se najčešće koristi u sprezi sa spektrometrom masa. Koristi se kao ionski izvor pri atmosferskom tlaku za ionizaciju plinova, tekućina i krutina pri ambijentalnim uvjetima. Postoje dvije različite izvedbe izvora iona DESI, a to su klasična izvedba DESI s nepropusnim krutim nosačem, te novije razvijena tekućinska izvedba DESI kod koje je nosač uzorka porozna površina do koje se tekući uzorak kontinuirano dovodi.

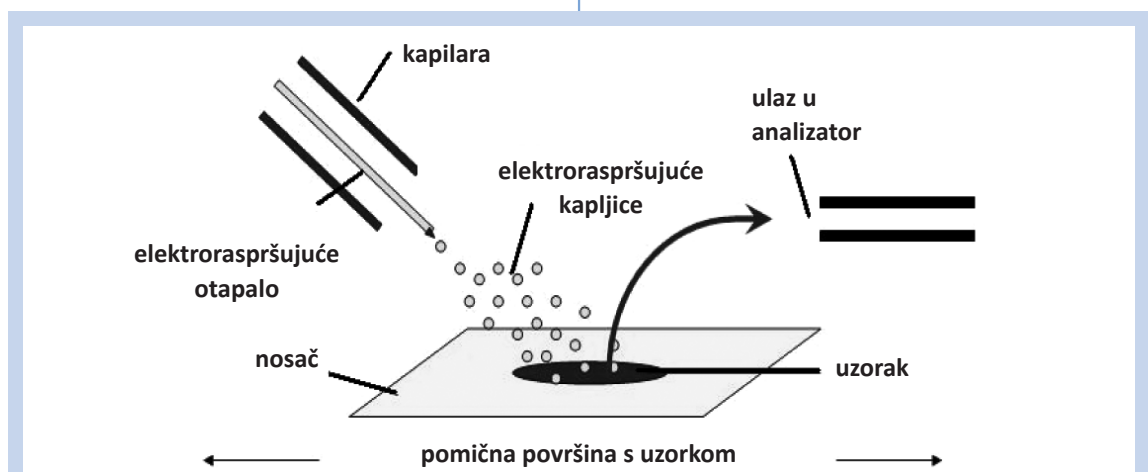
## KLASIČNA DESORPCIJA I IONIZACIJA ELEKTROASPRŠENJEM

Kod klasične desorpcije i ionizacije elektroraspršenjem kruti uzorci se nanose na nosač prije desorpcije, tekući uzorci se pak osuše na nosaču, dok se plinovi adsorbiraju na nosač<sup>2</sup>. Sama desorpcija i ionizacija elektroraspršenjem provodi se tako da se električno nabijena maglica elektroraspršenog ota-

pala usmjerava prema površini nosača na kojoj je nanesen uzorak<sup>3</sup>. Maglica se stvara od desorbiranog uzorka i plina, a plinovi koji se u tu svrhu koriste najčešće su dušik ili zrak<sup>4</sup>. Maglica elektroraspršenog otapala privlači se na površinu primjenom napona na nosač uzorka<sup>3</sup>. DESI je moguće primijeniti na vodljivim i izolatorskim nosačima, na nepolarnim nosačima poput alkaloida<sup>2,5</sup> te na polarnim nosačima poput proteina i peptida. Nosač uzorka može biti metalan, polimeran ili pak mineralna površina<sup>2</sup>. Promjene u sastavu elektroraspršujućeg otapala mogu se iskoristiti za selektivnu ionizaciju pojedinih spojeva u analitu te tako pospješiti detekciju ciljanih spojeva<sup>2</sup>. Udar nabijene mikrokapljice otapala na površinu uzorka proizvodi plinovite ione analita koji se stvaraju na površini nosača. Rezultirajući spektri masa gotovo su istovjetni onima dobivenim ionizacijom elektroraspršenjem tako da se uglavnom detektiraju jednostruko ili višestruko nabijeni molekularni ioni analita<sup>2</sup>. Nakon ionizacije, ioni analita putuju kroz zrak u sučelje pri atmosferskom tlaku, koje je spojeno sa spektrometrom masa (slika 1)<sup>3</sup>. Kod procesa DESI postoje dva mehanizma ionizacije analita. Kod molekula većih molekulske mase ionizacija se događa u plinskom stanju, dok se ionizacija kod molekula manjih molekulske mase odvija mehanizmom prijenosom naboja<sup>3</sup>. Spektri masa molekula većih molekulske mase poput peptida i proteina najviše nalikuju spektrima masa dobivenih ionizacijom elektroraspršenjem s karakterističnom raspodjelom višestruko nabijenih iona. To ukazuje na mehanizam desorpcije i ionizacije analita, gdje višestruko nabijena kapljica

elektroraspršujućeg otapala otapa analit. Nakon otapanja analita čestice otapala odbijaju se od površine uzorka na nosaču prema ulazu u spektrometar masa<sup>3</sup>. Na putu prema spektrometru masa kapljica se dodatno desolvatira i ionizira u plinskom stanju što uvjetuje višestruki naboj detektiranih iona<sup>6</sup>. Za molekule malih molekulske mase, ionizacija se zbiva mehanizmom prijenosa naboja elektrona ili protona. Postoje tri mogućnosti prijenosa naboja koje uključuju prijenos između iona otapala i analita na površini, prijenos između iona u plinskoj fazi i analita na površini, te prijenos između iona u plinskoj fazi i molekule analita u plinskoj fazi<sup>2</sup>. Mikrokapi elektroraspršujućeg otapala koje udaraju u površinu uzorka imaju prosječnu brzinu od  $120 \text{ ms}^{-1}$  i promjer  $2 - 4 \text{ }\mu\text{m}$ . Te brzine su u većini materijala manje od brzine zvuka, što sprječava mogućnost ionizacije stvaranjem udarnog vala koji nastaje pri brzini zvuka ili iznad nje. Neke mikrokapi se ne odbijaju direktno od površine već se neko vrijeme zadržavaju na površini uzorka. To produžava vrijeme kontakta između kapi i uzorka, povećavajući količinu analita koji se može otopiti s površine u električki nabijene kapi koje dalje putuju prema MS izvoru. Taj fenomen utječe na poboljšanu detekciju analita<sup>6</sup>.

Iskoristivost procesa otapanja i dosega iona koji ulaze u maseni spektrometar ovisi o tlaku i magličanju plina, protoku otapala i udaljenosti vrha raspršivača od ulaza u polje niskog tlaka. Optimizacijom tih parametara može se poboljšati analitički signal uzorka<sup>7</sup>.



**Slika 1.** Shematski prikaz uređaja za desorpciju i ionizaciju elektroraspršenjem (DESI)

**Figure 1.** Schematic diagram of the Desorption electrospray ionization (DESI) ion source

## TEKUĆINSKA DESORPCIJA I IONIZACIJA ELEKTROASPRŠENJEM

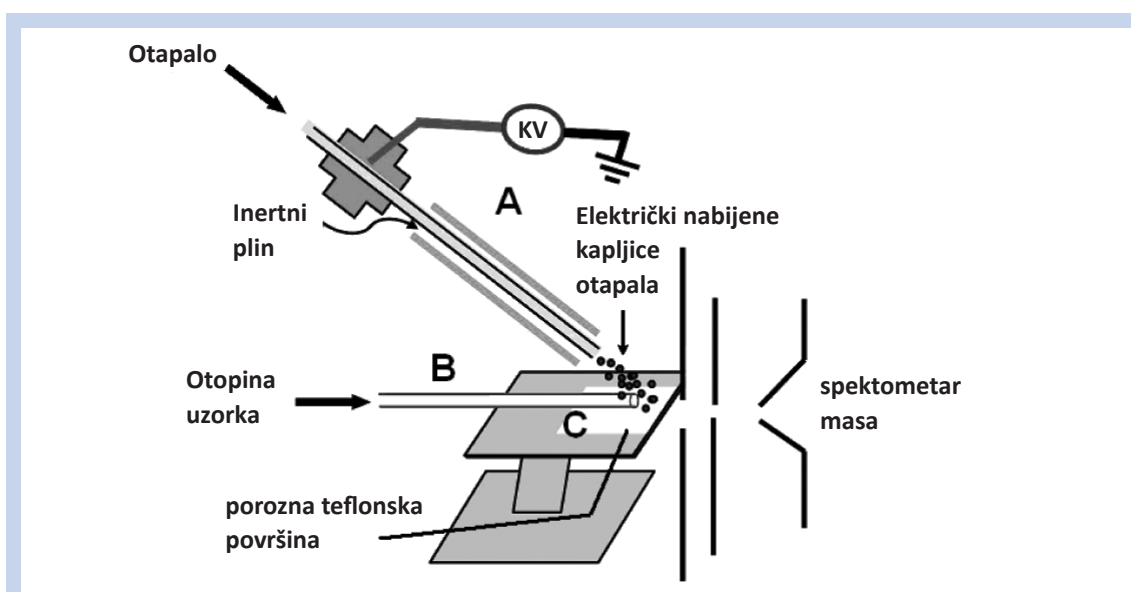
Tijekom analize DESI-MS kruti uzorci na površini nosača desorbiraju se i ioniziraju, dok se tekući uzorci najčešće suše na površini nosača na zraku prije desorpcije i ionizacije. Razlog tome je mogućnost trenutačnog otpuhivanja tekućeg uzorka s površine nosača strujom inertnog plina koji se koristi za stvaranje nabijenih mikrokapljica. Posljedica toga bila bi prekratko trajanje rezultirajućeg signala iona, u slučaju da je signal uopće bio detektiran. Zbog toga je razvijena specifična metoda tekućinske desorpcije i ionizacije elektroraspršenjem koja se koristi za direktnu analizu tekućih uzoraka. U toj se metodi tekući uzorak nanosi na pamučnu vatu, filtrirni papir ili poroznu teflonsku površinu. Uzorak za analizu se kontinuirano dovodi do porozne površine kroz silikatnu kapilaru injekcijskom iglom ili crpkom (slika 2)<sup>4</sup>. Zatim se analiza provodi kao i klasična analiza DESI. Ionizacija analita potječe od interakcije nabijenih mikrokapljica i kapljica tekućih uzoraka koje izlaze iz silikatne kapilare. Spajanjem nabijenih elektroraspršenih mikrokapljica i nenabijenih kapljica s uzorkom stvara sekundarno nabijene kapljice koje sadrže analit. Te se kapljice dodatno desolvatiraju što u konačnici vodi k ionizaciji<sup>4</sup>.

Prednosti analize tekućih uzoraka uz pomoć tekućinske DESI u odnosu na klasičnu DESI vidljive su najviše pri analizi bioloških uzoraka poput krvi i urina koji se nalaze u tekućem obliku. Direktna analiza bez sušenja uzoraka na površini poželjna je jer omogućava određivanje uzoraka iz njihovog nativnog okruženja. To može daljnje ubrzati frekvenciju analiza jer se umanjuju aktivnosti oko pripreme uzoraka prije analize DESI-MS. Tekućinska DESI omogućava povezivanje s analitičkim uređajima poput elektrokemijskih ćelija ili pak povezivanje sa separacijskim tehnikama poput tekućinske kromatografije, što u konačnici širi analitičku primjenjivost analiza DESI<sup>4</sup>.

## PRIMJENA ANALIZA DESI

### PRIMJENA DESI KOD ANALIZE PROTEINA I PEPTIDA

DESI je u početnim istraživanjima primjene bila ispitana na modelu analize osušenih krutih uzoraka proteina. Takva analiza bila je ograničena na proteine s molekulskom masom manjom od 25 kDa. Koristeći DESI-MS za direktnu analizu tekućih uzoraka, proteini s molekulskom masom do 65 kDa mogu se uspješno ionizirati iz otopine, te analizirati kao niz višestruko nabijenih iona. U ko-



**Slika 2.** Shematski prikaz aparature DESI-MS za direktnu analizu tekućih uzoraka: A Izvor elektroraspršujućeg otapala; B Uvođenje uzorka kroz silikatnu kapilaru (ova kapilara se može zamijeniti injekcijskom špricom); C Porozna teflonska površina

**Figure 2.** Schematic diagram of the DESI-MS apparatus for the direct analysis of liquid samples: A Electro spray solvent ion source; B Sample introduction silica capillary (this capillary can be replaced by a syringe needle); C Porous teflon surface

načnici, masa im se može odrediti nakon dekonvolucije višestruko nabijenih iona<sup>4</sup>.

Mogućnost desorpcije i ionizacije velikih proteina iz otopina tekućinskom DESI vjerojatno proizlazi iz manjih interakcija među proteinima u razrijeđenoj otopini u usporedbi s interakcijama u osušanim proteinima na nosaču. Poznato je kako se kod visokih koncentracija proteina može dogoditi agregacija zbog hidrofobno hidrofobnih ili kovalentnih intermolekularnih interakcija. To može voditi do značajnih strukturalnih promjena prote-

U budućnosti je moguća upotreba tehnike DESI u *in vivo* kliničkim analizama te u prijenosnim spektrometrima masa jednostavne i nezahtjevne primjene. Na taj bi se način omogućilo jednostavnije korištenje spektrometrije masa za dijagnostičke svrhe u bolnicama.

ina. Agregirani proteini, posebno visoke molekulske mase, teško se desorbiraju s površine. Mogućnost ioniziranja proteina velike molekulske mase iz otopine bez mogućnosti stvaranja neželjenih agregata s DESI-MS može u perspektivi imati veliki potencijal u biološkim analizama<sup>4</sup>.

Kod DESI-MS analiza proteina koji su iz otopine pripremljeni digestijom, analizu je moguće provesti bez kromatografskog odvajanja, čišćenja uzoraka i sušenja. To znatno pojednostavljuje laboratorijski rad kod pripreme uzoraka. Moguća je direktna tekućinska analiza DESI-MS bioloških tekućina poput, primjerice, nerazrijeđenog urina ili

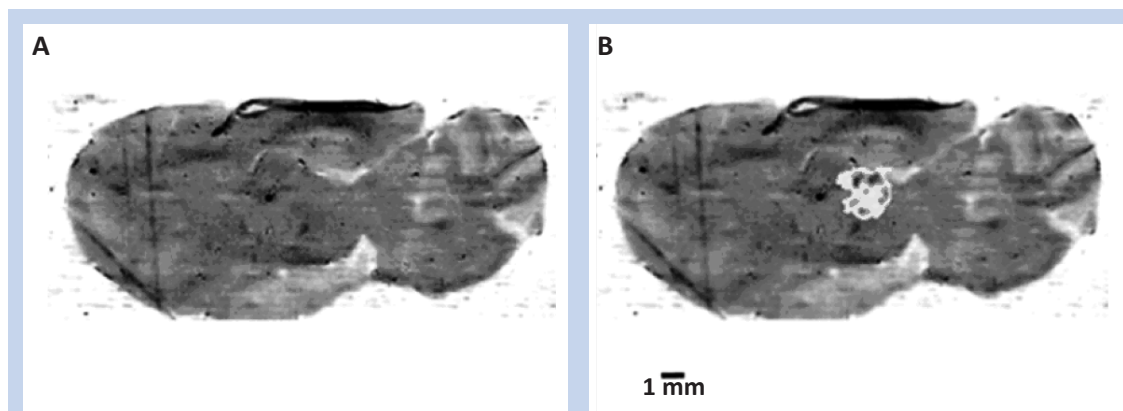
seruma. Razlog tome jest tolerancija tekućinske DESI na visoku koncentraciju soli u uzorku<sup>4</sup>.

#### PRIMJENA DESI KOD ANALIZE MIKROORGANIZAMA

DESI omogućuje direktnu analizu mikroorganizama uz pomoć MS u njihovom ambijentalnom okruženju. Spektri masa mikroorganizama dobiveni tehnikom DESI visoko su ponovljivi. Razlog visoke ponovljivosti spektara masa jest u načinu njihova dobivanja iz nativnih organizama, koji prije analize nisu tretirani nikakvim reagensijama ili podvrgnuti fizikalnim procesima koji ih mogu nepovratno izmijeniti. Izostanak degradirajućih procesa svodi razlike među dobivenim spektrima na minimum. Osim identifikacije vrste mikroorganizama, moguća je i njihova subkvalifikacija<sup>8</sup>.

#### PRIMJENA DESI U ANALIZI LIJEKOVA I NJIHOVIH METABOLITA U UZORCIMA BIOLOŠKIH TKIVA TEHNIKOM MOLEKULARNOG OSLIKAVANJA

Određivanje lijekova i njihovih metabolita tehnikom LC-MS/MS u uzorcima tkiva zahtijeva složenu i dugotrajnu pripremu uzoraka. Priprema uzorka uključuje homogenizaciju i ekstrakciju analita iz tkiva što onemogućava dobivanje detaljnijih histoloških informacija o distribuciji ili lokalizaciji lijekova i njihovih metabolita u tkivu. Nadalje, DESI omogućava direktnu, istovremenu analizu i vizualizaciju lijekova i njihovih metabolita u tkivima bez potrebe za kemijskim ili radiološkim označavanjem tkiva. DESI se u tom slučaju koristi kao tehnika mo-



**Slika 3.** A Slika reza mozga štakora prije administracije lijeka; B Preklopljena slika A i MS slika zastupljenosti lijeka (Klozapina) dobivena tehnikom molekularnog oslikavanja

**Figure 3.** A Optical image of rat brain section before drug administration B Overlaid image A and MS image of drug distribution (Clozapine) by molecular imaging technique

lekularnog oslikavanja. Skeniranje površine uzorka provodi se tokom nabijenih mikrokapljica. Molekularne slike stvaraju se prikazom intenziteta jednog ili više ionskih signala dobivenih s površine kao funkcija rasprostranjenosti na toj površini. Skeniranje se odvija u jednom smjeru konstantnom brzinom. Kao primjer prikazana je optička slika reza mozga štakora te preklapljena optička i DESI MS slika rasprostranjenosti neuroleptika Klozapina u rezu mozga štakora (slika 3)<sup>9</sup>.

Vrijeme potrebno za analizu tkiva tehnikom molekularnog oslikavanja ovisi o površini koja se treba analizirati te o željenoj rezoluciji. Analiza reza organskog tkiva DESI-MS pri rezoluciji od 250  $\mu\text{m}$  traje u ovisnosti o vrsti analize, između 30 minuta i 2 sata<sup>10</sup>. U literaturi je opisan i slučaj gdje je rezolucija u DESI eksperimentu smanjena na samo 40  $\mu\text{m}$ <sup>11</sup>.

### PRIMJENA DESI KOD ANALIZE OTISAKA PRSTIJU

Otisci ljudskih prstiju forenzičarima omogućavaju mnogo više informacija od jednostavne identifikacije osobe. Oni uz pomoć DESI-MS mogu biti dokaz kontakta osobe s ilegalnim supstancijama poput droga ili eksploziva. DESI se tada koristi kao tehnika molekularnog oslikavanja. Analitička informacija koja se dobije uz pomoć DESI-MS može biti korisna i za razlučivanje preklapajućih otisaka prstiju različitih osoba<sup>12</sup>.

### ZAKLJUČAK

Desorpcija i ionizacija elektroraspršenjem se, zbog svojih karakteristika, u sprezi sa spektrometrom masa svrstava u skupinu visokofrekventnih instrumentalnih tehnika. Velika propusnost omogućava primjenu tehnike u raznim granama analitike poput analize peptida i proteina, intaktnih mikroorganizama, u slikovnom prikazu tkiva, identifikaciji metabolita, zagađenju namirnica bakterijama, detekciji kvarenja mesa, određivanju zagađivača na ljudskoj koži, detekciji eksploziva, otkrivanju prirodnih spojeva itd. Ciljane molekule ili skupina molekula identificiraju se u načinu rada MS/MS usporedbom s referentnim spojevima. Razlike među srodnim spojevima lako se vizualiziraju u spektrima masa korištenjem analize glavne komponente (engl. *Principal component analysis*, PCA) koja statističkom obradom signala može razlučiti ciljani signal od šuma ili sličnih signala.

U budućnosti je moguća upotreba DESI u *in vivo* kliničkim analizama te u prijenosnim spektrometrima masa jednostavne i nezahtjevne primjene. Isti bi omogućili jednostavnije i široko primjenjivo korištenje spektrometrije masa u bolnicama za dijagnostičke svrhe<sup>13,14</sup>.

### ZAHVALA

Ovaj rad nastao je uz financijsku potporu projekta Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa 098-0982464-2393 i projekta Fonda za zapošljavanje i razvoj RH 14V09809.

### LITERATURA

1. Galić N, Cindrić M. Analiza proteina spektrometrijom masa. *Kem Ind* 2008;57:231-43.
2. Takáts Z, Wiseman JM, Gologan B, Cooks RG. Mass Spectrometry Sampling Under Ambient Conditions with Desorption Electrospray Ionization. *Science* 2004;306: 471-3.
3. Takáts Z, Wiseman JM, Cooks RG. Ambient mass spectrometry using desorption electrospray ionization (DESI): instrumentation, mechanisms and applications in forensics, chemistry, and biology. *Journal of mass spectrometry* 2005;40:1261-75.
4. Miao Z, Chen H. Direct Analysis of Liquid Samples by Desorption Electrospray Ionization-Mass Spectrometry (DESI-MS). *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 2009;20:10-9.
5. Talaty N, Takáts Z, Cooks RG. Rapid in situ detection of alkaloids in plant tissue under ambient conditions using desorption electrospray ionization. *Analyst* 2005;130: 1624-33.
6. Nefliu M, Smith JN, Venter A, Cooks RG. Internal energy distributions in desorption electrospray ionization (DESI). *J Am Soc Mass Spectrom* 2008;19:420-7.
7. Venter A, Sojka PE, Cooks RG. Droplet dynamics and ionization mechanisms in desorption electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Chem* 2006;78:8549-55.
8. Song Y, Talaty N, Tao AW, Pan Z, Cooks RG. Rapid Ambient Mass Spectrometric Profiling of Intact, Untreated Bacteria using Desorption Electrospray. *Ionization Chemical Communications* 2007;1:61-3.
9. Wiseman JM, Ifa DR, Zhu Y, Kissinger CB, Manicke NE, Kissinger PT et al. Desorption electrospray ionization mass spectrometry: Imaging drugs and metabolites in tissues. *Proc Nat Academy Sci USA* 2008;105:18120-5.
10. Wiseman JM, Ifa DR, Venter A, Cooks RG. Ambient molecular imaging by desorption electrospray ionization mass spectrometry. *Nat Protoc* 2008;3:517-24.
11. Kertesz V, Van Berkel GJ. Improved imaging resolution in desorption electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2008;22:2639-44.
12. Ifa DR, Manicke NE, Dill AL, Cooks RG. Latent Fingerprint Chemical Imaging by Mass Spectrometry. *Science* 2008; 321:805
13. Cooks RG, Ouyang Z, Takáts Z, Wiseman JM. Ambient Mass Spectrometry. *Science* 2006;311:1566-70.
14. Chen H, Wortmann A, Zenobi R. Neutral desorption sampling coupled to extractive electrospray ionization mass spectrometry for rapid differentiation of biosamples by metabolomic fingerprinting. *Journal of Mass Spectrometry* 2007;42:1123-35.