DESORPČNÍ ELEKTROSPREJ: MODERNÍ METODA ANALÝZY ORGANICKÝCH POVRCHŮ

VÁCLAV RANC[a], VLADIMÍR HAVLÍČEK[b], PETR BEDNÁŘ[a] a KAREL LEMR[a]

[a] *Katedra analytické chemie, PřF UP Olomouc, Tř. Svobody 8, 779 00 Olomouc,* [b] *Mikrobiologický ústav Akademie věd ČR,Vídeňská 1083,142 20 Praha 4*
lemr@prfnw.upol.cz

Došlo 12.4.07, přijato 30.4.07.

Klíčová slova: hmotnostní spektrometrie, DESI, chirální analýza, analýza léčiv

Obsah

1. Úvod
2. Ionizace desorpcí elektrosprejem (DESI)
3. Aplikace DESI v analýze chirálních látek
4. Závěr

1. Úvod

Hmotnostní spektrometrie dnes patří mezi klíčové analytické techniky, a to jak ve výzkumu[1], tak i v oblasti rutinní analýzy. Během posledních dvaceti let se použití metody rozšířilo snad do všech oblastí přírodních věd, od geologie, přes fyziku, astronomii a chemii k biologii, k analýze životního prostředí, do farmacie, medicíny, atp. Metoda je nezastupitelná v lékařství (diagnostika nádorových onemocnění, metabolických chorob atd.), pro kriminalisty (identifikace drog, detekce výbušnin, identifikace pachatelů zvláště nebezpečné trestné činnosti), je výhradním nástrojem antidopingových kontrol, používá se v archeologii (datování stáří předmětů) a geologii, v monitorování kvality životního prostředí, v toxikologii i v chemii (sledování průběhu chemických reakcí). Hmotnostní spektrometry jsou součástí výbavy většiny vesmírných sond i některé speciální vojenské techniky. Významnou úlohu hraje hmotnostní spektrometrie v otázkách národní bezpečnosti: technika dokáže odhalit a identifikovat látky, které mohou být zneužity při terorismu a bioterorismu.

Vývoj analytických metod na bázi hmotnostní spektrometrie se v posledních letech ubírá stále častěji k postupům umožňujícím rychlou a především ekonomicky nenáročnou analýzu, a to i stále větších molekul[2]. S neustálým technologickým pokrokem již dnes není problém vyvinout hmotnostně-spektrometrickou analytickou metodu pro analýzu biopolymerů, která bude disponovat detekčním limitem řádově v desetinách ppm (cit.[3]). Takto nízkých detekčních limitů lze však v mnoha případech dosáhnout jen u standardu, kde není analýza zatížena předúpravou vzorků. Značně komplikovanější je situace při analýze reálných biologických vzorků, kdy jejich zpracování zůstává stále jedním z klíčových kroků. Existuje celá řada způsobů hmotnostně-spektrometrické analýzy biologických vzorků. V zásadě nejsnazší cestou je použití desorpčních ionizačních technik, které umožňují i analýzu povrchu vzorku, anebo ionizace elektrosprejem („electrospray ionization“, ESI). Vývoj technik povrchové analýzy makromolekul založených na hmotnostní spektrometrii je v popředí zájmu předních výzkumných týmů v oblasti hmotnostní spektrometrie již od 70. let minulého století, kdy byla poprvé světu představena ionizační technika založená na desorpci plazmatem ^{252}Cf (cit.[4]). Ta umožnila hmotnostní spektrometrií realizovat analýzu menších proteinů, a to až do hmotnosti v řádu desítek tisíc Daltonů a s limitem detekce v řádu pg l^{-1}. V roce 1981 byl učiněn další krok na cestě k analýze biopolymerů, neboť byla vyvinuta technika FAB (cit.[5]) („fast atom bombardment“, ionizace bombardováním rychlými atomy), která se stala široce rozšířenou standardní metodou pro ionizaci peptidů. O necelých deset let později byla světu představena ionizace desorpcí laserem (LDI) (cit.[6,7]). Dalším zásadním krokem byl vývoj v oblasti MALDI (cit.[8]) (ionizace/desorpce laserem za účasti matrice) nebo SELDI (cit.[9]) (povrchem podpořená ionizace/desorpce laserem). Za objev technik umožňujících ionizaci biomolekul byla v roce 2002 udělena Nobelova cena za chemii. Dosud jmenované techniky však i přes nemalý přínos neodbourávají a často ani nezjednodušují samotnou přípravu vzorků k analýze. Z tohoto pohledu se jako velmi zajímavá jeví moderní ionizační technika DESI (cit.[10,11]) (ionizace desorpcí elektrosprejem).

2. Ionizace desorpcí elektrosprejem (DESI)

Princip DESI vychází z konceptu elektrospreje. Sprejovaná kapalina (často se jedná o směs vody s methanolem v poměru 1:1) je aplikována na studovaný povrch vzorku pod určitým úhlem (obyčejně 50°) a z určité vzdálenosti (zpravidla 5 mm). Geometrické parametry a vlastní parametry elektrospreje ovlivňují průběh desorpce a výtěžnost tvorby iontů. Interakcí iontů vzniklých sprejováním s povrchem vzorku dochází k desorpci iontů analytů, které jsou následně vedeny do hmotnostně-spektrometrického analyzátoru. Koncept desorpce elektrosprejem sebou přináší celou řadu výhod, na základě kterých se zcela mění pohled na hmotnostní spektrometrii jako na techniku analýzy vzorků se složitými matricemi[12], neboť tato nová ionizační technika zjednodušuje vlastní úpravu vzorků, někdy ji i zcela odbourává. Skutečností však také je, že dosahované meze detekce jsou výrazně vyšší v porovnání s elektrosprejem. Velký aplikační potenciál DESI lze demonstrovat na celé řadě vyvinutých analy-

tických postupů, které DESI využívají. DESI se řadí mezi neinvazivní techniky umožňující *in vivo* analýzu bez nutnosti použití anestetik. Tato vlastnost byla demonstrována například při výzkumu metabolismu orálně podaných léčiv následně detegovaných na povrchu lidské kůže[13]. Jednalo se o analýzu ketaminu a xylazinu. Schopnost DESI analyzovat makromolekuly vyplývá z vlastnosti ESI generovat vícenásobně nabité ionty. DESI již byla úspěšně aplikována při analýze cytochromu c (cit.[14]) nebo hemoglobinu[15] ve vzorku lidské krve. V současné době je též velice důležitá detekce a identifikace výbušnin[16]. Aplikovatelnost DESI v této oblasti lze demonstrovat např. na analýze trinitrohexahydro-1,3,5-triazinu (RDX) a oktahydro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetrazocinu (HMX) (cit.[17]). Hmotnostní spektrum je znázorněno na obr. 1. Dosažený detekční limit metody byl řádově v pg mm^{-2}. Uplatnění ionizace desorpcí elektrosprejem např. i ve zmíněné oblasti značně rozšiřuje možnosti využití hmotnostní spektrometrie i mimo chemické laboratoře. Výzkumná skupina R. G. Cookse intenzivně pracuje na vývoji přenosného detektoru výbušnin[18] založeného na DESI-MS, který by bylo možné využít např. v odbavovacích halách letišť či v budovách se zvýšeným bezpečnostním rizikem. Ionizace desorpcí elektrosprejem též zásadním způsobem rozšiřuje možnosti kombinace hmotnostní spektrometrie a jí získaných dat s jinými technikami. Již byly popsány např. metody využívající měření DESI-MS a jadernou magnetickou rezonancí (NMR) (cit.[19]) jako metabolomický/metabonomický nástroj umožňující diagnostiku karcinomů. Autoři publikace popisují identifikaci více než 80 metabolitů ve vzorku krysí moče, která byla analyzována pomocí DESI, a to bez jakékoli úpravy. Vlastní identifikace metabolitů byla založena na porovnání fragmentačních hmotnostních spekter a dat získaných NMR.

3. Aplikace DESI v analýze chirálních látek

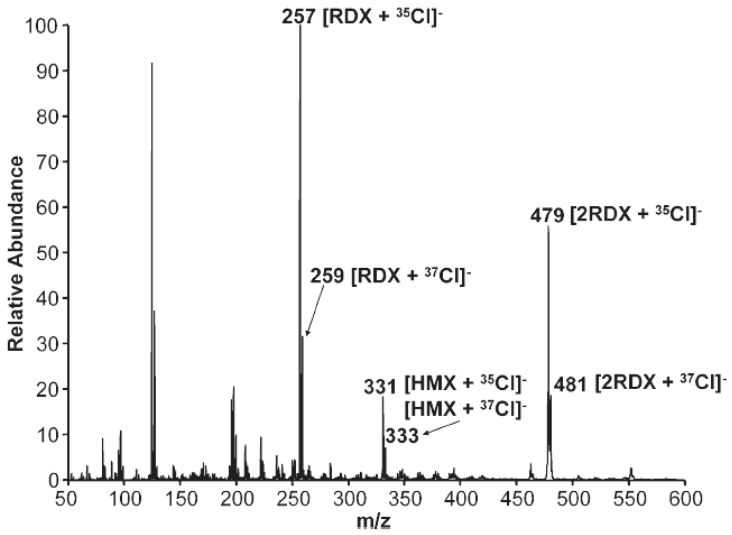
Dalším velkým aplikačním potenciálem hmotnostní spektrometrie je screening chirálních látek. Jednou z perspektivních metod umožňujících hmotnostní spektrometrii tento typ analýzy je Cooksova kinetická metoda[20–23]. Principem metody je tvorba trimerních klastrů analyzované látky (A) s opticky čistou referenční látkou (ref) a kovem (M), nejčastěji mědí. Obecný vzorec vzniklého klastru je $[M(ref)_2(A)\text{-}H]^+$. Fragmentace generovaného klastru vede k odštěpení jednoho z ligandů, tedy referenční látky nebo analytu.

Chirální diskriminace se projevuje v hodnotě R dané poměrem intenzit produktů fragmentace $[M(ref)(A)\text{-}H]^+$ a $[M(ref)_2\text{-}H]^+$ (rovnice (*1*)). Chirální selektivita použitého systému je vyjádřena pomocí veličiny R_{chiral}, kterou popisuje rovnice (*2*).

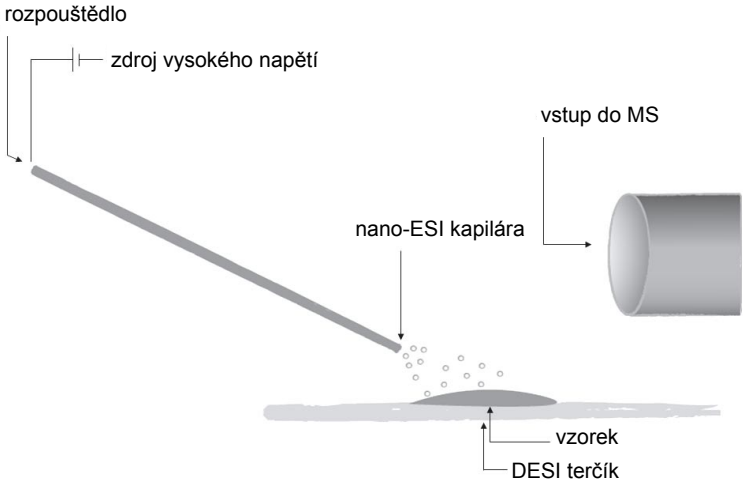
$$R = \frac{[M(ref)A - H]^+}{[M(ref)_2 - H]^+} \qquad (1)$$

$$R_{chiral} = \frac{R_R}{R_S} \qquad (2)$$

kde R_R a R_S jsou hodnoty R pro čistý *R* a *S* enantiomer. Z uvedených vztahů vyplývá, že pro hodnotu $R_{chiral} = 1$ nevykazuje použitý systém žádnou chirální selektivitu. Čím více se liší od jedné, tím je chirální diskriminace výraznější. Cooksova kinetická metoda již byla modifikována tak, aby umožňovala vysoce prostupnou průtokovou injekční analýzu[23,24] a aby byla využitelná pro spojení hmotnostního spektrometru se separačními technikami jako např. s HPLC (cit.[24]) nebo CE (cit.[25]). Ionizace



Obr. 1. **Hmotnostní spektrum získané DESI analýzou výbušnin typu RDX a HMX** (převzato z cit.[17]; Reprinted with permission from ref. [17]. Copyright (2005) American Chemical Society)

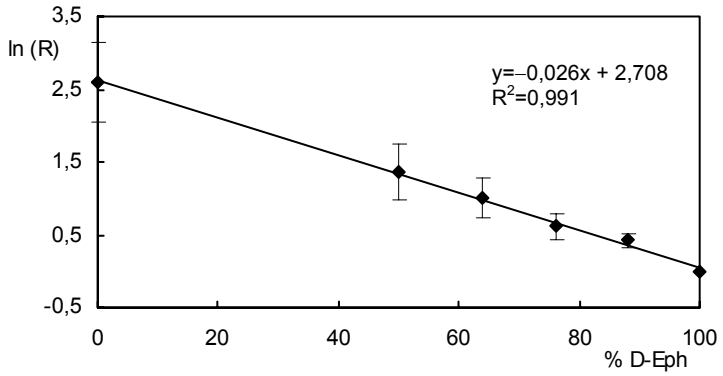


Obr. 2. **Schéma konstrukční varianty DESI, tzv. nano-DESI vyvinuté na našem pracovišti**

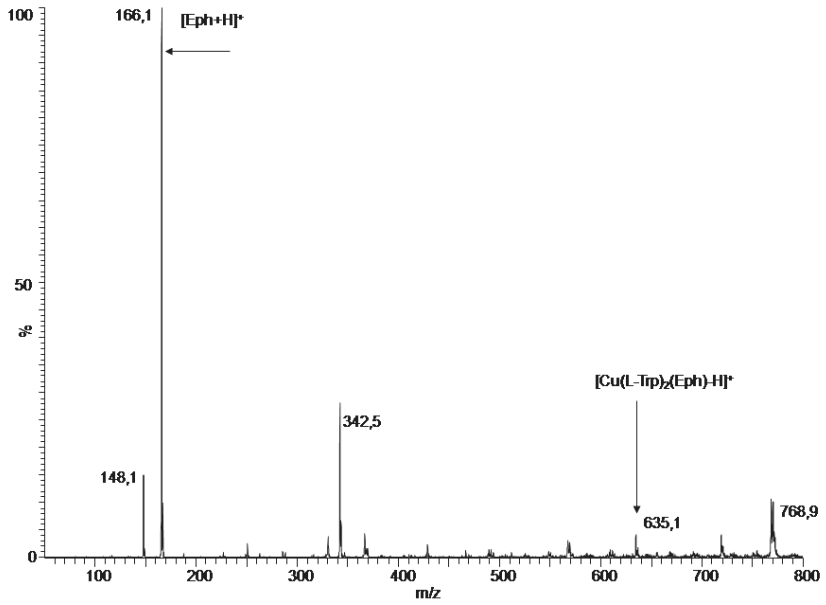
desorpcí elektrosprejem však ještě dále rozšiřuje aplikační potenciál této metody. Experimenty na našem pracovišti dokládají možnost nově aplikovat DESI i v analýze chirálních látek bez jejich předchozí izolace z matrice. Výsledky analýzy umožňují velice rychle rozhodnout, zda je ve vzorku obsažen *R* nebo *S* enantiomer, případně racemát. Tato schopnost může být potenciálně využita nejen v aplikacích zaměřených na výstupní kontrolu kvality léčiv, ale i při kontrole průběhu asymetrických syntéz a podobně.

Koncept námi sestaveného DESI však nevychází z elektrospreje, tak jak jej popisuje Z. Takáts a spol.[10], ale z nano-ESI (obr. 2). Tato modifikace umožňuje pracovat při nižších průtocích sprejované kapaliny (řádově desítky nl min^{-1}), čímž se omezuje rozmývání analytu. Jako držák vzorků slouží polyethylenový výlisek se vzorkovacím terčíkem o velikosti 5 × 2 mm. V současnosti jsou na našem pracovišti vyvíjeny metody založené na DESI, které umožňují screening chirálních léčiv v různým matricích (farmaceutické přípravky, krev).

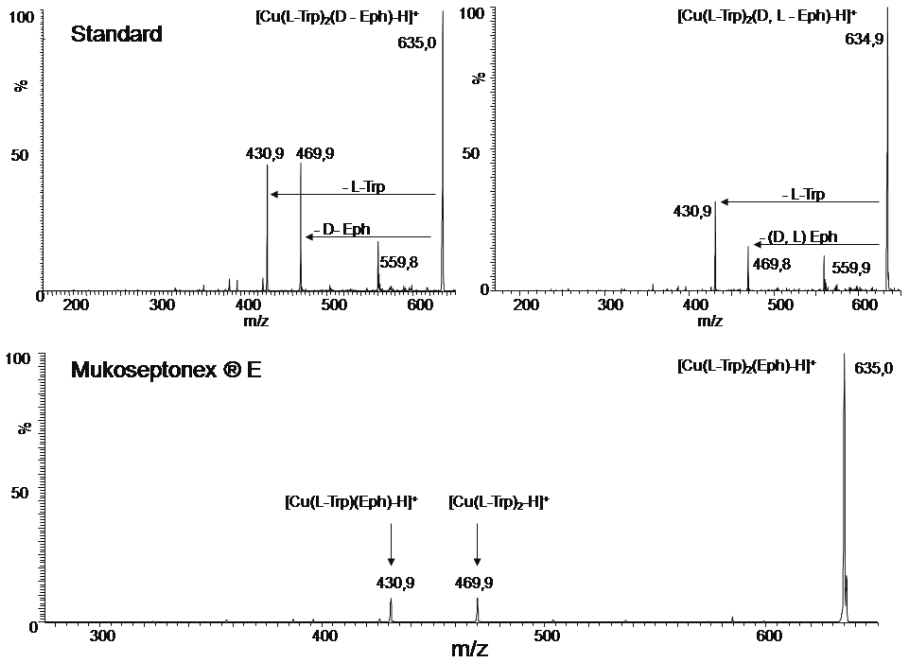
Jako příklad je dále podrobněji popsán postup a výsledky chirální analýzy efedrinu v komerčním preparátu Mukoseptonex ® E. Chirálním selektorem byla směs L-tryptofanu a $CuCl_2$. Selektor byl aplikován pomocí sprejovací kapaliny o složení $5\cdot10^{-4}$ mol l^{-1} L-tryptofan a $5\cdot10^{-4}$ mol l^{-1} $CuCl_2$ ve směsi voda–methanol (1:1, v/v). Pro kalibraci byly použity roztoky D-efedrinu a racemické směsi (5 mmol l^{-1}, voda–methanol, 1:1, v/v). Bylo použito celkem 5 roztoků o zastoupení D-efedrinu 50, 64, 76, 88 a 100 %. Na vzorkovací terčík DESI bylo aplikováno 10 μl



Obr. 3. **Kalibrační závislost ln(R) na enantiomerním podílu D-efedrinu (D-Eph)**



Obr. 4. **Hmotnostní spektrum Mukoseptonexu ® E;** Eph – efedrin, Trp – tryptofan



Obr. 5. **Fragmentační spektrum trimerního klastru pro standardy efedrinu (nahoře) a pro efedrin v Mukoseptonexu ® E (dole);** Eph – efedrin, Trp – tryptofan

vzorku, vzniklá kapka byla sušena 2 minuty na vzduchu a ihned analyzována. Kalibrační závislost je znázorněna na obr. 3. Korelační koeficient 0,991 je pro screeningové nasazení vyvinuté metody zcela dostačující. Veličina R_{chiral} byla určena z kalibrační závislosti a její hodnota je 2,7±0,12, což dokládá potřebnou chirální selektivitu. Získaná kalibrace byla následně použita pro chirální analýzu efedrinu v komerčním přípravku Mukoseptonex ® E

s deklarovanou koncentrací efedrinu 10 mg ml^{-1}. Vzorek nebyl nijak upravován a 10 µl bylo přímo naneseno na filtrační papír umístěný na vzorkovacím terčíku. Po dvou minutách byla provedena analýza. Zjištěný obsah D-efedrinu ve sledovaném vzorku byl 102±7,7 %, což je pro odlišení od racemátu zcela postačující.

Hmotnostní spektrum získané při DESI analýze vzorku Mukoseptonexu ® E je na obr. 4 a dokládá tvorbu trimerního klastru přímo z reálného vzorku v iontovém zdroji. Rozdíly v intenzitách fragmentů vzniklých při kolizí indukované disociaci trimerního klastru v iontové pasti jsou patrné z obr. 5. Z porovnání spekter je rovněž zřejmé, že ve vzorku je obsažen D-enantiomer.

Úspěšná tvorba trimerního klastru v prostředí DESI je důležitá nejen pro vlastní analýzu, ale je zajímavá i z hlediska pochopení základních dějů uplatňujících se v průběhu analýzy. Cílové trimerní klastry jsou generovány na základě interakce iontů chirálního selektoru s analytem a tato technika potvrzuje vznik trimerního klastru až v prostoru iontového zdroje a nikoliv v roztoku směsi analytu s chirálním selektorem přiváděném do iontového zdroje, což lze považovat za významné pro studium chirální diskriminace kinetickou metodou.

4. Závěr

Ionizace desorpcí elektrosprejem v dnešní době patří k ionizačním technikám s vysokým aplikačním potenciálem, což dokazuje počet aplikací, které již byly za relativně krátký čas existence této techniky publikovány. DESI nachází uplatnění nejen v analýze složitých matric, ale též i jako možná další alternativa k používaným zobrazovacím hmotnostně-spektrometrickým technikám. Prezentované výsledky dosažené s jednoduchým DESI systémem založeným na nanoelektrospreji a sestaveným na našem pracovišti ukázaly aplikovatelnost DESI v chirální analýze.

Autoři práce děkují za finanční podporu Ministerstvu školství, mládeže a tělovýchovy ČR (MSM6198959216 a LC 7017) a Grantové agentuře České republiky (203/07/0765).

LITERATURA

1. Hoffman E., Stroobant V.: *Mass Spectrometry Principles and Applications*, pp. 1–2. Wiley and Sons, New York 2001.
2. Baier D.: *Think knowledge: A philosophy of Scientific Instruments*. University of California press, Berkeley 2004.
3. Aggarwal S. K., Kinter M., Fitzgerald R. L., Herold D. A.: Crit. Rev. Lab. Sci. *31*, 35 (1994).
4. Anderl R. A., Cole J. D., Greenwood R. C.: Nucl. Instrum. & Methods Phys. Res., Sect. B *26*, 333 (1987).
5. Barber M., Bordoli R. S., Sedgwick R. D., Tyler A. N.: J. Chem. Soc., Chem. Commun. 325 (1981).
6. Karas M., Bachmann D., Hillenkamp F.: Anal. Chem. *57*, 2935 (1985).
7. Karas M., Hillenkamp F.: Anal. Chem. *60*, 2299 (1988).
8. Tanaka H., Xuan L. J., Morimoto S., Shoyama Y.,Isobe R., Nojima K.: Spectrosc. Int. J. *15*, 1 (2001).
9. Czader M., Kuzdzal S., Flinn I., Byrd, J.,Chan D., Borowitz M. J.: Blood *96*, 579A (2000).
10. Takáts Z., Wiseman J. M., Gologan B., Cooks R. G.: Science *306*, 471 (2004).
11. Cooks R. G., Gologan B., Wiseman J., Talaty, N., Chen H., Cotte – Rodriguez I.: Abstr. Paper. Am. Chem. Soc. *230*, U298 (2005).
12. Qu J., Liang Q., Luo G., Wang Y.: Anal. Chem. *76*, 2239 (2004).
13. Takáts Z., Czuczy N., Skoumal R., Katona M., v Proceedings of the *17th International Mass Spectrometry Conference*, poster Nr.: TuOr-24, Prague 2006.
14. Myung S., Wiseman J., Valentine S. J., Takáts Z. Cooks R. G.: J. Phys. Chem. *7*, 110 (2006).
15. Wiseman J., Puolitavial S., Takáts Z., Cooks G., Caprioli R.: Angew. Chem. Int. Ed. *44*, 4 *(*2005).
16. Cotte-Rodriguez I., Cooks R. G.: Chem. Comm. (Cambridge, England), 2968 (2006).
17. Cotte-Rodriguez I., Takáts Z., Talaty N., Chen H., Cooks R. G.: Anal. Chem. *77*, 6755 (2005).
18. Mulligan C. C., Talaty N., Cooks R. G.: Chem. Commun. (Cambridge, England), 1709 (2006).
19. Chen H., Pan Z., Talaty N., Raftery D., Cooks R. G.: Rapid. Commun. Mass Spectrom. *20*, 1577 (2006).
20. Tao W. A., Gozzo F. C., Cooks R. G.: Anal. Chem. *73*, 1692 (2001).
21. Augusti D. V., Carazza F., Augusti R., Tao W. A., Cooks R. G.: Anal. Chem. *74*, 3458 (2002).
22. Tao W. A., Clark R. L., Cooks R. G.: Anal. Chem. *74*, 3783 (2002).
23. Ranc V., Fryčák P., Müller L., Bednář P., Lemr K.: Chem. Listy *100*, 8 (2006).
24. Lemr K., Ranc V., Fryčák P., Bednář P., Ševčik J.: J. Mass Spectrom. *41*, 499 (2006).
25. Ranc V., Bednář P., Fryčák P., Lemr K.: v Proceedings of the *17th Internationnal Mass Spectrometry Conference*, Poster Nr.:ThP – 019, Prague, Czech Republic 2006.

V. Ranc[a], V. Havlicek[b], P. Bednar[a], and K. Lemr[a]
([a] Department of Analytical Chemistry, Palacky University Olomouc; [b] Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague): **Desorption Electrospray: A Modern Tool for Organic Surface Analysis**

Applicability of mass spectrometry is related to the progress in instrumentation including ion sources. Ionization techniques in MS often need sample preparation, which increases the analysis time. From this point of view, DESI (desorption electrospray ionization) seems to be an interesting alternative. Electrospraying of a sample with

a liquid leads to the production of analyte ions desorbed from the surface-deposited sample. A new modification of DESI, where electrospraying is provided by nano-ESI, and a new application in chiral analysis have been developed. Chiral analysis employs the Cooks kinetic method. Chiral selector is sprayed by nano-ESI onto the surface with a deposited chiral analyte. Trimeric clusters are formed in the bulk of the ion source. Their fragmentation allows chiral discrimination of enantiomers. The power of the DESI-based mass spectrometric tool is demonstrated on chiral analysis of ephedrine in commercial pharmaceutical Mucoseptonex® E. The analysis is performed without any sample preparation. That is why the analysis is simple and cost-effective. Calibration for ephedrine was performed with D-enantiomer and the racemate (correlation coefficient $R^2 = 0.996$) was obtained.