

OPTIMIZAREA METODELOR SPECTROMETRICE DE MASĂ PRIN CHIP-ELECTROSPRAY PENTRU STUDIUL BIOMOLECULELOR

Teză destinată obținerii
titlului științific de doctor inginer
la
Universitatea "Politehnica" din Timișoara
în domeniul INGINERIE CHIMICĂ
de către

Fiz. Valentina-Liliana Udrescu

Conducător științific: prof.univ.dr.ing.Lucian Rusnac
Referenți științifici: prof.univ.dr. fiz. Alina Diana Zamfir
prof.univ.dr.ing. Dan Ciubotariu
Conf.univ.dr.ing. Mihai Medeleanu

Ziua susținerii tezei: 24.10.2011

Seriile Teze de doctorat ale UPT sunt:

- | | |
|---|--|
| 1. Automatică | 8. Inginerie Industrială |
| 2. Chimie | 9. Inginerie Mecanică |
| 3. Energetică | 10. Știința Calculatoarelor |
| 4. Ingineria Chimică | 11. Știința și Ingineria Materialelor |
| 5. Inginerie Civilă | 12. Ingineria sistemelor |
| 6. Inginerie Electrică | 13. Inginerie energetică |
| 7. Inginerie Electronică și Telecomunicații | 14. Calculatoare și tehnologia informației |

Universitatea „Politehnica” din Timișoara a inițiat seriile de mai sus în scopul diseminării expertizei, cunoștințelor și rezultatelor cercetărilor întreprinse în cadrul școlii doctorale a universității. Seriile conțin, potrivit H.B.Ex.S Nr. 14 / 14.07.2006, tezele de doctorat susținute în universitate începând cu 1 octombrie 2006.

Copyright © Editura Politehnica – Timișoara, 2011

Această publicație este supusă prevederilor legii dreptului de autor. Multiplicarea acestei publicații, în mod integral sau în parte, traducerea, tipărirea, reutilizarea ilustrațiilor, expunerea, radiodifuzarea, reproducerea pe microfilme sau în orice altă formă este permisă numai cu respectarea prevederilor Legii române a dreptului de autor în vigoare și permisiunea pentru utilizare obținută în scris din partea Universității „Politehnica” din Timișoara. Toate încălcările acestor drepturi vor fi penalizate potrivit Legii române a drepturilor de autor.

România, 300159 Timișoara, Bd. Republicii 9,
tel. 0256 403823, fax. 0256 403221
e-mail: editura@edipol.upt.ro

Cuvânt înainte

Aspectele științifice abordate în cadrul tezei de doctorat „ **Optimizarea metodelor spectrometrice de masă prin chip-electrospray pentru studiul biomoleculilor**” se înscriu în tendința actuală a cercetării legăturilor dintre tehnologia de avangardă a microfluidicelor cu spectrometria de masă. Studiul de față, prin aspectele de cercetare abordate, completează cunoștințele asupra implementării microtehnologiei bazată pe spectrometria de masă, în studii de proteomică și glicomică. Deoarece spectrometrul de masă este un instrument important în domeniile amintite mai sus, este esențial să înțelegem nu numai rezultatele obținute cu acesta, dar și avantajele funcționării acestuia în tandem cu alte instrumente, de exemplu cu un robot pentru procesarea automată a probei. Specificitatea tandemului (cuplajul NanoMate QTOF MS), utilizat în spectrometria de masă și prezentat în acesta teză, este folosită la caracterizarea farmacocinetică a unor matrici biologice complexe. În ceea ce privește caracterizarea proteinelor, spectrometria de masă în tandem este o metodă importantă, versatilă, în care proteinele intacte sunt ionizate, folosind tehnica ionizării prin electrospray, și apoi sunt supuse fragmentării în analizorul de masă, în vederea identificării *de novo*. Tot în această lucrare este prezentat pe larg și primul cuplaj dintre robotul NanoMate și spectrometrul de masă de tip HCT MS. Acest tandem a fost testat și optimizat pentru a funcționa în regimul de screening și fragmentare în tehnica ionilor pozitivi și negativi pentru principalele clase de biomolecule: peptide, proteine și hidrați de carbon.

Rezultatele remarcabile obținute cu aceste noi platforme analitice și metodologii de lucru permit o estimare pozitivă cu privire la posibilitățile lor de a se constitui într-o alternativă viabilă la metodele analitice existente, în prezent, pentru cercetarea din domeniu.

Suportul financiar pentru desfășurarea activității de cercetare a fost pus la dispoziție de Autoritatea Națională pentru Cercetare Științifică (A.N.C.S., România) în cadrul proiectelor CE EX 98/2006, CE EX 111/2006 și PN II 41001/2007.

Timișoara, octombrie 2011

Autorul

Această lucrare este dedicată părinților mei

Desfășurarea cercetărilor și elaborarea lucrărilor s-a făcut sub îndrumarea prof. dr. ing. Lucian RUSNAC. Pentru acceptarea ca doctorand, pentru sugestiile și indicațiile metodologice date, pentru discuțiile de ordin teoretic și practic care m-au ajutat să depășesc momentele dificile de debut ale tezei, îmi exprim, pe această cale, cele mai sincere mulțumiri alături de întreaga mea recunoștință. Aduc de asemenea mulțumirile mele domnului prof.dr.ing. Petre NEGREA, președintele comisiei pentru susținerea publică a tezei de doctorat și membrilor comisiei: prof. dr. fiz. Alina Diana ZAMFIR, prof.dr.ing. Dan CIUBOTARIU și domnului conf.dr.ing. Mihai MEDELEANU. Cercetarea experimentală a fost făcută cu ajutorul direct al doamnei prof. dr. fiz. Alina Diana ZAMFIR, datorită contextului profesional și a colaborării dintre Facultatea de Inginerie Chimică cu [Facultatea de Inginerie Alimentară, Turism și Protecția Mediului](#), de la Universitatea Aurel Vlaicu, din Arad. Țin să-i mulțumesc în mod special pentru sprijinul acordat și pentru spiritul optimist în care a fost abordată fiecare etapă a acestui studiu, precum și pentru generozitatea cu care m-a

inițiat în munca de cercetare. De asemenea colegilor din grupul de cercetători, coordonați de doamna profesoară din cadrul Departamentului de Analiză și caracterizare, laboratorul de Spectrometrie de Masă de la Institutul Național de Cercetare Dezvoltare pentru Electrochimie și Materie Condensată, din Timișoara. Aduc mulțumiri pe această cale atât domnului prof. dr. ing. Eugen Nicolae Vintilă ȘIȘU, de la Universitatea de Medicină și Farmacie "Victor Babeș", din Timișoara, cât și doamnei CS III Ioana ȘIȘU, de la Institutul de Chimie al Academiei Române pentru excelența colaborare, pentru ajutorul prompt și eficient în problemele legate de sinteza și caracterizarea polizaharidelor funcționalizate. Aceleași mulțumiri pentru disponibilitatea de a colabora, prin furnizarea probelor utilizate pentru analiza structurală, doamnei prof. dr. Želica VUKELIĆ de la Departamentul de Chimie și Biochimie al Universității de Zagreb, doamnei dr. Marilena MANEA de la Departamentul de Chimie Analitică și Analiza Biopolimerilor (grup condus de domnul prof. dr. Michael PRZYBYLSKI), doamnei prof. dr. Jasna Peter KATALINIĆ, de la Institutul de fizică Medicală și biofizică, din cadrul Universității din Munster, Germania, domnului prof. dr. med. Detlev SCHINDLER de la Insitulul de Genetică Umană, Universitatea Würzburg și nu în ultimul rând doamnei dr. Kerstin WILLINGER de la Universitatea din Bonn. Adresez mulțumiri și domnului director general al INCEMC Timișoara, CS I Dr.Ing. Nicolae MIRICĂ, precum și domnului CS I Dr. Fiz. Ioan GROZESCU, Departamentul de Cercetare a Materiei Condensate din cadrul aceluiași institut. Nu în ultimul rând țin să mulțumesc familiei mele, pentru susținerea morală și părinților mei cărora le dedic această lucrare.

Udrescu, Valentina-Liliana

**OPTIMIZAREA METODELOR SPECTROMETRICE DE MASĂ
PRIN CHIP-ELECTROSPRAY**

Teze de doctorat ale UPT, Seria 4, Nr. 52, Editura Politehnica, 2008, 130 pagini, 59 figuri, 4 tabele.

ISSN: 1842-8223

ISBN: 978-606-554-367-6

Cuvinte cheie: spectrometrie de masă, spectrometru QTOF, spectrometru HCTMS, biomolecule, screening, fragmentare, analiză structurală

Rezumat,

Prezenta teză de doctorat și-a propus să combine tehnologia de avangardă a microfluidicelor cu spectrometria de masă (MS) în vederea depășirii limitelor curente ale biologiei moleculare în general și ale tehnicilor tradiționale din cercetarea biologică și biochimică, în particular.

Totodată, lucrarea a urmărit implementarea microtehnologiei cu MS în studii de proteomică și glicomică. Astfel, obiectivele tezei au fost: dezvoltarea, optimizarea și cuplarea cu spectrometria de masă de înaltă performanță, a unui sistem robotizat dotat cu un chip de siliciu, robotul NanoMate bifuncțional care integrează manipularea și injectarea automată a probei în MS prin chip electrospray; optimizarea pentru prima dată a robotului NanoMate pentru a funcționa în cuplaj cu un spectrometru de masă de tip capcană ionică de mare capacitate (HCT MS); optimizarea robotului NanoMate pentru a funcționa în cuplaj cu un spectrometru de masă de tip cuadrupolar hibrid cu timp de zbor (QTOF MS).

CUPRINS

Considerații teoretice

Introducere. Obiectivele tezei	7
Cap. I. Teoria și tehnica ionizării prin electrospray în spectrometria de masă	9
1.1 Noțiuni generale.....	9
1.2 Teoria fenomenului de ionizare prin electrospray.....	11
1.3 Ionizarea prin nano electrospray	18
Cap. II. Tendințe actuale în dezvoltarea sistemelor de ionizare prin chip- electrospray în spectrometria de masă	20
2.1 Cuplarea dispozitivelor chip microfabricate cu ESI-MS.....	22
Cap. III. Noutăți în dezvoltarea metodelor bazate pe chip-electrospray utilizate în proteomică și glicomică.....	31
3.1 Analiza proteinelor.....	31
3.2 Analiza hidraților de carbon și a gliconjugatilor	38

Partea experimentală

Cap. IV. Materiale și metode	41
4.1 Reactivi și materiale	41
4.2 Probele utilizate pentru analiză.....	43
4.3 Spectrometria de masă	44
4.4. Sistemul de injectare/ionizare complet automată prin chip-electrospray	55
4.5. Nomenclatura ionilor fragment	55

Contribuții originale. Rezultate și discuții

Cap. V Cercetări asupra realizării unui cuplaj între un sistem complet automat de introducere a probei prin chip-electrospray și spectrometrul de masă hibrid quadropolar cu timp de zbor cu accelerare ortogonală (QTOF MS).....	60
5.1. Experimente de cuplaj al robotului NanoMate cu injectare automată și ionizare prin chip electrospray cu spectrometrul de masă hibrid quadropolar cu timp de zbor cu accelerare ortogonală (QTOF MS).....	60
5.2. Studiu de fezabilitate a metodei nanoESI chip QTOF MS și optimizarea acesteia pentru compuși gliconjugati.....	65
Cap.VI Cercetări asupra realizării unui cuplaj între un sistem complet automat de injectare automată prin chip-electrospray și un spectrometru de masă de tip capcană ionică de mare capacitate (HCT MS)	86
6.1 Experimente de cuplaj ale robotului NanoMate cu injectare automată și ionizare prin chip electrospray cu spectrometrul de masă cu capcană ionică de mare capacitate HCT MS	86
6.2. Studiu de fezabilitate a metodei nanoESI chip HCT MS și optimizarea acesteia ..	87
6.3. Analiza glicopeptidelor.....	103
6.4. Analiza polizaharidelor funcționalizate.....	105

Concluzii	110
Bibliografie	114
Abrevieri.....	121
Termeni generali și fundamentali.....	122
Anexe	124

CONSIDERAȚII TEORETICE

INTRODUCERE. OBIECTIVELE TEZEI

În ultimul deceniu instrumentele utilizate în spectrometria de masă nu s-au schimbat fundamental, dar progresele importante făcute în dezvoltarea acestora au constat în automatizarea lor în același timp cu îmbunătățirea colectării și prelucrării datelor obținute. Automatizarea a fost necesară persoanelor implicate în munca de cercetare, în vederea efectuării unor activități repetitive care să conducă la o reducere a costurilor și a timpului de lucru, la o îmbunătățire a colectării datelor, la o reproductibilitate mai bună a rezultatelor, la o mai bună gestionare a datelor. Sistemele de automatizare asigură deci, o calitate mai bună a datelor și un control mai strict al modului în care se realizează operațiuni de rutină.

De asemenea popularitatea largă a spectrometriei de masă, ce o recomandă ca o tehnică de vârf în proteomică, este dată de specificitatea moleculară de neegalat (datorită capacității unice de a măsura cu precizie masa moleculară și de a oferi informații cu privire la structura fragmentelor de ioni diagnostic din proba analit), sensibilitate ultraînaltă la detecție, aplicabilitatea extrem de largă pentru toate tipurile de probă (volatili sau nevolatili, polare sau nepolare precum și materiale gazoase, lichide sau solide) și la majoritatea claselor de compuși. De aceea putem spune despre spectrometria de masă că este cea mai cuprinzătoare și mai adaptabilă tehnică de analiză aflată la dispoziția chimiștilor și biochimiștilor.

Dispozitivele polifuncționale, așa-numite sisteme de microanaliză totală (micrototal analysis systems, μ -TAS) reprezintă cea mai avansată micro-biotehnologie care există în prezent. În cazul cuplării sistemelor de microanaliză totală cu spectrometria de masă

(MS) platforma rezultată este capabilă să înlocuiască sursele clasice de ioni cu electrospray aducându-le la nivelul de chip, iar prin funcțiile lor integrate, acestea să efectueze operații analitice multiple.

Un astfel de exemplu este sistemul NanoMate produs de compania Advion BioSciences, în care funcțiile analitice sunt integrate într-un singur robot, dotat cu un chip de siliciu prin care se realizează ionizarea și introducerea probei în spectrometrul de masă. Acest sistem poate fi considerat este un adevărat laborator, care include un mecanism robotizat, o coloană de infuzie, o placă de microtitrare pentru depunerea probei și chipul de siliciu pentru electrospray având o suprafață de numai câțiva cm^2 .

Avantajele folosirii în bioanalitică a unui asemenea sistem sunt:

1. Eliminarea procedurilor laborioase și a experimentelor care necesită echipamente și aparate scumpe, spațiu și investiții pentru menținere și reparare;
2. Consum redus de probă și solvenți (1-2 microlitri, concentrație: atto-femtomolar);
3. Miniaturizare, integrare, ușurință de manipulare;
4. Costuri reduse: 2-3 euro/chip pentru o analiză completă;
5. Acuratețe și precizie excepțională, reproductibilitate ridicată;

6. Date structurale excelente la sensibilitate ultraînaltă;

7. Necesități minime de infrastructură.

În țara noastră nu a fost încă demarată, cu adevărat, implementarea sistemelor de laborator pe un chip în conjuncție cu MS în cercetarea din chimie, biochimie, și biomedicină. La nivel internațional tehnologia bazată pe sisteme de microanaliză totală este foarte avansată din punct de vedere tehnic, însă ea se află numai într-un stadiu incipient în relația sa cu aplicațiile și optimizarea pentru probe biologice. Numai câteva laboratoare din lume au testat această tehnologie de avangardă și au semnalat concomitent avantajele sale enorme. Cuplajul între μ -TAS și MS pentru o analiză totală (în vederea investigării structurii fine a biomoleculei) a fost până acum testat numai de câteva grupuri care însă au efectuat experimentele pentru studii de genomică și proteomică și sunt într-o fază de început. Această situație de la nivel mondial are două cauze majore: 1) explozia de cunoștințe în domeniul microtehnologiei, dublate de dobândirea unor competențe multiple asociate progreselor tehnologice și 2) de faptul că majoritatea laboratoarelor dispun deja de echipamente scumpe și sofisticate bazate pe aparatură masivă cu care sunt obișnuite să lucreze.

În acest context prezenta teză de doctorat și-a propus **să combine tehnologia de avangardă a microanalizei cu spectrometria de masă în vederea depășirii limitelor curente ale biologiei moleculare în general și ale tehnicilor tradiționale din cercetarea biologică și biochimică în particular.**

Totodată, lucrarea a urmărit implementarea microtehnologiei cu MS în studii de proteomică și glicomică și aplicarea acestei metodologii ultramoderne pentru analiza anumitor compuși gliconconjugați funcționali și identificarea unor biomarkeri de acest tip. Astfel, obiectivele tezei au fost:

- **dezvoltarea, optimizarea și cuplarea cu spectrometria de masă de înaltă performanță, a unui sistem robotizat dotat cu un chip de siliciu, robotul NanoMate** bifuncțional care integrează manipularea și injectarea automată a probei în MS prin chip electrospray.
- **optimizarea pentru prima dată a robotului NanoMate pentru a funcționa în cuplaj cu un spectrometru de masă de tip capcană ionică de mare capacitate (HCT MS).**
- **optimizarea robotului NanoMate pentru a funcționa în cuplaj cu un spectrometru de masă de tip cuadrupolar hibrid cu timp de zbor (QTOF MS).**
- **după optimizare, aceste tehnologii inovatoare și ultramoderne au fost aplicate în cercetări de chimie, biochimie și biomedicale, în particular în proteomică și glicomică** pentru screening, fragmentare și analiza structurală a diverselor tipuri de zaharide, de la polizaharide funcționalizate la glicani și compuși gliconconjugați (glicolipide și glicopeptide) exprimați în sistemul nervos central uman sănătos și afectat de boală (tumori) și respectiv dezordini de glicozilare în care hidrații de carbon joacă un rol esențial.
- **cuplarea sistemului NanoMate cu tehnica de disociere prin transfer de electroni (ETD)** a condus la aplicarea acestei metodologii combinate pentru analiza structurală prin fragmentare a peptidelor și proteinelor în regim *top-down*.

CAPITOLUL I

Teoria și tehnica ionizării prin electrospray în spectrometria de masă

1.1 Noțiuni generale

Ionizarea prin electrospray este astăzi tehnica de ionizare cea mai utilizată pe scară largă în industria chimică și în analizele biochimice. Eficiența sa în ionizare a schimbat profund științele biomoleculare, deoarece spre exemplu proteinele prezente în eșantioane oricât de mici, pot fi identificate și cuantificate cu un randament sporit.

Ionizarea prin electrospray (ESI) este o tehnică de ionizare la presiune atmosferică, pentru dezvoltarea căreia, în 2002, lui John B. Fenn de la Virginia Commonwealth University, Statele Unite ale Americii i s-a decernat premiul Nobel pentru Chimie. În ESI principiul de formare a ionilor în faza gazoasă este foarte diferit de cel de ionizare „clasică” prin impact electronic (EI), ionizare chimică (CI), ionizare chimică la presiune atmosferică (APCI) sau prin bombardament cu atomi rapizi (FAB). Diferența majoră dintre ESI și tehnicile de ionizare enumerate mai sus constă în faptul că în ESI proba este dizolvată cu solvenți polari (compatibili cu tehnica analitică folosită și cu adaos de electroliți în concentrație scăzută, 10^{-5} - 10^{-3} mol/l) și se pulverizează la presiune atmosferică printr-un capilar menținut la un potențial ridicat (3-4kV). Din această electropulverizare rezultă picături încărcate electric din care, ulterior, solventul se evaporă obținându-se ioni în fază gazoasă [1-3].

În contrast cu ionizările prin EI, CI sau FAB, unde ionii multiplu încărcăți se observă foarte rar, în cazul sursei de ioni cu electrospray, în soluție se formează ioni simpli și multiplu încărcăți derivând din: 1) cationi ai metalelor alcaline: Li^+ , Na^+ , K^+ , Cs^+ , Rb^+ ; 2) pământuri alcaline: Mg^+ , Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} ; 3) ioni ai metalelor tranzitionale simpli și dublu încărcăți precum și complecși ai acestora cu liganzi mono- și polidentati; 4) anioni ai acizilor anorganici, precum NO_3^- , Cl^- , H_2PO_4^- , H_2SO_4^- și SO_4^- ; 5) baze organice simpli și multiplu protonate precum amine, alcaloizi, peptide, proteine; 6) acizi organici sau fosfați organici simpli și multiplu deprotonați precum acizii nucleici; 7) hidrați de carbon simpli, dublu sau triplu protonați/deprotonați.

Unul din avantajele majore al acestui tip de ionizare îl reprezintă ușurința cu care se obțin ioni multiplu încărcăți în fază gazoasă. O consecință importantă a acestui fapt o reprezintă reducerea raportului m/z al ionilor, ceea ce permite înregistrarea spectrului de masă în cazul moleculelor mari, cum sînt cele provenite din peptide, proteine, oligonucleotide, compusi organometalici, polimeri, medicamente anticancer, pesticide, fosfopeptide [4-6] etc.

ESI este o tehnică de „ușoară” ionizare (adică, pentru producerea ionizării este necesară inducerea unei cantități mici de energie, în exces, în moleculă) care, la parametri normali de funcționare, produce o slabă fragmentare *in-source* astfel încât ionii pseudomoleculari sunt vizibili în spectrul ESI-MS ceea ce permite determinarea cu ușurință a masei moleculare.

ESI prezintă o sensibilitate foarte ridicată, ideală pentru analiza moleculelor nevolatile și fragile, polare și ionice sau chiar neionice, dar în solvent corespunzător (acid pentru donarea protonului sau bazic pentru formare de anioni) cu care în prezent se investighează un foarte mare număr de specii atât organice, cum sunt cele enumerate mai sus, cât și compusi anorganici, complecși anorganici, ioni coordinați de metal în molecule organice s.a.

Performanțele ESI s-au îmbunătățit prin cuplarea ei cu tehnici de separare precum electroforeză capilară (CE) și cromatografia lichidă (HPLC-*high performance liquid chromatography*), dar și cu analizoare care permit investigarea, la o rezoluție ridicată, a biomoleculelor de masă mare și generarea spectrului de fragmentare precum cel quadropolar hibrid cu timp de zbor (QTOF), cu rezonanță ciclotronică (FTICR) sau quadropolar de tip capcană ionică (QIT).

ESI a fost demonstrată ca tehnică de ionizare în spectrometria de masă în 1984 de către *Yamashita și Fenn* [1] și concomitent de *Aleksandrov și colab* [2]. Primele studii privitoare la fenomenul ionizării prin electropulverizare precum și la introducerea sursei de ioni cu electrospray ca sursă de ioni în fază gazoasă cu analiză prin spectrometrie de masă au fost inițiate încă din 1968 de către *Malcolm Dole și colab.* [3]

care au întreprins o serie de experimente de generare în vid a fasciculelor de ioni macromoleculari. În experimente se urmărea electropulverizarea unei soluții diluate de polistiren într-o baie de gaz (azot) la presiune atmosferică pentru ca, prin evaporarea solventului (3:2 benzen:acetona) din picăturile încărcate, densitatea superficială de sarcină să crească până la atingerea limitei *Rayleigh* care cauzează subdivizarea picăturilor. Prin continuarea procesului de divizare în soluție originală suficient diluată, se poate atinge o stare în care, în medie, fiecare picătură conține o singură macromoleculă. După ce întreg solventul se evaporă, cel puțin câteva sarcini rămân localizate pe macromoleculă. Rezultatul concret este o dispersare a macroionilor în baia de gaz care poate fi destins apoi sub forma unui jet supersonic, într-o cameră vidată. Se obțin astfel fascicule moleculare de intensitate ridicată și cu o împrăștiere redusă după viteze.

Eficacitatea acestei metode a fost demonstrată, de *Malcolm Dole*, în două seturi de experimente realizate în laboratoare separate, obținându-se pentru moleculele de polistiren un curent de ioni de la 10^{-14} până la $6 \cdot 10^{-13}$ A. Presupunând ca macroionii au atins viteza limită a gazului, în jetul liber, *Dole* a obținut valori ale raportului m/z corespunzătoare unor molecule simplu încărcate.

Scopul studiilor lui *Dole* fiind detectarea speciilor polimerice precum cele de polistiren care nu sunt ionizate în soluție, rezultatele obținute au fost pentru acea dată prea puțin convingătoare. Din acest motiv, în 1980, *Yamashita și Fenn*, cuplând sursa ESI cu un spectrometru de masă quadropolar (Fig. 1.1.1) reiau studiile privitoare la posibilitatea aducerii moleculelor complexe și nevolatile în fază gazoasă, fără descompunere, cu formarea unui jet liber, detectabil cu spectrometru de masă. Incep astfel primele investigații cu scopul de a se elucida mecanismele evaporării picăturilor și ionizării prin electrospray.

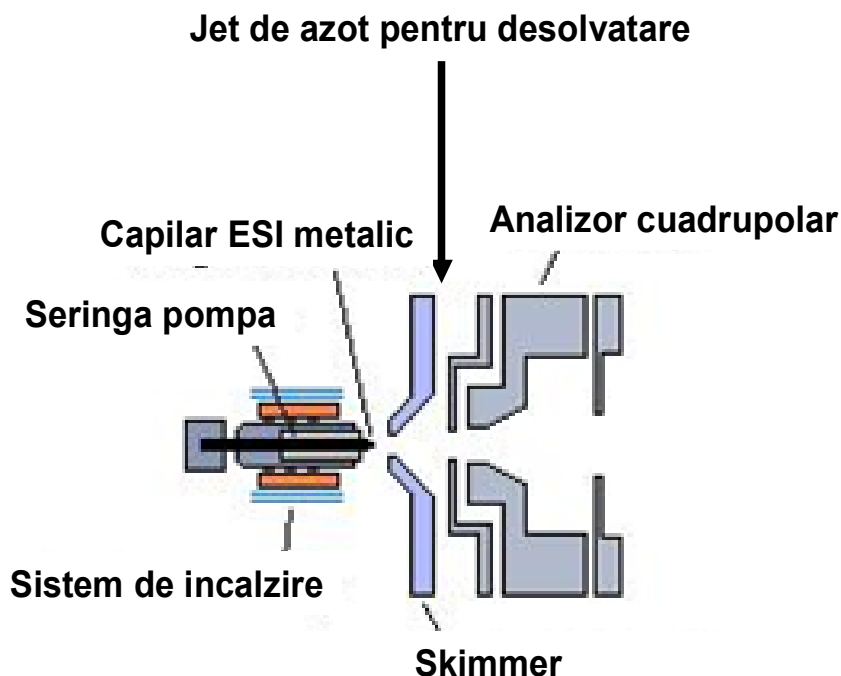


Fig. 1.1.1 Sursa de ioni cu ESI și interfața ESI-MS construită de Yamashita și Fenn [1]

În locul macromoleculilor, *Yamashita* și *Fenn* au utilizat însă specii moleculare cu masa moleculară suficient de mică astfel încât să fie posibilă analiza cu un analizor cuadrupolar care avea un domeniu de mase de până la 450 u.a.m. Prin această analiză s-au elucidat procesele complexe prin care picăturile încărcate se divid prin evaporație. Experimentele lui *Yamashita* și *Fenn* au arătat pentru prima dată ca fasciculul ionic rezultat prin ESI conține o largă varietate de specii ionice. Spectrul de masă înregistrat prin ESI a dovedit că aceste specii includ ioni în clusteri cu molecule de solvent și/sau specii neionizate, și că natura ionilor rezultați depinde de compoziția soluției originale, de temperatură și compoziția băii de gaz și de potențialul aplicat capilarului. Rapoartele lor au demonstrat că această tehnică de ionizare este capabilă să producă o varietate de clusteri de ioni și mai ales că ESI permite analiza prin spectrometrie de masă a moleculelor organice și bioorganice de masă moleculară foarte mare și oferă posibilitatea obținerii de ioni în fază gazoasă din compuși nevolatili sau prea labili pentru a putea fi analizați prin spectrometria de masă, utilizând metodele clasice de ionizare.

1.2 Teoria fenomenului de ionizare prin electrospray

Fenomenul ionizării prin electrospray, ce vizează formarea în final a ionilor în fază gazoasă presupune trei etape caracterizate fiecare de procese fizico-chimice diferite: 1) producerea picăturilor încărcate la vârful capilarului de electrospray; 2)

scindarea picăturilor prin evaporarea solventului și dezintegrări repetate ce conduc la formarea de picături extrem de mici cu stare de înaltă încărcare electrică; 3) generarea ionilor în fază gazoasă din picăturile mici purtând sarcină multiplă.

1.2.1 Mecanismul de producere a picăturilor încărcate

În figura 1.2.1 se prezintă diagrama schematică a unei surse ESI tipice, circuitul electric de cuplaj cu spectrometrul de masă în care este inserată și principalele procese responsabile de electropulverizare în *positive ion mode*.

În principiu, sursa cuprinde doi electrozi și anume capilarul ESI de oțel inoxidabil și contraelectrodul spectrometrului de masă conectate împreună (și în final la masă) prin intermediul unei surse de înaltă tensiune ce dezvoltă tensiuni (pozitive și negative) de până la 5-6 kV. În condiții tipice de funcționare, soluția conținând proba de interes este pompată prin capilarul ESI, menținut la potențial ridicat, și pulverizată înspre spectrometru. Dacă prin capilarul din fig.1.2.1 jetul de soluție, care conține proba dizolvată în solvent și un eventual adaos de electroliți, este pompat în absența vreunei tensiuni aplicate, la capătul acestuia se formează picături de lichid. Ele se detașează și cad în momentul în care devin suficient de mari încât greutatea lor depășește valoarea forței de tensiune superficială care le menține în coloana de lichid a capilarului. Prin aplicarea unei tensiuni pe capilar, primul efect vizibil constă în modificarea traiectoriei picăturilor care, în cădere, tind să aibă o componentă orizontală în direcția contraelectrodului. Pe măsura ce diferența de potențial dintre capilar și contraelectrodul P crește, picăturile desprinse devin tot mai mici, iar componenta orizontală a traiectoriei lor se mărește. Când debitul jetului de lichid este menținut constant, frecvența de desprindere a picăturilor crește pe măsură ce dimensiunea lor scade. În plus, este observabilă și o mărire a vitezei lor. Continuând creșterea tensiunii aplicate capilarului, picăturile devin vizibil alungite în direcția contraelectrodului atât timp cât sunt încă atașate capilarului, iar după desprindere, traiectoriile devin aproape orizontale înspre placa. În aceste condiții, o examinare atentă, arată că picăturile se formează la capătul unei coloane de lichid, numită *con Taylor* ce se extinde dincolo de capilar [1-3]. În continuare, creșterea tensiunii capilarului are drept consecință alungirea acestei coloane și îngustarea ei, până când devine punctiformă. Acum picăturile desprinse devin foarte mici, aproape în sensul efectului *Tyndall*, dar numai pe o distanță scurtă de la capătul coloanei de lichid, după care se "evaporă" complet. O tensiune mai ridicată determină o tranziție instantanee spre o stare în care se produce o ceață fină de picături, din puncte-sursă împrăștiate în jurul vârfului capilarului și concomitent coloana de lichid dispare.

Micro-electrospray:

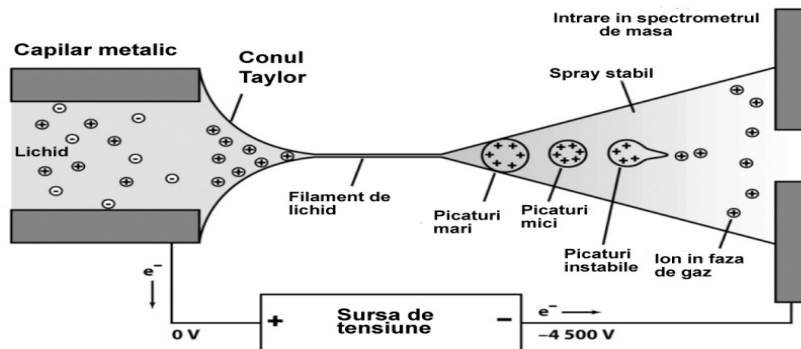
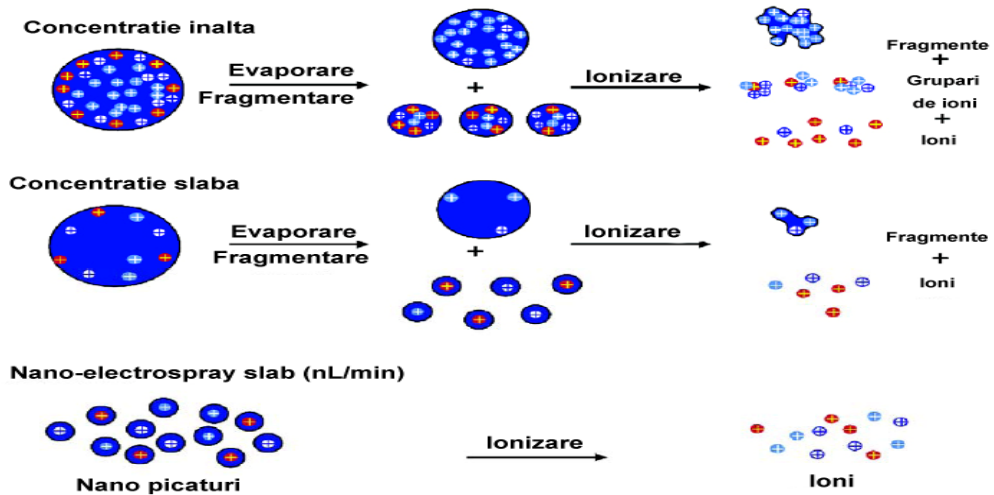


Fig.1.2.1 Schema principalelor procese fizico-chimice ale ionizării prin electrospray în *positive ion mode*. Aplicarea câmpului în lichid duce la formarea unui strat dublu electric. Acumularea de sarcină la suprafața meniscului destabilizează meniscul și determină pulverizarea de picături încărcate. Prin evaporarea solventului și divizarea picăturilor rezultă ioni în fază gazoasă [7]

Acest fenomen de electropulverizare își găsește explicația în faptul că, la aplicarea unei tensiuni pe capilar, câmpul electric apare în soluție, iar ionii disociați electrolytic se deplasează sub acțiunea câmpului, până la formarea unei distribuții de sarcină care contracarează câmpul aplicat (fig.1.2.1). În aceste condiții, zona cu soluție din interiorul capilarului va fi o zonă în care câmpul nu este prezent. Când capilarul este menținut pozitiv, adică sursa funcționează în *positive ion mode*, ionii pozitivi vor fi dirijați înspre meniscul de lichid, în timp ce ionii de semn contrar vor dobândi o *mişcare de drift* dirijată invers, îndepărtându-se de menisc. În *negative ion mode*, capilarului i se aplică un potențial negativ și ionii negativi vor fi dirijați

înspre menisc. Când forța *coulombiană* de respingere reciprocă, dintre ioni și suprafața capilarului (de aceeași polaritate), depășește forța de tensiune superficială a lichidului, suprafața expandează, picăturile de lichid de aceeași polaritate sunt expulzate de pe suprafața de lichid și dirijate în direcția câmpului dintre capilar și placă. În acest fel, prin mărirea câmpului, din con emerge un jet fin care se divide în picături mici, încărcate. Picăturile rezultate se află în echilibru dinamic întrucât ele sunt expulzate la o valoare a razei ce asigură echilibrul forțelor de coeziune respectiv respingere coulombiană, a sarcinilor de același semn. În cazul capilarului pozitiv, picăturile sunt și ele pozitive datorită excesului de cationi de la suprafața conului Taylor și din jetul format. Dacă electrolitul prezent în soluție este spre exemplu NaCl, în *positive ion mode* excesul de ioni de la suprafața picăturii sunt ionii de Na⁺, iar în *negative ion mode* sunt cei de Cl⁻. Acest mod de încărcare, care depinde de deplasarea ionilor pozitivi și negativi în direcții contrare sub acțiunea câmpului electric, este de fapt un *mecanism electroforetic* [8].

Picăturile încărcate produse din jet sunt în continuare dirijate spre contraelectrod. În timpul zborului de la capilar la contraelectrod, picăturile și ionii ce rezultă din ele intră într-o baie de gaz fierbinte, suferind ciocniri multiple cu moleculele acestuia și ajung într-o stare de desolvatare determinată atât de timpul de tranzit, temperatura băii de gaz cât și de concentrația efectivă a vaporilor de solvent din baia de gaz [1,2]. Timpul de tranzit estimat din mobilitatea ionilor și intensitatea câmpului electric dintre capilar și placă fiind de aproximativ 10 ms, numai ionii stabili termic vor "supraviețui". În plus, după numeroasele coliziuni o parte din ei se descarcă.

O parte a ionilor din acest jet traversează skimmer-ul spectrometrului și vor putea fi analizați în funcție de masă. O condiție esențială este ca jetul de gaz să fie uscat adică, să nu conțină deloc vapori de solvent. În caz contrar, temperaturile scăzute atinse în timpul expansiunii adiabatică a gazului determină condensarea vaporilor pe ioni, formând clusteri care pot deveni foarte mari.

Posibilitatea acestui efect este indicată de faptul că, prin creșterea debitului de lichid sau prin descreșterea celui de gaz, celălalte condiții rămânând neschimbate, curentul de ioni corespunzător tuturor peak-urilor înregistrate de *Fenn* cu analizorul cuadrupolar scade drastic chiar dacă curentul total la contraelectrod rămâne același. De unde rezultă că, în aceste condiții, populația clusterilor mai mici de ioni descrește mult mai mult decât cea a clusterilor mari de ioni [1-3].

Din cele de mai sus rezultă că, valoarea potențialului la care se produce electropulverizarea depinde de compoziția lichidului, forma capilarului, de presiunea și compoziția gazului din incintă, dar, cel mai mult, de distanța dintre capilar și contraelectrod, adică de intensitatea câmpului electric local. În cazul sursei de ioni cu electrospray echipată cu un capilar metalic având 0.1 mm diametru interior și 0.2 mm exterior, poziționat la 1-3 cm distanță de contraelectrod, tensiunea necesară pentru inițierea electropulverizării este aproximativ 2-3 kV. Întrucât capilarul ESI este foarte subțire, câmpul electric măsurat în aer, la vârful capilarului, este extrem de ridicat. Valoarea acestui câmp, când contraelectrodul are suprafața mare și plană, poate fi evaluată prin ecuația stabilită de *Smith* [9] și care exprimă valoarea intensității câmpului electric la vârful capilarului de electrospray pentru generarea instabilității conului Taylor și formarea jetului fin de picături încărcate:

$$E_c \approx (2\sigma \cos\theta / \epsilon_0 r_c)^{1/2} \quad (1)$$

unde σ reprezintă coeficientul de tensiune superficială al solventului, ϵ_0 este permitivitatea electrică a vidului, r_c este raza capilarului, iar θ este semiunghiul

conului *Taylor*. Din ecuația (1) rezultă automat valoarea potențialului ce trebuie aplicat capilarului pentru inițierea procesului de electrospray:

$$V_c \approx (r_c \sigma \cos\theta / 2\epsilon_0)^{1/2} \ln(4d/r_c) \quad (2)$$

Din ecuațiile (1) și (2) rezultă dependența :

$$E_c = 2V_c [r_c \ln(4d/r_c)]^{-1} \quad (3)$$

unde V_c reprezintă potențialul aplicat capilarului, r_c raza exterioară a capilarului iar d distanța de la capilar la contraelectrod. Din relațiile de mai sus rezultă că prin aplicarea, spre exemplu, a unui potențial de 2kV unui capilar cu raza $r_c = 10^{-4}$ m și $d = 0.02$ m se generează un câmp electric la vârful capilarului $E_c \approx 6 \cdot 10^6$ V/m. Cel mai important parametru geometric este r_c și întrucât E_c este invers proporțional cu raza capilarului, E_c descrește drastic cu r_c și lent cu d prin dependență logaritmică.

Presupunând că, în cazul fenomenului ESI separarea de sarcină este de natură electroforetică rezultă că, în condiții de spray stabil în *positive ion mode*, picăturile pozitive emise vor transporta continuu ioni pozitivi. Necesitatea creerii echilibrului de sarcină într-un asemenea dispozitiv de curent electric continuu precum și faptul că numai electronii pot traversa legăturile metalice alimentând potențialul electric al electrozilor (Fig.1.2.1), conduc la ipoteza că, procesul ESI include o conversie electrochimică a ionilor prin transfer de electroni. În acest fel, sursa de ioni cu electrospray poate fi privită ca un tip special de celulă electrolitică în care transportul ionilor nu apare într-o soluție continuă precum în cazul electrolizei obișnuite ci, o parte din acest transport ionic este creat chiar și în fază gazoasă. La electrodul pozitiv, care în *positive ion mode* este interfața lichid-capilar metalic, se generează reacția electrochimică de oxidare care furnizează soluției ioni pozitivi, prin convertirea atomilor de metal ai capilarului în ioni pozitivi ce pătrund în soluție [10]. Curentul de electroni rezultați din reacția de oxidare este dirijat, evident, înspre sursa de înaltă tensiune ce alimentează capilarul pozitiv (Fig. 1.2.1). La contraelectrod apare reacția de reducere cu dirijarea electronilor *dinspre* sursa de înaltă tensiune. Când sursa ESI funcționează în *negative ion mode*, echilibrul de sarcină este asigurat, pe baza aceluiași mecanism, de reacția de reducere la electrodul negativ, care este acum capilarul ESI și de oxidare la contraelectrod.

1.2.2 Scindarea picăturilor și fisiunea coulombiană

Picăturile încărcate produse prin spray suferă în continuare, în sursa ESI, un fenomen de divizare datorită evaporării continue a solventului în timp ce sarcina rămâne constantă. Divizarea picăturilor la o sarcină constantă a fost confirmată experimental prin observarea directă a picăturilor de către *Davis et al.* [11] într-un experiment utilizând analizor quadrupolar ion trap, cu vizualizarea picăturii prin *light-scattering*.

Prin evaporarea solventului raza, r_c , a picăturii descrește continuu conducând în acest fel la o micșorare a forței de coeziune ce menține picătura [12]. Sarcina electrică a picăturii rămânând constantă, va conduce la o mărire a forței de respingere electrostatică a sarcinii situată pe suprafață, până când picătura atinge așa-numita *limită de stabilitate Rayleigh*:

$$q_{RY} = 8\pi(\epsilon_0 \sigma r_c^3)^{1/2} \quad (4)$$

Ecuația (4) care reprezintă expresia matematică a limitei *Rayleigh* arată de fapt condiția în care forța de respingere electrostatică devine egală cu forța de

coeziune care menține picătura întreagă. Picătura încărcată devine instabilă când raza r_c și sarcina să satisfacă ecuația (4) (ce se obține matematic, din egalarea celor două forțe: de repulsie coulombiană și de tensiune superficială). Experimental, s-a observat că picăturile suferă fisiune în momentul în care sunt foarte aproape de limita *Rayleigh*. Prin micșorarea treptată a volumului, la o evaporare continuă a solventului, raportul sarcină/volum crește foarte mult ceea ce are drept consecință atingerea stării de instabilitate care provoacă fisiunea *Rayleigh* sau *dezintegrarea electrodinamică*. În acest proces, de fapt, prin fragmentarea picăturii, sarcinile electrice excedentare responsabile de instabilitate sunt expulzate până când raportul sarcină/volum atinge din nou valoarea stării de stabilitate. În dezintegrare, se apreciază că se elimină aproximativ 15% din sarcina totală a unei picături și totodată aproximativ 2% din masa de dinainte de fisiune. După câteva cicluri de evaporare/fisiune *Rayleigh*, se produc clusteri de ioni în fază gazoasă.

1.2.3 Teorii privind mecanismul producerii ionilor în fază gazoasă

Pentru explicarea formării ionilor în fază gazoasă din picăturile foarte mici încărcate electric, rezultate în urma fisiunii coulombiene, au fost propuse două mecanisme susținute de teoria matematică corespunzătoare. Primul mecanism a fost propus de către *Dole și colab.*[3] concomitent cu primele lor experimente de ESI-MS. Fiind interesat în determinarea maselor moleculare ale soluțiilor de polistiren și presupunând că numai acest tip de molecule a fost prezent în particulele pulverizate, *Dole* a putut postula formarea unei picături conținând un singur ion pseudomolecular. Teoria sa se bazează pe ideea că, fisiunea coulombiană a picăturilor continuă și dincolo de limita *Rayleigh* până când din aceste fisiuni repetate rezultă o picătură de dimensiuni extrem de mici, conținând un singur ion. Ulterior, prin evaporarea solventului, ca urmare a ciocnirilor cu atomii gazului uscat din interfața, rezultă ionul în fază gazoasă. Acest model a fost denumit, de *Dole*, *Modelul Sarcinii Reziduale, Charged Residue Model (CRM)* sau *Teoria Picăturii cu Ion Singular (Single Ion Droplet (SID) Theory)*.

Cel de al doilea mecanism a fost propus de *Iribarne și Thomson* [14] și este cunoscut sub denumirea de *Teoria Evaporării Ionice, Ion Evaporation Theory* (Fig.1.2.2). În această teorie se presupune că, ionul în fază gazoasă este generat prin evaporarea sa direct de pe suprafața unei picături puternic încărcate electric. Această emisie a ionului se datorează, forței coulombiene de respingere dintre ionul încărcat și celelalte sarcini de pe picătură. Analizând acest fenomen, *Iribarne și Thomson* au ajuns la concluzia că intensitatea câmpului electric de la suprafața picăturii încărcate, care se evaporă, poate deveni suficient de mare astfel încât să determine desorbția unui ion din picătura de lichid.

Teoria *Iribarne -Thomson* [14] afirmă că, emisia directă a ionului are loc numai după descreșterea considerabilă a razei picăturii și că, deși aflat în competiție cu respingerea coulombiană, emisia devine proces predominant pentru picăturile cu rază mai mică de 10 nm.

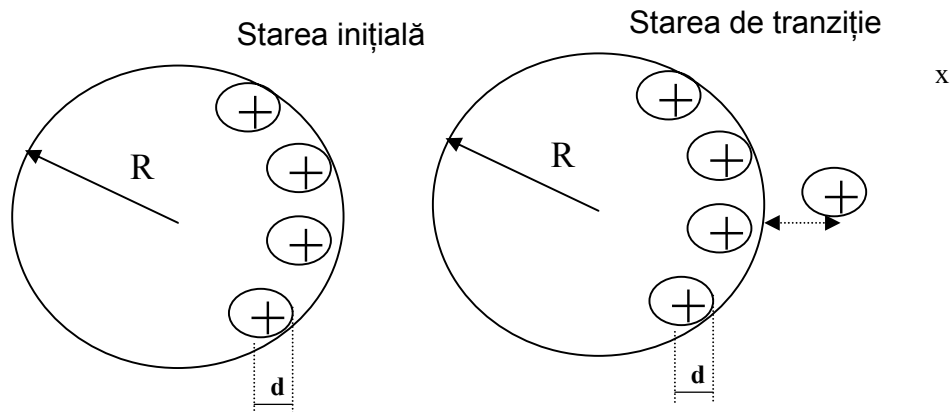


Fig.1.2.2. Modelul lui *Iribarne-Thomson* de evaporare ionică. Starea inițială și cea de tranziție prezintă o picătură de raza R cu un exces de ioni pozitivi simplu încărcăți la suprafața. Ionii sunt înconjurați de sfera de solvatare, de raza d . În starea finală, un ion se evaporă la distanța x de picătură (conform teoriei Iribarne x este aproximativ $0,6 \text{ nm}$, $R < 10 \text{ nm}$) [15]

În sprijinul acestui model conceptual, *Iribarne* și *Thomson* au adus dovezi experimentale prin măsurători de mobilitate, atât pentru ionii negativi cât și pentru cei pozitivi rezultați din ceața de picături încărcate, care sunt pulverizate din soluții conținând diferite specii moleculare.

O extindere a acestui model a fost inițiată de *J.B. Fenn* care, pornind de la conceptul lui *Iribarne și Thomson*, a dezvoltat o teorie similară ce explică formarea ionilor multiplu încărcăți în fază gazoasă. Însă, între studiile experimentale ale lui *Iribarne și Thomson* și cele ale lui *Yamashita și Fenn* există o diferență principală majoră, și anume în ceea ce privește metoda de producere a particulelor încărcate. Astfel, în timp ce *Iribarne și Thomson* provoacă o încărcare a picăturilor prin însuși procesul de pulverizare, *Yamashita și Fenn* determină pulverizarea picăturilor prin capilarul menținut la o tensiune ridicată, pulverizare ce este o consecință a existenței sarcinilor electrice (ionii formați prin disociere în soluție). În acest din urmă caz, potențialul ridicat al capilarului are rolul de a mări densitatea de sarcină de pe suprafața picăturii. Rezultatul este deci, o dispersare de picături purtând aceeași sarcină, de același semn (cu al potențialului capilarului), și nu pulverizarea unui amestec de particule cu sarcini electrice contrare.

Deși modelul lui *Dole* a fost reluat de *Rollgen* [16], care a furnizat și suportul experimental și matematic, iar modelul *Iribarne-Thomson* a fost succesiv dezvoltat și confirmat de *Fenn*, reluat de *Loscertales și Fernandez de la Mora* [17] și examinat cantitativ de *Tang și Kebarle* [18], nici una din cele două teorii nu au găsit până în prezent un consens general, rămânând în continuare un subiect de discuție și cercetare.

Ambele însă, contribuie la elucidarea, într-o oarecare măsură, a proceselor fizico-chimice responsabile de fenomenul ionizării prin electrospray, majoritatea trăsăturilor caracteristice ale spectrelor de masă ESI putând fi explicate fie cu unul, fie cu celălalt dintre modele.

1.3 Ionizarea prin nanoelectrospray

Sursa de ioni cu nanoelectrospray (Fig. 1.3.1) a fost concepută și introdusă pentru prima dată în spectrometria de masă de către *Mann* și *Wilm* [19]. În cazul tehnicii clasice de nanoelectrospray emitorul de ESI este format dintr-un capilar de sticlă terminat printr-un vârf cu un orificiu de aproximativ 20-30 μm diametru interior, în care proba lichidă de analizat (10-15 μL) este introdusă cu ajutorul unei pipete de tip „microloader”. Un fir de oțel inoxidabil conectat la sursa de înaltă tensiune este de asemenea introdus în capilar. Procesul de ESI se declanșează prin aplicarea pe firul de oțel din interiorul soluției [21-22] a unei tensiuni mult mai mici decât în cazul surselor microESI prezentate mai sus, și anume de 1-1.5 kV.

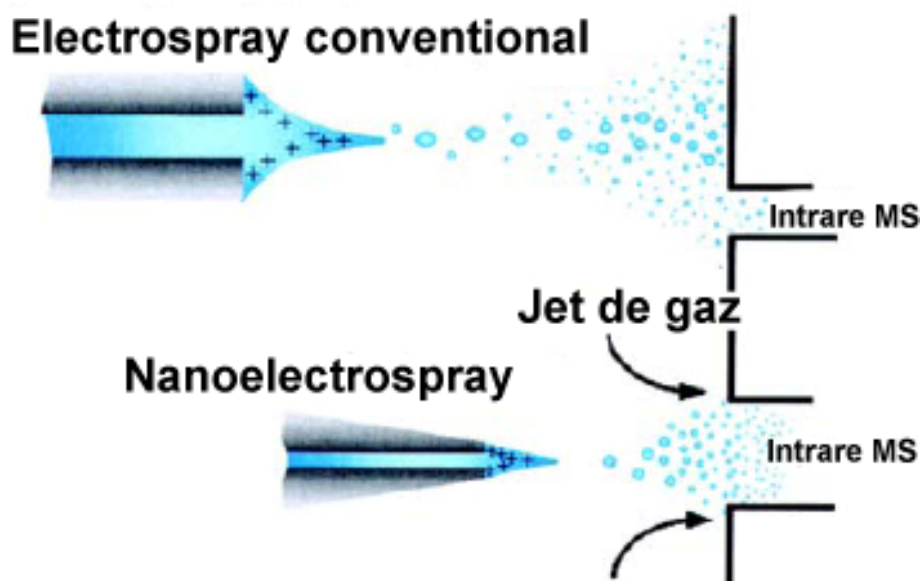


Fig.1.3.1. Procesul de electropulverizare în sursa convențională cu microspray și cea cu nanospray [20]

O altă variantă o reprezintă nano-emitorii de tip capilar de sticlă, având deasupra suprafața exterioară un strat dintr-un material conductor precum, aur, argint, cupru, carbon sau diverse aliaje. În cazul acestor sisteme de nanoESI, procesul de electrospray se asigură prin conectarea suprafeței exterioare la sursa de înaltă tensiune a spectrometrului, cu ajutorul unui fir conductor. Astfel de nano-emitori pot funcționa atât în regim de sursă ESI independentă cât și ca electropulverizator pentru MS în cuplaje cu sisteme de separare precum HPLC, CE etc. [23].

Debitele asigurate de acești emitorii sunt 400-500 nL/min ceea ce face ca sensibilitatea surselor de nanoESI să fie mult superioară celor cu infuzie de tip microESI prin ac de seringă.

În ultimii ani, o dată cu explozia tehnologiei microfluidice și a sistemelor de chip, așa cum se va discuta și în cele ce urmează, sursele nanoESI au fost mult îmbunătățite în termeni de debit, sensibilitate, reproductibilitate și calitate a semnalului prin conceperea, dezvoltarea și introducerea în spectrometria de masă a micro- și nano-chipurilor pentru electrospray.

CAPITOLUL II

Tendințe actuale în dezvoltarea sistemelor de ionizare prin chip-electrospray în spectrometria de masă

Dezvoltarea chipurilor pentru ESI-MS, crează premiza unor performanțe superioare datorită atât miniaturizării, în comparație cu metodele tradiționale discutate mai sus precum microESI bazate pe infuzie prin seringă sau nanoESI cu pulverizare prin capilar, cât și a consumului redus de probă și al timpului de execuție. Integrarea unor faze multiple pentru prepararea probelor și introducerea lor prin ESI, rămâne o mare provocare științifică și tehnică [24-26].

În pofida noii dezvoltări a tehnicilor instrumentale, caracterizarea completă a unei probe biologice utilizând ESI MS și tehnicile aferente rămâne în esență o încercare analitică foarte dificilă în principal din următoarele cauze:

- i) posibilităților reduse de detecție prin MS a componentelor aflate în concentrație mică în amestecuri biologice deosebite de complexe;
- ii) reproductibilitatea limitată a experimentelor efectuate prin ESI bazată pe capilar sau seringă-pompă ca urmare a variabilității formei și dimensiunii vârfului de ESI de la un electropulverizator la altul;
- iii) sensibilitatea mai scăzută a dispozitivelor ESI cu injectare prin seringă sau capilar;
- iv) imposibilitatea de a menține prin seringă pompă sau capilar a unui semnal ESI de lungă durată, din cauza debitului ridicat (seringa: $\mu\text{L}/\text{min}$; capilar: 3-400 nL/min) de injectare și a volumului redus de lichid ce poate fi încărcat în seringă respectiv capilar.

Uneori sunt necesare proceduri laborioase de preparare a probelor, inclusiv separarea, purificarea și eventuala depolimerizarea/digestia pentru eșantioanele mai complexe, înainte de a fi supuse analizei prin spectrometrie de masă. Tehnicile moderne folosesc sisteme de microanaliză totală (microTAS), ce au fost dezvoltate pentru a facilita integrarea pe un singur chip a mai multor operații, precum prepararea probelor, condiționarea lor, separare prealabilă, purificare și introducerea adecvată prin electrospray în spectrometrul de masă în vederea obținerii unor informații detaliate compoziționale și structurale prin analiza de screening și fragmentare MS. Această nouă dezvoltare urmărește maximizarea performanțelor ESI MS prin reducerea cantității necesare de probă, a timpului de analiză, precum și a costurilor legate de operațiile preliminare și a celor legate de exploatarea propriu-zisă a aparatului.

Dispozitivele microfabricate și tehnologiile ultramoderne "Lab on a chip"[27-28], au capacitatea de a manipula, distribui și detecta cantități infime de probe. Particularitățile majore asociate acestei miniaturizări constau în viteza ridicată cu care se fac determinările, reducerea volumului de probă utilizat și a consumului de reactivi, integrarea unor elemente operaționale și capacitatea de a asigura o viteză de analiza mărită prin desfășurarea concomitentă a operațiilor. Utilizarea acestor dispozitive microfluidice în spectrometria de masă este așadar justificată, de vreme ce probele sunt procesate în manieră secvențială și este utilizat ca detector numai un singur spectrometru de masă. În ultimii ani, au fost investite eforturi semnificative în dezvoltarea spectrometrelor de masă cuplate prin intermediul ionizării de tip electrospray cu dispozitive miniaturizate [29-31], iar în viitorul

apropiat este de așteptat interfațarea cu sisteme și mai complexe. Până în prezent a fost realizată integrarea electroforezei capilare (CE), electrocromatografiei capilare (CEC) și microcromatografiei lichidă (μ LC), a elementelor de preconcentrare și microreacție, precum și cuplarea acestor dispozitive microfabricate cu spectrometria de masă cu ionizare prin electrospray. Dezvoltarea unor strategii precise de injectare a probelor prin intermediul chipurilor, în separările ultrarapide prin CE și a separărilor complexe 2D, cum ar fi cromatografia electrocinetică micelară urmată de electroforeza capilară sau CEC urmată de CE ca și implementarea analizei cu viteză mare pe microchip, reprezintă un reper major în performanțele și proiectarea microhidrodinamică. Utilizarea de rutină a tehnicilor microfluidice, în analiza ADN, a proteinelor, a hidraților de carbon sau în selecția medicamentelor, a stabilit câteva repere care demonstrează pe deplin puterea acestor dispozitive analitice microfabricate [32-35]. Aceste aparate sunt capabile să opereze volume de probă în domeniul microlitrilor și să analizeze volume mici de ordinul 1 – 10pL.

Utilizând tehnologia sistemelor micro-electromecanice (MEMSs) și variate metode chimice, o multitudine de microcanale interconectate (10-100 μ m diametru interior) pot fi fabricate pe un microchip, permitând ca proceduri analitice ce cuprind o arie largă precum separări ale fragmentelor de ADN, reacții antigen-anticorp, metode flowcitometrice și amplificări PCR să poată fi executate pe un dispozitiv microTAS [25]. Nu doar complexa analiză a ADN poate fi realizată pe un chip de microTAS, dar și pretratarea, detectarea, digestia, separarea, depolimerizarea specifică, reacții enzimatiche specifice în analiza proteinelor, hidraților de carbon, compușilor glicoconjugați, lipidelor, moleculelor mici, medicamentelor, poluanților și diverși metaboliți pot fi executate pe un microdispozitiv de tip microTAS. Cele mai larg utilizate dispozitive microfluidice de până acum sunt acelea ilustrate de microchipul pentru electroforeză. Ele utilizează un flux electroosmotic (EOF) ce conduce fluidul în microcanale și permite o separare de o eficiență ridicată comparabilă cu electroforeza capilară, doar că în acest caz, timpul necesar poate fi atins doar într-o zecime din timpul necesar în CE clasică.

Pentru a cupla dispozitivele microTAS cu MS este necesară însă și o interfață robustă și stabilă [25, 29-31]. Două tipuri de interfețe de ionizare, ionizare prin electrospray și o matrice de desorbție/ionizare cu laser (MALDI), au fost dezvoltate pentru instrumentele comerciale MS. Majoritatea dispozitivelor microfluidice de analiză totală sunt cuplate cu interfețe pentru nanoESI, aceasta deoarece ce ordinul de mărime al eșantioanelor lichide în varianta nanoESI este comparabil cu cel ale fluidelor din microcanale. Ultimul scop a cuplării sistemelor microTAS cu MS este cel de a utiliza un chip microfluidic pentru o preparare a probelor mai rapidă, într-o singură etapă, și introducerea probelor on-line subsecvențial pentru analiza MS, întrucât majoritatea chipurilor microfluidice utilizate până în prezent (mai mult sau mai puțin disponibile comercial) execută doar separarea probelor urmată de electrospray sau MALDI sau numai electrospray prin chip. Există, desigur, o mare provocare tehnică asociată dezvoltării unei analize totale pe chip și din acest motiv realizările metodologice de până acum sunt întrucâtva mai modeste decât cele legate de chipurile monofuncționale, însă totodată foarte promițătoare. În continuare, va fi discutată funcționarea unei interfețe de electrospray construită pentru chipuri pe bază de sticlă (sau cuarț) și polimeri și vor fi prezentate principalele realizări în integrarea unor funcții complexe, precum digestia și preconcentrarea pe dispozitive microfluidice de tip microTAS, ce pot intensifica acuratețea identificării *de novo* și stabilitatea îndelungată a procesului de electrospray, condiții atât de necesare în studiile de proteomică și glicomică.

2.1 Cuplarea dispozitivelor chip microfabricate cu ESI-MS

În ultimii ani s-a demonstrat că chipurile monofuncționale, asigurând doar electropulverizarea, sau cele polifuncționale de tip microfluidice microTAS pentru manipularea soluțiilor lichide sunt perfect compatibile cu sursele de ESI miniaturizate în cuplaj cu spectrometrul de masă [31-35]. Cu toate acestea, cuplajul și adaptarea sistemelor chip monofuncționale sau microTAS la ESI-MS este un procedeu foarte laborios cuprinzând următoarele etape generale: i) realizarea unei încorporări optime a chipului în configurația sursei; ii) poziționarea chipului față de orificiul de intrare al MS; iii) determinarea valorilor optime ale potențialelor ESI și MS.

Cuplajul cu MS a unui sistem chip sau microTAS integrat necesită întotdeauna construirea de sisteme de montare pentru conectarea microchipului și ajustarea corespunzătoare a ansamblului astfel încât, el să corespundă configurațiilor surselor ESI, ale spectrometrelor de masă cu care se realizează interfațarea. Interfața construită trebuie tratată optimizată pentru manipularea chipului, introducerea probei și livrarea corespunzătoare a tensiunilor. În particular, poziționarea exactă a microchipului în sursele ESI ale spectrometrelor este o etapă crucială pentru o operare robustă și reproductibilă a microchipului în vederea efectuării funcțiilor de separare, purificare, preconcentrare pe chip și infuzarea lor prin ESI MS [23, 24, 36, 37].

Evaluarea comparativă a performanțelor obținute cu diferite tipuri de aliniamente față de orificiu MS va ghida optimizarea ulterioară a funcțiilor microchipului precum: adaptarea volumului injectorului microfabricat și starea suprafeței microcanalului pentru a putea asigura un control riguros al fluxului electroosmotic și pentru a limita interacțiunea moleculei analitice cu pereții microcanalului. În cazul tuturor cuplajelor, etapa imediată următoare asamblării mecanice microTAS-MS o constituie optimizarea parametrilor electrolitului tampon (pH, concentrație, temperatura, natura), ai probei (concentrație, volum injectat), ai procesului de ESI (tensiune, flux gaz desolvatare, temperatura desolvatare) și ai MS (detecție, viteza scanare, parametri de izolare/fragmentare precursor).

Unul din elementele esențiale ale sistemului chip-ESI MS îl reprezintă emițătorul ESI, întrucât de caracteristicile acestuia depinde esențial calitatea spectrelor de masă obținute și, în ultima instanță, informația structurală rezultată din întregul experiment. În prezent, prin dezvoltarea puternică a tehnologiei de microfabricație, s-a putut elabora un mare număr de modele pentru emițătorul de electrospray compatibil cu cuplarea dispozitivului chip sau microfluidic microTAS cu MS.

2.1.1 Emițătorul de electropulverizare al unui microchip

În anii anteriori, MEMS a fost principala tehnologie pentru fabricarea microdispozitivelor din substraturi pe bază de siliciu, ca de exemplu cuarț și sticlă. Primul microdispozitiv ESI a fost construit în această abordare. În 1997, *Ramsey* și colaboratorii [38] au construit un chip din sticlă pentru ESI. Acest model a extins aplicabilitatea microdispozitivelor de la detecția prin fluorescență la detecția prin spectrometrie de masă. În același timp, după cum este prezentat în figura 2.1.1, grupul condus de *Barry Karger* a dezvoltat un dispozitiv similar cu un multicanal ESI pentru a permite analize mai performante [39]. Totuși, au fost semnalate unele probleme legate de faptul că un emițător deschis la exterior construit pe o margine plată fără nici un mecanism de reglare sau control al fluidului va forma o picătură mare ce va diminua eficacitatea separării datorită lărgirii benzii. Mai mult, există probleme asociate cu interfața ESI datorită hidrofilității emițătorului din sticlă sau

cuart. Soluția de spray va fi atrasă pe suprafața microchipului și va tinde să formeze o picătură mare ce intra în competiție cu o ionizare stabilă. Pentru a elimina această posibilitate și pentru a îmbunătăți performanțele microchipului suprafața a fost hidrofobizată. În acest fel se reduce umectarea la ieșirea din capilar a chipului, însă stabilitatea chimică poate fi afectată prin descărcare electrică. În plus, fără o presiune externă semnificativă pentru a genera o rată a fluxului de 100-200 $\mu\text{L}/\text{min}$, semnalul de electrospray nu a fost stabil din cauza curgerii electroosmotice scăzute. O altă încercare de a înlătura neajunsul a fost recurgerea la asistență pneumatică. În acest sens, un gaz de pulverizare și un lichid auxiliar au fost adăugate la capătul terminal al canalului de separare pentru a reduce dimensiunea picăturii și de asemenea, pentru a crește eficiența ionizării. Acest procedeu s-a constituit în timp ca bază pentru construirea nebulizatoarelor pneumatice miniaturizate ca parte integrantă a chipului. Într-un astfel de dispozitiv integrat, peptidele, dintr-un amestec conținând 5 astfel de structuri, au fost bine separate și ionizate pentru analiza prin MS.

Un model de electrospray direct de pe capătul unui canal a fost realizat pe un chip microTAS pe bază de polimer. *Wen* și colaboratorii [40] au utilizat policarbonatul (PC) pentru a fabrica un microchip și au incorporat o duză triunghiulară ascuțită la marginea chipului pentru a susține ionizarea și rezervoare pentru a facilita zona de concentrarea isoelectrică (IEF). Cu un asemenea sistem, un amestec de 3 proteine a fost bine separat prin IEF în canalul de separare și ionizat secvențial prin emițătorul ESI. Eficiența separării a fost mai slabă decât în cazul folosirii capilarelor funcționalizate, dar în schimb s-au eliminat problemele de umectare întâlnite în dispozitivele de sticlă ce exploatează proprietatea hidrofobă nativă a polimerului utilizat.

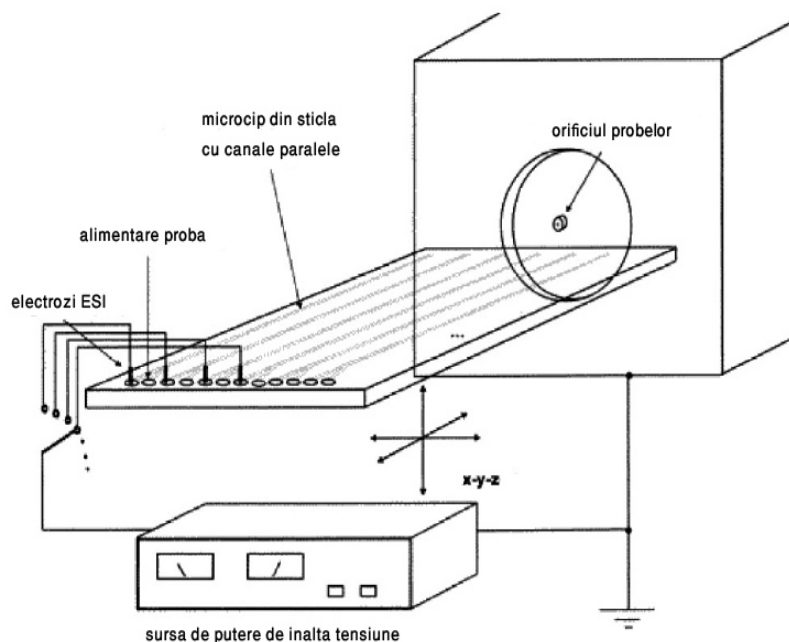


Fig. 2.1.1 Reprezentarea schematica a interfeței microchip multicanal ESI-MS dezvoltată de grupul lui *Karger* [39]

2.1.2 Dispozitiv de ESI prin capilar atașat unui microchip de sticlă

Producerea ionilor în fază gazoasă din ESI este mult mai eficientă dacă se utilizează un emițător de dimensiuni mai mici. În plus, este mai puțin complicat să se atașeze o linie de transfer ca o interfață de electrospray decât fabricarea prin decapare umedă. De asemenea se pot prevedea avantajele metodelor de fabricare a microchipurilor pentru a produce funcțiuni multiple prin microfabricare. Acest tip de model a fost prima oară introdus de grupul lui *Ruedi Aebersold* [41].

În figura 2.1.2 este prezentat un capilar lung de 12 cm care a fost atașat la marginea dispozitivului microfluidic și conectat la spectrometrul de masă. Acest capilar transportă proteinele prin curgere electroosmotică către spectrometrul de masă. Aplicarea unei tensiuni ridicate capilarului determinând ionizarea probelor la intrarea în spectrometrul de masă. În sistemul *Aebersold*, problema poziționării prin aliniere a capilarului nu este complet rezolvată, ea rămânând o deficiență a acestui model. În scopul de a atașa un capilar la capătul unui dispozitiv cu substrat tare, două metode principale au fost raportate pentru această cuplare. Mai întâi *Zhang* și colaboratorii [45] au utilizat decaparea dublă pentru a construi un canal larg în care a fost introdus capilarul. Procedura a fost reproductibilă, dar după interconectare s-a observat apariția unui volum mort semnificativ. Din acest motiv, într-un alt model, *Harrison* și grupul lui *Thibault* [46] au cooperat pentru a demonstra că există posibilitatea de a fixa un capilar, cu un volum mort mic ($<0,7\text{nL}$), prin modelarea unui orificiu superior îngust. Aceasta face chipul utilizabil cu un emițător de nanospray performant. În conformitate cu rezultatele raportate, probele din canalul separator pot fi bine transferate cu mai puțin fluid injectat, însă procesul de forare necesită îndemânare pentru a obține un aliniament precis al canalului și a reduce contaminarea lui în timpul fabricării chipului.

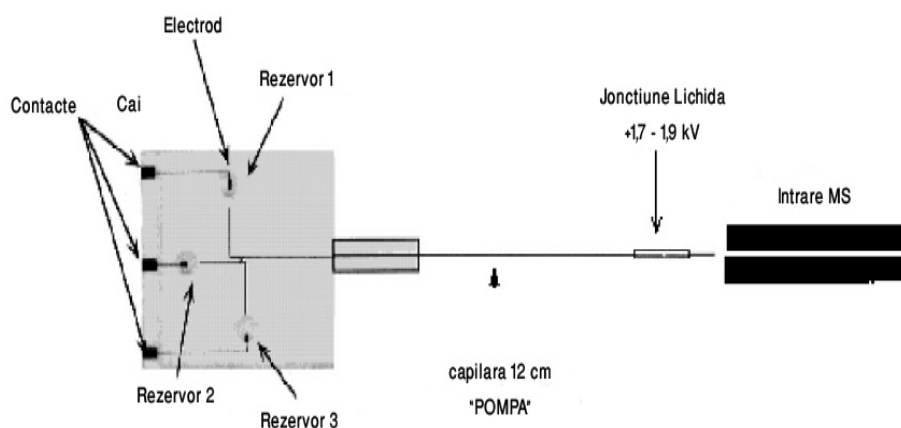


Fig. 2.1.2 Ilustrarea schematică a dispozitivului microTAS cu ESI pentru MS introdus de *Aebersold* [41]

În timp, atașarea unui capilar a devenit principalul model pentru chipurile ESI datorită ușurinței fabricării și performanțelor excelente ale ESI. Totuși, această abordare s-a dovedit a nu fi ușor de controlat și în plus oferă slabe reproductibilități. În scopul depășirii acestor neajunsuri și îmbunătățirii performanțelor sistemelor microTAS cu capilar extern atașat, *Henion* și colab. [42, 43] au construit un

microchip ce include separare prin electroforeză capilară urmată de electrospray (Fig. 2.1.3). Dispozitivul este reglabil și prezintă un tub emițător din oțel inoxidabil ce include un flux de reîncărcare și un gaz de pulverizare pentru a intensifica eficiența ionizării. Aceasta realizare oferă nu numai posibilitatea aplicării unei tensiuni optime de ESI, dar și de a se constitui ca o zonă tampon, ceea ce înseamnă că separarea nu este afectată de fluxul de pulverizare. Toate condițiile pot fi bine armonizate în emițătorul separat pentru fiecare dispozitiv microfluidic. În acest model, performanțele de electrospray au fost optimizate în afara dispozitivului și pulverizatorul a putut fi reatașat la diferite chipuri, ceea ce extinde timpul de viață și elimină problemele de contaminare. Rezultatele arată că eficiența separării prin utilizarea unui astfel de chip microfluidic poate atinge eficiența unei coloane cu 2860 de talere teoretice, permițând separarea și detectarea clară a moleculelor mici precum carnitina și acrilcarnitina utilizând dispozitive de electropulverizare cuplate. Dezavantajul semnalat în cazul acestui model este că efectul de diluare provenit de la fluxul pneumatic poate reduce dramatic sensibilitatea de detecție, impunând lucrul cu concentrații ceva mai ridicate ale probei aflate în solvent.

2.1.3 Capilare ascuțite neacoperite atașate la un microchip din sticlă

Pentru a elimina efectul de diluare cauzat de fluxul de pulverizare, un emițător de electropulverizare neacoperit devine o alternativă pentru utilizarea microchipurilor ESI. În scopul de a obține o ionizare stabilă fără ajutor pneumatic trebuie luate în considerare forma, dimensiunea interioară și proprietățile suprafeței emițătorului. De obicei un capilar îngust, cu un diametru exterior redus, poate genera *conul Taylor* pentru ESI, la o tensiune mai mică, înainte de a începe descărcarea de tip *Corona*.

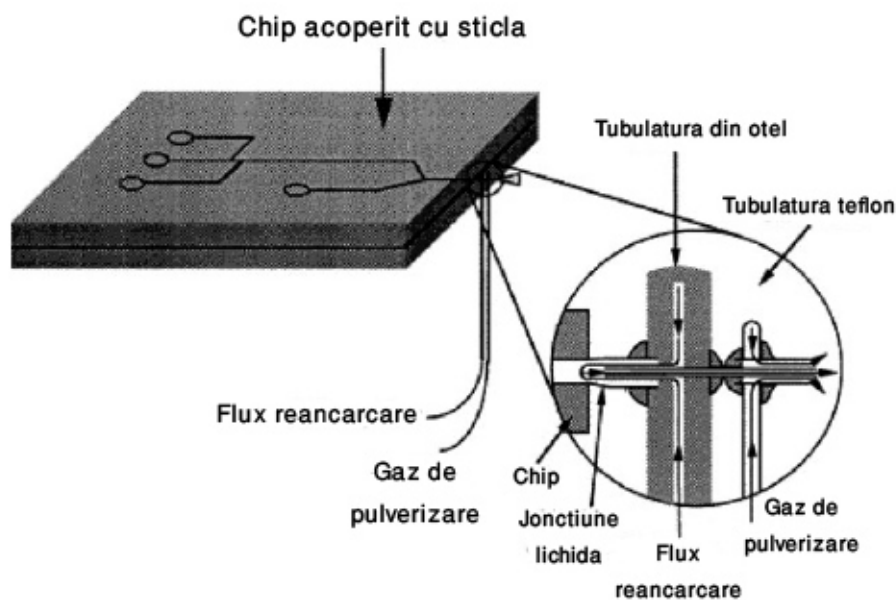


Fig. 2.1.3 Reprezentarea schematică a sistemului microTAS CE/ ESI MS conceput de grupul *Henion* [44]

Pe de altă parte, unele materiale conductoare, folosite pentru depunere pe suprafața emițătorului, ca de exemplu aurul și carbonul, pot mări stabilitatea semnalului de ESI și eficiența ionizării. Totuși, în anumite condiții de operare ale electropulverizării, s-a putut observa efectul de efervescentă care constă, în apariția bulelor de gaz la capătul pulverizatorului de ESI. În scopul de a elimina efectul de efervescentă și a obține performanțele unei ionizări stabile, tensiunea adecvată aplicată ESI joacă un rol important în modelul fără strat conductor.

În acest context, Grupul lui *Karger* [45] a construit un sistem microTAS CE/ESI MS cu interfață bazată pe joncțiune de lichid pe chip, în care tensiunea aplicată pentru electroforeză, care alimentează și circuitul CE poate fi de asemenea utilizată și pentru electrospray, prin joncțiune. În scopul transferului cu succes a probei prin joncțiune la emițătorul ESI, a fost fabricat un canal de ghidare pentru o aliniere mai precisă cu ieșirea canalului de separare. Din rezultatele comunicate, rezultă că a fost atinsă o eficiență ridicată de separare (echivalenta cu 40000 de talere teoretice), însă totodată apare clar că detecția la nivelul atomolar a fost practic compromisă din cauza diluării probei în joncțiunea de lichid. Un model similar a fost dezvoltat și de către grupul lui *Harrison* [46] care a creat un alt model, fără depunere metalică, prin adăugarea unei porțiuni suplimentare de canal, ce facilitează aplicarea tensiunii ESI. Porțiunea de canal a fost extinsă de la punctul de conectare dinspre capătul ascuțit al ESI înspre canalul de separare. Această metodă poate, de asemenea micșora efectul de lărgire al benzii de analit, asigurând și o sensibilitate mai mare de 7 fmol/ μ L, înregistrată la testarea acestor dispozitive pentru detecția peptidelor rezultate din digestia enzimatică.

2.1.4 Emițător capilar de electrospray atașat de un microchip din polimer

Comparativ cu substraturile din sticlă, plasticul are avantajul costurilor scăzute și a fabricației pe o scară largă, ceea ce le face mai atractive și mai potrivite pentru producerea în serie în scopuri comerciale. Mai multe metode, de la grefarea termică [47], decaparea cu laser UV [48], litografie cu raze X [49] și modelare prin copiere [50] au fost dezvoltate pentru a realiza microcanalele pe un dispozitiv pe bază de polimer. Până acum mai multe substraturi de polimer au fost utilizate pentru fabricarea chipurilor ESI cum ar fi, polimetil-metacrilat (PMMA), polimetilsiloxane (PDMS), polycarbonate (PC) etc. Două proprietăți fac ca polimerii să fie foarte potriviți ca materiale pentru fabricarea dispozitivelor microTAS pentru ESI. În primul rând, în comparație cu materialele din sticlă sau cuarț, plasticitatea polimerului la temperaturi acceptabile îl face adaptabil pentru fiecare formă. În acest fel, utilizarea materialelor plastice devine o alternativă satisfăcătoare pentru tehnologiile MEMS complicate. O a doua proprietate cheie, a dispozitivelor din plastic, este hidrofobicitatea lor. Datorită caracterului său hidrofobic nativ, plasticul este ideal pentru utilizare ca emițător pentru MS, fără nici o altă procedură de modificare. Mai mult, temperatura redusă impusă de procesul de producție este o caracteristică atractivă pentru substraturile din polimer, ceea ce face ca fabricarea microchipurilor să fie extrem de facilă în laboratoare fără o dotare specială. Cu toate acestea, fabricarea chipurilor ESI pe substraturile din polimer este oarecum limitată de plasticitatea acestora.

Asemănător cu chipurile din sticlă, fabricarea dispozitivelor ESI presupune, fie un capilar atașat la capăt, fie modelarea canalului electropulverizator direct pe suprafața chipului pe bază de polimer.

O primă variantă interesantă de microTAS CE/ESI MS polimeric a fost raportată de *Kameoka* și colaboratorii care au construit un chip microfluidic din polimer cu o ieșire deschisă la capătul canalului. Chipul a fost cuplat cu un micropulverizator [51]. Separarea probelor prin CE pe chip a fost urmată de ionizare prin electropulverizare ESI, ceea ce a demonstrat pentru prima dată că dispozitivele, pentru microfluide, pe bază de polimer pot fi cuplate on-line pentru detecția prin MS prin intermediul ionizării prin electrospray. Pentru interfațarea cu detectorul de tip MS, grupul lui *Chen* [52] a utilizat PDMS ca substrat pentru chipuri. O joncțiune lichidă a fost fixată la capătul canalului pentru a conecta capătul ascuțit al capilarului cu canalul de separare. Folosind ca detector spectrometrul de masă, grupul amintit a obținut rezultate excelente în separarea și identificarea atât a peptidelor standard, cât și a celor derivatizate prin acetilare.

2.1.5 Dispozitive ESI de introducere a probei, fabricate pe substraturi din silicon

Un alt tip de dispozitiv microTAS este cel dedicat injectării directe a probei, dispozitiv cu care se elimină neajunsurile tehnice ce decurg din integrarea etapei de separare. Într-un dispozitiv microTAS de introducere directă, emițătorul ESI poate fi construit în formatul unui șir de microcapilare dispuse paralel, format utilizat, în general, în analizele multiple. Abordarea analizei prin introducerea directă are însă dezavantajul că, poate conduce la suprimarea ionilor minori din amestecurile complexe, dar și la posibilitatea apariției efectului de interferență în timpul analizei MS. Cu toate acestea, prezintă avantajul clar al vitezei de lucru, ceea ce permite să fie executate cicluri multiple de fracționare a ionilor pe instrumente de MS, în timp foarte scurt. Majoritatea dispozitivelor de injectare directă au fost fabricate prin tehnologii MEMS utilizând substraturi din silicon. *Lee* și colaboratorii descriu un proces de fabricare a duzelor din parilenă la marginea unui microchip din silicon [53]. Emisia stabilă a ionilor poate fi atinsă la un debit minim de numai câțiva nL/min fără utilizarea unui gaz de pulverizare. Deși acest tip de dispozitiv necesită o tensiune relativ mare pentru obținerea a unei electropulverizări uniforme, utilizarea parilenei pentru fabricarea microvârfului depășește problemele de fragilitate asociate cu vârfurile capilarelor și astfel dispozitivul devine mai robust pentru comercializare.

Într-un alt model de introducere a probei, comercializat pentru bioanaliza probelor biologice [54], autorii au utilizat un proces de decapare profundă cu ioni reactivi (DRIE) sau MEMS pentru a construi o placă ESI miniaturizată. Un canal a fost gravat de-a lungul plăcii de silicon și o duză (10 μm DI x 30 μm DE) a fost conectată pe capătul canalului așa cum este prezentat în figura 2.1.4. Rezervorul gravat în partea din spate poate reține analitul pentru ionizare directă. De asemenea este posibilă cuplarea altor dispozitive de separare datorită volumului mort scăzut. Prin utilizarea tehnologiei MEMS, pot fi realizate analize multiple prin alinierea duzelor în serie, cu o mare densitate pe plăcuțe de câțiva cm^2 . Datorită vitezei mari de prelevare a analiților asigurată de acest gen de dispozitive, se poate utiliza convenabil un instrument MS funcționând în regim de tandem MS, pentru selectarea ionilor în primul analizator de masă și apoi detecția în cel de-al doilea analizator de masă, pentru a compensa lipsa separării. Acest microchip este de asemenea compatibil cu interfața MALDI-MS. Când este cuplat cu prelevarea probelor direct de pe un gel 2-D, probele formate in-gel pot fi analizate secvențial prin instrumente MALDI-MS și ESI-MS pentru a mări cantitatea de informații obținută. Limitările legate de neintegrarea separării, în varianta injectării directe, sunt depășite de forma miniaturizată și viteza de analiză rapidă, ceea ce furnizează o platformă

convenabilă și la costuri mici pentru analiza în proteomică.

2.1.6 Dispozitive ESI de introducerea a probei fabricate pe substraturi polimerice

În scopul obținerii unei microelectropulverizări performantă și stabilă, canalul de ieșire ESI trebuie să fie întodeauna ascuțit. Astfel, se reduce fenomenul de răspândire al lichidului și se micșorează tensiunea necesară inițierii procesului ESI și stabilirii conului *Taylor*. Substraturile polimerice, precum PDMS, PMMA și poliamidele, au fost des utilizate în acest scop întrucât, corespund destul de bine acestor deziderate.

Ca și în cazul substraturilor siliconice, și clasa de microTAS polimerice, cu injectare directă, prezintă varianta de dispozitiv de pulverizare multicanal (Fig.2.1.4) pentru analiza probelor multiple în regim *high throughput*. În această direcție, se remarcă mai ales studiile lui *Yuan* și *Shiea* care au construit un analizator secvențial sub formă de stea compus dintr-o formă ascuțită la ieșirea canalului deschis, ce a fost tăiat manual printr-un cuțit în substratul de PMMA [55].

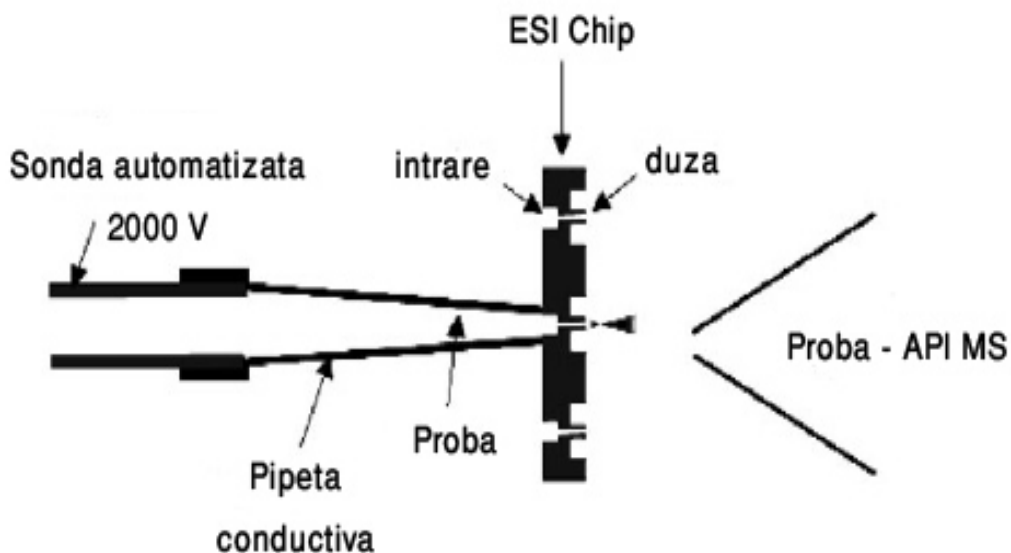


Fig. 2.1.4 Schema microchipului cu ieșiri multiple [55]

Lichidul poate fi prins în canalele adânci fără utilizarea unei plăci de acoperire. Dispozitivele de acest gen necesită însă rezervoare suficient de adânci pentru a minimiza efectul evaporării din canalul deschis. Mai mult, pentru a obține o ionizare prin electropulverizare eficientă este necesară aplicarea unei tensiuni relativ mari (3-4 kV).

Rolando și colaboratorii au dezvoltat mai recent o sursă model cu un microvârf ce funcționează în condiții de nano-electrospray așa cum este arătat în figura 2.1.5 [56]. În acest scop autorii au conceput în chip o „peniță” cu o structură planară, prin utilizarea fotorezistorului epoxi negativ SU-8, ce oferă calitate și reproductivitate mare în procesul de fabricație. Funcționarea micropeniței este foarte asemănătoare cu aceea a unui stilou cu pompă, astfel încât penițele conțin

un rezervor și o deschizătură capilară ce conduce proba de analizat în punctul de vârf al „peniței”. În această variantă de concepere a micropulverizării, potențialul de electrospray este redus cu succes la 1.5 kV, ceea ce îl face mult mai compatibil cu cerințele nanoESI decât multe dintre celelalte dispozitive microfluidice bazate pe canale.

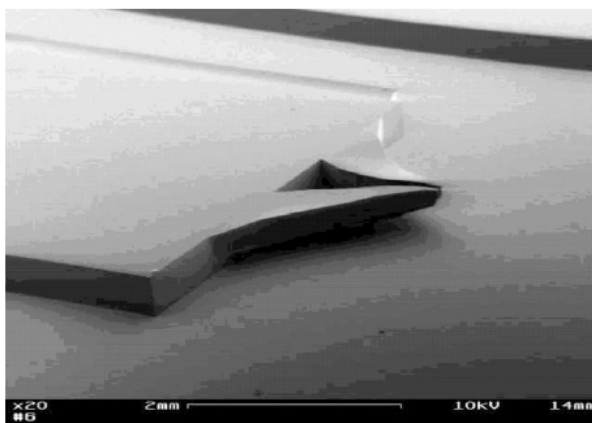


Figura 2.1.5 Fotografia unei structuri de tip penița [56]

Pentru majoritatea formelor ascuțite obținute prin prelucrare manuală, poziția conului lui *Taylor* nu este stabilă, ceea ce cauzează contaminarea între canale. În scopul reducerii fenomenului de contaminare, *Kameoka* și colaboratorii au inserat o foaie tringhiulară [57]. Acest artificiu a permis realizarea unui dispozitiv dens cu distanța de 80 μm între fiecare vârf. Din rezultatele prezentate de autori, sistemul a arătat o bună stabilitate la electrospray și o reproductibilitate mărită. Această realizare tehnologică găsindu-și aplicabilitatea în descoperirea drogurilor și a substanțelor dopante, activitate ce necesită o analiză calitativă și cantitativă foarte performantă.

Alte emițătoare ESI multiple au fost realizate de grupul lui *Smith* [58]. Autorii au utilizat metoda de ablațiune cu laser pentru a fabrica canalele de trecere (30 μm) prin plăcile de PC și le-au introdus în producția de serie.

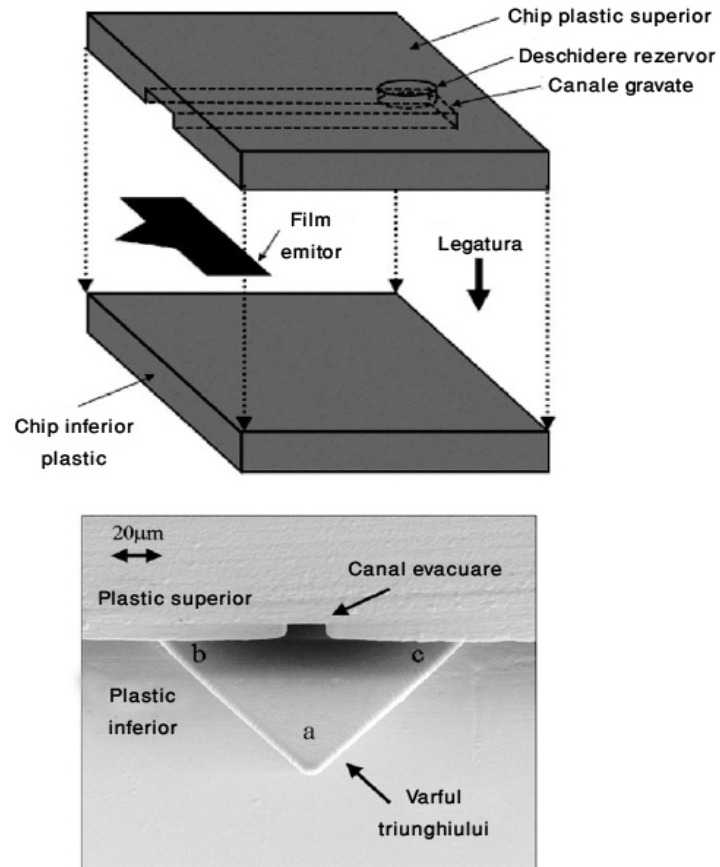


Fig.2.1.6 Procesul de fabricare a unui vârf triunghiular singular de electro-spray integrat cu canale microfluidice [58]

Spre deosebire de aplicarea ESI secvențială, emițătorul de pe placă realizează spray simultan constituindu-se de fapt într-o sursă de multielectrospray a ionilor. În acest fel, intensitatea semnalului poate fi mărită prin colectarea tuturor ionilor generați de toți emițătorii, în același timp, (Fig. 2.1.6).

CAPITOLUL III

Noutăți în dezvoltarea metodelor bazate pe chip-electrospray utilizate în proteomică și glicomică

3.1 Analiza proteinelor

Pentru analiza proteinelor prin MS, pretratamentul probelor include o multitudine de etape ce consumă timp și resurse. Etapele de pretratare, ca de exemplu digestia enzimatică, măresc puterea de acoperire a secvențializării în timp ce altele, ca de exemplu degresarea, mărește sensibilitatea detecției. Integrarea microTAS a acestor pași este de o importanță specială pentru analiza proteomică pe scara largă și în care complexitatea probelor este extrem de mare. Sistemele microfluidice trebuie așadar, să se constituie într-un mijloc puternic de integrare a metodelor, cum sunt pretratarea și analiza automată a proteinelor.

Prima strategie de digestie cu tripsină integrată pe un chip ESI a fost pusă la punct de către *Xue* și colaboratorii [59]. Soluția de tripsină și probele au fost puse în rezervor, apoi injectate direct pentru analiza MS. Strategia fiind simplă, rata de digestie a fost limitată de raportul mic tripsină-proteină precum și de timpul scurt de contact. Pentru a intensifica gradul de digestie, *Harisson* și colaboratorii au construit o cameră microfluidică conținând tripsină imobilizată pe un suport solid (2.4 μl) așa cum este prezentat în figura 3.1.1 .

În acest fel proteinele pot fi fragmentate în peptide mici cu un bun randament când trec prin camera de digestie, asigurându-se astfel și un raport optim enzimă/proteină. Mai mult, suportul solid ce conține enzima imobilizată poate fi îndepărtat pentru utilizarea în varianta fără digestie enzimatică sau poate fi înlocuit cu unul nou. Din rezultatele prezentate, acoperirea (*sequence coverage*) aminoacizilor poate atinge 92% pentru proteinele standard, ceea ce face dispozitivele integrate o platforma convenabilă pentru procesarea automată a probelor și identificare *de novo* a proteinelor.

Pentru proteinele prezente în concentrații mici, precum cele extrase din gelurile bidimensionale (SDS-PAGE 2D) sau pentru proteinele modificate posttranslațional, etapa de preconcentrare este extrem de importantă pentru a obține rezultate satisfăcătoare. Extracția fazei solide (*solid-phase extraction*, SPE) este o tehnologie importantă de pretratare a probelor în acest caz. *Li* și colaboratorii au dezvoltat un microsistem (Fig. 3.1.1) bazat pe utilizarea unui suport solid de fază inversă C18 sau un mediu cu afinitate pentru cationi integrat pe chip pentru a îmbogăți analiza [60]. Aceste exemple demonstrează potențialul chipului, bazat pe afinitatea selectivă a fazei staționare pentru peptidele studiate (chiar și la concentrații mici, ce de exemplu 20 ng/mL) prezente în plasma umană. Mai mult, compabilizarea dispozitivelor PDMS microfluidice, modificate cu alte dispozitive miniaturizate pentru a integra întregul proces și a-l face utilizabil pentru prelevarea continuă din flux, reprezintă o nouă dimensiune în analitica biochimică. De curând, a fost de asemenea explorată și posibilitatea separării și analizei ESI-MS/MS prin conectarea unui cartuș de digestie enzimatic miniaturizat și a unui cartuș de desalinizare în serie cu orificul de admisie a probelor pe un microchip. Spre deosebire de strategia integrării camerelor de extracție și digestie pe chip, *Tan* și colaboratorii [61] au fabricat o serie de 8 coloane monolitice poroase integrate pe

chip pentru analiza directă MS. Polimerizarea *in situ* deține mai multe avantaje, ca de exemplu construcția fără sinterizare, preparare ușoară cu un control bun al porozității și al suprafețelor chimice, și ținând cont de aceste avantaje, polimerizarea *in situ* poate constitui o alternativă la strategia împachetării.

O altă aplicație a polimerizării *in situ* a fost demonstrată de Lazăr și colaboratorii pentru chipurile electrocromatografice în separarea probelor complexe în canalele dispozitivelor microfluidice înainte de analiza prin MS [62].

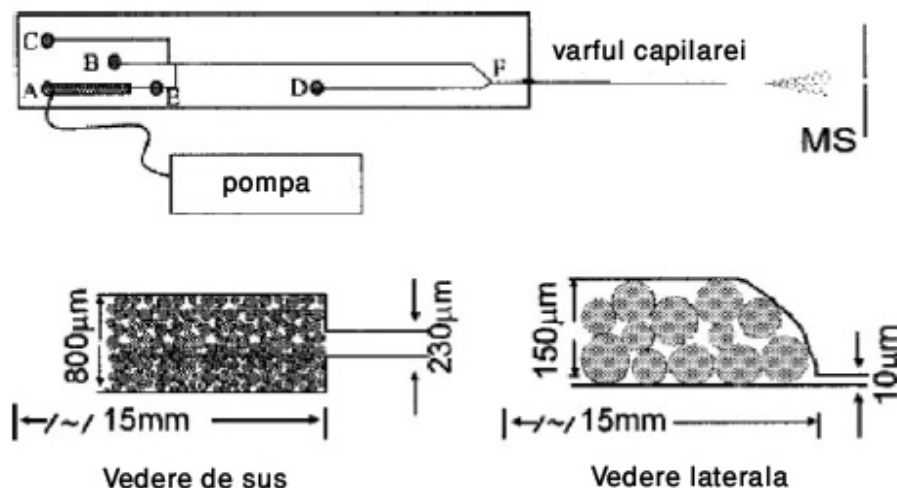


Fig. 3.1.1 Reprezentarea schematică a camerei de digestie ce conține enzima imobilizată pe un suport solid integrat și a chip-ului CE [60]

Încărcarea pozitivă a polimerilor monolitici îmbunătățește performanțele separării și curgerea electroosmotică ceea ce mărește eficiența eluției. În acest studiu, pentru o digestie standard a proteinelor a fost obținută o acoperire secvențială a aminoacizilor de aproximativ 70-80% iar eficiența separării a fost de aproximativ 3000-4000 secvențe în canale de 5-6 cm lungime. Un astfel de dispozitiv ESI microfluidic se comercializează actualmente pe piață. Canalul a fost construit prin ablațiunea laser pe un film PI și un electrod din platină a fost depus la capătul canalului pentru a aplica tensiunea pentru ESI.

În afară de chipurile de electroforeză menționate anterior, compania Agilent Technologies [63] a lansat un dispozitiv microTAS HPLC-chip constând dintr-o coloană cu fază inversă construită în interiorul chipului pe bază de polimer ce execută separarea prin cromatografie lichidă cuplată cu un sistem de pompare nanofluidică (Fig. 3.1.2). În acest dispozitiv integrat chipul este plasat ca sandwich între „stator” și un „rotor” valvă, ceea ce obligă proba să curgă atât prin coloana de îmbogățire cât și prin coloana de separare. Pe lângă aceasta chipul nu necesită nici un adaptor între separare și vârful de nanospray permițând și schimbarea valvei complexe, ceea ce elimină scurgerile de lichid și problemele de blocare, și scurtează timpul de analiză în comparație cu sistemele LC-ESI tradiționale. Pornind de la aceste avantaje, se poate obține o capacitate de secvențializare mărită și prin cuplarea la o coloană de schimb ionic puternic acidă, ceea ce face ca acest chip microTAS să fie extrem de performant pentru aplicațiile din proteomică.

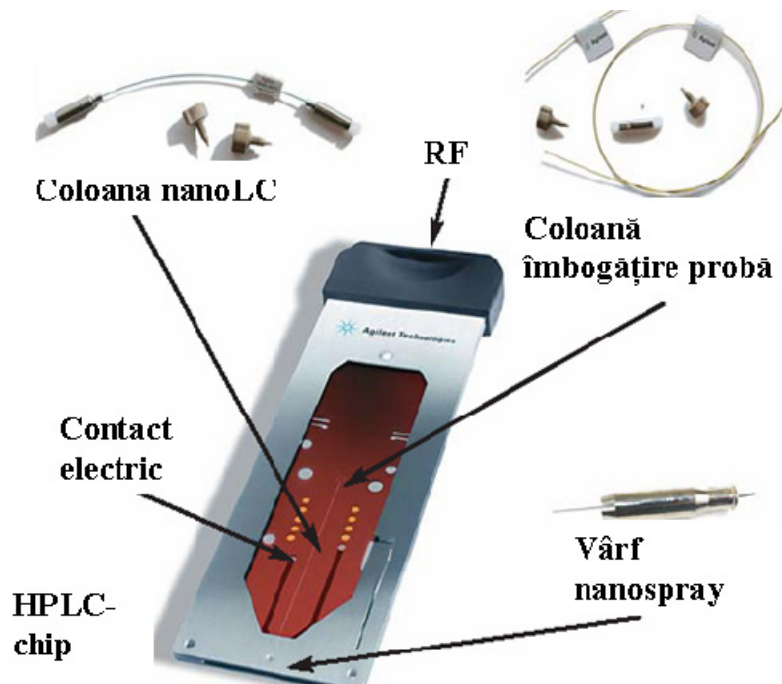


Fig. 3.1.2 Dispozitiv microTAS pentru HPLC-chip și cuplaj ESI MS construit de firma Agilent Technologies (prin amabilitatea Agilrom Bucuresti)

În figura 3.1.3 este prezentată o aplicație concretă a acestui dispozitiv în cuplaj cu un spectrometru de masa de tip ion trap. Aplicația se referă la analiza unui amestec de peptide obținut prin digestia cu tripsină, a unei proteine necunoscute. Se poate observa că, spre deosebire de analiza clasică HPLC cu infuzie ESI prin capilar, HPLC-chip MS a permis detectarea/separarea unui număr mult mai mare de componente peptidice care au putut fi identificate prin spectrul MS corespunzător fiecărui component. Mai mult, comparația cu HPLC clasic prin capilar arată că, HPLC-chip oferă un timp de eluție/analiză mult redus și o rezoluție net superioară: 6 sec lățimea peak-ului aferent componentului care a suferit eluție după 15 secunde, față de 15.7 sec lățimea peak-ului aferent aceluiași component eluat abia după 21 secunde în experimentul HPLC-capilar.

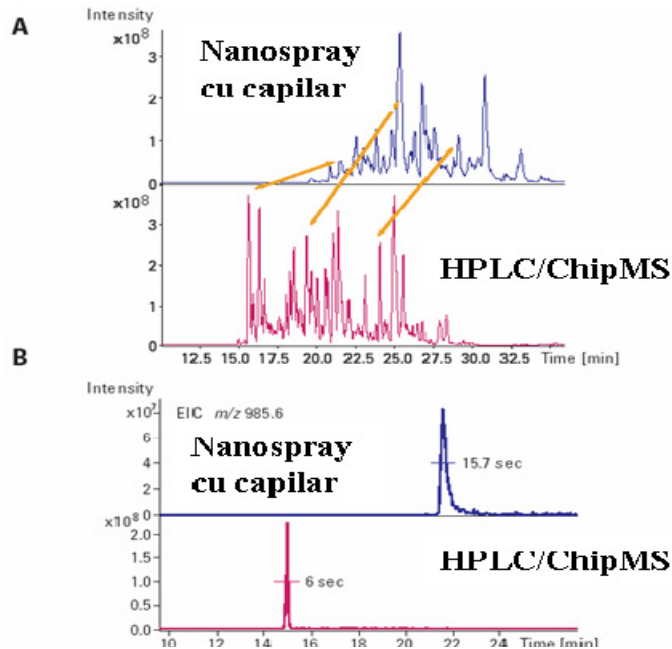


Fig. 3.1.3 Analiza proteomică comparativă HPLC-chip și HPLC-capilar.
 A: Cromatograma curentului total de ioni (TIC) la analiza prin HPLC-chip și HPLC capilar; B: Cromatograma curentului extras de ioni (EIC)

O variantă interesantă de HPLC pe chip de siliciu cu aplicații clare în proteomică a fost de curând propusă de LETI Grenoble [64]. Aceste micro sisteme fabricate utilizând microtehnologia de siliciu conțin o microcoloană cu un raport aria suprafeței/volum mare, funcționalizată cu enzime specifice pentru digestia proteinelor și/sau hidroliza enzimatică a gliconjugatilor. În continuarea acestei microcoloane enzimatică se găsește o coloană cromatografică încorporată tot pe chip pentru separarea prin HPLC a produșilor digestionați. Terminalul coloanei HPLC conține un orificiu practicat în chip pentru electrospray astfel încât chipul poate fi folosit în cuplaj direct cu ESI MS (Fig. 3.1.4).

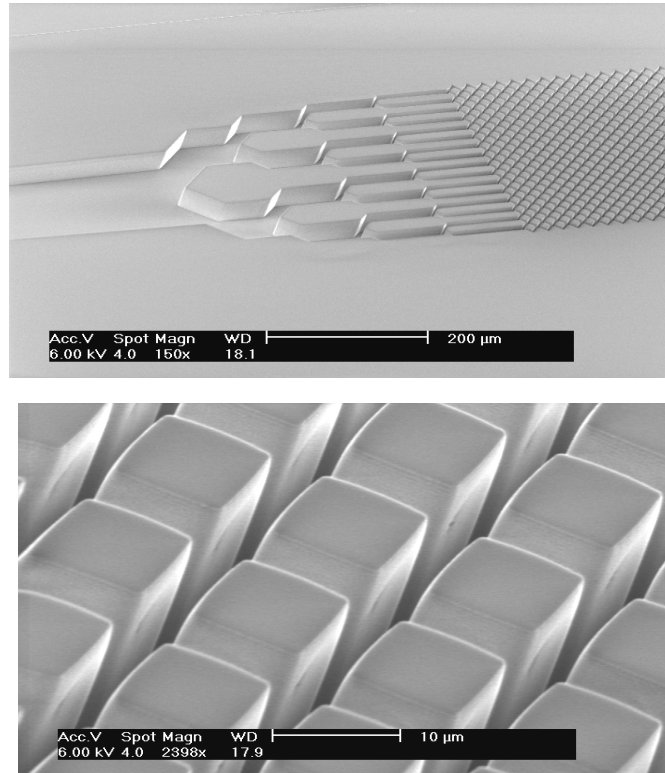


Fig. 3.1.4 Microchip integrat de siliciu cu reactor enzimatic, coloană microfabricată LC și ESI (prin amabilitatea LETI Grenoble)

Un sistem microTAS de polimer care integrează CE/ESI MS atât în regimul *sheath-less* (fără lichid suplimentar și gaz de susținere al procesului de electrospray) cât și *sheath-flow* (cu adaos de jet de solvent pentru inițierea și susținerea ESI) pentru analiza proteinelor și a peptidelor rezultate din digestie a fost lansat în urmă cu 4 ani de Compania DiagnoSwiss, Lausanne, Elveția (Fig. 3.1.5).

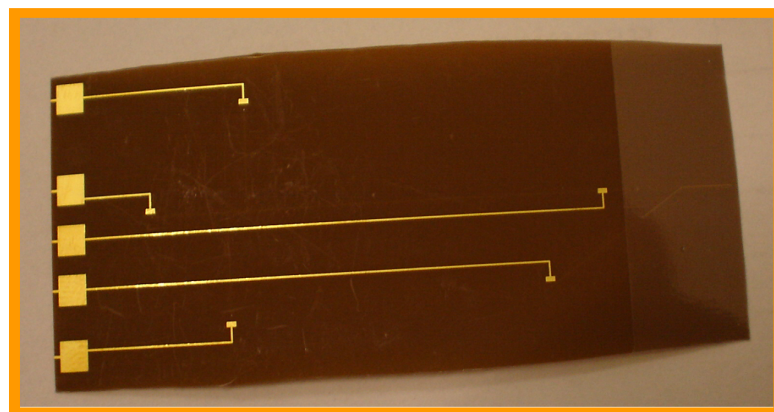


Fig. 3.1.5 Sistem microTAS de polimer care integrează CE/ESI MS (prin amabilitatea DiagnoSwiss, Lausanne)

Pentru confecționarea dispozitivului microTAS, se creează cu un material fotorezistent o replică pe o folie poliamidică, de grosimea 75 μm , acoperită cu cupru, utilizând drept mască un strat gravat. Materialul fotorezistent este dezvoltat și în continuare se trece la profilare chimică pentru îndepărtarea cuprului deprotejat în locurile microcanalelor. Poliamida este apoi profilată cu plasmă până la obținerea dimensiunilor finale ale canalului, 120 μm lățime și 45 μm adâncime. Pentru contactul electric se introduc microelectrozi de 100 μm lățime acoperiți cu aur, vizibili în fotografie, și o serie de contacte de formă pătrată aurite, plasate la baza microcanalului. Chipul mai conține rezervoare micrometrice pentru plasarea probei, a electrolitului de CE și colectarea reziduurilor. Fenomenul de CE/ESI: injecție electrocinetică, separare, transport și electrospray al componentelor separate, se dirijează prin aplicarea corespunzătoare a tensiunilor pe contactele electrice, prin intermediul unor comutatoare atașate extern. Tot în acest fel electrocinetic se dirijează și regimul *sheathless* sau *sheath-flow* de lucru în CE/ESI.

În studiile de proteomică, clasice, spectrometrele de masă care funcționează cu ionizare prin electrospray, fie că sunt de la firmele Waters/Micromass, Bruker, Thermo Finnigan, Shimadzu, sau Applied Biosystems, folosesc pentru introducerea probelor sistemul cu sursă nanoESI sau microESI. În sistemul microESI proba este aspirată într-o seringă conectată printr-un capilar la vârful sursei, care constă dintr-un ac metalic relativ subțire. Seringa este încastrată într-un dispozitiv de pompaj cu debit reglabil, iar soluția este pompată din seringă prin capilar înspre vârful electropulverizator. Sistemele nanoESI folosesc niște capilare foarte fine de sticlă în care proba este introdusă cu ajutorul unei pipete cu vârf foarte fin de tipul celor folosite în tehnica gel-electroforeză. Aceste capilare sunt fie disponibile comercial, fie pot fi obținute și confecționate în laborator. Cele comerciale au o depunere metalică pe suprafață exterioară, iar la utilizare se introduc în orificiul sursei venind în contact cu sursa aflată la tensiunea de electrospray. Capilarele care, din scopuri practice și de economie, se confecționează în laborator sunt din sticlă ce are interiorul profilat în formă de omega pentru a preveni formarea bulelor în timpul electropulverizării. Tuburile capilare se comandă de regulă de la o companie specializată și apoi se trag cu ajutorul unui trăgător care poate fi și el confecționat în laborator, în scopul obținerii unui vârf foarte ascuțit, fin și totodată deschis. Și în acest caz proteina sau amestecul de peptide rezultat din digestie se introduce cu ajutorul pipetei ultrafine în interiorul nanocapilarului însă cum suprafața acestuia nu este depusă cu un material conductor, în interiorul capilarului se introduce un fir de oțel inoxidabil care se conectează la sursa de înaltă tensiune a ESI. Deși metoda este practică și necostisitoare utilizarea capilarelor pentru electropulverizare suferă de foarte multe neajunsuri care au fost des raportate în literatura de specialitate. În primul rând, așa cum am arătat în capitolul anterior, debitele pe care un asemenea capilar le furnizează sunt de aproximativ 400-500 de nl/min ceea ce, în cazul analizelor biologice când se dispune de o cantitate infimă de probă, încă reprezintă un consum destul de mare. Cel de al doilea dezavantaj bazat pe capilar este lipsa de reproductibilitate a calităților vârfului pulverizator. Chiar și în cazul capilarelor confecționate în industrie reproductibilitatea formei vârfului și a diametrului orificiului deschis este redusă. În cazul capilarelor produse în laborator această reproductibilitate este și mai mică. De forma vârfului și de dimensiunea diametrului orificiului depinde esențial, valoarea câmpului electric care se stabilește în soluție și în ultimă instanță inițializarea procesului ESI, pe care îl susține pe toată durata aplicării tensiunii. Din acest motiv, lipsa de reproductibilitate a vârfului determină lipsa de reproductibilitate a experimentelor. Deseori în literatura este semnalat faptul că una și aceeași proteină aflată în condiții identice de analiză a furnizat

spectre diferite la schimbarea capilarului electropulverizator. Din această cauză tendința cercetării în proteomică, la ora actuală, este spre introducerea acelor sisteme microTAS care fac ca reproductibilitatea orificiilor de ESI ale chipului, să fie de 100% [37, 65-70]. Mai mult, tehnologia de fabricare a chipurilor a atins în acest moment stagiul în care poate construi micro și nanochipuri ce lucrează la debite de maxim 50 nl/min și cu o eficiență a ionizării atât de mare încât sunt capabile să ionizeze și să furnizeze în spectru semnale ale unor componenți aflați în amestec, la nivel de urmă și care prin nici o altă metodă analitică nu ar putea fi vreodată detectați. Deși tehnologia microTAS este atât de avansată, în studiile de proteomică chipurile ESI nu pot funcționa fără un cuplaj adecvat cu spectrometrul de masă. Așa cum am arătat, din acest punct de vedere cercetările nu sunt chiar atât de avansate întrucât sistemele de chip trebuiesc adaptate la configurațiile, parametrii de funcționare și caracteristicile spectrometrului de masă. Aceste caracteristici diferă foarte mult nu numai de la un tip de spectrometru la altul, ci și între spectrometre de același tip dar produse de firme diferite. Mai mult, toate dezvoltările din domeniul microTAS prezentate până acum nu rezolvă o problemă din ce în ce mai acută semnalată mai ales în proteomică și anume necesitatea analizelor în regim *high throughput* (în ritm de transfer rapid) care se poate face numai prin automatizarea injectării/manipulării probei. Combinarea infuziei prin chip cu robotizarea operațiilor a devenit stringentă în ultimii ani, în special din cauza creșterii exponențiale a numărului de probe ce trebuie analizate prin MS într-un timp cât mai scurt și a complexității din ce în ce mai mari a acestora. În acest context firma *Advion BioSciences* [71-72] a lansat un sistem microTAS pentru proteomică mai întâi și, așa cum se va arăta în paragraful următor, implementat și în glicomică [65-70], în care se combină injectarea robotizată cu ionizarea prin chip ESI. Robotul, denumit NanoMate, este primul sistem automat din lume de introducere a probelor în spectrometrul de masă, prin chip nanoelectrospray. Acest robot este prezentat în figura 3.1.6.

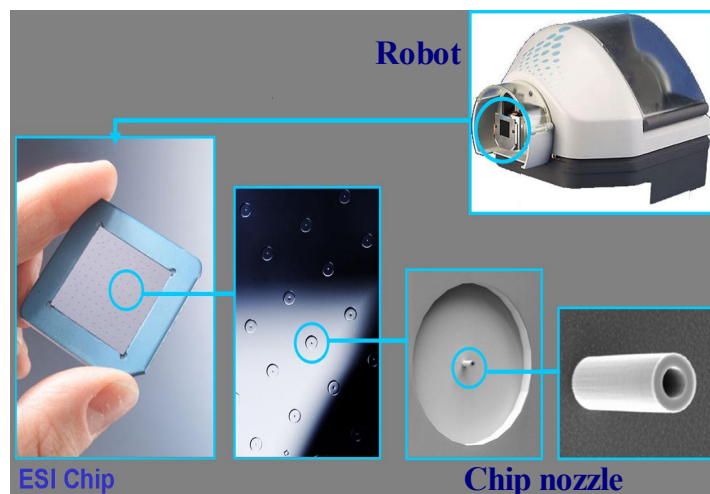


Fig. 3.1.6 Robotul NanoMate echipat cu chip ESI din siliciu produs de firma Advion BioSciences (prin amabilitatea Advion BioSciences)

Robotul conține un platan ce are prevăzut un aranjament de 96 de locașuri în care se pipetează probele și un suport cu 96 de pipete de plastic ce au depuse pe suprafața exterioară un strat inert de grafit. Sistemul NanoMate poate fi programat astfel încât brațul sau să atașeze o pipetă de plastic și apoi să se deplaseze automat înspre placa ce conține probele, să aspire între 2 și 20 μL soluție-probă și apoi să se deplaseze în poziție orizontală pentru a electropulveriza proba prin orificiul unui chip aflat în dreptul spectrometrului de masă. Pentru electropulverizare robotul aplică pe vârful pipetei tensiunea de electrospray stabilită și optimizată de operator prin intermediul programului Chip Soft care controlează robotul. Chipul este un substrat de siliciu ce are practicate 100 de orificii fiecare cu diametrul interior de 10 μm sau, în versiunea cea mai recentă, din 2008/2009, 400 orificii fiecare cu diametru de 2.5 μm și este fabricat prin metode semiconductoare clasice precum fotolitografie și modelarea cunoscută sub numele *deep ion reactive etching*.

3.2 Analiza hidraților de carbon și a glicoconjugăților

Diversitatea structurală a glicoconjugăților în țesuturi și celule este determinată de complexitatea foarte mare a compoziției lor precum și de specificitatea tisulară a acestor compoziții. Pentru a elucidă structura unei anume specii de glicoconjugăți implicată într-un anume proces fiziologic sau patologic este literalmente necesară o foarte precisă și detaliată analiză structurală. În ultimii ani, prin metode bazate pe electroforeză capilară și pe gel (1 și 2 -dimensională), cromatografie lichidă, cromatografie pe strat subțire (TLC) cât și prin metode imunochimice și imunohistochimice [73] a fost demonstrată diferența în compoziția și cantitatea glicoconjugăților din diferitele matrici umane, precum și distribuția lor la suprafața celulelor și în spațiul extracelular. Rezultatele experimentale obținute cu tehnicile enumerate mai sus, sunt însă bazate numai pe comparații și oferă date numai asupra componentelor majore prezente în amestecurile native complexe. Acest neajuns a fost atribuit atât sensibilității reduse a metodelor implicate până acum în analiza compusilor glicoconjugăți cât și a posibilităților lor de detecție, limitată numai la caracterizarea structurală a speciilor majore din diferitele matrici umane. Elucidarea structurală a speciilor individuale de glicoconjugăți în amestecurile complexe extrase din matrici umane (țesuturi, fluide ale corpului etc) reprezintă o cerință fundamentală pentru determinarea compoziției lor în regiuni specifice și pentru corelarea specificității acestor structuri cu funcția specializată a fiecărei matrice umane, în condiții de subiect sănătos și bolnav.

Pentru a defini și înțelege interrelația structură-funcție a fiecărei entități structurale de glicoconjugăți, implicată într-un anume proces fiziologic/patologic, și pentru a îmbunătăți potențialul lor terapeutic și de diagnostic, în deceniul trecut spectrometria de masă cu ionizare prin electrospray [74, 75] a fost aplicată pentru analize la sensibilități de ordin picomolar. În prezent însă, sunt necesare noi platforme spectrometrice de masă pentru a permite analize care să ofere date privitoare la complexitatea structurală ridicată a glicoconjugăților.

În laboratoarele analitice ale lumii au fost implementate cu succes strategii pentru detectarea și fragmentarea diferitelor tipuri de glicoconjugăți incluzând glicopeptide, glicoproteine, ganglioizide și sulfo-GlcA-glicosfingolipide. Aceste strategii au fost bazate pe spectrometrie de masă cu ionizare prin nanoESI în cuplaj cu analizoare de masă precum cuadrupolar hibrid cu timp de zbor (QTOF), cu rezonanță ciclotronică și transformată Fourier (FTICR) în tandem MS [76,77] sau prin cuplaj direct (on-line) al electroforezei capilare (CE) cu ESI QTOF MS/MS [78,79], utilizând interfețe construite în laboratoarele respective.

Din 2004 au fost analizați, pentru prima dată prin intermediul sistemului automat NanoMate, bazat pe injectare prin chip nanoESI în cuplaj cu QTOF MS, glicoconjugati extrași din creier uman și din urina unor pacienți suferind de dezordni de glicozilare în scopul determinării structurilor moleculare și identificării biomarkerilor diferitelor afecțiuni [65-70, 80, 81]. Toate aceste noi metode au permis nu numai detectarea și caracterizarea structurală a unor fracțiuni de glicoconjugati izolate, dar și o analiză compozițională detaliată a unor amestecuri native complexe extrase din țesut în cantități extrem de mici (pico și attomolar). Mai mult, prin aceste metode ultraperformante, a fost posibilă și fragmentarea prin tandem MS (MS/MS) direct din amestecul complex, a speciilor individuale minore.

Tehnicile moderne și sofisticate de spectrometrie de masă caracterizate prin sensibilitate, rezoluție și înaltă precizie au oferit o platformă analitică de mare potențial pentru dezvoltarea de strategii, ce au avut drept scop analiza structurală a glicoconjugatilor. Până în prezent s-au inițiat și publicat deja [66, 69, 70, 82] asemenea strategii bazate pe ESI QTOF și FTICR echipat cu un magnet ecranat activ de 9,4 Tesla. Acest din urmă spectrometru de masă, a putut oferi o rezoluție de 10^6 și o precizie în determinarea masei de sub 1 ppm.

Pentru a îmbunătăți procesul de electrospray, stabilitatea semnalului, eficiența ionizării și sensibilitatea analizei s-a implementat în studiile de glicomică, pentru prima dată, cuplajul dintre spectrometria de masă și ionizarea prin chip electrospray utilizând chipuri monofuncționale în combinație cu metode de fragmentare ale ionilor prin disocieri induse prin ciocnire (CID) [37, 65-70]. Astfel, două spectrometre de masă diferite (QTOF și FTICR) au fost interfațate fiecare cu două sisteme diferite de ionizare bazate prin chip: un dispozitiv robotizat de introducere a probei, complet automată bazată pe electrospray prin chip de siliciu, și un sistem de chip polimeric micropulverizator subțire pentru injectarea probei prin electrospray în analizor (Fig.3.2.1). Ambele sisteme de chip ESI au fost testate și aplicate la analiza unui amestec complex de ganglioziide extrase din creierul adult uman normal, a unei fracțiuni polisialilate (GT1) de ganglioziide extrase din creierul adult uman normal și separate prin cromatografie pe strat subțire (TLC), a amestecurilor complexe de glicopeptide din urina unor pacienți suferind de boala lui Schindler și a unor amestecuri native de glicolipide din tumori ale creierului uman (gliosarcom). Acest sistem nou de ionizare și-a dovedit capacitățile și performanța superioară, în comparație cu metodele tradiționale de introducere a probei bazate pe electrospray cu capilar. Avantajul derivă în special din aceea că, oferă o eficiență a ionizării foarte ridicată ceea ce permite detectarea speciilor de ganglioziide minore care, foarte des reprezintă biomarkeri relevanți și nu ar putea fi altfel detectate/identificate prin nici o altă metodă analitică. Un alt avantaj al tehnologiei MS bazate pe chip a fost sensibilitatea ultraînaltă reprezentată prin cantități sub-picomolare de probă necesare pentru o investigare structurală completă a extractelor din creier.

Acest aspect este de o deosebită importanță pentru aplicabilitatea acestei metode în investigațiile clinice, pentru care de obicei sunt disponibile cantități infime de material biologic. Toate aceste studii prealabile demonstrează capabilitatea și potențialul sistemelor chip-ESI în combinație cu spectrometria de masă de înaltă performanță pentru elucidarea structurală a componentelor individuale de GSL din amestecuri extrase din regiunile creierului, fără a fi nevoie de tehnici laborioase de separare, care să precedă analiza prin MS.

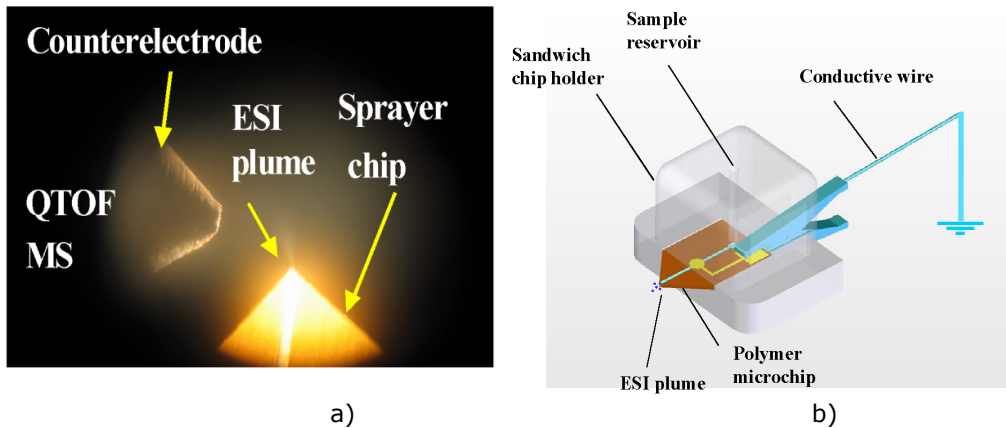


Fig.3.2.1. Primul cuplaj din lume al unui microchip polimeric monofuncțional cu a) QTOF MS [37] și b) FTICR MS [77] pentru analiza gangliozidelor și glicopeptidelor

De asemenea, folosind dispozitive de chip monofuncționale prin intermediul cărora au putut fi analizate componente minore de glicoconjuzați necunoscute anterior, aceste studii demonstrează că, o extindere a investigației ar putea fi capabilă să ofere date structurale care să conducă la descoperirea de noi structuri biomarker.

x
x x

Pentru a extinde cercetarea asupra dezvoltării unor noi metode de spectrometrie de masă bazate pe sisteme microfluidice și a implementării acestora în științele vieții, în teza de doctorat de față s-a realizat combinarea micro și nanotehnologiei, cu cele mai moderne spectrometre de masă. Tehnologia chip a fost succesiv cuplată cu spectrometria de masă de cea mai înaltă performanță, de tip QTOFmicro MS și respectiv, pentru prima dată, cu spectrometria de masă bazată pe analizor cu capcană ionică de mare capacitate (high capacity ion trap ultra mass spectrometer, HCT MS). Cele două sisteme cuplate au fost optimizate pentru o obținerea unei platforme superioară, necesară în analiza peptidelor, proteinelor, hidraților de carbon și a derivaților lor glicoconjuzați, din perspectiva identificării *de novo* a compoziției, expresiei și structurii lor, în diverse matrici sintetice sau biologice.

PARTEA EXPERIMENTALĂ

CAP. IV MATERIALE ȘI METODE

4.1 Reactivi și materiale

În vederea pregătirii probelor pentru analiza prin spectrometrie de masă cuplată cu robotul NanoMate și pentru realizarea unor experimente optime s-au folosit numai reactivi cu un grad înalt de puritate și aparatura de laborator performanta și de ultima generație care să corespundă necesităților studiului.

Astfel, metanolul, acetonitrilul, acidul formic (98%), acidul acetic și cloroformul cu grad de puritate HPLC au fost achiziționați de la firma Merck (Darmstadt, Germania). Având în vedere calitatea acestora și puritatea testată înainte de experimente prin infuzie "blank" acești solvenți au putut fi utilizați fără purificare ulterioară. În toate experimentele ce au necesitat dizolvarea probei în apă, s-a folosit exclusiv apă deionizată, bidistilată. Pentru obținerea apei bidistilate/deionizate necesare în obținerea soluțiilor probelor s-a folosit sistemul SG 2000, SG Wasseraufbereitung und Regenerierstation GmbH (Barsbüttel, Germania). Acesta are o capacitate bazală de 2000 L apă cu un conținut total de săruri de 1.79 mol/m³, cu conductivitatea de 20 μS/cm, debitul maxim este de 450 L/h și operează cu o presiune de 10 bari, astfel încât apa deionizată obținută are o conductivitate de 0.1 μS/cm.

În ceea ce privește controlul permanent al calității apei, acesta s-a realizat utilizând un conductometru digital LFW 200, SG Wasseraufbereitung und Regenerierstation GmbH (Barsbüttel, Germania) cu un domeniu de măsură al conductivității cuprins între 0.1-199.9 μS/cm.

În vederea concentrării, soluțiile probelor au fost liofilizate într-un evaporator rapid cu vid SpeedVac Concentrator, SPD 111V-230, Thermo Electron Corporation (Asheville, NC, USA) cuplat cu o pompă de vid ROTAVAC valve control de la Heidolph (Schwabach, Germania). Evaporatorul SPD 111V-230 cu trapă de răcire, are prevăzute 40 lăcașe pentru tuburi Eppendorf de 1.5-2.0 mL și un display electronic de unde se poate regla temperatura și timpul de funcționare.

Toate soluțiile probelor au fost stocate în tuburi Eppendorf de 1.5 mL și depozitate între experimente la -27°C. Probele uscate au fost cântărite utilizând o balanță analitică AGN100, cu precizia de 0,0001 g și capacitate de măsură până la 100 g.

Pentru obținerea soluțiilor stoc ale probelor, materialul uscat a fost dizolvat în solventul sau amestecul de solvenți respectivi, apoi agitat pentru solubilizare un timp cuprins între 5-10 minute cu ajutorul unui vortex IKA® lab dancer, (IKA® Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Germania) care are o viteză fixă de rotație (2800 rpm) și este utilizat pentru tuburi cu diametrul maxim de 30 mm. După solubilizare, soluțiile au fost centrifugate 1-2 h într-o centrifugă model Sigma 2-16, Sartorius (Göttingen, Germania), la 15000 rpm. După centrifugare a fost colectat supernatantul. Centrifugarea s-a dovedit absolut necesară pentru a evita blocarea orificiului chip de către impuritățile solide, nedizolvate, rezultate în procesele de extracție și de pregătire a probelor din materialul biologic. În același scop al prevenirii blocării chip-ului, etapa de centrifugare s-a efectuat și pentru probele standard disponibile comercial chiar dacă furnizorul a indicat o puritate foarte mare a probei solide.

După dizolvarea în solventul sau amestecul de solvenți, între experimente stocarea probelor s-a realizat la -27°C , iar în vederea analizei acestea au fost dezghețate utilizând un termobloc digital de la firma FALC Instruments (Treviglio, Italia). Termoblocul are 20 lăcașe pentru tuburi Eppendorf și are capacitatea de a încălzi până la 150°C peste temperatura mediului ambiant. Pentru a evita deprecierea probelor (de natură biologică) analizate, încălzirea în vederea dezghețării s-a realizat menținând proba în termobloc la 20°C pentru cel mult 2 minute. Înainte de analiza, în etapa de optimizare a concentrației s-au realizat diferite diluții ale soluțiilor stoc care și acestea au fost agitate cu Vortex-ul, 1-2 minute și apoi centrifugate din nou timp de 15-20 minute într-o minicentrifugă EW-17310-07, Cole-Parmer (Vernon Hills, Illinois, USA). Minicentrifuga este prevăzută cu un rotor cu 6 lăcașe pentru tuburi Eppendorf de 1.5/2.0 mL, dar se poate utiliza și pentru tuburi de 0.4-0.5 mL utilizând adaptoarele furnizate de producător. Viteza de centrifugare este fixă, 6000 rpm.

Etapa de dializă, în vederea eliminării sărurilor care a fost necesară pentru probele de glicopeptide din urina pacienților suferind de boala lui Schindler precum și pentru toate probele de ganglioizide, a fost efectuată cu ajutorul unor membrane de dializă de 500 Da „cut-off” cumpărate de la Schuell, Darmstadt, Germania.

Pentru obținerea soluțiilor probelor și pentru aplicarea acestora în plăcile de microtitrare s-au utilizat pipete automate cu volum reglabil de 0.5-10, 5-50, 20-200 și 100-1000 μL și vârfulurile aferente de unică folosință de la firma Eppendorf, Hamburg, Germania.

Toate spectrele de masă HCT MS au fost calibrate cu ajutorul standardului de calibrare extern „tuning mix” G2421A achiziționat de la firma Agilent Technologies (Santa Rosa, CA, USA). Standardul este un amestec de peptide ai căror ioni acoperă întregul domeniu de m/z în care probele de analiză dau semnale atât în tehnica de detecție a ionilor negativi, cât și în cea a ionilor pozitivi (tabelul 2.1.1).

Tabelul 4.1.1 Valorile m/z pentru ioni pozitivi și negativi pentru standardul de calibrare extern „tuning mix” G2421A (Agilent)

MOD POZITIV (m/z)	MOD NEGATIV (m/z)
118.09	112.99
322.05	431.98
622.03	601.98
922.01	1033.99
1521.97	1633.95
2121.93	2233.91
2721.89	2833.87

Parametrii pentru obținerea acestor ioni la calibrare cu standardul „tuning mix” au fost:

- presiunea gazului de nebulizare: 40 psi
- debitul gazului de uscare (evaporare): 10L/min
- temperatura gazului de uscare (evaporare): 350°C
- intervalul de scanare: 50-3000 m/z

Spectrele de masă QTOF MS au fost calibrate folosind iodura de sodiu achiziționată de la Merck (Darmstadt, Germania) care furnizează semnale ce acoperă domeniul de mase investigat.

4.2. Probele utilizate pentru analiză

4.2.1 Eșantioanele de ganglioizide

Extract nativ de ganglioizide din meningiom benign uman

Extractul nativ de ganglioizide din meningiom uman adult (barbat, 47 de ani) a fost obținut de la Facultatea de Medicină a Universității din Zagreb Croația prin amabilitatea doamnei Prof. Dr. Zeljka Vukelic. Diagnosticul de meningiom a fost pus prin intermediul tomografiei computerizate și a rezonanței magnetice. Pacientul a fost supus operației de extirpare a tumorii. După extirpare, diagnosticul a fost confirmat prin analiza histopatologică. Pentru extragerea ganglioizidelor țesutul tumoral a fost cântărit și apoi stocat la $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ganglioizidele au fost extrase aplicându-se procedura dezvoltată de Svennerholm and Fredman [83]. În vederea analizei prin chip-MS, în laboratoarele noastre extractul de ganglioizide a fost supus desalifierii prin dializa timp de 72 de ore în apă folosind membranele de dializa cu cut-off 500 Da amintite mai sus. În final proba a fost uscată complet în Speed Vac și apoi dizolvată în metanol pur.

Extract nativ de ganglioizide din hemangiom uman adult

Extractul nativ de ganglioizide din hemangiom uman adult (bărbat, 42 de ani) localizat în emisfera dreaptă a cortexului frontal a fost obținut tot de la Facultatea de Medicină a Universității din Zagreb, Croația. Diagnosticul de hemangiom a fost de asemenea pus prin intermediul tomografiei computerizate și a rezonanței magnetice. După extirparea tumorii, diagnosticul de hemangiom cavernos a fost confirmat prin analiza histopatologică. Extragerea ganglioizidelor s-a realizat după îndepărtarea vaselor de sange și a elementelor necrotice. Etapele următoare de extragere și purificare în vederea analizei prin chip-MS au fost identice cu cele descrise la 2.2.1.1.

Amestec complex de O-glicopeptide sialilate din urina unui pacient suferind de boala lui Schindler

Proba constând în amestecul complex de O-glicopeptide sialilate din urina unui pacient suferind de boala lui *Schindler* a fost obținută de la Institutul de Fizică Medicală și Biofizică al Universității din Münster, Germania, prin amabilitatea Prof. Dr. Jasna Peter-Katalinic. Pacientul, în vârstă de 4 ani, din Bonn, a fost diagnosticat cu această deficiență de stocare lizozomală de către Detlef Schindler de la Institutul de Genetică Umană din Würzburg. Glicopeptidele au fost extrase de către echipa germană, conform procedurii descrise și publicate anterior [21, 22, 65]. În vederea analizei prin chip-MS, în laboratoarele noastre probele au fost supuse purificării prin dializă (membrana cut-off 500 Da), urmată de liofilizare (SpeedVac) și dizolvare în metanol pur.

4.2.2 Polizaharide funcționalizate

Probele de polizaharide modificate (cu HMD-hexametilendiamină și amină aromatică) au fost obținute de la Institutul de Chimie al Academiei Române, filiala Timișoara din precursori de maltodextrin și Paselli achiziționați de la AVEBE. Sintezele, descrise în detaliu în publicațiile [84-86] au fost realizate de grupul condus de Prof. Dr. Eugen Sișu.

4.2.3 Peptide standard

Dipeptidele Leu-Ala și Val-Ala, tripeptida Leu-Leu-Leu și polipeptida Substance P puritate $\geq 97\%$ (HPLC) au fost achiziționate de la Firma Sigma (Mannheim, Germania) sub formă de pudră liofilizată, în toate cazurile, și analizate fără a mai fi necesară o purificare prealabilă.

4.2.4 Apomioglobina standard

Proteina apomioglobina (*apomyoglobin from equine skeletal muscle*) a fost de asemenea achiziționată de la Firma Sigma (Mannheim, Germania) sub formă de pudră liofilizată și analizată fără purificare prealabilă.

4.3. Spectrometria de masă

4.3.1 Spectrometrul de masă cuadrupolar hibrid cu timp de zbor (quadrupole time-of-flight: QTOF-MS)

Experimentele de spectrometrie de masă au fost efectuate utilizând instrumentul QTOF Micro MS cu accelerare ortogonală, de construcție *Micromass/Waters*, Manchester, Marea Britanie (Fig. 4.3.1). Spectrometrul este echipat cu sursă de ioni cu electrospray în geometrie *Micromass* de tip Z. În această geometrie, capilarul ESI este dispus pe direcție perpendiculară pe contraelectrod (con) astfel încât, traiectoria ionilor în sursă este forma de "Z".

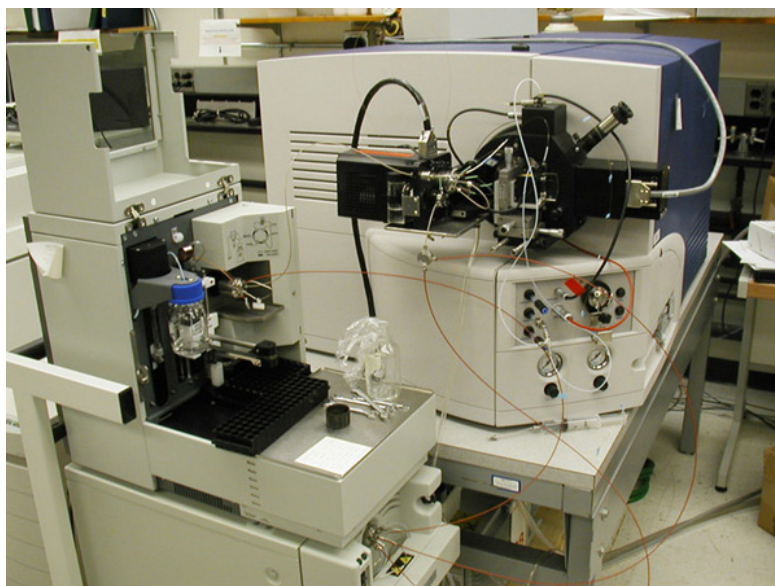


Fig. 4.3.1. Spectrometrul QTOF MS Micro (Micromass/Waters)

Spectrometrul QTOF este un sistem hibrid care îmbină simplitatea și performanța analizorului de tip cuadrupolar, cu ultraeficiența analizorului cu timp de zbor cu accelerare ortogonală. În contrast cu analizoarele triplu-cuadrupolare, instrumentul exploatează partea TOF pentru achiziționarea detecției simultane a tuturor ionilor, cu baleierea întregului domeniu de mase selectat. Puterea de rezoluție foarte ridicată combinată cu stabilitatea reflectronului TOF furnizează măsurători de masă de o excelentă acuratețe permițând diferențierea componentelor cu mase similare. Timpul rapid de răspuns și de acumulare a semnalului, face ca acest tip de spectrometru să fie cel mai potrivit pentru interfațarea ESI-MS cu tehnicile premergătoare de separare, bazate pe fază lichidă.

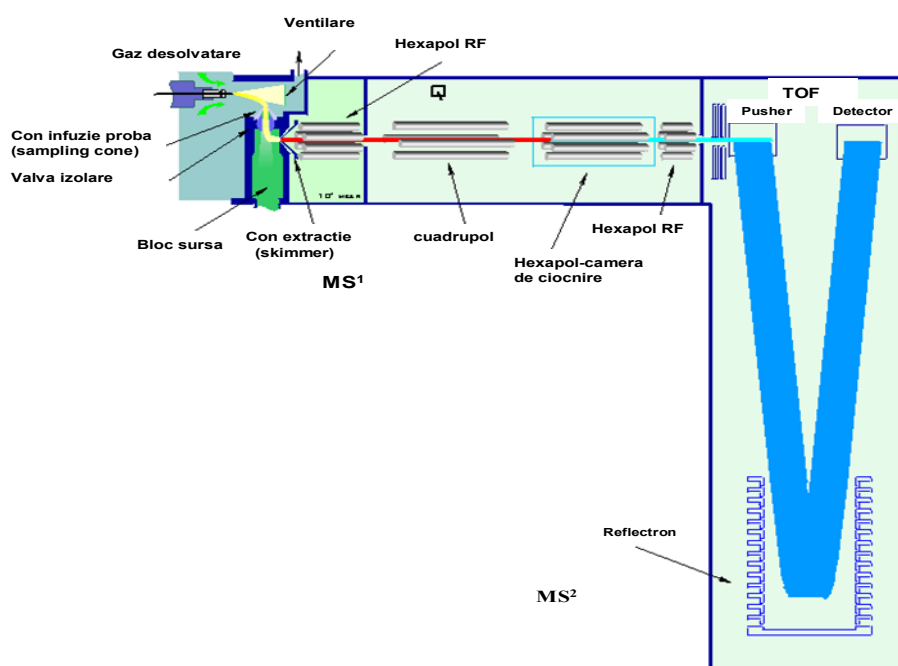


Fig. 4.3.2 Principalele componente și elemente de optică ionică ale spectrometrului de masă hibrid cuadrupolar/timp de zbor cu accelerare ortogonală, de tip QTOF, Micromass/Waters [87].

Elementele fundamentale ale spectrometrului (Fig. 4.3.2) sunt analizorul cuadrupolar MS¹, camera de ciocnire hexapol (*hexapole collision cell*) și analizorul MS² reflectron-TOF. În principiu, ionii generați în sursa Z-spray sunt transferați către analizorul MS¹ cuadrupolar prin intermediul lentilelor RF. După ce părăsesc analizorul cuadrupolar, ionii pătrund în analizorul cu timp de zbor, ortogonal MS². Fasciculul ionic este focalizat în *pusher* cu ajutorul lentilelor de accelerare, focalizare și ghidare. În continuare, *pusher-ul* trimite un puls ionic către reflectron. În timpul zborului de la *pusher* la detector, ionii sunt separați după raportul m/z în funcție de timpul lor de zbor astfel că ionii de raport m/z mare ajung la detector evident mai târziu (Fig.4.3.3).

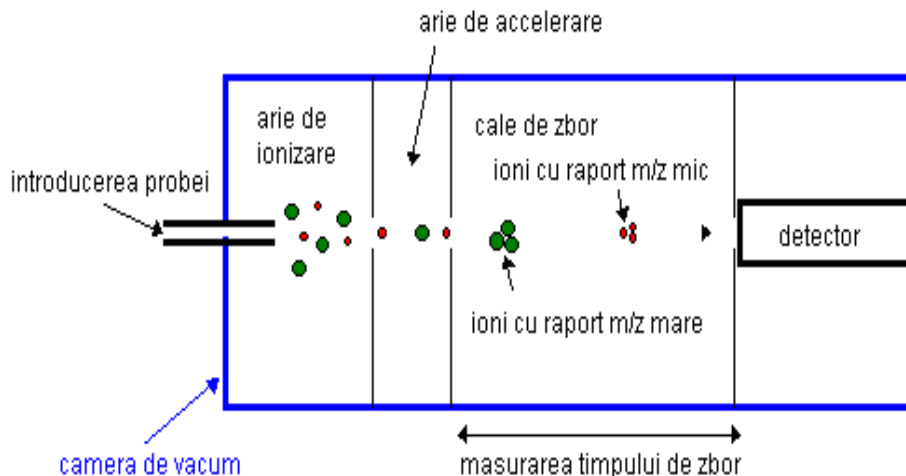


Fig. 4.3.3 Separarea ionilor în zona TOF [88]

În cazul spectrometrului cu accelerare ortogonală, QTOF, *Micromass*, axele TOF și cea a sursei au direcții independente astfel încât, accelerarea fascicului ionic în sursă se face pe direcție *ortogonală* la direcția TOF. Independența axelor TOF și a sursei prezintă următoarele consecințe favorabile:

- posibilitatea de a se reduce împrăștierea după viteze în direcția TOF
- posibilitatea de a se controla independent energia fascicului ionic continuu din porțiunea de accelerare ortogonală și cea de drift din zona TOF către detector.

În acest fel, timpul necesar fascicului ionic de a străbate și umple zona de accelerare ortogonală și timpul necesar accelerării lui și mișcării de drift spre detector sunt aproximativ aceiași.

Avantajele acestor efecte sunt în primul rând îmbunătățirea puterii de rezoluție care astfel poate atinge $m/\Delta m$ 5000-6000 (la 50% din înălțimea peak-ului) adică, o excelentă valoare pentru instrument de tip TOF și, care, în plus este constantă pe tot domeniul de masă și independența de viteză de scanare. Un al doilea avantaj este mărirea considerabilă a sensibilității spectrometrului de masă care în acest caz atinge valori de fmol-attmol adică de 10 până la 100 ori mai ridicată decât în spectrometrele de masă cuadrupolare triple.

Un alt element ce aduce o semnificativă îmbunătățire a performanțelor TOF îl reprezintă reflectronul-câmp electrostatic care are rolul esențial de a corecta dispersia după energii a ionilor ce părăsesc sursa ESI (Fig. 4.3.4).

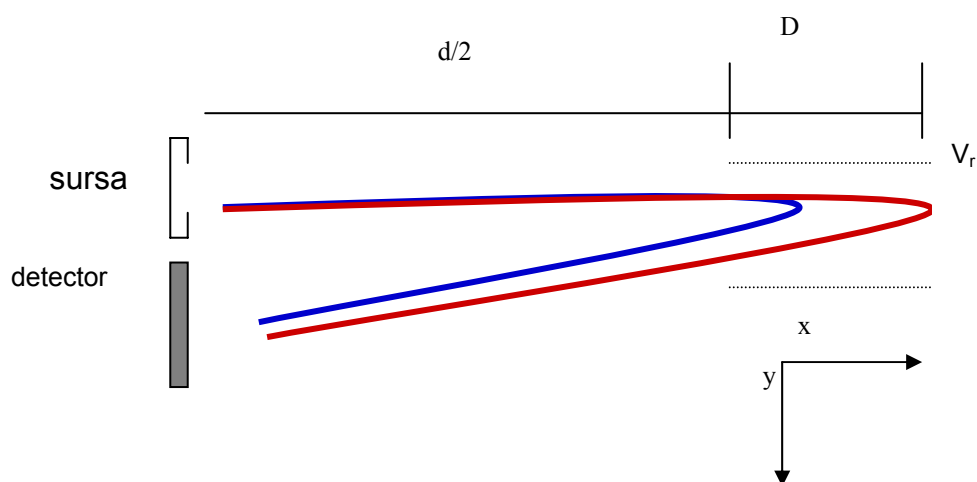


Fig 4.3.4. Mișcarea a doi ioni de aceeași masă, dar energii cinetice diferite în regiunea TOF-reflectron a spectrometrului QTOF-MS (d -distanța totală liberă de câmp, D -distanță în câmp electrostatic) [89]

Figura 4.3.4 redă schematic traiectoriile în regiunea TOF liberă de câmp și în cea a reflectronului, a doi ioni de aceeași masă, dar cu împrăștiere după energie. La pătrunderea în zona reflectronului, câmpul electrostatic îi frânează până la energie cinetică zero. Apoi, ionii sunt reaccelerați în direcție opusă. Ionul de energie cinetică mai mică va fi frânat până la repaos, într-un interval de timp mai scurt decât pentru cel de energie cinetică mai mare, și deci va avea un drum de zbor mai lung în zona libera de câmp și mai scurt scurt în reflectron. Ionul cu exces energetic va avea timpul de zbor mai lung în reflectron și mai scurt în zona din afara acestuia. Prin aplicarea unei tensiuni optime pe reflectron V_r și alegerea unei distanțe d corespunzătoare, timpii de zbor ai celor doi ioni în zona liniară și cea a reflectronului se pot compensa, astfel încât timpul lor total de zbor să fie același și ei să atingă detectorul simultan.

Fiind un hibrid tandem, spectrometrul QTOF poate funcționa atât în *modul MS* cât și în *modul MS-MS*. În *modul MS*, quadrupolul acționează ca un filtru larg, *banda-trecere*, care transmite un domeniu larg de mase (RF-only mode) către camera de ciocnire. Ionii traversează hexapolul și pătrund în regiunea *pusher* a TOF. În intervalul de timp în care ei se deplasează cu mișcare de drift în TOF, în regiunea de accelerare ortogonală pătrunde următorul puls ionic. *Pusher*-ul poate opera extragerea ionilor din regiunea de accelerare ortogonală la frecvența repetitivă de până la 20 KHz astfel încât detectorul achiziționează câte un "full spectrum" la fiecare 50 μ s. Ionii sunt detectați de un detector microcanal (*microchannel plate*), iar semnalul achiziționat în timp este convertit în semnal digital. Fiecare spectru este însumat ca histograma în memoria convertorului până în momentul în care spectrele histogramate sunt transferate către computer. Computerul rulează programul *Mass*

Lynx care permite manevrarea și controlarea informatizată a instrumentului, fixarea tuturor parametrilor de operare (precum *ESI-mode*, potențial capilar ESI, potențial contraelectrod, temperatura/gaz desolvatare, energie ciocnire respectiv potențial accelerare etc) selectarea MS sau MS/MS *mode*, selectarea precursorului pentru fragmentare, achiziționarea semnalului, extragerea spectrului prin combinarea în progresie a histogramei TIC, procesarea și prelucrarea (*smooth*, *subtract*, *magnification* etc.) a spectrului de masă.

În MS/MS *mode*, analizorul cuadrupolar operează în tehnica sa normală de funcționare: sursa Z-spray conduce ionii perpendicular pe direcția de spray, prin contraelectrodul conic (*sampling cone*) către hexapolul RF-only *ion guide*. După focalizare în hexapol, analizorul cuadrupolar, ca *banda-trecere* foarte îngustă, selectează ionul precursor care este trimis în camera de ciocnire. Gazul din camera de ciocnire este de regula Ar sau Xe, iar presiunea să se ajusteze în funcție de natura analizei și a moleculei analitice de fragmentat. În studiul de față s-a folosit Ar drept gaz de ciocnire. Pentru cele mai multe analize, presiunea se menține la valoare relativ ridicată de aproximativ 0.05 Torr. Ionii fragment rezultați din ciocnirea cu moleculele gazului inert (*collision induced dissociation*, CID), sunt refocalizați de către cel de-al doilea hexapol RF-only și fantele consecutive și extrași ortogonal față de direcția accelerării, înspre TOF.

Caracteristicile instrumentului sunt următoarele:

- putere de rezoluție: 4-6000 (FWHM full width at half maximum: 50% din înălțimea peak-ului)
- sensibilitate: fmol-attmol
- eficiență (*duty cycle*) : 2-3 % (aproximativ de 100 ori mai mare decât a analizorului cuadrupolar)
- precizia în determinarea masei moleculare: 20-50 ppm
- viteza de achiziție: 10 scan/sec
- domeniul de mase practic: 7000 Da

4.3.2. Spectrometrul de masă cu capcană ionică de mare capacitate (HCT MS)

Analizorul cu capcană ionică cuadrupolar (QIT) a fost inventat de Wolfgang Paul, pentru care a primit, în 1989, Premiul Nobel pentru Fizică.

Analizorul cu capcană ionică [90] este un sistem alcătuit din 3 electrozi (fig.4.3.5): un electrod inelar situat central și 2 electrozi adiacenți, *end-caps*, anterior, respectiv posterior față de electrodul inelar (aceștia au în secțiune o formă hiperbolică).

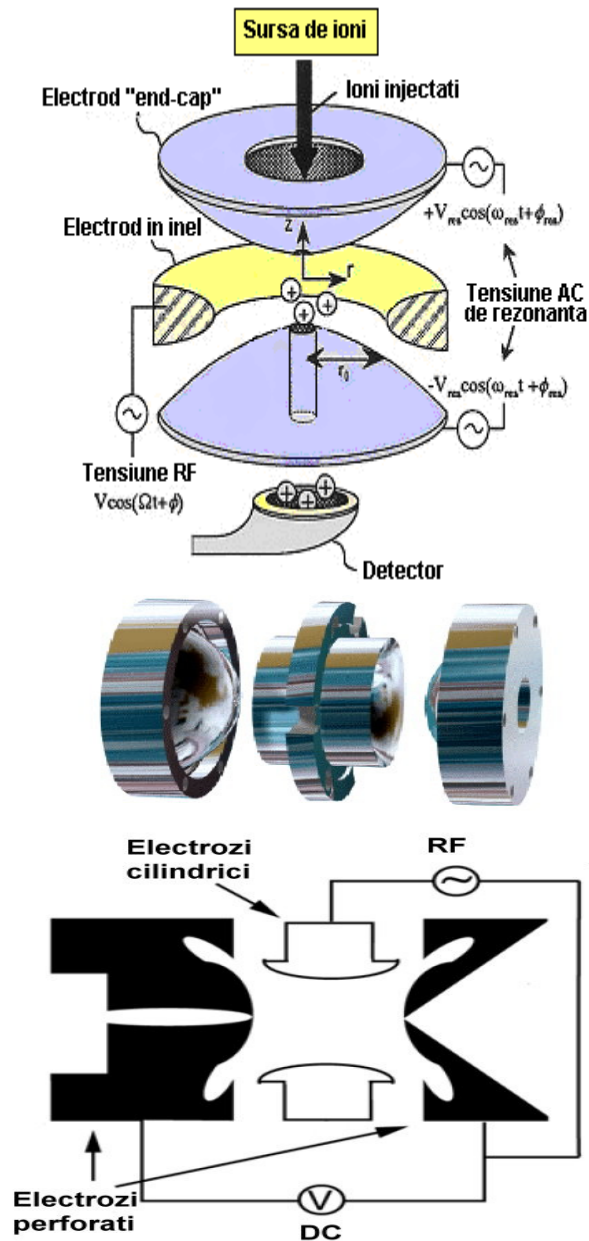


Fig. 4.3.5 Analizorul cu capcană ionică [91]

Pe electrodul inelar este aplicată o tensiune RF pentru a genera un câmp electric cuadrupolar. Câmpul cuadrupolar este acela în care intensitatea câmpului E variază liniar cu deplasarea x : $E = E_0 \cdot x$
 Potențialul aplicat (Φ) care stabilizează câmpul electric trebuie să varieze quadratic cu x pentru a fi respectată condiția de mai sus: $\Phi = f(x^2)$ ($E = -d\Phi/dx = f(x)$)
 În câmpul cuadrupolar tridimensional prezent în analizorul QIT, ionii sunt supuși

alternativ unor forțe de stabilizare și de destabilizare și oscilează atât în direcția r (radială) cât și z (axială). Mișcarea stabilă a ionilor nu permite nici un grad de libertate. Dacă potențialul RF este pozitiv, reprezentarea grafică este în forma de "șa" (fig. 4.3.6a), iar în cazul potențialului negativ reprezentarea grafică este în forma de "jgheab" (fig. 4.3.6b).

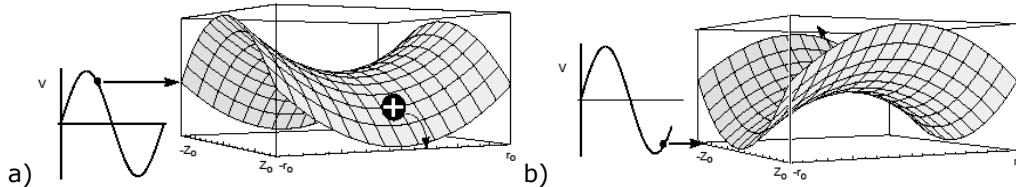


Fig. 4.3.6 a) Un ion localizat de un potențial în direcția z va fi accelerat față de centrul sistemului (capcanei ionice). Când potențialul RF își modifică semnul, câmpul se inversează și același ion este accelerat spre centrul sistemului, b) [92]

Considerații similare celor din figura 4.3.6 vor fi observate pentru un ion care se deplasează pe direcția radială, r . În cazul în care are loc inversarea câmpului la un interval adecvat, ionii vor fi captați atât în direcția r , cât și în direcția z , într-un volum definit de cei 3 electrozi (electrodul în inel și cei 2 electrozi *end-caps*).

Deoarece câmpul electric este simetric și se ia în considerare numai deplasarea radială $r = \sqrt{x^2 + y^2}$ și cea axială, z , potențialul în orice punct în acest câmp fiind dat de relația: $\Phi_{r,z} = (U + V \cos \omega t) (r^2 - 2z^2 + 2z_0^2) / (r_0^2 + 2z_0^2)$, unde primul termen descrie variația sa temporală, iar cel de-al doilea dependența spațială; r_0 reprezintă raza internă a electrodului în inel, z_0 este cea mai apropiată distanță de la centru la electrozii *end-caps*, U este potențialul continuu, iar V este potențialul RF aplicat între electrodul inelar și electrozii *end-caps*; ω este frecvența unghiulară, iar t este timpul.

Ionii cu o anumită valoare a raportului m/z vor fi supuși unei mișcări stabile în capcana ionică. Soluția cantitativă pentru condiția de stabilitate este descrisă de o ecuație diferențială de ordinul doi a lui Mathieu [90]. Soluțiile acestei ecuații (de fapt două ecuații independente care descriu mișcarea necuplată a unui ion în direcțiile r și z) reprezintă condițiile de stabilitate, care sunt redată sumar sub forma unei diagrame de stabilitate [90] (fig.3.3.6), exprimată în termenii coordonatelor a_z și q_z ai lui Mathieu:

$$a_z = -2a_r = -16zU / m(r_0^2 + 2z_0^2) \omega^2 \text{ și } q_z = -2q_r = 8zV / m(r_0^2 + 2z_0^2) \omega^2$$

Stabilitatea radială, exprimată în termenii a_r și q_r , trebuie de asemenea menținută simultan cu stabilitatea în direcția z .

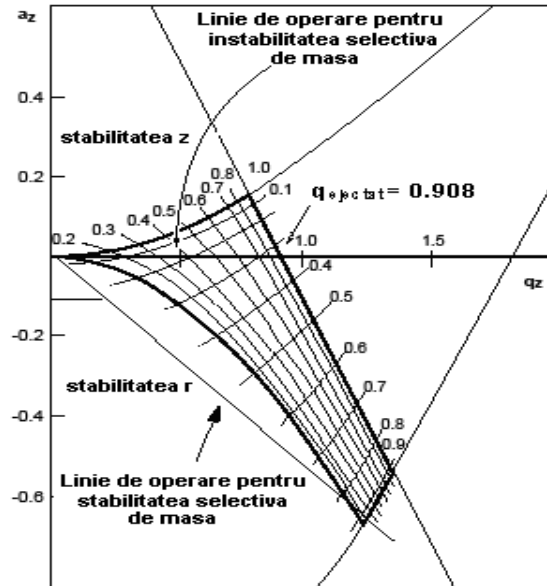


Fig.4.3.7 Diagrama de stabilitate a lui Mathieu pentru QIT [90]

Ionii cu parametri Mathieu identici, dar valori diferite ale m/z , se comportă identic. Operațiunea optimă cere ca ionii să aibă condiții favorabile inițiale, condiții care sunt realizate prin utilizarea unui gaz-tampon de He ($\approx 1\text{mTorr}$) necesar pentru a înlătura energia cinetică a ionilor și a-i determina să ocupe regiunea centrală a capcanei ionice. În mod tipic, capcana ionică poate înmagazina $10^5 - 10^6$ ioni înainte ca explozia coulombiană să afecteze semnificativ traiectoriile acestora și în consecință să reducă semnificativ rezoluția de masă.

Spectrele de masă sunt înregistrate în mod normal prin operarea MS cu capcana ionică de tip quadrupolar, în modul de scanare al instabilității selective de masă. Amplitudinea V , a potențialului RF aplicat, este crescută pentru a determina "mișcarea" ionilor de-a lungul axei q_z (fig.4.3.7), până când aceștia devin instabili la limita la care $q_z = 0.908$. Pe măsură ce aceștia ating regiunea de instabilitate, energiile lor cinetice și deplasările în direcția z cresc și aceștia părăsesc capcana ionică printr-un orificiu din electrodul *end-cap* și ajung la detectorul extern. Ionii cu m/z crescător sunt evacuați și detectați pe măsură ce tensiunea RF este crescută, generând astfel un spectru de masă. Ecuația analizei de masă pentru un MS cu capcană ionică de tip quadrupolar, care funcționează în modul de instabilitate selectiv de masă, este obținută prin rearanjarea expresiei parametrului q_z din ecuația lui Mathieu: $m/z = 8V / q_z (r_0^2 + 2z_0^2) \omega^2$.

Ecuația arată că în acest mod de operare, mișcarea ionilor este constrânsă de axa $a_z=0$ și nici o tensiune continuă nu este aplicată electrozilor *end-caps*. Pentru capcanele ionice construite după așa-numita geometrie ideală, $r_0 = z_0\sqrt{2}$, iar $m/z = 4V / q_z r_0^2 \omega^2$, ionii captați au frecvențe de oscilație caracteristice, denumite frecvențe seculare, separate în direcțiile r și z . Componentul principal al acestor frecvențe seculare este $(\omega/2)\beta$ (rad/sec), unde β este un parametru care variază cu coordonatele a și q ; la valori scăzute ale a_z și q_z , $\beta z = \sqrt{a_z + q_z^2} / 2$.

Mișcarea este decuplată în direcțiile r și z , iar frecvența în direcția r este jumătate din frecvența în direcția z . Deoarece ionii au frecvențe caracteristice, un potențial alternativ al frecvenței egal cu frecvența seculară a mișcării ionilor va determina ca

ionii să primească energii cinetice crescătoare (fig. 2.3.8a). Dacă semnalul este aplicat între electrozii *end-caps*, ionii vor fi activați în direcția z (fig. 2.3.8b). Deplasarea în direcția z crește, iar dacă semnalul rezonant este suficient de puternic, acești ioni activați translațional pot fi evacuați prin orificiile din electrozii *end-caps* în direcția z, după câteva cicluri de aplicare a potențialului ac. Alți ioni, care au m/z diferit, nu sunt afectați [90].

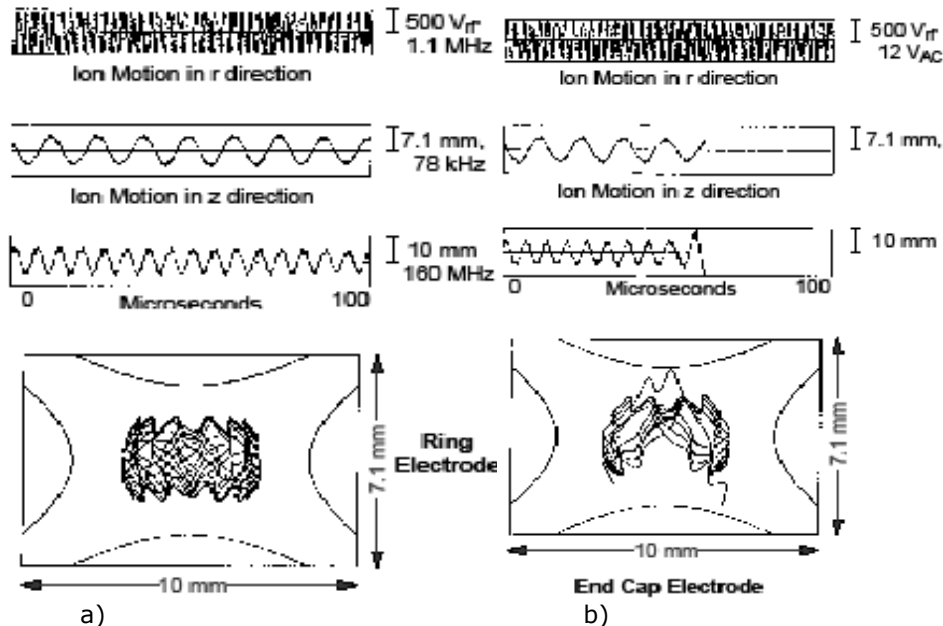


Fig. 4.3.8 a) O simulare a traiectoriei unui ion cu $m/z=100$ într-o capcană ionică ce operează sub o tensiune $r_f=500V$ și o frecvență de 1.1MHz. b) O simulare a traiectoriei ionice atunci când de-a lungul electrozilor *end-caps* este aplicat un potențial alternativ suplimentar (în rezonanță cu frecvența de mișcare a ionului în direcția z).

Se poate observa că, nu există nici un efect asupra mișcării ionice în direcția r. Totuși, deplasarea în direcția z crește, iar ionul este încărcat cu energie și este evacuat prin orificiile din electrozii *end-caps* după câteva cicluri de aplicare a potențialului ac. Alți ioni, care au m/z diferit nu sunt afectați [90].

MS/MS și MSⁿ utilizând analizorul QIT

Spectrometria de masă în tandem (MS/MS) este un procedeu de examinare individuală a ionilor într-un amestec de ioni: ionii de interes sunt izolați în funcție de valorile raportului m/z caracteristic, activați prin ciocnire și li se permite să disocieze. Ionii produși rezultați sunt examinați într-un al doilea pas de măsurare de masă (Fig. 3.3.9).

Într-un spectrometru de masă cu capcană ionică, MS/MS este realizată prin utilizarea unei succesiuni de operații suplimentare în funcția de scanare.

Funcția de scanare începe cu ionizarea și este urmată de selecția unui ion-părinte într-un pas care implică evacuarea tuturor celorlalți ioni din capcană. Ionul-părinte

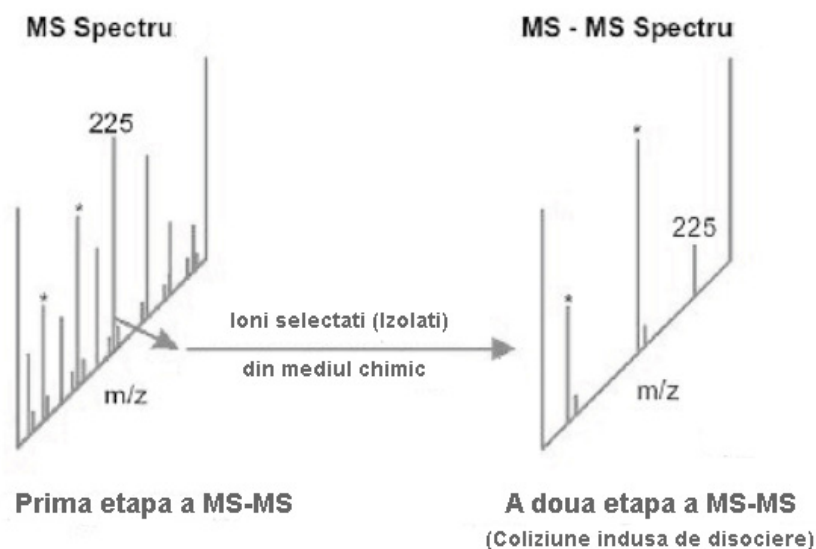


Fig. 4.3.9. Fragmentarea ionilor prin MS/MS [93]

este apoi excitat translațional în mod tipic prin aplicarea unei tensiuni RF suplimentare pe electrozii *end-caps*. Producții ionici, rezultați în urma disocierii indusă prin ciocnirea acestor ioni excitați cu gazul-tampon de He, sunt înregistrați prin scanarea tensiunii RF astfel încât să se obțină o a doua scanare a analizei de masă.

Principalul avantaj al experimentului MS/MS este specificitatea crescută. Acest lucru este util în distincția izomerilor, secvențializarea biopolimerilor și mai ales în analiza amestecurilor complexe. În experimentele de spectrometrie de masă în tandem, semnalul este eliminat sau redus foarte mult din cauza altor componente ale matricei sau a zgomotului instrumentului.

O trăsătură unică a spectrometriei de masă cu capcană ionică este posibilitatea de a realiza MS^n , având o importanță deosebită în elucidarea structurală [67-70]. Selectivitatea MS^n înseamnă că un compus poate fi fragmentat, iar fragmentele rezultate pot fi izolate și analizate în continuare, pentru a furniza informații structurale despre moleculele complexe din diverse amestecuri.

Avantajele analizorului QIT:

1. sensibilitate crescută
2. caracter compact și simplitate mecanică într-un dispozitiv care este capabil de performanțe înalte
3. experimentele de spectrometrie de masă în tandem sunt disponibile prin realizarea măsurătorilor secvențiale de spectrometrie de masă
4. pot fi studiate reacțiile ionilor/moleculelor pentru ionii de masă selectată
5. este posibilă obținerea unei rezoluții mari ($>10^6$ pentru $m/z >1000$) prin scanări lente, însă exactitatea măsurătorii de masă devine relativ slabă
6. ionii care au raport m/z mare sunt accesibili utilizând experimente de rezonanță
7. detecția nedistructivă este posibilă utilizând tehnicile de transformare Fourier.

Analizorul cu capcană ionică de mare capacitate (HCT Ultra)

Majoritatea experimentelor de spectrometrie de masă din această teză au fost realizate utilizând spectrometrul de masă cu capcană ionică de mare capacitate (HCT Ultra PTM Discovery) de la firma Bruker Daltonics (Bremen, Germania) prezentat în figura 4.3.9.



Fig.4.3.10 Spectrometrul cu capcană ionică de mare capacitate HCT Ultra (Bruker Daltonics)

Acest tip de QIT ultramodern se caracterizează printr-o mai mare capacitate de stocare a ionilor obținută prin descreșterea densității ionice a ionilor care sunt excitați înainte de a fi evacuați din analizorul cu capcană ionică cu geometrie optimizată. În acest scop, ionii de interes sunt întâi excitați într-o orbită mai mare față de ceilalți prin excitație rezonantă bipolară. După ce ionii sunt excitați în această orbită, sunt evacuați precis în timp, din capcana ionică prin rezonanță neliniară. Este important faptul că această evacuare a ionilor se realizează cu o mare precizie temporală, ceea ce duce la evacuarea rapidă cu rezoluție ridicată la mare capacitate. Spectrometrele cu capcană ionică de mare capacitate stochează de 10^3 - 10^5 ori mai mulți ioni decât cele cu capacitate normală ceea ce permite atingerea unor valori ridicate ale sensibilității analizei.

Spectrometrul de masă utilizat în acest studiu este interfațat cu un computer care rulează pachetul integrat Compass 1.2 care include modulele Hystar 3.2.37 și Esquire 6.1.512 pentru controlarea instrumentului și achiziționarea spectrelor de masă și a cromatogramelor curentului total de ioni și un portal Data Analysis 3.4.179 pentru stocarea cromatogramelor și a spectrelor și procesarea tuturor datelor de MS adică extragerea semnalului principal, netezirea spectrelor, deconvoluția și calibrarea lor. Caracteristica unică a acestui spectrometru de masă o reprezintă rezoluția și precizia ridicată în determinarea masei, viteza mare de achiziție, sensibilitatea înaltă (infuzie cu cantități de probă de ordinul zecilor de nL/min) și capacitatea ridicată de stocare a ionilor, posibilitatea unică de a efectua stadii multiple de fragmentare (MS^{11} în modul manual și MS^6 în modul automat). În plus, HCT MS oferă avantajul câtorva tehnici diferite de fragmentare: disociere indusă prin ciocnire (collision – induced dissociation, CID MS/MS) și disocierea prin transfer de electroni (electron transfer dissociation, ETD MS/MS), prima fiind cea mai eficientă și care va fi utilizată pentru disocierea moleculelor de ganglioze.

O altă caracteristică importantă a spectrometrului de masă HCT Ultra este versatilitatea acestuia prin posibilitatea cuplajului cu diferite surse de infuzie [67-70]. Sursele de ioni ESI produse de Bruker Daltonics, care pot fi cuplate la spectrometrul de masă HCT Ultra sunt: on-line microelectrospray (cu injectare prin seringă-pompă), off-line nanoelectrospray, on-line nanoelectrospray, robot automat de injectare, precum și electron transfer dissociation (ETD, disociere prin transfer de electroni), respectiv sursă CID pentru fragmentarea ionilor.

În experimentele efectuate cu instrumentul HCT MS, toate spectrele au fost înregistrate în domeniul 100-3000 m/z la o viteză de scanare de 8000 m/z pe secundă. Fragmentarea în stadii multiple, MS^n , a fost efectuată fie prin disociere induse prin ciocnire folosind He drept gaz de ciocnire, fie prin ETD folosind fluorantena drept reactant. Atât în cazul fragmentării prin CID cât și în cel al disocierii prin ETD Ioni precursori sau părinte au fost izolați într-o fereastră de izolare de 2u. Spectrele de fragmentare s-au obținut optimizând amplitudinea semnalului de RF la valorile indicate în capitolul destinat rezultatelor experimentale obținute.

4.4. Sistemul de injectare/ionizare complet automată prin chip-electrospray (robotul NanoMate)

Ionizarea complet automatizată prin chip-nanoelectrospray s-a realizat utilizând robotul NanoMate BiVersa (Advion Biosciences, Ithaca, NY, USA) controlat prin software-ul ChipSoft 8.1.0 care operează sub sistem Windows. Atât plăcile de microtitrare cu 96 locașuri cât și placa-suport cu vârful de injectare a probelor, pentru pipeta conductivă a robotului au fost procurate de la firma Advion. Probele au fost trecute prin chipuri de siliciu cu 400, respectiv 100 orificii, având diametrul de numai 2,5 respectiv 10 μm , cumpărate de asemenea de la firma Advion.

Azotul utilizat pentru desolvatare, precum și heliul utilizat pentru fragmentarea ionilor au fost obținuți de la firma Linde, România. Gradul de puritate al acestora este de 99.999 %vol.

4.5. Nomenclatura ionilor fragment

4.5.1. Nomenclatura ionilor fragment pentru determinarea secvenței aminoacizilor din peptide și proteine

Secvența aminoacizilor din proteine și peptide poate fi determinată utilizând cantități infime de probă: 10^{-9} - 10^{-12} g folosind fie CID fie ETD MS^n . Să presupunem că se operează în modul ion pozitiv. Deoarece secvența repetitivă din proteine este aceiași $-\text{NH}-\text{CH}(\text{R})-\text{CO}$ fragmentările controlate în CID care au cea mai mare probabilitate să se producă pot să fie doar de următoarele tipuri:

- scindarea legăturii Ca -C
- scindarea legăturii C-N
- scindarea legăturii N- Ca

cea ce conduce la obținerea a 6 fragmente cărora li se atribuie prin convenție notația \mathbf{a}_n , \mathbf{b}_n , \mathbf{c}_n atunci când sarcina pozitivă este păstrată pe fragmentul care conține acidul N-terminal și notațiile \mathbf{x}_n , \mathbf{y}_n și \mathbf{z}_n atunci când sarcina pozitivă este păstrată pe fragmentul care conține acidul C-terminal. Indicele \mathbf{n} indică numărul de

aminoacizi conținuți în fragmentul respectiv. Indiferent unde s-a rupt molecula, fragmentele încărcate electric rezultate pot fi reținute și supuse unei noi fragmentări astfel încât, se poate realiza secvențializarea (determinarea locului de așezare al aminoacizilor în lanțul polipeptidic) oricărei proteine. În figura 4.5.1 se prezintă explicit modul de atribuire a notațiilor fragmentelor provenite de la secvențializarea unei peptide după nomenclatura introdusă de [94]:

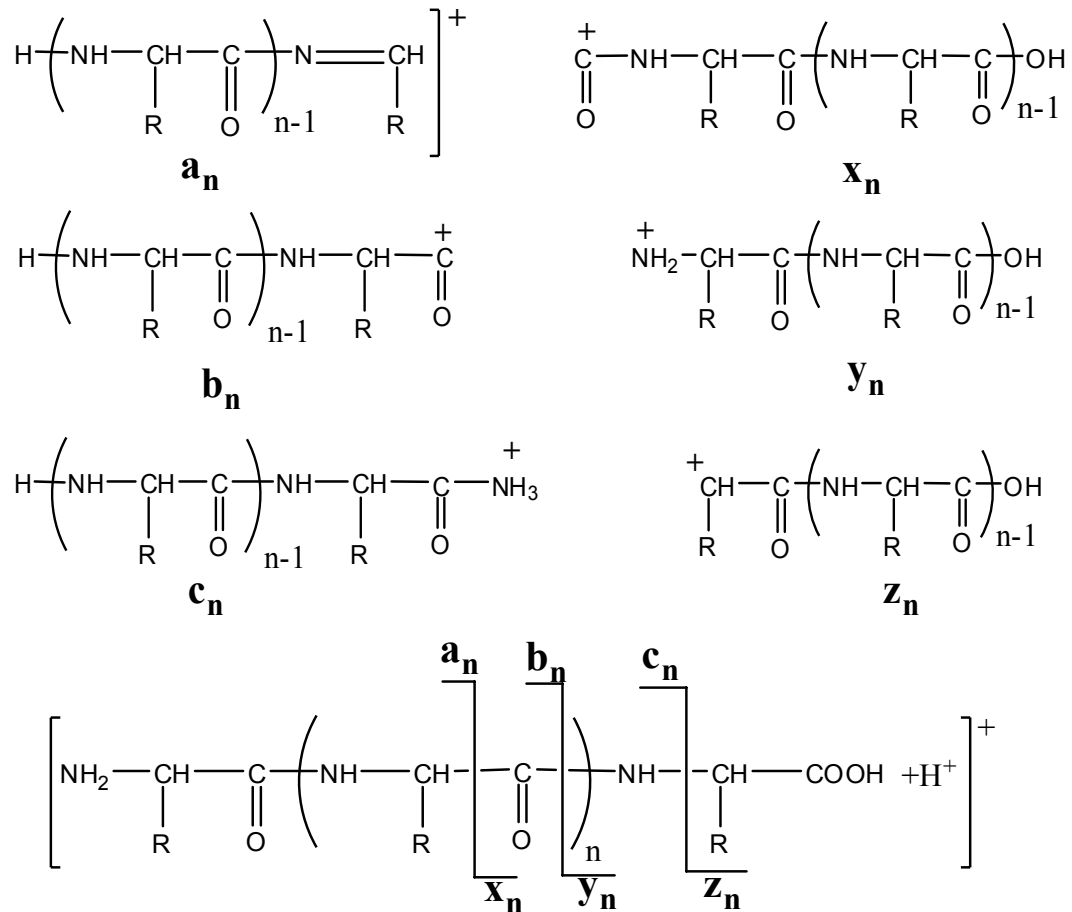


Fig 4.5.1. Nomenclatura scindărilor într-o secvență peptidică

Diferența de masă între doi ioni consecutivi supuși fragmentării permite aflarea identității fragmentului pierdut și astfel determinarea secvenței. Există două excepții unde interpretarea spectrului poate crea confuzii: Ile cu Leu care sunt izomeri și Gl_n cu Lis care sunt izobari. Când există astfel de situații se apelează la izolarea fragmentelor și supunerea acestora unor fragmentări în condiții specifice care să individualizeze natura acestor aminoacizi.

4.5.2. Nomenclatura ionilor fragment pentru determinarea secvenței glicoconjugatilor

Secvențializarea oligo, polizaharidelor, a glicoproteinelor și glicolipidelor este una dintre marile cuceriri ale ultimei decade. Varietatea naturii legăturilor precum și a dificultății de ionizare a acestor molecule a făcut imposibilă utilizarea lor în analiza spectrometrică de masă sub forma nederivatizată (adică nemodificată la nivelul grupărilor hidroxilice) până la apariția tehnicilor ESI, MALDI, Q și IT.

Pe lângă obținerea picului molecular M^+ se obțin de regulă, funcție de condițiile de lucru alese, o serie de picuri care dețin informații foarte valoroase asupra modului cum unitățile monozaharidice se leagă în interiorul lanțului polizaharidic. Mai mult chiar, folosind variantele MS-MS sau ESI-QTOF-MS/MS sau MALDI-TOF-TOF se pot alege astfel de condiții în care unitățile monozaharidice componente ale lanțului să fie îndepărtate pe rând realizându-se astfel determinarea secvenței polizaharidice. Fragmentele rezultate au fiecare semnificația lor precisă, iar convenția de notare după Domon și Costello [95], azi unanim acceptată, este prezentată în continuare. Orice polizaharid conține capătul nereducător, respectiv capătul reducător, care în unele situații poate fi legat de o proteină sau de un lipid. Partea neglucidică a lanțului polizaharidic se numește **aglicon**.

Legăturile cele mai afectate de rupere (fragmentare) sunt legăturile eterice dintre unitățile monozaharidice și de aceea sunt și cele mai frecvente. Fragmentele care rezultă în urma scindării acestor legături se notează cu **Z** și **Y** dacă conțin capătul reducător (respectiv agliconul) și cu **B** și **C** dacă conțin capătul nereducător.

Uneori fragmentarea lanțului oligozaharidic nu are loc în dreptul legăturilor eterice între unitățile componente ci, chiar în interiorul heterociclului constituent al zaharului. În cazul în care fragmentul rămâne atașat de specia ionizată care conține capătul reducător (sau capătul ce conține agliconul) el se notează cu **X**; dacă fragmentul rămâne atașat de specia ionizată care conține capătul nereducător el se notează cu **A**.

Atât în notația lui **A** cât și a lui **X** apar indici superiori care indică în dreptul cărei legături din heterociclu unde are loc scindarea. De exemplu, în figura 4.5.2: $^{2,4}A_2$ această notație ne furnizează următoarea informație: fragmentul respectiv aparține capătului nereducător, la nivelul celui de-al doilea zahăr s-au scindat legăturile între atomii de carbon numerotați cu 2 și 4.

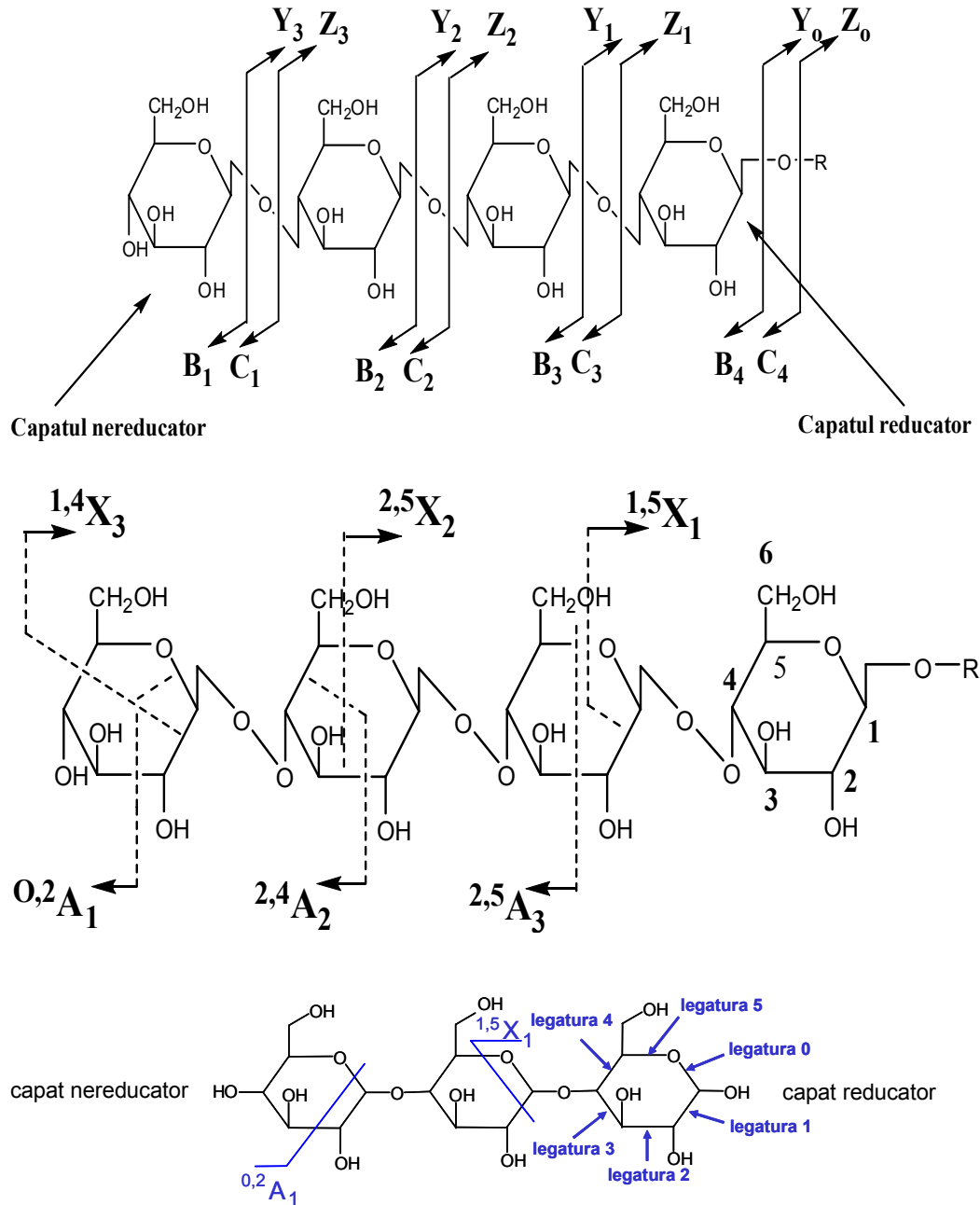


Fig. 4.5.2. Nomenclatura scindărilor într-o secvență oligozaharidică [95]

Oligo și polizaharidele pot fi fragmentate atât în **modul ionilor pozitivi** cât și în **modul ionilor negativi**. În ambele situații fragmentele rezultate pot apărea „îmbogățite” ca masă, observându-se frecvent picuri care sunt cu 23 Da sau 39 Da (sau multiplii ai acestor valori) mai grele decât masa calculată teoretic. Acest fapt

rezultă din aceea că soluția care conține polizaharidul de ionizat conține ioni de Na sau de K care formează aducți cu grupările hidroxilice; apar astfel în spectru picuri corespunzătoare ionilor mono, di sau polisodiați care se notează $[M + xNa]^{n+}$. În locul sodiului poate fi potasiul sau în unele cazuri ambii ioni. Frecvente sunt și pierderile unei sau mai multor molecule de apă: în acest caz picul apare „sărăcit” cu valoarea de 18 Da sau multiplii ai acesteia. Astfel de picuri se notează $[M - pH_2O]^{n+}$. Din analiza tuturor fragmentelor din spectrul de masă se pot deduce:

- natura unității glucidice constituyente
- tipul de legătură între unitățile glucidice(1-4,1-3,1-6)
- ordinea în care unitățile glucidice se succed în lanț.

Nu se poate încă determina geometria legăturii anomerice (alfa sau beta). În acest mod se pot secvențializa probe de oligo sau polizaharide care nu cântăresc mai mult de 9-10pg.

4.5.3. Nomenclatura ganglioizidelor

În această lucrare ganglioizidele și precursorii de tip glicosfingolipide sunt abreviați în conformitate cu sistemul introdus de Svennerholm în 1980 [96] și de recomandările Comisiei de Nomenclatură Biochimică a IUPAC-IUB [97] după cum urmează: LacCer, Gal β 4Glc β 1Cer; GA2, Gg₃Cer, GalNAc β 4Gal β 4Glc β 1Cer; GA1, Gg₄Cer, Gal β 3GalNAc β 4Gal β 4Glc β 1Cer; nLc₄Cer, Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1Cer; Lc₄Cer, Gal β 3GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1Cer; GM3, II³- α -Neu5Ac-LacCer; GD3, II³- α -(Neu5Ac)₂-LacCer; GT3, II³- α -(Neu5Ac)₃-LacCer; GM2, II³- α -Neu5Ac-Gg₃Cer; GD2, II³- α -(Neu5Ac)₂-Gg₃Cer; GM1a or GM1, II³- α -Neu5Ac-Gg₄Cer; GM1b, IV³- α -Neu5Ac-Gg₄Cer; GalNAc-GM1b, IV³- α -Neu5Ac-Gg₅Cer; GD1a, IV³- α -Neu5Ac,II³- α -Neu5Ac-Gg₄Cer; GD1b, II³- α -(Neu5Ac)₂-Gg₄Cer; GT1b, IV³- α -Neu5Ac,II³- α -(Neu5Ac)₂-Gg₄Cer; GQ1b, IV³- α -(Neu5Ac)₂,II³- α -(Neu5Ac)₂-Gg₄Cer; nLM1 or 3'-nLM1, IV³- α -Neu5Ac-nLc₄Cer; LM1 or 3'-isoLM1, IV³- α -Neu5Ac-Lc₄Cer; nLD1, disialo-nLc₄Cer.

CONTRIBUȚII ORIGINALE. REZULTATE ȘI DISCUȚII

Cap. V Cercetări asupra realizării unui cuplaj între un sistem complet automat de introducere a probei prin chip-electrospray și un spectrometrul de masă hibrid quadrupolar cu timp de zbor cu accelerare ortogonală (QTOF MS)

5.1. Experimente de cuplaj ale robotului NanoMate cu injectare automată și ionizare prin chip electrospray cu spectrometrul de masă hibrid quadrupolar cu timp de zbor cu accelerare ortogonală (QTOF MS)

Scopul acestui studiu a fost interfațarea robotului NanoMate, cu injectare automată și ionizare prin chip ESI, cu un spectrometru de masă ultra modern quadrupolar hibrid cu timp de zbor (quadrupole time-of-flight, QTOF) și optimizarea riguroasă a cuplajului și metodologiei generale de lucru în scopul standardizării ei.

Primele experimente de interfațare a chipESI s-au efectuat cu un spectrometru de masă quadrupolar hibrid cu timp de zbor (QTOF) de la firma Micromass, Manchester, Marea Britanie. Spectrometrul de masă QTOF funcționează în cuplaj cu o sursă de ioni cu electrospray, în geometria de tip Z a firmei Micromass. Spectrometrul este interfațat cu un computer ce rulează programul Mass Lynx, sub Windows N.T. Software-ul Mass Lynx controlează instrumentul, înregistrează cromatogramele, iar prin intermediul său cromatograma curentului total de ioni înregistrată este procesată astfel încât se generează spectrele de masă. Spectrele de masă la rândul lor sunt procesate, netezite, tot prin intermediul programului Mass Lynx. Pentru înregistrarea spectrelor de masă s-a utilizat modul ionilor negativi, care s-a dovedit anterior cel mai potrivit pentru ionizarea și detectarea GSL. În toate experimentele temperatura sursei a fost menținută la 80°C, iar pentru desolvatarea și formarea ionilor în fază gazoasă, s-a folosit drept gaz de desolvatare, azot la un debit de 50 l/h .

Spectrometria de masă în tandem a fost efectuată prin tehnica disocierilor induse prin ciocnire utilizând argon ca și gaz pentru ciocnire. Toate spectrele de masă au fost calibrate folosind drept calibrant iodură de sodiu întrucât aceasta generează prin electrospray semnale ionice care acoperă un domeniu larg de mase.

În versiunile lor originale toate spectrometrele de masă care funcționează cu ionizare prin electrospray fie că sunt de la firmele Micromass, Bruker, Finnigan sau Applied Biosystems folosesc pentru injectarea probelor sistemul de sursă nanoESI sau microESI. În sistemul microESI proba este aspirată într-o seringă conectată printr-un capilar la vârful sursei, și care constă dintr-un ac metalic relativ subțire. Seringa este încastrată într-un dispozitiv de pompaj cu debit reglabil, iar soluția este pompată din seringă prin capilar înspre vârful electropulverizator. Sistemele

nanoESI folosesc niște capilare foarte fine de sticlă în care proba este introdusă cu ajutorul unei pipete cu vârf foarte fin de tipul celor folosite în tehnica gel-electroforeza. Aceste capilare sunt fie disponibile comercial, fie pot fi obținute și confecționate în laborator. Cele comerciale au o depunere metalică pe suprafața exterioară iar la utilizare se introduc în orificiul sursei venind în contact cu sursa aflată la tensiunea de electrospray. Capilarele, care din scopuri practice și de economie, se confecționează în laborator sunt din sticlă ce are interiorul profilat în formă de "omega" pentru a preveni formarea bulelor în timpul electropulverizării. Tuburile capilare se comandă de regulă, de la o companie specializată și apoi se subțiază cu ajutorul unui trăgător, care poate fi și el confecționat în laborator, în scopul obținerii unui vârf foarte ascuțit, fin și totodată deschis. Și în acest caz, proba se introduce cu ajutorul pipetei ultrafine în interiorul nanocapilarului însă cum suprafața acestuia nu este depusă cu un material conductor, în interiorul capilarului se introduce un fir de oțel inoxidabil care se conectează la sursa de înaltă tensiune a ESI. Deși metoda este practică și necostisitoare utilizarea capilarelor pentru electropulverizare suferă de foarte multe neajunsuri care au fost des raportate în literatura de specialitate. În primul rând, debitele pe care un asemenea capilar le furnizează sunt de aproximativ 400-500 de nl/min adică un consum destul de mare de probă, ceea ce este un inconvenient în cazul analizelor biologice când se dispune de cantitate mică de probă. Cel de al doilea dezavantaj bazat pe capilar este lipsa de reproductibilitate a calităților vârfului pulverizator. Chiar și în cazul capilarelor confecționate în industrie, reproductibilitatea formei vârfului și a diametrului orificiului deschis este redusă. În cazul capilarelor produse în laborator această reproductibilitate este și mai mică. De forma vârfului și dimensiunea diametrului orificiului depinde valoarea câmpului electric care se stabilește în soluție și în ultimă instanță, cum se inițiază procesul ESI și cum îl susține pe toată durata aplicării tensiunii. Din acest motiv, lipsa de reproductibilitate a vârfului determină lipsa de reproductibilitate a experimentelor. Deseori în literatură este semnalat faptul că una și aceeași probă aflată în condiții identice de analiză a furnizat spectre diferite la schimbarea capilarului electropulverizator. Din această cauză, tendința cercetării la ora actuală este înspre introducerea sistemelor de chipuri fabricate prin metodele nanotehnologice/semiconductoare precise care fac ca reproductibilitatea orificiilor de ESI ale chipului să fie de 100%. Mai mult, tehnologia de fabricare a chipurilor a atins în acest moment stadiul în care pot construi micro și nanochipuri, ce lucrează la debite de maxim 50 nl/min, cu o eficiență a ionizării atât de mare încât sunt capabile să ionizeze și să furnizeze în spectru semnale ale unor componente aflate în amestec la nivel de urmă și care prin nicio altă metodă analitică nu ar putea fi vreodată detectați. Deși tehnologia chip este atât de avansată, chipurile ESI nu pot funcționa fără un cuplaj adecvat cu un spectrometru de masă. Din acest punct de vedere cercetările nu sunt chiar atât de avansate întrucât sistemele de chip trebuiesc adaptate mereu la configurațiile sistemului, la parametrii de funcționare și la caracteristicile spectrometrului de masă. Aceste caracteristici diferă foarte mult, nu numai de la un tip de spectrometru la altul, ci și între spectrometre de același tip, dar produse de firme diferite.

În acest context scopul acestui stadiu al cercetării a fost interfațarea spectrometrului de masă QTOF cu un robot produs de firma Advion BioSciences din Norwich Marea Britanie. **Robotul denumit NanoMate este primul sistem automat din lume de introducere a probelor în spectrometrul de masă, prin chip electrospray.** Acest robot este prezentat în figura 5.1.1.

După cum se observă robotul conține un platan ce are prevăzut un aranjament de 96 locașuri în care se pipetează probele. Robotul este conectat la un laptop ce rulează programul Chip Soft prin intermediul căruia se controlează robotul.

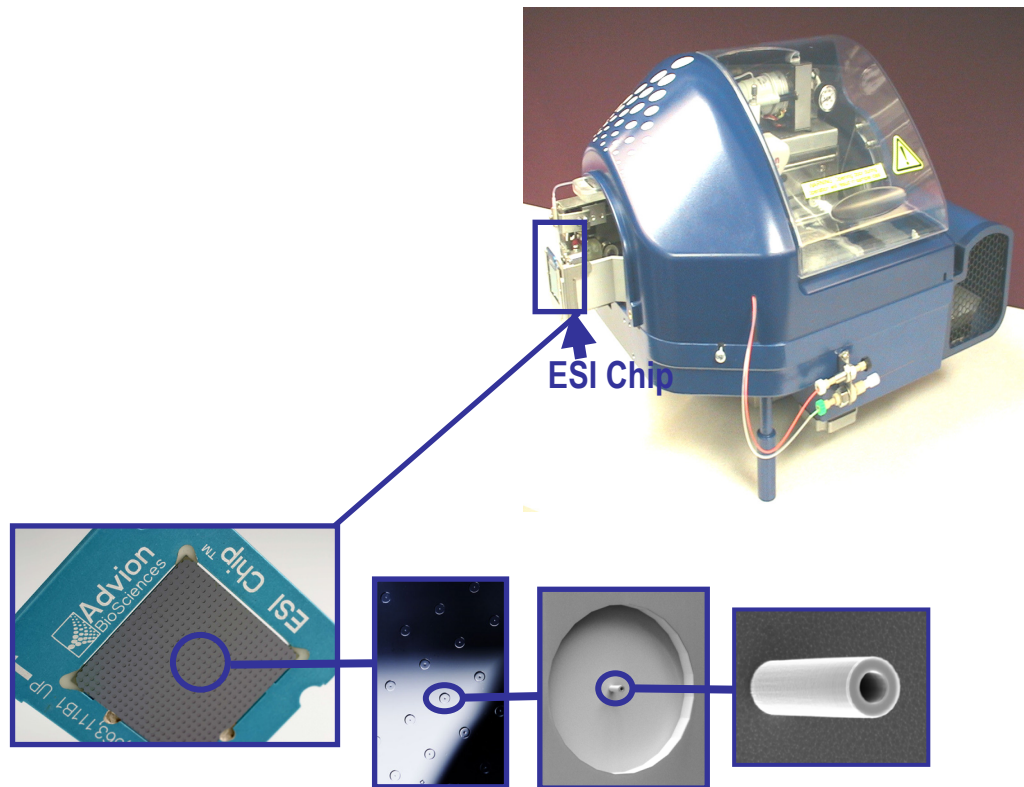


Fig.5.1.1. Robotul NanoMate echipat cu chip ESI din siliciu produs de firma Advion BioSciences, Norwich, Marea Britanie (prin amabilitatea Advion BioSciences)

Robotul mai conține un suport cu 96 de pipete de plastic ce au depuse pe suprafața exterioară un strat inert de grafit. Robotul este programat astfel încât, brațul său să atașeze o pipetă de plastic, apoi să se deplaseze automat înspre placa ce conține probele, să aspire 2-5 microlitri probă și apoi să se alinieze în poziție orizontală pentru electropulverizarea probei printr-un orificiu al chip-ului (Fig.5.1.2). Pentru electropulverizare robotul aplică pe vârful pipetei tensiunea de electrospray stabilă și optimizată de operator prin intermediul programului Chip Soft. Chipul este un substrat de siliciu ce are practicate 100 de orificii fiecare cu diametrul interior de 10 μm . Chip-ul este obținut prin metode semiconductoare clasice precum fotolitografie și modelare, cunoscute sub numele de *deep ion reactive etching*.



Fig.5.1.2. Principiul injectării automate a probei, la robotul NanoMate echipat cu chip ESI



Fig.5.1.3. Cuplajul dintre robotul NanoMate, echipat cu chip ESI, cu spectrometrul de masă QTOF MS

Pulverizarea prin chip are avantajul unui consum foarte mic de probă, al unui spray extrem de stabil având o reproductibilitate de 100% a experimentelor. Ceea ce îl face însă unic, este capacitatea de a oferi o maximă eficiență a ionizării, atât prin formarea de ioni multipli încărcăți, cât și prin electropulverizarea componentelor minore ce apar în amestecurile biologice complexe.

Din acest motiv, *chip electrospray* are capacitatea unică de a descoperi biomolecule ce nu pot fi detectate utilizând o altă metodă bioanalitică. Toate aceste atribute au condus la alegerea robotului NanoMate pentru realizarea cuplajului cu QTOF MS, urmată de optimizarea metodei pentru analiza GSL sialilate, în scopul detectării de biomarkeri în tumori ale creierului uman.

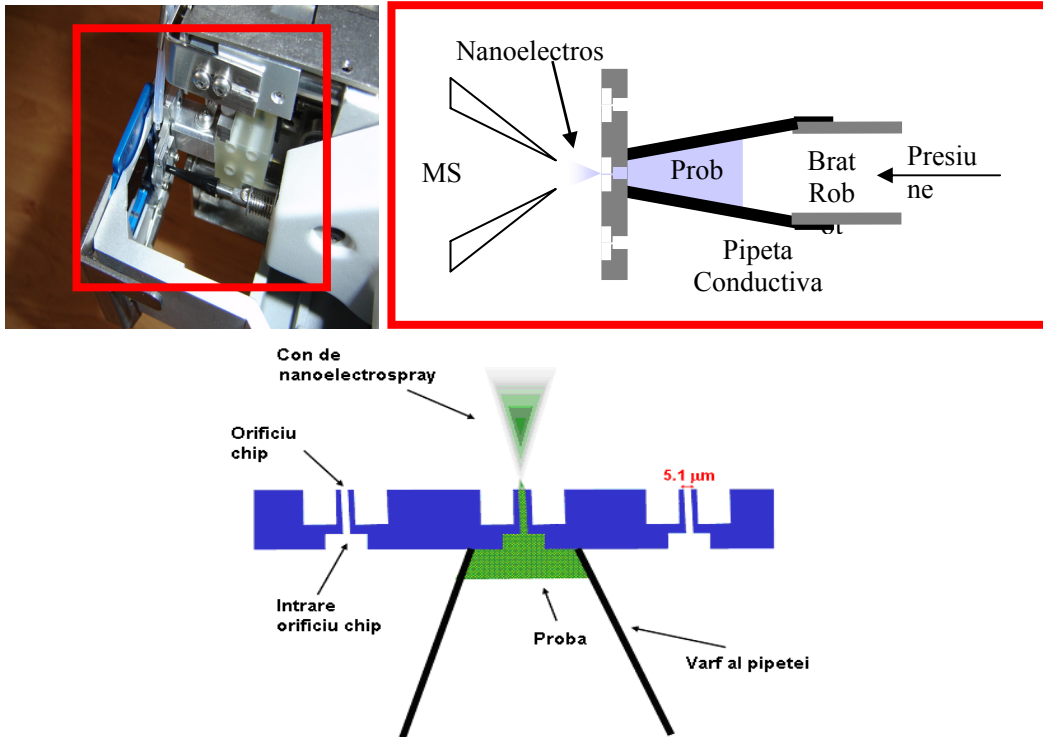


Fig. 5.1.4. Funcționarea robotului NanoMate cu chip ESI în cuplaj cu spectrometrul QTOF MS

În studiul de față robotul a fost cuplat cu spectrometrul de masă QTOF, prin intermediul unui sistem de cuplaj, special construit. Ansamblul celor două instrumente cuplate este prezentat în figura 5.1.3., iar principiul de funcționare a robotului NanoMate în regim QTOF MS este prezentat în figura 5.1.4.

În vederea realizării cuplajului în primă fază, a trebuit dezasamblată sursa originală de nanoelectrospray a companiei Micromass cu care este livrat spectrometrul de masă. După dezasamblarea sursei s-a trecut la proiectarea sistemului de prindere a robotului de spectrometrul de masă, mai exact de partea frontală a acestuia, în așa fel încât poziționarea robotului să fie identică cu poziția inițială a sursei originale. În plus, sistemul de prindere trebuie să mai îndeplinească următoarele calități:

- să poată fi ușor asamblat și dezasamblat, iar procesul cuplajului să nu dureze mult timp astfel încât îndată ce este necesară revenirea la sursa originală, acest lucru să se poată face rapid;
- să nu necesite modificări ireversibile ale niciunui component original, caracteristic spectrometrului (sursa de ioni și/sau analizoarele);
- să fie flexibilă în ceea ce privește poziționarea robotului în diferite unghiuri și la diferite distanțe față de contraelectrodul spectrometrului de masă;
- să permită decuplarea totală dintre robot și spectrometrul de masă, astfel încât ele să poată funcționa independent. Acest aspect este extrem de important atât pentru identificarea problemelor care apar în timpul analizei cât și pentru remedierea eventualelor avarii;

- să fie confecționat din materiale rezistente și totodată să nu aibă o masă foarte mare întrucât sistemul de prindere împreună cu robotul (care cântărește 18 kg) sunt susținute de spectrometrul de masă;
- să poată susține robotul, iar manipularea robotului să se facă solidar sau parțial solidar cu sistemul de prindere pentru a evita deteriorarea reciprocă;
- nici o parte metalică să nu ajungă în contact cu sursele de tensiune ale spectrometrului sau robotului și să nu obtureze deplasarea chipului, a brațului robotului și a tuburilor ce alimentează robotul cu gazul de lucru.

Ținând cont de toate aceste cerințe s-a efectuat un sistem de prindere care permite conectarea robotului cu spectrometrul de masă, în modul prezentat în figura 5.1.3 Sistemul de prindere constă dintr-un braț de oțel inoxidabil fixat în poziție verticală pe spectrometrul de masă care, se continuă cu un al doilea braț pe axa Oz, față de spectrometru. În partea inferioară a robotului printr-un sistem de prindere adaptat configurației robotului este încastrată o placă metalică groasă ce are practicat un orificiu de diametru comparabil cu diametrul brațului Oz. Robotul poate culisa pe bratul Oz și poate fi fixat într-o poziție anume, printr-un sistem de prindere adecvat încorporat în placa metalică. Brațul Oz are un grad de libertate pe direcția Ox astfel încât, prin intermediul său robotul se poate deplasa pe direcțiile Oz și Ox față de contraelectrodul spectrometrului de masă. Cu ajutorul brațului vertical plasat pe direcția Oz întreg sistemul poate culisa pe această direcție și în consecință întreg sistemul oferă flexibilitate pe Ox,y,z. Sistemul de prindere nu cântărește mai mult de 2 kg, nu vine în contact decât cu capacul exterior al spectrometrului de masă pe care se sprijină în trei puncte și nu împiedică mișcarea robotului, sau accesul la spectrometrul de masă, sau accesul gazelor de alimentare.

Pentru analiza GSL pentru toate experimentele s-a folosit un platan al probelor, din sticlă, pentru a evita interacțiunea solventului și a moleculelor cu pereții de plastic ai platanelor clasice și pentru a evita orice contaminare. Tot în acest scop, pentru fiecare experiment de injecție în MS, s-a folosit o altă pipetă și un alt orificiu al chipului și s-a optimizat în detaliu distanța dintre chipul electropulverizator și orificiul de intrare al contraelectrodului spectrometrului de masă.

La începutul experimentelor, în platanul probelor, s-au depus câte 10 microlitri de probe în trei orificii diferite. Pentru a se putea face un studiu cu adevărat comparativ, toate condițiile de măsură ale celor trei probe, au fost identice. Astfel, pentru toate cele trei probe robotul a fost programat să aspire 5 microlitri de probă urmat de 2 microlitri de aer în vârful pipetei, iar apoi a fost inițiată electropulverizarea la tensiuni de 1,7 kV aplicate pe vârful pipetei, în timp ce chipul de siliciu a fost menținut la potențial zero. Pentru toate cele trei probe, după inițierea ESI, semnalul a fost menținut constant la o tensiune de 1,8 kV și o presiune aplicată lichidului din pipetă de 0,3 psi. Toate spectrele au fost înregistrate menținând contraelectrodul spectrometrului de masă la o tensiune de 40 V, pe timp de 15 scanuri, iar apoi această tensiune a fost crescută, prin procedeu de rampă până la 100 V, așa cum se va descrie în continuare.

5.2. Studiu de fezabilitate a metodei nanoESI chip QTOF MS și optimizarea acesteia pentru compuși glicoconjugati

5.2.1. Analiza glicosfingolipidelor sialilate (ganglioziide)

GSLs acide, ca glicosfingolipidele sialilate (GSLs), numite ganglioziide (GGs),

și cele sulfatate având acid glucuronic sulfatat conectat de glicosfingolipide (sulfo-GlcA-GSLs) sunt localizate în stratul extern al membranei plasmatică, fiind exprimate la suprafața mai multor tipuri de celule și sunt răspândite în rândul vertebratelor în special în sistemul nervos al mamiferelor. În timp ce glicosfingolipidele sialilate (ganglioizidele) sunt abundente, în special, în sistemul nervos central (SNC), Glc-GSLs sunt mai abundente în nervii periferici [69, 73]. Ele sunt implicate în procese biologice ca dezvoltarea fetală, maturarea, diferențierea, îmbătrânirea, și sunt implicate în transformările maligne și în degenerescența neuronală [99-101].

Pentru a elucida structura speciilor GSL implicate în procese patologice au fost implementate tehnicile: spectrometrie de masă – o analiză sensibilă și exactă implicând nanoESI-QTOF MS în tandem MS, electroforeză capilară/nano-ESI/QTOF MS/MS, și chipuri automate bazate tot pe injectare prin nanoESI QTOF MS. Prin aceste metode s-au realizat caracterizarea individuală și detaliată a compusilor și s-a reușit stabilirea unui tipar compozițional al amestecurilor de GSL extrase din țesuturi umane [69-70]. Metodele bazate pe chip MS însă, nu au fost introduse ca tehnici de rutină în acest domeniu și fezabilitatea lor nu a fost cu adevărat demonstrată.

În acest context, studiul de față și-a propus demonstrarea fezabilității metodei nanoESI chip QTOF MS și optimizarea ei pentru prima dată la analize de GSL sialilate, cu o aplicație directă asupra GSL din tumori primare ale creierului uman.

Amestecurile native de GSL sialilate din meningiom și hemangiom au fost dizolvate în metanol pur și transferate în locașurile robotului NanoMate. Robotul a fost programat să aspire 5 microlitri în pipeta conductivă. Ionizarea prin chip electrospray a fost inițiată la o tensiune de -1,7 kV aplicați la vârful pipetei, o presiune de 0,3 psi și o tensiune de 40 V pe contraelectrodul spectrometrului de masă. În aceste condiții s-a observat apariția semnalului de electrospray care a avut o intensitate constantă. Cu toate acestea, la aceste valori ale tensiunilor aplicate, s-a observat în spectrul de masă extras din cromatograma curentului total de ioni numai câțiva ioni dublu și triplu încărcăți, corespunzând speciilor majore de ganglioizide GM1, GD1 și GT1 care sunt prezente în orice amestec extras din vreo regiune a creierului uman în mare abundență. Pentru a se obține detectarea speciilor minore și eventual a biomarkerilor, parametrii de ionizare prin chip electrospray au fost modificați la valorile de -1.8 kV tensiune aplicată pe pipeta conductivă, 0,3 psi, iar potențialul contraelectrodului a fost treptat modificat de la 40 la 100 volți. În figurile 5.2.1. și 5.2.2 sunt prezentate spectrele de masă ale amestecurilor de ganglioizide din meningiom și hemangiom obținute prin combinarea în progresie a scanurilor din cromatograma curentului total de ioni achiziționate timp de 10 minute, în condițiile descrise mai sus.

În experimentele din figura 5.2.1 și figura 5.2.2 sistemul NanoMate a electropulverizat soluțiile cu un debit de aproximativ 100 nl/min astfel încât pentru generarea spectrului din figura 5.2.1 a fost necesar un consum de numai 3 pmol de proba. Tot 3 pmol de material au fost necesari și pentru înregistrarea spectrului din figura 5.2.2. Din analiza spectrelor prezentate în figura 5.2.1 și figura 5.2.2. rezultă clar că, optimizarea condițiilor de chip electrospray QTOF MS: a favorizat formarea ionilor simplu încărcăți, transferați în analizorul MS intacti (fără fragmentare în sursă), a determinat o ionizare optimă a ganglioizidelor conținând lanțuri lungi de oligozaharide și modificări labile și a oferit posibilitatea de detectare și ionizare a componentelor minore prezente în amestec. Mai mult, se poate observa că, prin această metodologie s-a reușit minimalizarea fragmentărilor în sursă a tuturor

atașamentelor labile de acid sialic (NeuAc). Acest aspect de reducere semnificativă, prin chip electrospray, a fragmentărilor gangliozidelor induse în sursă a fost semnalat de altfel și în discuțiile anterioare. El reprezintă un avantaj major în analiza biomoleculilor în special în cazul amestecurilor conținând specii polisialilate sau structuri complexe modificate prin atașamente periferice labile de tip carbohidrat precum fucozile sau necarbohidrat precum acetilare. Aceste unități structurale se detasează de scheletul molecular foarte rapid astfel încât în cazul în care fragmentarea în sursă nu este împiedicată spectrul de masă oferă date eronate întrucât moleculele ce au aceste modificări se detectează fie fără aceste modificări fie cu fragmente ale acestora rupte în sursă de ioni.

Analiza prin chip electrospray QTOF a fost precedată de o serie amplă de experimente de optimizare. În cadrul acestor optimizări, experimentele au fost cel mai mult concentrate asupra găsirii sistemului de solvent pentru obținerea electrospray-ului corespunzător și a concentrației optime a probelor. S-au testat și în acest caz sisteme de solvenți precum metanol 100%, metanol/apa în diferite rapoarte (1:1; 1:2; 1:3; 1:4), metanol/cloroform/apa în diferite rapoarte precum și sisteme mai complexe cu adaos de 1- și 2- propanol, acetat de amoniu în pH ușor alcalin titrat cu amoniac în concentrații de 10-20 mM. În cazul ionizării prin chip electrospray, în cuplaj cu QTOF MS, problema fragmentării în sursă este mult diminuată întrucât ionizarea prin chip electrospray are caracteristici diferite față de ionizarea clasică prin capilar. Acest fapt se datorează distribuției câmpului electric, care este foarte concentrat în jurul chip-ului, și care permite astfel o ionizare foarte eficientă cu o formare de ioni multipli încărcăți, fără a fi nevoie să se aplice tensiuni deosebit de înalte pe contraelectrod sau pe pipeta ce pulverizează soluția gangliozidică prin chip. Mecanismul diferit de ionizare efectuat printr-un canal al chip-ului de numai 10 micrometri împiedică fragmentările în sursă fiind de asemenea remarcată și printr-o eficiență deosebită de ionizare a speciilor minore ce nu pot fi transferate în faza ionică gazoasă, în spectrometrul de masă prin electrospray pe capilar. Sistemele de chip însă au dezavantajul de a nu tolera săruri și de a nu permite electropulverizarea unor soluții mult prea vâscoase, dar care în cazul capilarelor ar putea fi electropulverizate. Din acest motiv și în acest caz, spectrele cele mai fidele pentru compoziția probei, care s-au putut obține prin electropulverizare pe chip, au fost cele înregistrate în soluție pur metanolică. Acest aspect a fost avantajos și din perspectiva posibilității de a compara aceste spectre cu cele obținute prin electrospray pe capilar cu detecție tot în soluție metanolică.

Un al doilea parametru care a trebuit optimizat a fost concentrația probei de gangliozidă. Experimentele de optimizare au început cu concentrații cuprinse între 10 și 5 pmol/microlitru și nu au condus la obținerea vreunui semnal, întrucât concentrația, așa cum s-a dovedit ulterior, a fost mult prea ridicată pentru ionizarea ultrasensibilă prin chip electrospray. Din acest motiv au fost întreprinse o serie de experimente de ionizare prin chip electrospray utilizând soluții diluate treptat în metanol până la concentrațiile de 5 și sub 5 pmol/microlitru. Abia la aceste valori extrem de scăzute ale concentrației, care dovedesc sensibilitatea ultra înaltă a metodei, s-a putut obține un semnal de electrospray, care însă a trebuit optimizat din perspectiva parametrilor instrumentali cum ar fi: potențialul de electropulverizare aplicat pe vârful electropulverizator prin chip, presiunea gazului de susținerea sprayului, potențialul contraelectrodului spectrometrului de masă, presiunea gazului de desolvatare, temperatura de desolvatare, numărul de cicluri scan de înregistrări pe secundă, timpul de achiziționare a semnalului, procesarea prin netezire/*smooth*, procesarea prin extragerea semnalului principal și neglijarea zgomotului: *subtract*, calibrarea spectrometrului de masă, minimizarea abaterii/devierii de masă.

Spectrul extrasului de ganglioziide din meningion, obținut în condițiile cele mai optim realizate, este prezentat în figura 5.2.1. Rezultatele înregistrate prin chip electrospray s-au dovedit a fi remarcabile din perspectiva numărului de specii ce au putut fi detectate, a preciziei în determinarea masei, a calității spectrului și a posibilității de a identifica toate speciile prezente în amestec. Astfel, ionizarea prin chip electrospray a permis identificarea numai prin screening a unui număr de 28 de specii ganglioizidice care diferă prin constituția părții oligozaharidice și compoziția unității ceramidice 10 specii diferite de GM3 au fost identificate, cele mai abundente fiind și în acest caz cele 3 structuri GM3 (d18:1/16:0), GM3 (d18:1/22:0), GM3 (d18:1/24:0). Un fapt deosebit de interesant îl reprezintă prezența structurilor GM1, care se observă în spectrul prin chip electrospray. Analiza atentă a figurii 5.2.1 denotă identificarea a nu mai puțin de 12 componente GM1. Se remarcă structura abundentă de tip GM1 cu baza sfingoidă dihidroxilată și structura globală ceramidică de compoziție (d 18:1/24:1) detectată la m/z 1626.95 acompaniată de structura, fără dublă legătură, de la 1268.95 deplasată deci, prin absența dublei legături cu 2 unități față de structura de compoziție ceramidică identică și lanțul oligozaharidic

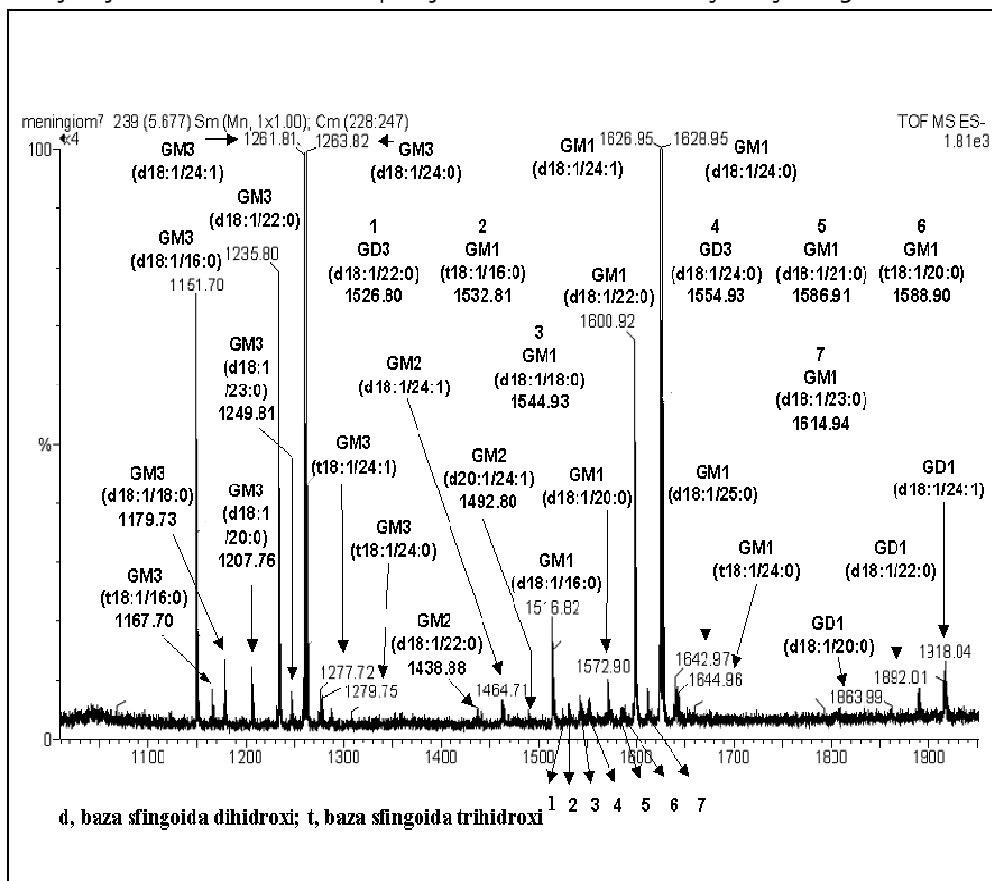


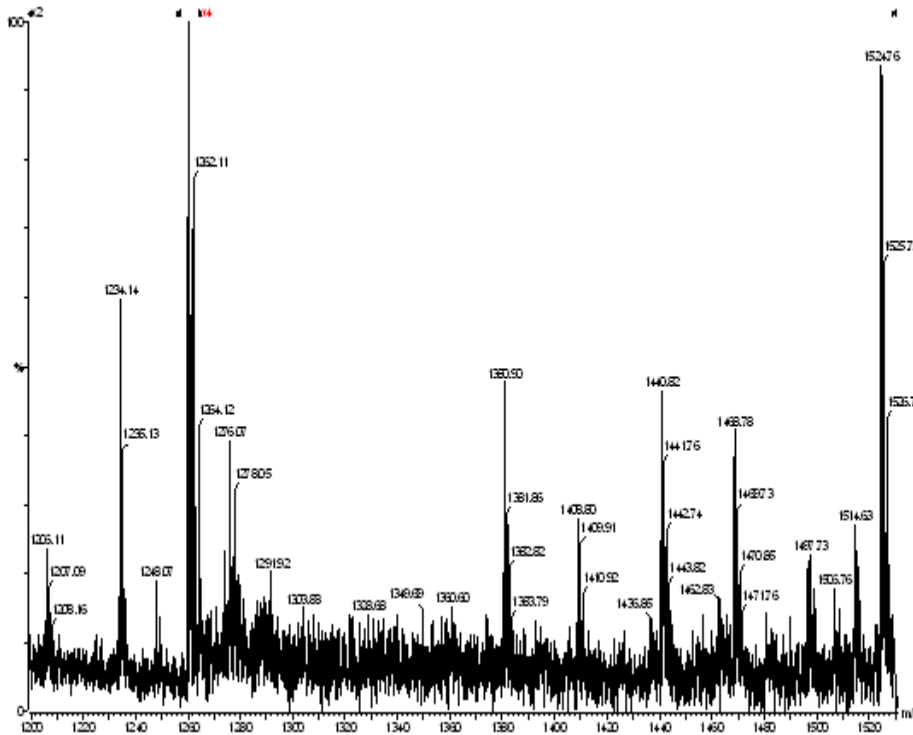
Fig.5.2.1. Analiza compoziției ganglioizidelor din meningiom benign uman prin nanoESI chip QTOF MS. Solvent: MeOH 100%; timp acumulare semnal: 10 min (la 2.1 scan/s); potențial chip 0 V (chip conectat la pământ); potențialul conului (contraelectrod) 50 V. temperatura desolvatare: 80 °C; gaz desolvatare azot la presiune 15 p.s.i; precizie medie în determinarea masei: 10 p.p.m; calibrare: NaI

monosialilat identic de la 1626.95. Aceste două specii sunt împreună cu biomarkerii GM3 de 18:1/24:1 și aferentul fără dublă legătură (d 18:1/24:0) cei mai abundenți în acest amestec. Cum însă aceste structuri GM1, cu baza dihidroxilată, nu au fost depistați ca prezenți în spectrul din creierul normal nici măcar la nivel de „urmă”, pot fi considerate, tot o caracteristică a tumorii de meningiom.

Următoarea categorie ganglioizidică vizibilă, o reprezintă structura GD3. Se poate observa existența a doua peak-uri foarte puțin intense, dar totuși bine detectabile, aferente structurilor GD3. Aceste date sunt într-o concordanță perfectă cu informația HPLC și arată o dată în plus superioritatea ionizării prin chip electrospray și potențialul acestei metode, de a detecta componenți extrem de slab exprimați în amestecuri complexe, dominat de structuri abundente. Cele două structuri GD3 identificate prezintă ambele o bază sfingoidă dihidroxilată și au constituțiile ceramidice (18:1/22:0) și respectiv (18:1/24:0). Aceste două specii au fost detectate prin ionii puțin abundenți, simplu încărcăți de la m/z 1526.80 (peak-ul 1 în figura 5.2.1) și respectiv 1544.93 (peak-ul 4 în figura 5.2.1).

Datele de chip electrospray QTOF demonstrează însă, fără îndoială, și existența speciilor de tip GD1 în țesutul tumoral. Trei specii diferite de tip GD1 au fost identificate prin analiza de mare sensibilitate chip electrospray QTOF MS. Cea mai abundentă specie GD1 a fost identificată prin intermediul ionului simplu încărcat de la 1918.04 și atribuită compoziției ceramidice (d18:1/24:1), cu dublă legătură, fără ca specia conexă fără dubla legătura să fie și ea prezentă. Celelalte două specii cu lanțuri ceramidice mai scurte și anume (d18:1/20:0) și respectiv (d18:1/22:0) au fost identificate ca ioni foarte puțin abundenți la masele m/z 1863.99 și respectiv 1892.01. Prin urmare, trei specii diferite de structură GD1 există într-adevăr în meningiomul uman benign și sunt fără îndoială corelați cu tumoarea.

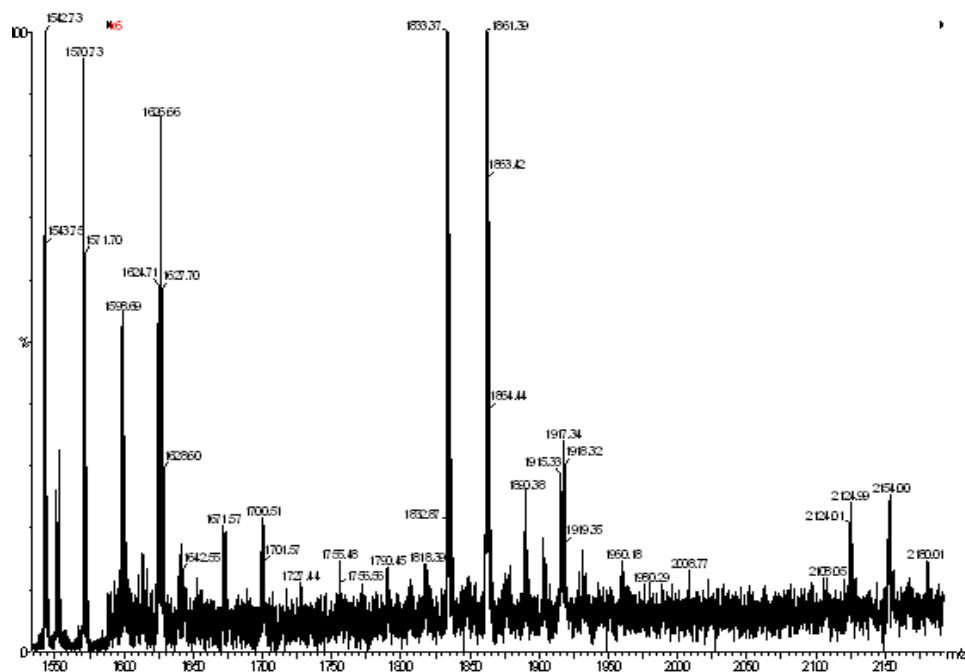
În scopul testării în continuare a fezabilității cuplajului s-a întreprins analiza structurilor ganglioizidice din hemangiomul uman (adult). Acest stadiu al investigării a urmărit testarea posibilității de realizare a unui screening al amestecului complex ganglioizidic din hemangiom și a determinării a compoziției bazată pe măsurarea cu mare exactitate a maselor moleculare ale speciilor detectate. Așa cum s-a descris anterior, de cea mai mare importanță într-o asemenea analiză o reprezintă optimizarea condițiilor chipESI MS în vederea detectării a cât mai multor specii prezente în amestec și a obține prin spectrul de masă o imagine cât mai fidelă a compoziției amestecului ganglioizidic.



a)

Fig. 5.2.2. Analiza gangliozidelor izolate din hemangiom uman (adult) prin nanoESI chip QTOF MS. Solvent: MeOH 100%; tensiune contraelectrod (sampling cone) 30 V; potențial chip 0 V (chip conectat la pământ); timp acumulare semnal: 10 min (la 2.1 scan/s); temperatura desolvatare: 80 °C; gaz desolvatare azot la presiune 15 p.s.i; precizie medie în determinarea masei: 10 p.p.m; calibrare: NaI. a): domeniul de masă 1200-1550; b) domeniul de mase 1550-2200.

Procedura de optimizare a constată și în acest caz în testarea multor sisteme de solvenți pentru electrospray și înregistrarea de spectre la diferite valori ale parametrilor sursei de electrospray și în diferite condiții de măsură ale analizorului și detectorului. S-au testat sisteme de solvenți precum metanol pur, metanol/apa în diferite rapoarte, metanol/clorofom/apa în diferite rapoarte precum și sisteme mai complexe implicând adaos de 1- și 2 propanol sau acetat de amoniu în pH ușor alcalin titrat cu amoniac în concentrații de 10-20 mM și în acest caz, ca și în cazul gangliozidelor din meningiom s-a observat că cele mai bune rezultate au fost obținute prin dizolvarea probei în MeOH 100%.



b)

Fig.5.2.2. Analiza compoziției gangliozidelor din hemangiom uman (adult) prin NanoESI chip QTOF MS.

Folosirea aceluiași sistem de solvent este deosebit de utilă și pentru a putea realiza la finalul proiectului a unei riguroase comparații între expresiile gangliozidelor obținute prin MS în aceleași condiții de analiză (solvent, aparatură, parametri înregistrare spectre). Soluțiile metanolice au permis lucrul în condiții de ionizare la tensiuni mai mici ceea ce a împiedicat fragmentarea grupărilor labile și detectarea ionilor pseudomoleculari intacti. Toate determinările prin chip nanoESI QTOF MS au fost și în acest caz efectuate la concentrația de 5 pmol/microlitru (calculat pentru o masă moleculară medie de 1500).

În Tabelul 5.2.3 este prezentată desemnarea ionilor detectați prin nanoESI chip QTOF MS.

Tabel 5.2.3. Gangliozidele detectate în țesutul de hemangiom prin analiza chipESI-QTOF MS

<i>m/z</i> ionul molecular	Structura identificată
1150.718	GM3 (d18:1/16:0)
1179.745	GM3 (d18:1/18:0)
1181.753	GM3 (d18:0/18:0)
1207.778	GM3 (d18:1/20:0)
1235.811	GM3 (d18:1/22:0)
1237.811	GM3 (d18:0/22:0)

1249.786	O-Ac-GM3 (d18:1/20:0) (or GM3 (18:1/23:0))
1259.790	GM3 (d18:1/24:2)
1261.819	GM3 (d18:1/24:1)
1263.834	GM3 (d18:1/24:0)
1265.845	GM3 (d18:0/24:0)
1382.815	GM2 (d18:1/18:0)
1384.818	GM2 (d18:0/18:0)
1410.851	GM2 (d18:1/20:0)
1438.861	GM2 (d18:1/22:0)
1442.788	GD3 (d18:1/16:0)
1444.806	GD3 (d18:0/16:0)
1468.799	GD3 (d18:1/18:1)
1470.827	GD3 (d18:1/18:0)
1472.839	GD3 (d18:0/18:0)
1498.855	GD3 (d18:1/20:0)
1512.855	O-Ac-GD3 (d18:1/18:0)
1516.823	GM1 (d18:1/16:0)
1526.884	GD3 (d18:1/22:0)
1540.890	O-Ac-GD3 (d18:1/20:0)
1544.886	GM1 (d18:1/18:0)
1552.898	GD3 (d18:1/24:1)
1554.918	GD3 (d18:1/24:0)
1556.927	GD3 (d18:0/24:0)
1568.906	GM1, nLM1 și/sau LM1 (d18:1/20:2)
1570.892	GM1, nLM1 și/sau LM1 (d18:1/20:1)
1572.912	GM1, nLM1 și/sau LM1 (d18:1/20:0)
1600.927	GM1, nLM1 și/sau LM1 (d18:1/22:0)
1626.978	GM1, nLM1 și/sau LM1 (d18:1/24:1)
1628.969	GM1 și/sau nLM1 (d18:1/24:0)
1673.894	GD2 (d18:1/18:0)
1729.965	GD2 (d18:1/22:0)
1755.971	GD2 (d18:1/24:1)
1757.977	GD2 (d18:1/24:0)
1835.940	GD1, nLD1 și/sau LD1 (d18:1/18:0)
1847.425	GT3 (d18:0/24:0)
1881.244	Hex-HexNAc-nLM1 (d18:1/16:0)
1885.273	O-Ac-GT3 (18:1/24:1)
1887.223	O-Ac-GT3 (18:1/24:0)
1891.352	GD1, nLD1 și/sau LD1 (d18:1/22:0)
1918.002	GD1, nLD1 și/sau LD1 (d18:1/24:1)
2125.971	GT1 (d18:1/18:1)
2127.563	GT1 (d18:1/18:0)
2154.563	GT1 (d18:1/24:1)
2210.99	GT1 (d18:1/24:0)

d- baza sfinoidă dihidroxilată;

Din analiza spectrelor din figura 5.2.2. și a tabelului 5.2.3 se poate observa că, a putut fi identificat un număr de 50 de structuri ganglioizidice diferite în hemangiomul

uman (adult). Aceste structuri diferă prin constituția părții ceramidice și/sau prin compoziția lanțului zaharidic atasat și în cazul acestei tumori, speciile dominante sunt cele cu lanț zaharidic scurt, de tip GM3 ceea ce arată clar diferența exprimării acestor molecule în hemangiom față de țesutul de creier normal. Nu mai puțin de 13 structuri diferite de tip GM3 există în hemangiomul uman, din care una este *O*-acetilata. Remarcabil este de asemenea și numărul mare de specii di-sialilate de tip GD3 (11 structuri diferite) și prezența a două specii GD3 acetilate. Se poate observa și în acest caz, exprimarea redusă a speciilor polisialilate (de tip GT) cât și prezența câtorva specii polisialilate, cu grad de sialilare 3, de tip GT (de redusă intensitate) care sunt acetilate. Exprimarea redusă a polisialilatelor pare a fi un marker general al țesuturilor tumorale întrucât această caracteristică (lanțuri zaharidice scurte, cu grad de sialilare scăzut) a fost remarcat prin chip MS și în cazul anterior, în condiții identice de solvent, concentrație, electrospray și achiziție de semnal. Datele de chipMS arată clar că speciile de GM3 sunt biomarkeri asociați hemangiomului. Structurile scurte, monosialilate sunt cunoscute drept ganglioziide asociate creierului fetal reglate de antigene în timpul dezvoltării. În perioada de maturizare a creierului ele dispar treptat, devenind doar componente minore a compoziției ganglioizidelor din creierul uman adult normal. Prezența lor într-o asemenea abundență în țesutul din hemangiom, în dauna componentelor caracteristice țesutului normal (GM1) este în corelație directă cu procesul de diferențiere prezent în celulele tumorale față de celule normale netransformate.

5.2.2. Analiza glicopeptidelor

Etapa următoare a cercetării a vizat aplicarea, testarea și optimizarea cuplajului NanoMate QTOF MS pe o altă categorie de compuși glicoconjugați și anume un amestec foarte complex de peptide *O*-glicozilate (*O*-glicopeptide) obținute din urina unor pacienți suferind de o deficiență enzimatică ereditară de *N*-acetilhexozaminidaza [21, 22, 76, 102-104]. Această deficiență a fost descoperită și diagnosticată ca atare de către Dr. Detlev Schindler de la Institutul de Genetică Umană a Universității din Würzburg, Germania. Primii pacienți diagnosticați cu boala lui Schindler au fost doi copii, frați, în vârstă de 4 și respectiv 5 ani. Deficiența în activitatea enzimei *N*-acetilhexozaminidaza (activitate enzimatică reziduală de sub 5%) induce o acumulare de aminoacizi și respectiv peptide glicozilate, sialilate cu efecte devastatoare asupra organismului [102-104]. Numărul deosebit de mare al componentelor de glicopeptide acumulate face imposibilă detectarea lor în totalitate, în absența unei metode extrem de sensibile și eficiente de analiză MS, în scopul identificării. Determinarea componentelor eliminate prin urină, ca și produși catabolici de excreție, este de o maximă importanță pentru înțelegerea mecanismului enzimatic deficitar și mai ales pentru stabilirea unui tratament eficient. Anterior studiului ce va fi prezentat în această lucrare, au fost elaborate și publicate o serie de metodologii bazate pe diferite tehnici de spectrometrie de masă în vederea identificării componentelor de *O*-glicopeptide prezente în urina pacienților. Astfel, amestecul complex extras din urina pacientului a fost anterior succesiv analizat prin electroforeza capilară (CE, capillary electrophoresis) în cuplaj direct (on line) sau indirect (off line) cu spectrometrul de masă de tip QTOF cu ionizare prin ESI [21,22]. Această tehnică combinată s-a dovedit cea mai eficientă, întrucât a permis separarea componentelor din amestec și detectarea lor după separare prin ESI MS. Tot în cadrul acestor studii, structurile au putut fi analizate în detaliu prin fragmentare în tehnica disocierilor induse prin ciocnire, CID. Cu toate că rezultatele au fost remarcabile atât în ceea ce privește numărul componentelor noi

ce au putut fi identificate, cât și în ceea ce privește acuratețea informațiilor structurale obținute prin CID, metoda CE MS a prezentat și o serie de dezavantaje precum sunt:

- i) necesitatea realizării unei interfețe de cuplaj între CE și MS;
- ii) necesitatea elaborării și aplicării unui protocol deosebit de laborios de separare și detectare on line a amestecului;
- iii) timp de analiză (separare prin capilarul CE și detecție MS) de ordinul zecilor de minute;
- iv) consum mare de probă;
- v) reproductibilitate limitată a experimentelor;
- vi) costuri ridicate pentru manufacturarea interfeței, întreținerea ei și mentenanța celor două aparate în cuplaj.

Având în vedere aceste neajunsuri ale metodei, în 2004 o fracțiune din amestecul complex de glicopeptide, separata prin cromatografie pe gel permeabil a fost pentru prima dată supusă analizei prin NanoMate MS [65]. Datele obținute precum și consumul mic de probă și timpul redus de analiză au fost extrem de promițătoare și au aratat că prin NanoMate MS se pot identifica și componentele minore din amestecuri complexe, fără a fi nevoie de tehnici de separare cuplate cu MS. Din acest motiv, pentru a extinde cercetările raportate anterior, în această etapă a cercetării amestecul de glicopeptide extras și purificat din urina unui pacient suferind de boala lui *Schindler* a fost supus analizei prin intermediul cuplajului NanoMate QTOF, realizat așa cum s-a descris în paragrafele anterioare.

În acest scop, un eșantion de probă sub forma de pulbere liofilizată a fost dizolvat, succesiv, până la o concentrație de 3 pmol/ μ L în următoarele sisteme de solvenți: H₂O, H₂O/MeOH 50/50 v/v, H₂O/MeOH 80/20 v/v, H₂O/MeOH 20/80 v/v, H₂O/EtOH 50/50 v/v pentru analiza în modul de detecție a ionilor negativi și respectiv H₂O, H₂O/HCOOH 50/50 v/v pentru analiza în modul de detecție a ionilor pozitivi.

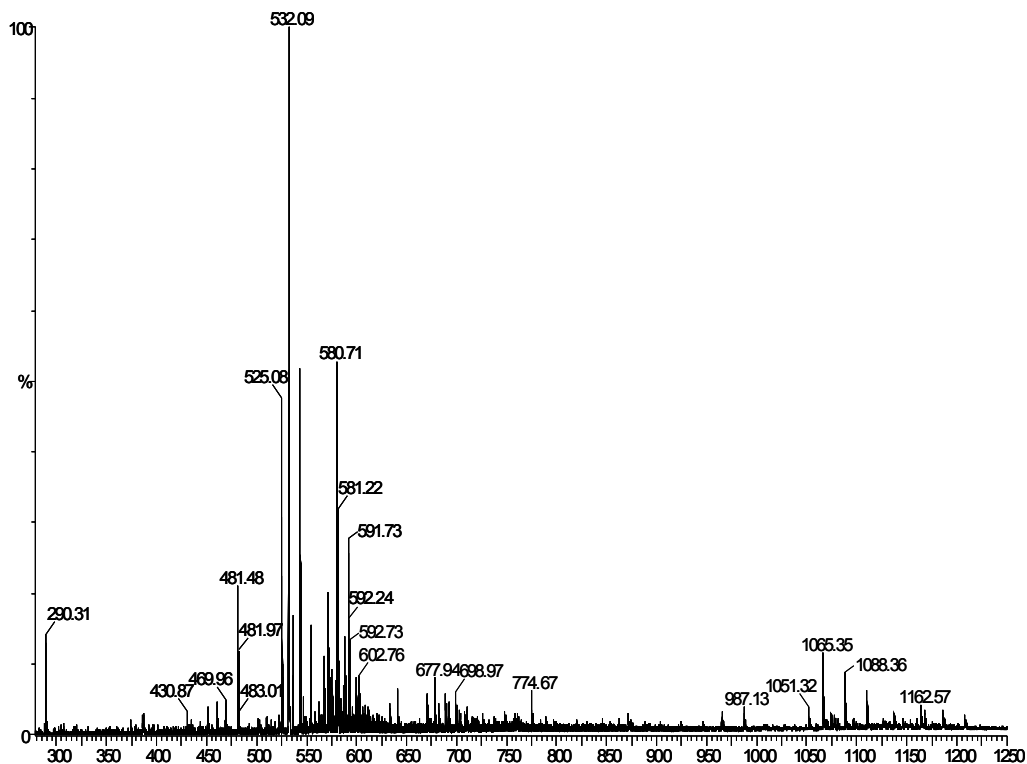


Figura 5.2.4 Analiza prin NanoMate QTOF MS a compoziției glicopeptidelor sialilate extrase din urina unui pacient suferind de boala lui *Schindler*. Solvent: MeOH 100%; timp acumulare semnal: 5 min (la 2.1 scan/s); potențial chip 0 V (chip conectat la pământ); tensiune contraelectrod 30 V. Temperatura desolvatare: 80 °C; gaz desolvatare azot la presiune 15 p.s.i; precizie medie în determinarea masei: 10 p.p.m; calibrare: NaI.

După dizolvarea în solventul corespunzător, proba a fost omogenizată cu ajutorul unui Vortex, câteva minute, și apoi supusă centrifugării (5000 rps) timp de 60 min. După centrifugare, supernatantul colectat a fost depus în orificiul plăcii de microtitrare a robotului NanoMate și injectată prin ESI, folosind modul ionilor negativi, în QTOF MS. Spectrul de masă obținut în condiții optimizate, prin achiziționarea semnalului timp de 5 min. Este prezentat în fig. 5.2.4, iar speciile identificate din acest spectru sunt înregistrate în tabelul 5.2.5.

Tabelul 5.2.5 Desemnarea ionilor detectați prin NanoMate QTOF MS în amestecul de glicopeptide și aminoacizi sialilați din urina pacientului suferind de boala lui Schindler

<i>m/z</i> pentru ionul [M-2H]²⁻	<i>m/z</i> pentru ionul [M-H]⁻	Structura identificată
nedetectat	290.31	NeuAc-H ₂ O
nedetectat	308.29	NeuAc
435.18	871.21	NeuAcGalGalNAc-Thr-Pro
nedetectat	468.45	GalGalNAc-Ser
nedetectat	469.96	NeuAcGal
481.48	964.22	NeuAc ₂ GalGalNAc
nedetectat	483.01	GalGalNAc-Thr
525.08	1051.32	NeuAc ₂ GalGalNAc-Ser
532.09	1065.35	NeuAc ₂ GalGalNAc-Thr
563.11	1128.77	NeuAcGal ₂ GlcNAcGalNAc-Ser
571.24	1144.39	NeuAcGal ₂ GlcNAcGalNAc-Thr
580.71	1162.57	NeuAc ₂ GalGalNAc-Thr-Pro
633.45	nedetectat	NeuAc ₂ GalGlcNAcGalNAc-Thr
642.32	nedetectat	FucNeuAcGal ₂ GlcNAcGalNAc-Ser
671.44	nedetectat	NeuAc ₃ GalGalNAc-Ser
677.94	nedetectat	NeuAc ₃ GalGalNAc-Thr
708.33	nedetectat	NeuAc ₂ Gal ₂ GlcNAcGalNAc-Ser
715.41	nedetectat	NeuAc ₂ Gal ₂ GlcNAcGalNAc-Thr
nedetectat	760.62	NeuAcGalGalNAc-Ser
nedetectat	774.67	NeuAcGalGalNAc-Thr
nedetectat	835.54	NeuAcGal ₂ GalNAc
852.67	nedetectat	NeuAc ₃ Gal ₂ GalNAcGalNAc-Thr
873.51	nedetectat	NeuAc ₂ Gal ₃ GlcNAc ₂ GalNAc-Ser-H ₂ O
890.48	nedetectat	NeuAc ₂ Gal ₃ GlcNAc ₂ GalNAc-Ser

Din analiza spectrului și a tabelului 5.2.5 se poate constata că, prin NanoMate QTOF MS, deși nu a fost implicată o tehnică de separare cuplată direct cu spectrometrul s-au putut ioniza, detecta și identifica un număr de 23 de glicoforme în amestecul investigat. Spectrul prezintă atât ioni dublu deprotonați cât și monodeprotonați, unele structuri fiind prezente în spectru prin ambele tipuri de ioni.

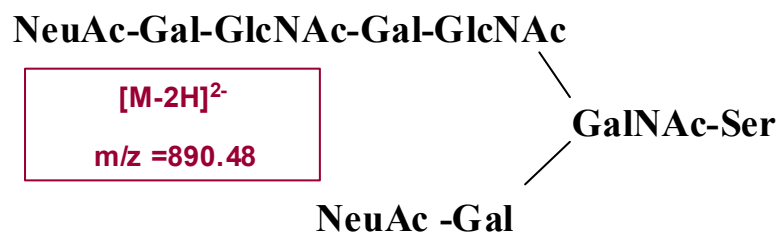


Figura 5.2.6. Structura moleculară a ionului dublu deprotonat detectat la m/z 890.48 în spectrul din fig. 5.2.4.

Prezența ionilor dublu deprotonați, în special a celor corespunzători lanțurilor lungi de zaharide, indică o ionizare foarte eficientă prin chip ESI, în solventul și la parametrii setați pe cele două instrumente.

Aceste măsurători de screening au relevat că în amestecul biologic sunt prezente O-glicopeptide, cu lanț peptidic scurt (Ser, Thr și Thr-Pro), dar și un lanț de carbohidrați de dimensiune variabilă. S-au identificat, glicopeptide conținând lanțuri de la 2 unități de zaharide (dizaharide precum GalGalNAc), până la 8 unități de monozaharide (ionul de la 890.48 a cărui structură este prezentată în fig. 5.2.6). Se mai poate remarca și identificarea unei structuri fucozilate, și anume hexazaharida de compoziție FucNeuAcGal₂GlcNAcGalNAc-Ser, precum și existența unei diversități a statutului de sialilare. Astfel, cu privire la acest din urmă aspect, se poate constata că în general glicopeptidele, din urina pacientului, sunt polisialilate întrucât, doar 8 specii sunt monosialilate în timp ce 12 specii sunt di- și trisialilate.

Spre deosebire de analizele raportate anterior prin CE MS, prezenta metodologie NanoMate QTOF a permis obținerea acestor informații compoziționale și structurale, printr-un experiment de numai 5 minute. Având în vedere debitul de 100 nL/min livrat de chipul NanoMate, pentru o concentrație de 3 pmol/ μ L infuzată 5 min, rezultă un consum de probă de numai 1.5 pmol pentru obținerea spectrului din fig.5.2.4. Această sensibilitate a analizei este de câteva zeci de ori mai mare decât în cazul experimentelor de CE MS raportate anterior și efectuate cu un amestec similar de glicopeptide. Cât privește reproductibilitatea experimentelor, spre deosebire atât de cuplajul CE MS cât și de infuzia prin nanocapilare, aceasta a fost de 100% în cazul experimentelor din aceeași zi și de 98% pentru experimentele efectuate de la o zi la alta. **Toate aceste rezultate, obținut pe un amestec biologic concret și deosebit de complex dovedesc superioritatea din toate punctele de vedere a sistemului NanoMate MS pentru analiza glicopeptidelor.**

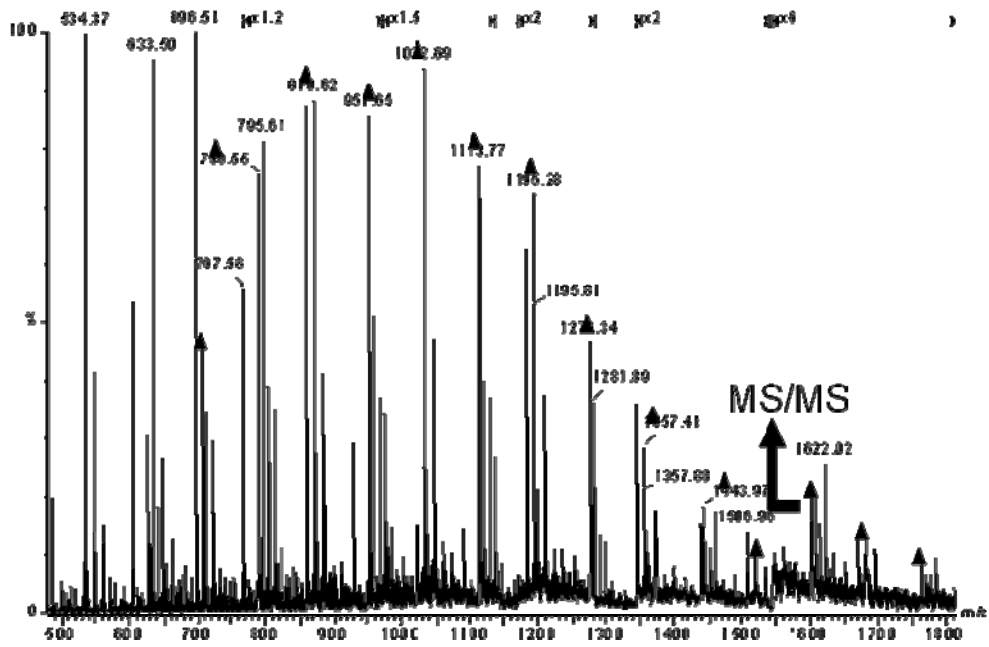
5.2.3. Analiza polizaharidelor funcționalizate

Carbohidrații reprezintă o anumită clasă de biopolimeri cu grad ridicat de complexitate structurală. Aceștia sunt compușii carbonilici polihidroxilici (aldehide și

cetone), clasificați în funcție de numărul de molecule monozaharidice, de care este legat numărul de unități monomere unite prin legături glicozidice ca: monozaharide, oligozaharide (se formează din două sau mai multe monozaharide, n monozaharide, prin eliminarea a $n-1$ molecule de apă) și polizaharide (polimeri în care n , numărul de monozaharide este foarte mare și relativ nedeterminat). Carbohidrații sunt prezenți, ca oligozaharide sau glicoconjugati, caz în care lanțul oligozaharidic este legat covalent la un aglicon. Cazul cel mai frecvent întâlnit fiind legarea la un alt biopolimer: o proteină și/sau o lipidă [105]. În forma naturală, carbohidrații sunt omniprezenți pe suprafețele membranelor celulare sau pe regiunile expuse de macromolecule și, ca urmare, sunt ideali pentru depozitarea unor semnale în formă biologică prin care sunt identificate alte sisteme biologice [106-107]. Polizaharidele sub formă de homopolimeri și heteropolimeri au un număr mare de unități de monozaharidă unite prin legături glicozidice. Diferite polizaharide naturale, permit modificarea chimică sau pot fi folosite ca blocuri pentru sinteza de materiale hibride [108]. În ultimul deceniu, modificarea chimică de suprafață, utilizând matrici nepolare polimere cu carbohidrați hidrofilici, a fost dezvoltată în sensul de a obține copolimeri bloc cu proprietăți amfilice, care permit reacții biochimice sau reacții biologice la suprafața polimerului. Blocurile de copolimeri sunt o categorie specială de polimeri, care aparțin unei familii de materiale, cunoscute și sub numele de materiale moi. Ele pot fi considerate ca fiind formate din două sau mai multe blocuri chimic omogene de polimer, unite prin legături covalente. Aceste tipuri de copolimeri pot fi sintetizate în mai multe moduri [109], cu toate acestea, una dintre cele mai cunoscute metode se bazează pe proprietatea de cuplare a unui bloc hidrofob funcționalizat la o jumătate de hidrofil. Această procedură poate fi aplicată cu succes pentru modificarea polizaharidelor la sfârșitul capătului reducător, așa cum a fost descris anterior [110].

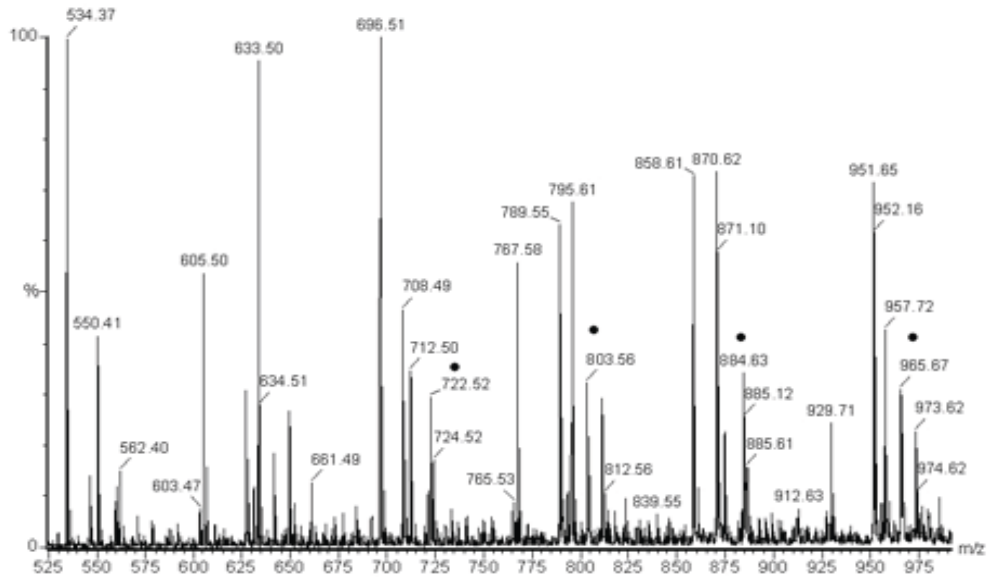
În studiul de față, un amestec de maltodextrină (polimer ce prezintă o distribuție de mase moleculare) de greutate moleculară medie 3000 a fost cuplată la 1,6-hexametilendiamina (HMD). Legarea elementului diamină la lanțul polizaharidic a fost realizată printr-o reacție de aminare reductivă. Produsele de cuplare au fost caracterizate prin sistemul de spectrometrie de masă de tip QTOF MS în cuplaj direct cu robotul NanoMate realizat așa cum este descris mai sus.

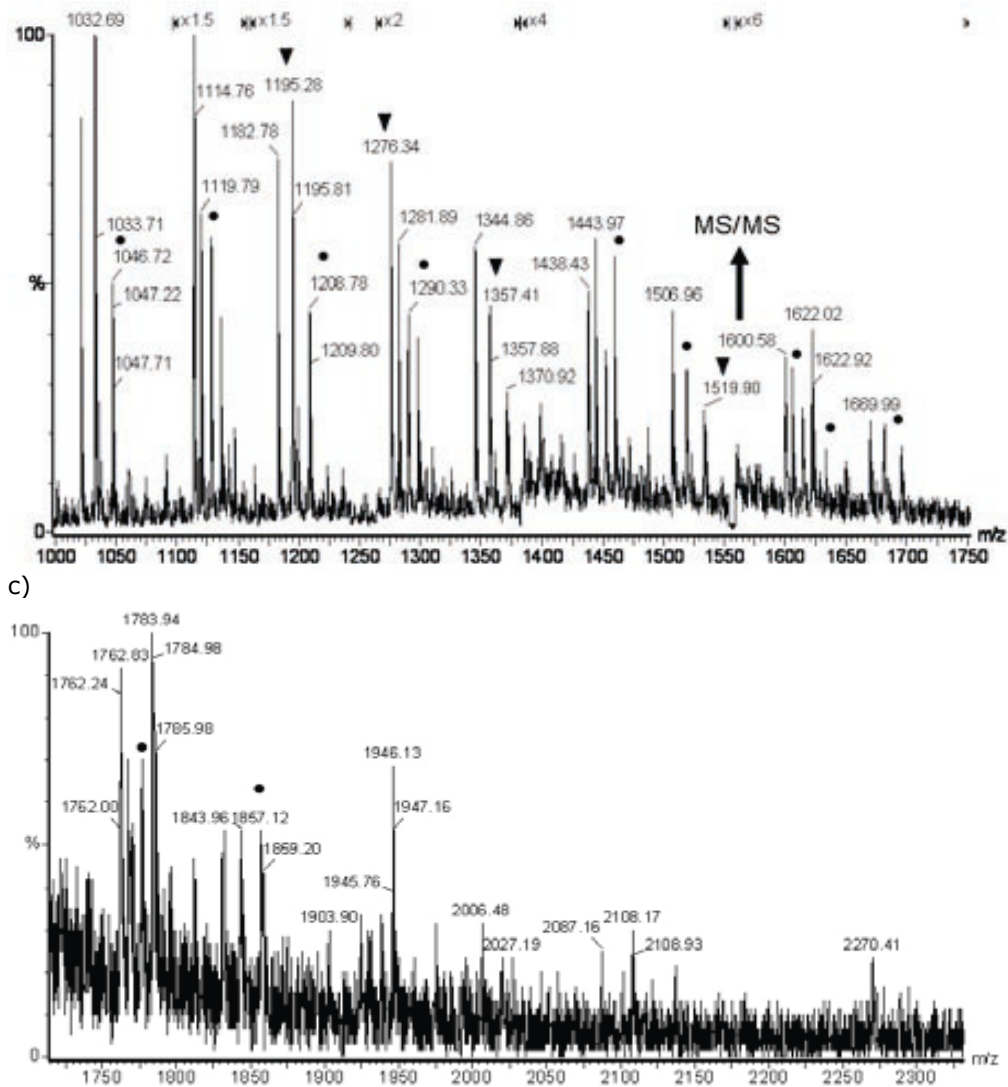
Scopul acestui studiu a fost acela de a optimiza cuplajul NanoMate-QTOF pentru screeningul și fragmentarea polizaharidelor funcționalizate. Prin reacția de aminare reductivă s-a creat o nouă legătură C-N într-un carbohidrat, care există în soluție, fie într-un hemiacetal ciclic sau sub formă de lanț-deschis de aldehide și un reziduu diamină (Fig. 5.2.7).



a)

b)





d)

Figura 5.2.7. Spectrul NanoMate QTOF MS al amestecului modificat de maltodextrină, în modul ionilor pozitivi. a) m/z (500 - 1800); b) m/z (525-975); c) m/z (1000-1750); d) m/z (1725-2300). Tensiunea capilar: 1.2 kV. Tensiune contraelectrod (sampling cone): 30 - 60 V. Achiziție: 850 scanări. ▼-serie Gl_nGHD ; • - pentru produsele care rezultă dintr-o reacție din partea Gl_nGHD *N*-formilare

Pentru a confirma formarea legăturii de HMD-maltodextrina și pentru a identifica produșii de cuplare probele au fost analizate prin cuplajul NanoMate-QTOF MS . Astfel 10 μ l de soluție de probă, dizolvată în MeOH/H₂O/HCOOH au fost injectate prin nanoESI MS. Pentru a genera o ionizare optimă a fiecărui component din amestec, tensiunea pe electrospray a fost stabilită la 1,2 kV, în timp ce potențialul conului a variat în intervalul 30 - 60 V.

Semnalul a fost achiziționat aproximativ 30 de minute, în acest interval fiind acumulate cca. 850 de scanări. Acest lucru este echivalent cu aproximativ 26.66 pmoli de material, folosit într-un singur experiment de screening MS. În figura 5.2.7. a) este prezentat spectrul obținut în cele 850 de scanări, folosind o tensiune variabilă a conului. Pentru a asigura vizibilitatea tuturor componentelor detectate, figurile 5.2.7. de la *b* la *d* prezintă zonele din cadrul seriilor *m/z* de la: 525-975 (Fig. 5.2.7.b); 1000 - 1750 (fig. 5.2.7.c); 1725 - 2300 (fig. 5.2.7. d). Identificarea componentelor importante detectate prin screening-ul MS cu nanoESI QTOF este prezentată în tabelul 5.2.8.

Tabel 5.2.8. Desemnarea ionilor detectați prin NanoMate-QTOF MS în proba de maltodextrină funcționalizată cu HMD

Nr. peak	<i>m/z</i>	Starea de încărcare	Structura propusă	Nr. peak	<i>m/z</i>	Starea de încărcare	Structura propusă
1	534.37	+ 1	GI ₃ (2Na)	52	1182.78	+ 1	GI ₇ (2Na)
2	550.41	+ 1	GI ₂ GHD -3H ₂ O	53	1195.28	+2	GI ₁₃ GHD
3	560.42	+ 2	GI ₅ GHD(CHO)	54	1198.78	+2	GI ₁₅ -2H ₂ O
4	574.43	+ 2	GI ₅ GHD(CHO) ₂	55	1208.78	+2	GI ₁₃ GHD(CHO)
5	605.50	+1	GI ₂ GHD	56	1217.63	+2	GI ₉ GHD(2Na)
6	627.44	+2	GI ₆ GHD	57	1222.81	+2	GI ₁₃ GHD(CHO) ₂
7	631.49	+2	GI ₈ -2H ₂ O	58	1253.78	+1	GI ₆ GHD
8	633.50	+1	GI ₂ GHD(CHO)	59	1276.34	+2	GI ₁₄ GHD
9	641.46	+2	GI ₆ GHD (CHO)	60	1279.83	+2	GI ₁₆ -2H ₂ O
10	650.01	+2	GI ₆ GHD(2Na)	61	1281.89	+1	GI ₆ GHD(CHO)
11	655.46	+2	GI ₆ GHD(CHO) ₂	62	1290.33	+2	GI ₁₄ GHD(CHO)
12	696.51	+1	GI ₄ (2Na)	63	1297.82	+1	GI ₈
13	708.49	+2	GI ₇ GHD	64	1302.79	+2	GI ₁₄ GHD(CHO) ₂
14	712.50	+2	GI ₉ -2H ₂ O	65	1344.86	+1	GI ₈ (2Na)
15	722.52	+2	GI ₇ GHD(CHO)	66	1357.88	+2	GI ₁₅ GHD
16	730.04	2+	GI ₇ GHD(2Na)	67	1360.92	+2	GI ₁₇ -2H ₂ O
17	736.51	+2	GI ₇ GHD(CHO) ₂	68	1370.92	+2	GI ₁₅ GHD(CHO)
18	767.58	+1	GI ₃ GHD	69	1384.94	+2	GI ₁₅ GHD(CHO) ₂
19	789.55	+2	GI ₈ GHD	70	1415.41	+1	GI ₇ GHD
20	793.06	+2	GI ₁₀ -2H ₂ O	71	1438.43	+2	GI ₁₆ GHD
21	795.61	+1	GI ₃ HMD(CHO)	72	1441.37	+2	GI ₁₈ -2H ₂ O
22	803.56	+2	GI ₈ GHD(CHO)	73	1443.97	+1	GI ₇ GHD(CHO)
23	812.09	+2	GI ₇ GHD(2Na)	74	1451.93	+2	GI ₁₆ GHD(CHO)
24	817.56	+2	GI ₈ GHD(CHO) ₂	75	1459.84	+1	GI ₉
25	858.61	+1	GI ₅ (2Na)	76	1465.87	+2	GI ₁₆ GHD(CHO) ₂
26	870.62	+2	GI ₉ GHD	77	1506.96	+1	GI ₉ (2Na)
27	874.61	+2	GI ₁₁ -2H ₂ O	78	1519.00	+2	GI ₁₇ GHD
28	884.63	+2	GI ₉ GHD(CHO)	79	1533.01	+2	GI ₁₇ GHD(CHO)
29	892.59	+2	GI ₇ GHD(2Na)	80	1600.58	+2	GI ₁₈ GHD
30	898.61	+2	GI ₉ GHD(CHO) ₂	81	1605.34	+1	GI ₈ GHD(CHO)
31	912.24	+3	GI ₁₅ GHD(Na)	82	1614.02	+2	GI ₁₈ GHD(CHO)

32	929.71	+1	GI ₄ GHD	83	1622.02	+1	GI ₁₀
33	951.65	+2	GI ₁₀ HMD	84	1669.99	+1	GI ₁₀ (2Na)
34	955.68	+2	GI ₁₂ -2H ₂ O	85	1684.78	+2	GI ₂₁ -2H ₂ O
35	957.72	+1	GI ₄ GHD(CHO)	86	1695.23	+2	GI ₁₉ GHD(CHO)
36	965.67	+2	GI ₁₀ GHD(CHO)	87	1739.11	+1	GI ₉ GHD
37	973.62	+2	GI ₈ GHD(2Na)	88	1762.83	+2	GI ₂₀ GHD
38	979.69	+2	GI ₁₀ GHD(CHO) ₂	89	1767.98	+1	GI ₉ GHD(CHO)
39	1020.7 0	+1	GI ₆ (2Na)	90	1775.50	+2	GI ₂₀ GHD(CHO)
40	1032.6 9	+2	GI ₁₁ GHD	91	1783.94	+1	GI ₁₁
41	1036.7 0	+2	GI ₁₃ -2H ₂ O	92	1830.00	+1	GI ₁₁ (2Na)
42	1046.7 2	+2	GI ₁₁ GHD(CHO)	93	1843.96	+2	GI ₂₁ GHD
43	1054.2 0	+2	GI ₉ GHD(2Na)	94	1846.19	+1	GI ₁₀ GHD - 3H ₂ O
44	1060.7 0	+2	GI ₁₁ GHD(CHO) ₂	95	1857.12	+2	GI ₂₁ GHD(CHO)
45	1091.7 8	+1	GI ₅ GHD	96	1929.19	+1	GI ₁₀ GHD(CHO)
46	1114.7 6	+2	GI ₁₂ GHD	97	1937.78	+2	GI ₂₂ GHD(CHO)
47	1117.2 3	+2	GI ₁₄ -2H ₂ O	98	1946.13	+1	GI ₁₂
48	1119.7 9	+1	GI ₅ GHD(CHO)	99	2004.16	+2	GI ₂₃ GHD
49	1127.7 6	+2	GI ₁₂ GHD(CHO)	100	2085.01	+2	GI ₂₄ GHD
50	1135.7 1	+1	GI ₇	101	2108.17	+2	Glc ₂₆
51	1141.7 5	+2	GI ₁₂ GHD(CHO) ₂	102	2269.96	+2	GI ₂₆ GHD(2Na)

Figura 5.2.7. a-d) arată că, spectrul este dominat de ioni care fac parte din seria majoră de maltodextrină modificată (GI_nGHD). Toți ioni desemnați în figură, împreună cu valorile lor aferente, m/z , astfel atribuite structurii lor, apar ca fiind ioni ai moleculelor de GI_nGHD, dublu încărcăți. Spectrul indică o dispersie de masă, centrată în intervalul masei moleculare 1580 – 3680, care indică și un grad de polimerizare (DP) de la 2 la 26. În cadrul acestei serii de m/z , apare un shift de 81 echivalent cu o jumătate din masa unității de glucoză care se repetă. Interesant, și la fel de vizibilă și în figura 5.2.7., seria majoră GI_nGHD (marcat de ▼) este însoțită de trei grupuri de ioni suplimentari, toți conectați la seria majoră și care acoperă aceleași valori m/z ca și gama de GI_nGHD. Primele două grupuri formează o „rețea” de ioni dublu încărcăți distanțați fie prin m/z 14 (28 Da) sau 28 (56 Da), care pot fi atribuiți la compuşii care rezultă dintr-o reacție secundară de N-formilare a unui produs Glc_nGHD cu dimetilformamidă (DMF) în timpul sintezei (reacție secundară, Fig. 5.2.9).

Cel mai probabil, acest proces apare prin adăugarea unui grup formil la secvența de amino-terminal, care induce creșterea masei efective din 28 Da (14 m/z modificat, marcat de ● în Fig 5.2.7. b-d). Compoziția moleculară care provine din măsurarea masei exacte este în concordanță cu compoziția teoretică a produselor secundare de

N-formil. A treia serie constă în câțiva ioni, simpli încărcăți, de mică intensitate ce corespund derivatului di- N-formil (figura. 5.2.7., tabelul 5.2.8).

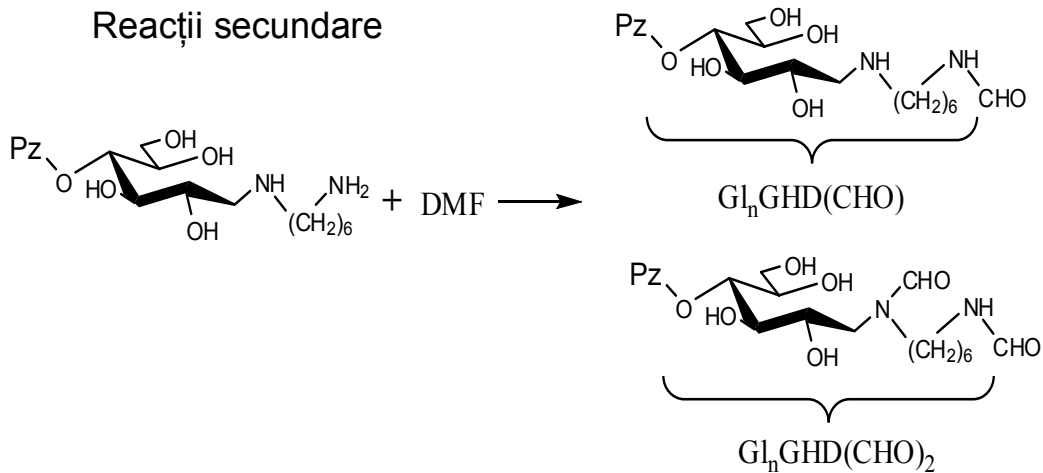
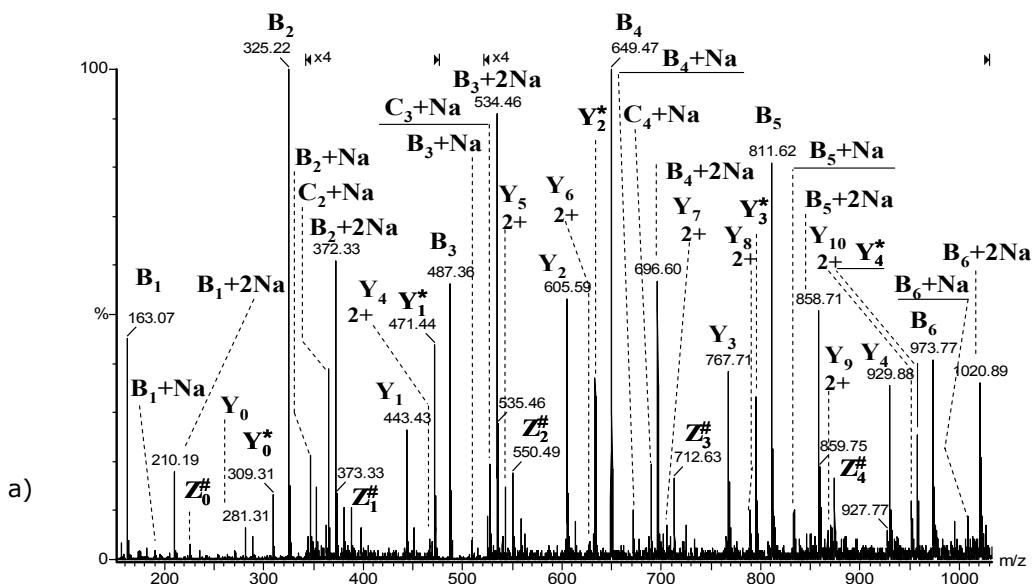
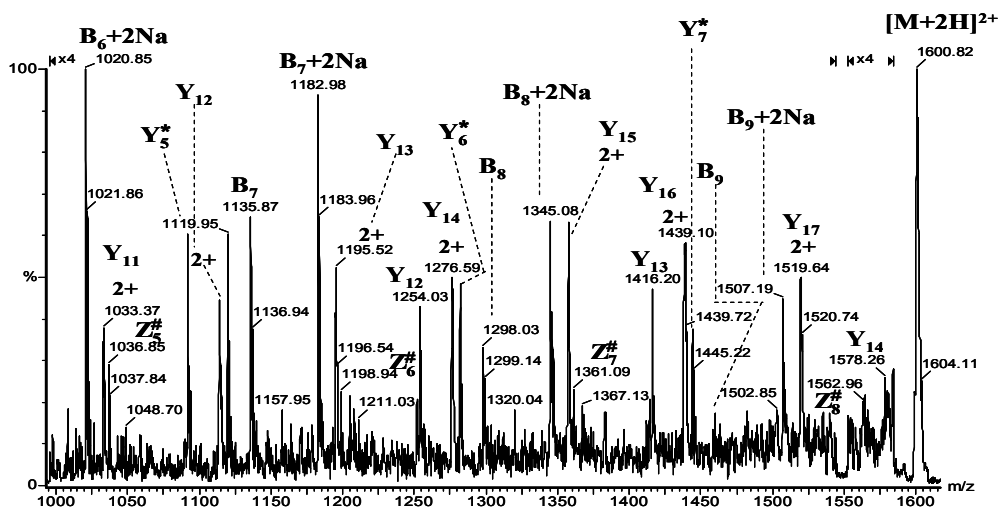


Fig. 5.2.9. Reacții secundare în sinteza GI_nGHD prin aminare reductivă

În scopul de a furniza dovezi concludente pentru formarea legăturii dintre linker-ul HMD și lanțurile polizaharidice, ionul dublu protonat, atribuit (conform cu calculul masei la m/z 1600.82) lui GI_{18}GHD a fost supus fragmentării printr-un experiment CID MS/MS. Spectrul obținut după 15 min., corespunde la aproximativ 430 scanări, obținute prin acumularea de semnal în regim de energii variabile de ciocnire [26-30] și este prezentat în figura 5.2.10. a, b.





b)

Fig. 5.2.10. NanoMate-QTOF MS/MS a ionului dublu încărcat la m/z 1600.82 detectat în proba de maltodextrină HMD-modificată. **a)** m/z (150-1020); **b)** m/z (1000-1600). Potențial electropray: 1.2kV. Potențialul conului: 50 V. CID la energii de ciocnire variabile (E_{lab}) între 40-70 eV. Presiune argon (P_{lab}): 10-15 p.s.i. ($Z^\# = Z - 2H_2O$; $Y^* = Y + 2Na - H_2O$). Nomenclatura ionilor fragment este în conformitate cu [95].

Analizând spectrul din figura 5.2.10 se poate observa faptul că, în condiții optime de fragmentare, semnalele înregistrate se atribuie unui set complet de ioni de tip Y detectat fie ca ioni mono-protonați de mare intensitate (Y_0 la Y_{14}), disodiați simpli încărcăți, dehidratați (Y_0^* la Y_7^*) sau dublu-protonați (Y_4 la Y_{17}). Spectrul, prezintă de asemenea, semnale corespunzătoare fragmentelor de ioni de tip B, cum sunt monoprotoneții și monoprotoneții seriei disodiate B_1 - B_9 , trei fragmente de ioni de tip-C monosodiați (C_2 , C_3 , C_4) și simplii încărcăți cu pierdere de H_2O și doi ioni de mică intensitate de tip Z ($Z_0^\#$ la $Z_8^\#$). Fragmentarea ionilor obținută prin CID MS/MS și spectrul corespunzător ionilor astfel generați constituie dovezi care arată că $Gl_{18}GHD$ prezintă o legătură HMD-polizaharidă.

În seria de experimente prezentate aici, am căutat să dezvoltăm un protocol sigur și fiabil, de modificare a unor maltodextrine liniare cărora le-am atașat la un capăt o grupare amino (prin reacție de aminare reductivă) având ca scop caracterizarea produselor de cuplare utilizând cuplajul NanoMate-ESI Q-TOF MS și CID MS/MS. Elucidarea compoziției amestecului obținut, precum și determinarea în detaliu a structurii componentelor individuale a fost făcută utilizând tehnica ionilor pozitivi cu ajutorul tandemului nanoESI Q-TOF, prin CID la energii joase de coliziune.

Măsurarea exactă a masei moleculare, realizată prin screening-ul de masă nanoESI, a indicat formarea de specii de maltodextrina derivatizate cu grupări amino, având grade de polimerizare diferite ce variaza între 2-26. În ultima etapă a analizei prin MS, optimizând condițiile de MS/MS a fost indusă o fragmentare eficientă a ionului $[M+2H]^{2+}$ ion ce corespunde componentei $Gl_{18}GHD$.

În spectrele de fragmentare obținute, am putut identifica secvențele ionilor diagnostic pentru structura unui lanț linear de HMD-legată, care conține 18 resturi de

Glc și deci susținerea conceptului de formare a legăturilor GI-HMD. Acest studiu are o importanță deosebită pentru obținerea produșilor de reacție și a aplicațiilor pe care metoda dezvoltată, le presupune. Astfel polizaharidele HMD-legate pot fi utilizate în producerea de copolimeri di-bloc și pentru funcționalizarea peptidelor și proteinelor în vederea creșterii gradului lor de solubilitate. Mai mult decât atât, am demonstrat că, randamentul de ionizare prin electrospray este mai mare în cazul polizaharidelor modificate printr-o diamină atașată capătului reducător. De asemenea metoda descrisă aici, poate fi considerată un model în ceea ce privește derivatizarea carbohidraților cu lanțuri lungi, care nu prezintă grupuri ușor ionizabile și care în stare naturală nu pot fi investigate prin spectrometria de masă.

Cap.VI Cercetări asupra realizării unui cuplaj între un sistem complet automat de injectare automată prin chip-electrospray și un spectrometru de masă de tip capcană ionică de mare capacitate

6.1 Experimente de cuplaj ale robotului NanoMate cu injectare automată și ionizare prin chip electrospray cu spectrometrul de masă cu capcană ionică de mare capacitate HCT MS

În cele ce urmează, vom arăta cum un instrument HCT a fost pentru prima dată interfațat cu un robot NanoMate, pentru a crea un sistem care combină injectarea ESI, automată, bazată pe chip de siliciu, cu screeningul ultra-rapid și fragmentarea în stagii multiple, la sensibilitate superioară.

Robotul NanoMate a fost cuplat la un spectrometru de masă HCT Ultra printr-un sistem de cuplare efectuat în laborator (figura 6.1.1). Pentru interfața NanoMate, sursa convențională de electrospray pentru ioni, de la Bruker, a fost detașată și toate setările instrumentului HCT, inclusiv conexiunile electrice au fost readaptate pentru funcționarea în regim ESI decuplat de spectrometrul de masă al sistemului NanoMate. Având în vedere configurația de tip „benchtop”, de fixare pe masă de laborator a spectrometrului HCT, care este mult mai facilă pentru cuplaje de orice tip, robotul a fost fixat pe masa de lucru, pe trei axe O-xyz reglabile care permit ajustarea grosieră a poziției sale față de spectrometrul HCT MS. Reglarea fină a chipului, în dreptul orificiului de intrare al HCT MS, se realizează și în acest caz prin intermediul programul ChipSoft al robotului. Ulterior cuplării mecanice, robotul a fost conectat la conducta de aprovizionare cu azot, a nebulizatorului HCT MS, care îi asigură presiunea de azot necesară injectării probei. Poziția chipului de electrospray a fost ajustată, corespunzător contraelectrodului HCT pentru a se asigura un transfer optim al speciilor ionice în spectrometrul de masă.

Într-o placă NanoMate, prevăzută cu 96 de orificii, au fost încărcate eșantioane de 10 μ l soluție de lucru. Robotul a fost programat să aspire întreg volumul de probă, urmat de aspirarea a 2 μ L de aer în vârful pipetei și apoi injectarea probei pe partea Inlet a unui microcip cu 400 de orificii. Aspirația aerului a fost necesară pentru a preveni scurgerea de proba în timpul parcursului pipetei de la godeu spre chip. Întreg ansamblu cuplat NanoMate HCT MS a fost reglat și optimizat atât pentru lucru în sistemul de operare în modul ionilor negativi, cât și pentru ionizarea și detectarea ionilor pozitivi, atunci când se operează în modul ionilor pozitivi. În funcție de tipul probei analizate și de tipul ionilor detectați, electrospray-ul a fost inițiat prin aplicarea unei tensiuni de 0.60-0.80 kV pe vârful de pipetă, și o presiune de azot de 0.50-0.70 psi. În scopul de a preveni eventualele fragmentări în sursă HCT, tensiunea de ieșire pe capilar a fost stabilită la -(40-50) V. Sursa bloc, a fost menținută la temperatura constantă de 200°C, lucru ce a permis o desolvatare optimă a picăturilor generate, suprimându-se în acest fel gazul de desolvatare care poate contribui la o reducere a sensibilității analizei. După injectarea probei de analizat și analiza MS, vârful de pipetă a fost schimbat automat, iar pentru fiecare eșantion s-a utilizat un nou vârf și un nou orificiu. În acest fel, s-a

împiedicat orice contaminare de la o proba la alta, încrucișată sau aleatoare. Fiecare orificiu de pe chip are un diametru intern de 2.5 μm , ceea ce a permis și în condițiile date, un flux de lucru de aproximativ 50nL/min.

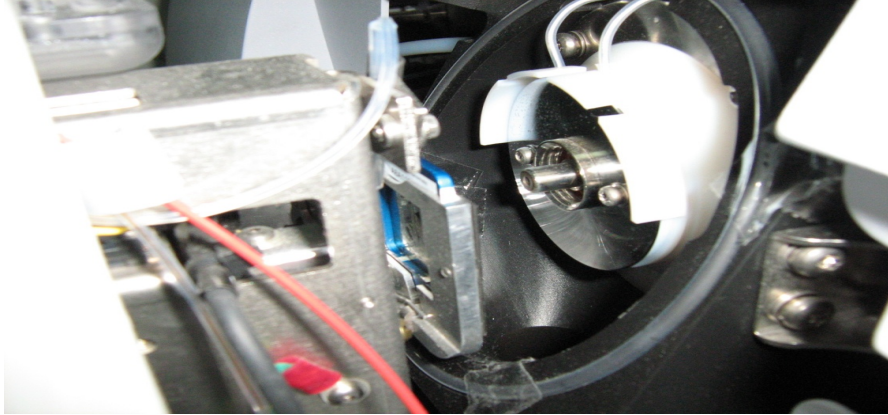
6.2. Studiu de fezabilitate a metodei nanoESI chip HCT MS și optimizarea acesteia.

Primul cuplaj dintre robotul NanoMate și spectrometrul de masă de tip HCT MS a fost testat și optimizat pentru a funcționa în regimul de screening și fragmentare în modul ionilor pozitivi și negativi pentru principalele clase de biomolecule: peptide, proteine și hidrați de carbon. La aceștia din urmă s-au analizat atât mono și polizaharidele ca atare, cât și derivații glicoconjugați de tip glicopeptidă și glicolipidă.

a)



b)



c)



Fig. 6.1.1 Cuplajul chip-spectrometru de masă a) vedere a întregului ansamblu; b) contactul robot-spectrometru de masă cu chip-ul de siliciu conectat; c) infuzia probei prin chip în spectrometrul de masă

6.2.1. Analiza peptidelor

Dipeptide

Testarea fezabilității sistemului a debutat cu molecule simple de dipeptide de compoziție: Leu-Ala și Val-Ala. S-a urmărit găsirea parametrilor instrumentali optimi, precum: tensiunea de ionizare, potențialul contraelectrodului, presiunea gazului de injectare a probei, dar și ai parametrilor care descriu soluția, cum sunt: concentrația probei, natura solventului, pH-ul care să determine o ionizare cât mai eficientă și o reducere a posibilelor fragmentari în sursă. Întrucât este binecunoscut

faptul că peptidele și aminoacizii se ionizează eficient prin formarea de cationi, fie prin protonare, fie prin aducție de cationi ai metalelor alcaline (Na, K) experimentele s-au efectuat în modul ionilor pozitivi.

În figura 6.2.1. este prezentat spectrul de screening MS prin NanoMate HCT MS al Leu-Ala în modul de ionizare și detectare a ionilor pozitivi. Spectrul prezentat a fost obținut la o concentrație a probei de 1 pmol/ μ L într-o soluție de H₂O/HCOOH 50/50 (v/v). Adăosul de acid formic a fost necesar pentru a asigura cationizarea prin protonare.

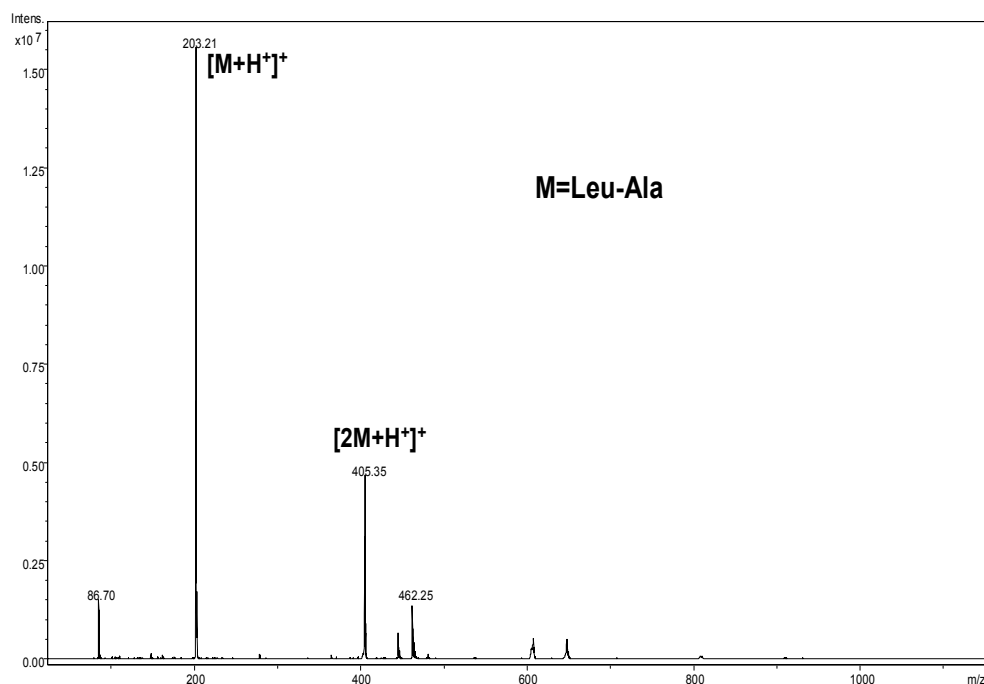


Fig. 6.2.1. Spectrul NanoMate HCT MS, în modul ionilor pozitivi, al dipetidei Leu-Ala. Condiții experimentale: solvent H₂O/HCOOH 50/50 (v/v); concentrația probei de 1 pmol/ μ L; potențial ESI 1.40 kV; tensiune capilar: 50 V; presiunea gazului de infuzie: 0.30 psi; timp de achiziție: 1 min.

Analizând spectrul din figura 6.2.1 se poate observa că, semnalul cel mai intens (intensitate deosebit de mare de 1.6×10^7 counts/sec) corespunde ionului simplu încărcat de la m/z 203.21, aferent moleculei monoprotonate Leu-Ala. Pe lângă acest ion abundent, spectrul prezintă și un semnal relativ intens la m/z 405.35. Acest semnal, corespunde dimerului monoprotonat al Leu-Ala. Surprinzător, la o concentrație a probei în soluție de numai 1 pmol/ μ L spectrul a prezentat și dimerul

Leu-Ala. Aceasta observație indică faptul că, **pentru analiza peptidelor sistemul NanoMate HCT prezintă o sensibilitate de câteva ori mai mare decât sistemul de introducere clasică a probei prin capilar, fie el în regim micro-sau nano-ESI.** În cazul acestor tehnici de ionizare la o concentrație de 1 pmol/ μL , proba nu a putut fi detectată fiind necesară o concentrație de cel puțin 10 pmol/ μL pentru a se obține un semnal cu o intensitate suficient de mare cât să permita izolarea ionului și fragmentarea sa ulterioară, prin CID MS².

În vederea testării posibilității de a realiza analiza structurală, prin fragmentarea ionului, utilizând disocierile induse prin ciocnire, ionul corespunzător monomerului Leu-Ala, detectat la 203.21, a fost izolat. Pentru aceasta s-a aplicat o tensiune de izolare într-o fereastră de 2u, în capcana ionică, și apoi a fost supus disocierii prin coliziune (CID MS²), folosind heliu drept gaz de ciocnire.

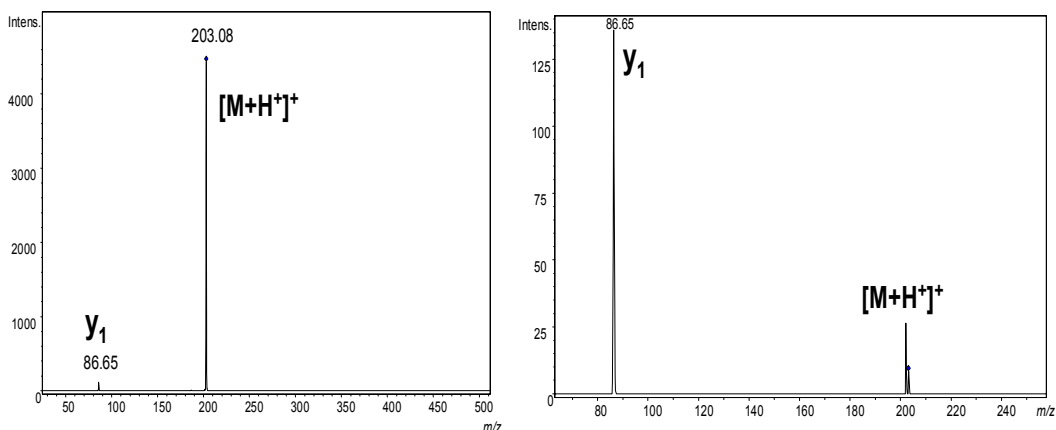


Fig. 6.2.2 Spectrul NanoMate HCT CID MS², în modul ionilor pozitivi, al dipeptidei Leu-Ala. Condiții experimentale: solvent H₂O/HCOOH 50/50 (v/v); concentrația probei de 1 pmol/ μL ; potențial ESI 1.40 kV; tensiune capilar: 50 V; presiunea gazului de infuzie: 0.30 psi; timp de achiziție: 1 min. Fragmentare la amplitudinea semnalului de RF de a) 0.3 V; b) 0.6 V. Nomenclatura ionilor fragment este în conformitate cu [94]

Aplicând un semnal de radiofrecvență cu amplitudine de 0.3 V, ionul a fost excitat la o energie de ciocnire corespunzătoare și a disociat în fragmentele ionice observabile în spectrul din figura 6.2.2. a)

Din această figură se observă că, la amplitudinea de 0.3 V a semnalului de RF aplicat s-a obținut un semnal de intensitate foarte mică aferent fragmentului y₁ (Ala), în timp ce semnalul corespunzător ionului precursor izolat, a păstrat o intensitate mult mai mare. Acest aspect denotă faptul că, majoritatea ionilor precursori nu s-au fragmentat la energia de activare provenită prin semnalul de RF. În consecință, a fost necesară optimizarea parametrilor de fragmentare în scopul inducerii unei disocieri eficiente.

Prin mărirea la 0.6 V, a amplitudinii semnalului de RF, s-a obținut spectrul din figura 6.2.2. b). Se poate remarca o creștere semnificativă a abundenței ionului fragment de tip y₁ (Ala) și o reducere a intensității ionului precursor rămas nedisociat.

Metoda optimizată pentru dipeptida Leu-Ala a fost aplicată la o altă dipeptidă, și anume Val-Ala. Spectrul de screening MS, prin NanoMate HCT MS, al dipeptidei Val-Ala, în tehnica de ionizare și detectare a ionilor pozitivi, este prezentat în figura 6.2.3.

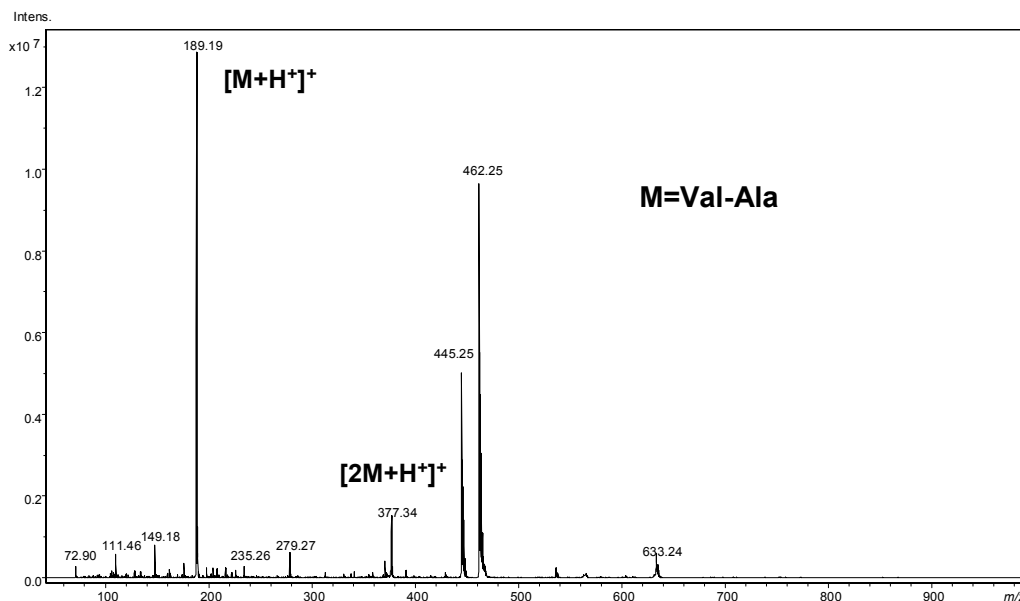


Fig. 6.2.3. Spectrul NanoMate HCT MS, în modul ionilor pozitivi, al dipeptidei Val-Ala. Condiții experimentale: solvent $H_2O/HCOOH$ 50/50 (v/v); concentrația probei de 1 pmol/ μL ; potențial ESI 1.40 kV; tensiune capilar: 50 V; presiunea gazului: 0.30 psi; timp de achiziție: 1 min.

Fragmentarea prin CID MS^2 a ionului precursor Val-Ala monoprotonat, la m/z 189.19, achiziționată în condiții identice celor aplicate pentru Leu-Ala, este prezentată în figura 6.2.4. a și b.

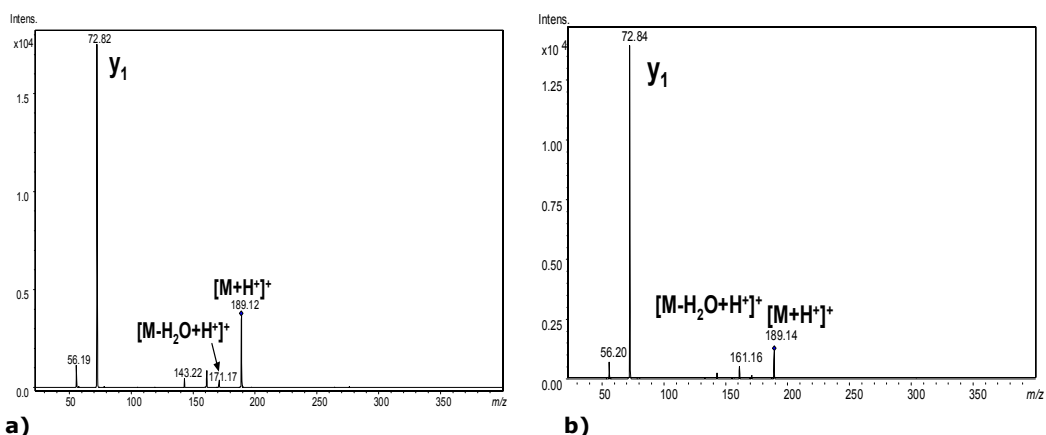


Fig. 6.2.4. Spectrul NanoMate HCT CID MS^2 , în modul ionilor pozitivi, al dipeptidei Val-Ala. Condiții experimentale: solvent $H_2O/HCOOH$ 50/50 (v/v); concentrația probei de 1 pmol/ μL ; potențial ESI 1.40 kV; tensiune capilar: 50 V; presiunea gazului: 0.30 psi; timp de achiziție: 1 min. Fragmentare la amplitudinea semnalului de RF de: a) 0.3 V; b) 0.6 V. Nomenclatura ionilor fragment este în conformitate cu [94]

Tripeptide

Având în vedere rezultatele promițătoare, obținute cu noua tehnică spectrometrică de masă formată din robotul NanoMate în primul său cuplaj, cu un spectrometru de tip capcană ionică de mare capacitate HCT MS, cercetările au fost extinse asupra unor peptide mai complexe formate din lanțuri cu un număr mai mare de aminoacizi. Astfel următoarele experimente au vizat ionizarea și detectarea prin NanoMate HCT MS a unei tripeptide conținând trei unități de leucină. Aplicând metodologia dezvoltată și descrisă mai sus proba Leu-Leu-Leu dizolvată într-o soluție de H₂O/HCOOH 50/50 (v/v) la o concentrație a probei de 1 pmol/μL a fost injectată automat prin NanoMate în spectrometrul HCT MS. Spectrul de screening electrospray în tehnica de ionizare și detecție a ionilor pozitivi este prezentat în figura 6.2.5.

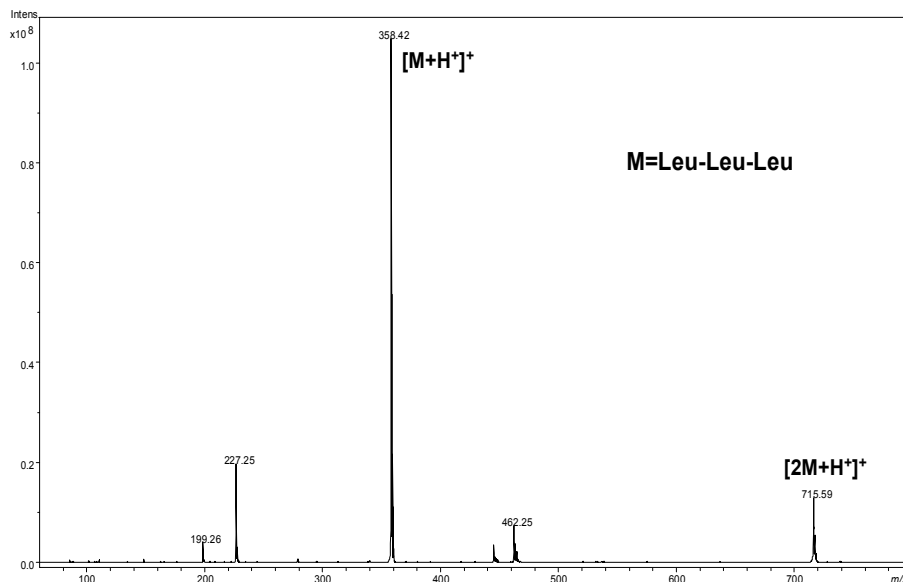


Fig. 6.2.5. Spectrul NanoMate HCT MS, în modul ionilor pozitivi, al tripeptidei Leu-Leu-Leu. Condiții experimentale: solvent H₂O/HCOOH 50/50 (v/v); concentrația probei de 1 pmol/μL; potențial ESI 1.40 kV; tensiune capilar: 50 V; presiunea gazului : 0.30 psi; timp de achiziție: 1 min.

Din acest spectru se observă o ionizare foarte eficientă și a unei peptide mai lungi, cu detectarea la m/z 358.42 a ionului molecular, Leu-Leu-Leu rezultat prin monoprotonearea moleculei. Ionul corespunzător Leu-Leu-Leu, a putut fi evidențiat printr-un semnal deosebit de intens de 10⁸ counts/sec deși concentrația probei a fost și în acest caz de numai 1 pmol/μL. Mai mult, această concentrație, deși foarte scăzută a generat formarea și detectarea dimerului monoprotonat care se observă în spectrul din figura 6.2.5., ca ion de abundență înaltă (10⁷ counts/sec). În concluzie, sensibilitatea analizei s-a păstrat la fel de ridicată și pentru peptidele mai mari.

Polipeptide

Testarea cuplajului NanoMate HCT MS pentru peptide cu un număr ridicat de aminoacizi s-a realizat pe proba numită, Substance P. Aceasta polipeptidă este de fapt o

neuropeptidă ce conține 11 aminoacizi așa cum este prezentat în fig. 6.2.6. Substance P funcționează ca un neurotransmițător și neuromodulator [111]. Este eliberată din terminalele specifice ale nervilor senzoriali și se găsește în creier și în coloana vertebrală, fiind asociată cu procese inflamatorii și cu senzația de durere [112]. În spectrometria de masă, în special pentru testarea noilor dispozitive atât de ionizare/injectare prin ESI, cât și a celor de detecție sau fragmentare a ionilor precursori, precum și pentru validarea diferitelor noi metodologii, Substance P este utilizată cu precădere drept standard (respectiv model de validare, datorită structurii sale, disponibilității comerciale în stare de puritate ridicată și a proprietăților sale de ionizare și fragmentare).

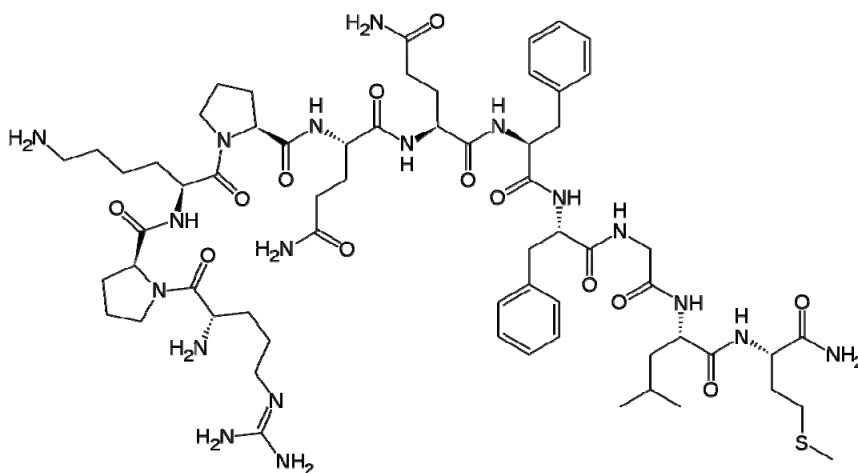


Fig. 6.2.6. Structura moleculei de Substance P [112]

Cele mai multe studii [113-114] ce raportează noi dezvoltări tehnico-metodologice în domeniul spectrometriei de masă cu ionizare prin electrospray, a tehnicilor de separare și fragmentare conjugate cu ESI demonstrează viabilitatea metodei utilizând în primul rând această polipeptidă.

Din acest motiv, un eșantion de pudră liofilizată de Substance P, disponibil comercial, a fost cântărit și dizolvat în solventul H₂O/HCOOH 50/50 (v/v) la o concentrație a probei de 1 pmol/μL, calculată pentru masa moleculară a Substance P de 1347.63 g/mol. Pentru a asigura dizolvarea completă, soluția a fost omogenizată prin amestecare folosind un aparat Vortex, timp de câteva minute. Apoi din aceasta, s-au extras 30 μL de soluție, care a fost supusă centrifugării timp de 20 de minute, la 5000 rpm. După centrifugare supernatantul a fost colectat și apoi pipetat în rezervorul de tip duza, a plăcii de microtitrare, a robotului NanoMate. Centrifugarea a fost necesară în scopul eliminării particulelor insolubile existente în standardul comercial de Substance P.

Robotul a fost programat să aspire 10 μL din soluția de analiză și să injecteze acest volum, prin chip electrospray, în HCT MS. Semnalul de ESI a fost inițiat și menținut constant, prin aplicarea unui potențial ESI de 1.40 kV, o tensiune de ieșire aplicată capilarului de 50 V și o presiune a gazului de injectare de 0.30 psi. Acest semnal a fost achiziționat 1 minut. Spectrul generat prin însumarea scanărilor achiziționate în acest interval de timp este prezentat în fig. 6.2.7. Se poate observa că, în aceste condiții s-a putut obține un raport semnal/zgomot excelent și o intensitate foarte mare a picului de bază de peste 2×10^7 counts/sec. Picul de bază din spectrul

prezentat în figura 6.2.7, corespunde unui semnal de la m/z 674.55. Distribuția izotopică (diferența de m/z 0.5 dintre izotopi) indică faptul că, ionul respectiv este dublu încărcat. În conformitate cu calculul masei, rezultă că acest ion reprezintă molecula dublu protonată $[M+2H]^2+$ a Substance P. În spectrul din figura 6.2.7, în afara picului de bază ce corespunde Substance P dublu protonată, se mai poate observa și ionul dublu încărcat de la m/z 696.40. Din calculul masei, efectuat pentru acest ion, s-a obținut că acesta reprezintă ionul dublu sodiat $[M+2Na]^2+$ al moleculei de Substance P. De asemenea la m/z 1347.80 se poate observa un ion simplu încărcat mai puțin abundent, care conform masei moleculare, corespunde ionului monoprotonat $[M+H]^+$ al Substance P. Ceilalți ioni de mică intensitate vizibili în spectrul din figura 6.2.7 nu au putut fi atribuiți, cel mai probabil, ei reprezentând impurități la nivel de urmă, ezistente în eșantionul comercial și pe care sistemul NanoMate HCT MS, datorită sensibilității deosebit de ridicate le-a ionizat și detectat, chiar dacă se aflau într-o cantitate infimă în proba.

Măsurătorile de screening al Substance P prin NanoMate HCT MS demonstrează și în acest caz, că sistemul funcționează excelent pentru peptidele lungi, că manifestă aceeași sensibilitate de excepție, de nivel picomolar ca și pentru peptidele cu un număr mic de aminoacizi. Mai mult, sistemul a permis o ionizare deosebit de eficientă a acestei polipeptide, cu formare de ioni dublu încărcăți, ceea ce reprezintă o condiție fundamentală pentru fragmentarea moleculei prin ETD. Se mai observă faptul că, aceste condiții de ionizare prin chip, ce presupun tensiuni de ionizare mult mai scăzute decât în cazul procesului de electrospray prin micro și nano capilare, au favorizat ionizarea moleculei intacte de Substance P. Spectrul din figura 6.2.7 nu prezintă picuri corespunzătoare unor fragmente nespecifice și necontrolate în sursa ESI, așa cum se întâmplă și este des raportat în cazul analizei peptidelor mai lungi, prin MS bazat pe electrospray clasic prin micro și nano capilare.

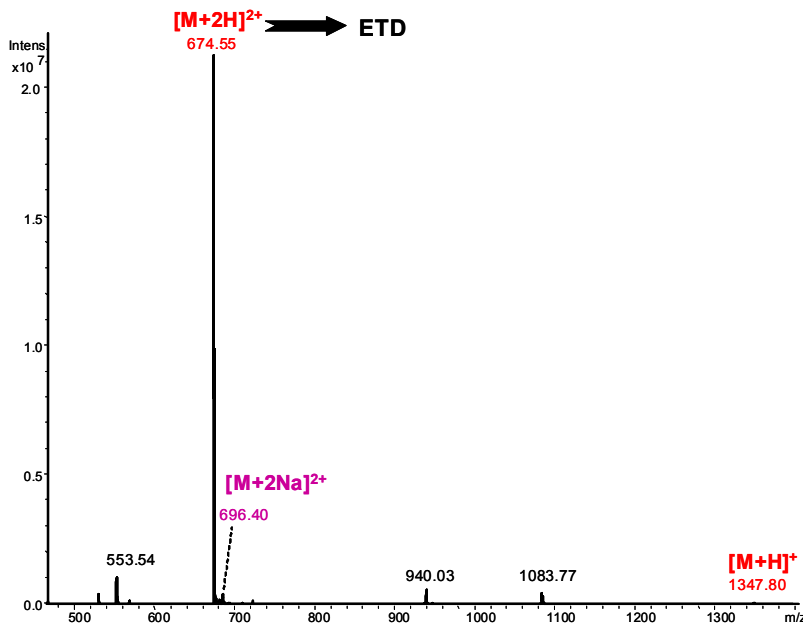


Fig. 6.2.7. Spectrul NanoMate HCT MS, în modul ionilor pozitivi, al Substance P. Condiții experimentale: solvent H₂O/HCOOH 50/50 (v/v); concentrația probei de 1 pmol/μL; potențial ESI 1.40 kV; tensiune capilar: 50 V; presiunea gazului: 0.30 psi; timp de achiziție: 1 min. M=molecula de Substance P

Aceste avantaje deosebite, unice chiar, ale ionizării prin chip cu ajutorul robotului NanoMate au oferit premiza aplicării tehnicii de fragmentare prin ETD pentru analiza structurală a acestei polipeptide. Așa cum se știe, fragmentarea prin ETD necesită formarea ionilor multiplu încărcăți (cel puțin dublu încărcat) precum și existența unui semnal constant pe timp îndelungat, de mare intensitate a ionului precursor, intact (fără fragmentări necontrolate în sursă).

Aceste condiții, au făcut procesul dificil, dacă nu chiar imposibil de îndeplinit prin ESI bazat pe capilar și au făcut ca tehnica ETD să stagneze, din perspectiva aplicațiilor sale, în analiza unor biomolecule mai complexe. De aceea, întrucât cuplajul NanoMate HCT MS reușește să îndeplinească aceste premize ale aplicării ETD, în acest stadiu al cercetării, **s-a încercat pentru prima dată fragmentarea unei polipeptide prin ETD având ca sistem de introducere a probei, robotul NanoMate.** În acest scop, Substance P a fost livrată prin NanoMate HCT MS în condițiile descrise mai sus, iar ionul dublu încărcat detectat la m/z 674.55 a fost izolat într-o fereastră de 2u și supus interacțiunii cu reactantul ETD, care în acest caz a fost fluorantena.

După un timp de reacție de 50 ms s-a obținut spectrul de fragmentare ETD MS² prezentat în figura 6.2.8. Din calculul maselor fragmentelor rezultate s-a observat că **disocierea prin ETD a fost deosebit de eficientă.** Deși polipeptida conține o secvență de 11 aminoacizi s-au generat aproape toți ionii fragment de tip c și z (schema 6.2.9) conform mecanismului binecunoscut de disociere prin ETD, și totodată s-au observat scindări multiple și formarea, cum era de așteptat, a radicalului cation $[M+2H^+]^{+\bullet}$. Acest din urmă mecanism rezultă prin transferul unui electron de la reactantul fluorantena, fără disocierea peptidei, dar cu reducerea de către electron a uneia dintre sarcinile electrice pozitive create de unul dintre protoni. **Acest spectru ETD, deosebit de informativ din punct de vedere structural, demonstrează că prin combinația NanoMate HCT MS, tehnica de disociere prin ETD are clare perspective de aplicabilitate în cazul polipeptidelor, în special a celor cu modificări postranlaționale (glicozilare, fosforilare).**

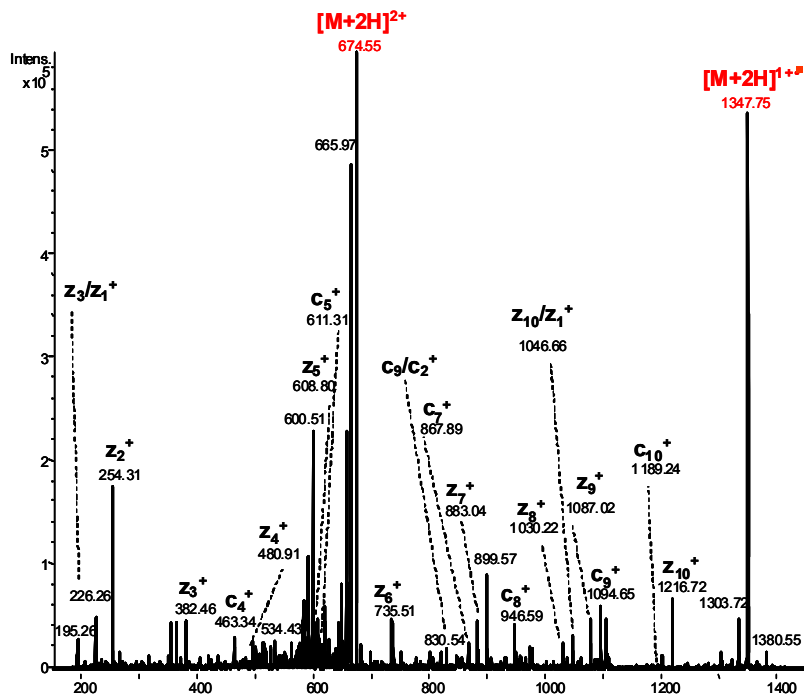
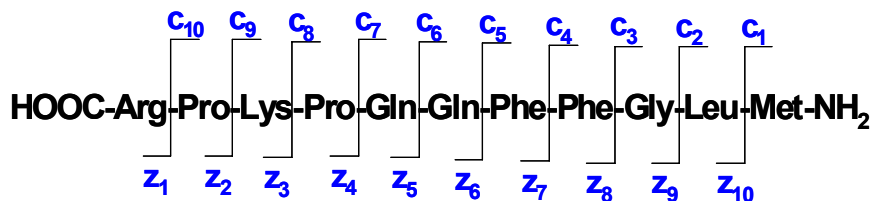


Fig. 6.2.8 Spectrul NanoMate HCT ETD MS² al Substance P, ion precursor: [M+2H]²⁺ detectat în spectrul MS la m/z 674.55. Condiții experimentale: solvent H₂O/HCOOH 50/50 (v/v); concentrația probei de 1 pmol/μL; potențial ESI 1.40 kV; capillary exit: 50 V; presiunea gazului: 0.30 psi; timp de achiziție: 1 min; fereastra de izolare 2 u; reactant: fluorantena; timp de reacție 50 ms. M=molecula de Substance P. Nomenclatura ionilor fragment este în conformitate cu [94]

Pentru acestea din urmă, prin NanoMate HCT MS și disociere ETD va fi posibilă identificarea poziției de modificare (de atașare a zaharidei sau de fosforilare). Acest aspect va fi în viitor foarte util întrucât prin celelalte tehnici de fragmentare (precum CID) pozițiile de modificare nu pot fi stabilite din cauza mecanismului de disociere ce determină fragmentarea cu precădere a grupării atașate de peptidă prin legătura mult mai labilă decât cea amidică.

Schema 6.2.9 Secvența de aminoacizi din constituția Substance P determinată prin experimentul ETD MS²



6.2.2. Analiza peptidelor modificate

Cuplajul NanoMate HCT MS a fost testat în combinație cu tehnica de disociere prin transfer de electroni, ETD, pentru identificarea peptidelor modificate. În acest sens a fost supus analizei un eșantion de peptidă sintetică modificată cu daunorubicina (Dau-GnRH III). Aceasta peptidă modificată [115], a fost obținută de la Laboratorul de chimie analitică și analiza biopolimerilor, al Universității din Konstanz, prin amabilitatea domnei dr. Marilena Manea.

Proba, sub forma de pulbere liofilizată, a fost dizolvată în sistemul de solvent $H_2O/HCOOH$ 50/50 (v/v), la o concentrație a probei de 1 pmol/ μL . Un eșantion de 25 μL de soluție a fost supus centrifugării, la 5000 rpm, timp de 50 de minute. După centrifugare a fost extras supernatantul, care a fost apoi pipetat în orificiul plăcii de microtitrare a robotului NanoMate.

Robotul a fost programat să aspire 5 μL din soluția eșantion, urmat de 2 μL aer (pentru a preveni picurarea probei) și lăsat să-i livreze sub formă de electrospray de prin chip, apoi în HCT MS. Spectrul de masă astfel obținut este prezentat în figura 6.2.10. În paralel, în scopul unei analize comparative, proba a fost măsurată folosind injectarea clasică, prin seringă-pompă. Spectrul rezultat este inserat, tot în figura amintită, pentru a facilita o observare comparativă mai precisă.

Din analiza celor două spectre se poate observa că, spre deosebire de injectia clasică, introducerea probei prin chip, a facilitat formarea unui ion triplu protonat. Această ionizare deosebit de eficientă, prin chip, face ca tehnica sa fie mult mai potrivită pentru fragmentarea indusă prin transfer de electroni, pentru care este necesară o stare de încărcare multiplă a ionului precursor.

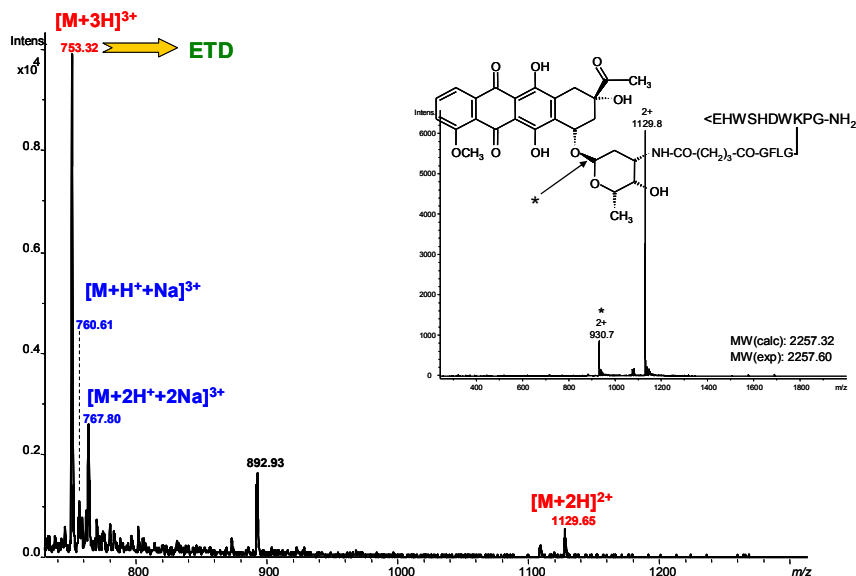


Fig.6.2.10 Spectrul NanoMate HCT MS, în modul ionilor pozitivi, al bioconjugatului Dau-GnRH III. Inserare: spectrul Dau-GnRH III comparativ, obținut prin injectare clasică, folosind seringă-pompă. Condiții experimentale: solvent $H_2O/HCOOH$ 50/50 (v/v); concentrația probei de 1 pmol/ μL ; potențial ESI 1.30 kV; tensiune capilar: 40 V; presiunea gazului: 0.40 psi; timp de achiziție: 30 s. M=molecula Dau-GnRH III.

Mai mult, se remarcă faptul că prin injectarea clasică, din cauza potențialului ridicat necesar ionizării și a câmpului intens, dintre vârful de electrospray și

contraelectrodul HCT, fragmentarea în sursă nu poate fi evitată. Astfel, în spectrul obținut prin injectare clasică, se observă ruperea în sursă a legăturii, marcate cu asterisc în figură.

O asemenea fragmentare nespecifică și necontrolată are consecințe defavorabile asupra intensității ionului precursor intact. Scăderea acestei intensități cauzează și reducerea drastică a semnalului în spectrul ETD. Din aceste motive rezultă că, extinderea aplicabilității ETD pentru astfel de molecule complexe necesită obligatoriu interfațarea spectrometrului de masă cu tehnica bazată pe chip, care să asigure încărcarea multiplă a moleculei și să prevină fragmentarea în sursă.

Ionul triplu protonat detectat în spectrul de screening la m/z 753.32 a fost izolat într-o fereastră de 2 u și supus fragmentării prin ETD, utilizând și în acest caz fluorantena ca agent de reacție. Spectrul ETD este prezentat în figura 6.2.11.

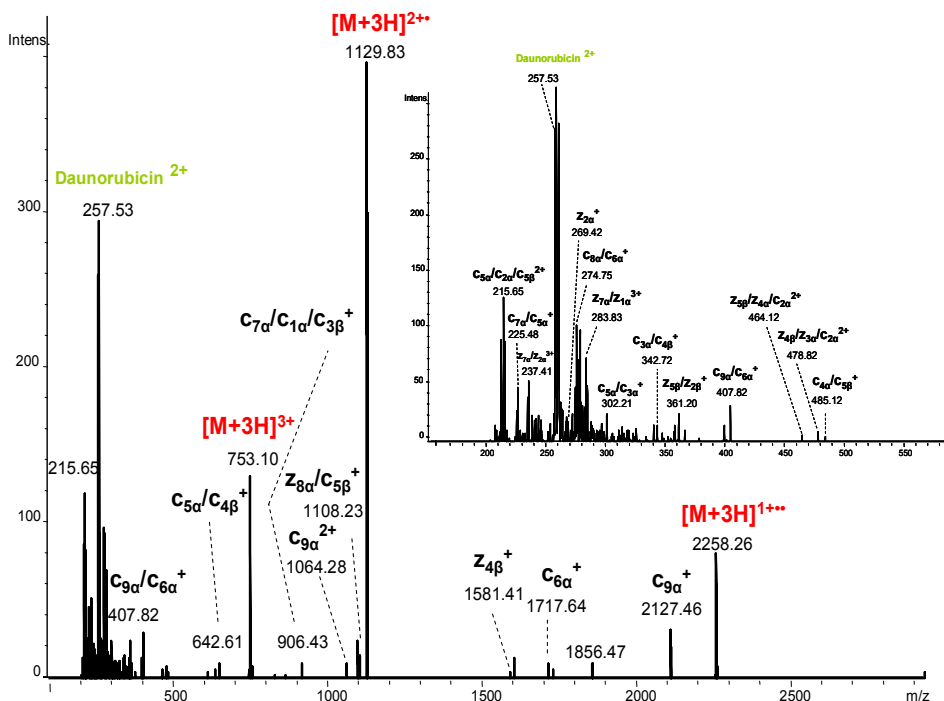
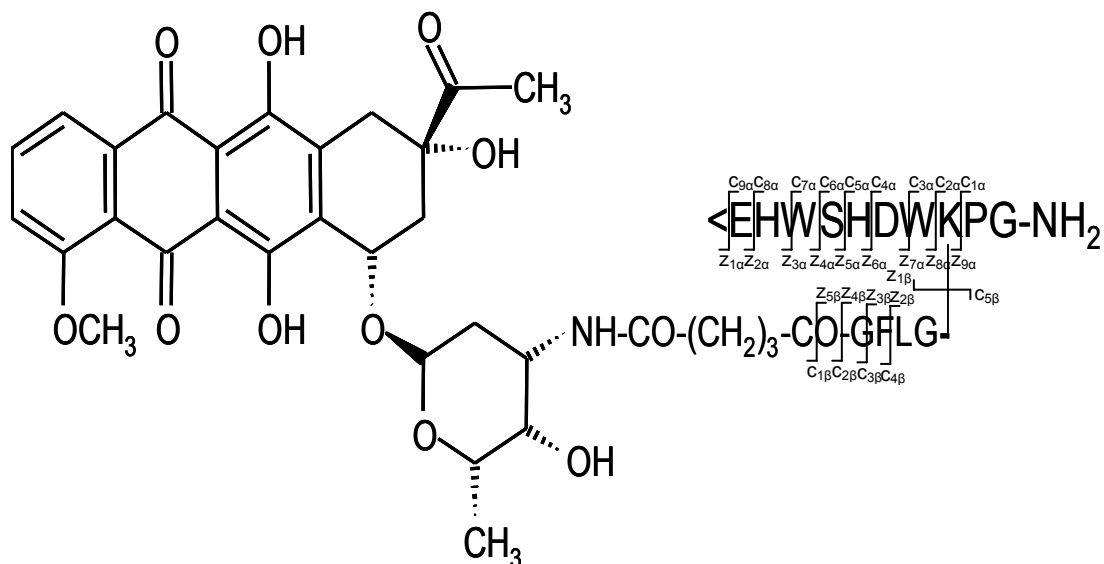


Fig. 6.2.11. Spectrul NanoMate HCT ETD MS^2 al Dau-GnRH III, ion precursor: $[M+3H]^{3+}$ detectat în spectrul MS la m/z 753.32. Condiții experimentale: solvent $H_2O/HCOOH$ 50/50 (v/v); concentrația probei de 1 pmol/ μL ; potențial ESI 1.30 kV; tensiune capilar: 40 V; presiunea gazului: 0.40 psi; timp de achiziție: 30 s; fereastră de izolare 2 u; reactant: fluorantena; timp de reacție 50 ms. M=molecula de Dau-GnRH III. Nomenclatura ionilor fragment este în conformitate cu [94]

Din analiza spectrului ETD rezultă că, a avut loc o fragmentare deosebit de eficientă, cu formarea unui mare număr de ioni fragment de tip c și z, specifici clivării legăturii N- C_{α} , care apare prin ETD (schema 6.2.12). Se mai remarcă, formarea atât a radicalului cation dublu încărcat, cât și a radicalului simplu încărcat.

Schema 6.2.12 Fragmentarea prin ETD a bioconjugatului Dau-GnRH III



6.2.3. Analiza proteinelor

Cuplajul NanoMate a fost în continuare testat și optimizat, pentru analiza prin screening și fragmentare, pentru proteine. Pentru a verifica abilitatea sistemului cuplat de a ioniza și detecta proteine, s-a utilizat o probă standard de apomioglobină. Această proteină de masă moleculară teoretică 16.950.5 g/mol este foarte des utilizată în spectrometria de masă, fie ca și calibrant, fie ca standard respectiv etalon pentru testarea tehnicilor și metodologiilor inovatoare din spectrometria de masă.

Pentru efectuarea experimentelor asupra proteinei apomioglobină, proba care se obține de la producător sub forma liofilizată, a fost cântărită și dizolvată în solutul H₂O/HCOOH 50/50 (v/v) pentru a se obține o soluție de concentrație 5 pmol/μL, calculată pentru masa moleculară 16.950.5 g/mol. Proba, un eșantion de 20 μL, a fost supus centrifugării, la 5000 rpm, timp de 30 de minute. După centrifugare a fost extras supernatantul care a fost apoi pipetat în duza plăcii de microtitrare a robotului NanoMate. Centrifugarea este necesară în scopul eliminării particulelor insolubile existente în standardul comercial de apomioglobina. Experimentele efectuate pe soluții necentrifugate nu au permis obținerea semnalului de ESI, iar inspecția la microscop a chipului a indicat faptul că, orificiul pulverizator a fost blocat de particulele insolubile din probă.

Robotul a fost programat să aspire 5 μL din soluția eșantion, pe care să-i livreze prin chip în electrospray și de acolo, în HCT MS. Pentru un potențial ESI de 1.52 kV, o tensiune de ieșire pe capilar de 50 V și o presiune a gazului de injectare de 0.50

psi, s-a obținut spectrul din figura 6.2.13. Se poate observa că, spectrul prezintă un raport semnal/zgomot excelent și are aspectul tipic spectrelor ESI ale proteinelor, cu o distribuție gaussiană a picurilor aferente diferitelor stări de încărcare ale moleculei de apomioglobina. Condițiile optimizate aplicate au indus ionizarea eficientă a moleculei și obținerea a 8 picuri corespunzătoare următorilor ioni moleculari derivați din protonarea multiplă a moleculei de apomioglobina: $[M+21H^+]^{21+}$, $[M+20H^+]^{20+}$, $[M+19H^+]^{19+}$, $[M+18H^+]^{18+}$, $[M+17H^+]^{17+}$, $[M+16H^+]^{16+}$, $[M+15H^+]^{15+}$ și $[M+14H^+]^{14+}$. Determinarea stărilor de încărcare (notate în figura 6.2.13.) din rapoartele m/z , ce corespund aceleiași mase m , precum și deducerea din valorile m/z și din stările de încărcare a masei moleculare a proteinei, s-a realizat cu ajutorul programului de deconvoluție din softul Data Analysis al spectrometrului HCT MS. Din spectrul obținut, prin deconvoluție, programul a calculat o masă experimentală determinată de 16949.25 Da. Aceasta valoare experimentală situează acuratețea în determinarea masei la o valoare de sub 15 ppm, ceea ce reprezintă o precizie deosebit de bună pentru un instrument de tip capcană ionică.

Experimentele efectuate în condiții de tensiuni mai ridicate au demonstrat o deplasare a distribuției gaussiene înspre rapoarte m/z mai mari care reflectă o stare de încărcare mai mică determinată de câmpul electric intens ce induce desorbția ionilor cu stare de încărcare mică de pe picătura pulverizată. Invers, tensiunile mai scăzute au arătat deplasarea distribuției înspre rapoarte m/z mai mici adică stări de încărcare din ce în ce mai ridicate. Aceste observații sunt în concordanță cu fenomenele raportate anterior [116] în cazul ionizării prin electrospray cu injecție prin vârf metalic sau nanocapilar. În spectrul din figura 6.2.13, ce reflectă starea ridicată de încărcare și deci o ionizare eficientă, valorile de 1.52 kV pentru potențialul ESI și 50 V pentru tensiunea de ieșire a capilarului, reprezintă valorile minime pentru care s-a mai putut obține semnal ESI. În comparație cu ionizarea clasică prin micro- sau nano- injecție bazată pe vârf metalic sau capilar, așa cum era de așteptat, ionizarea prin chip este mult mai eficientă, fapt reflectat prin stările de încărcare înaltă ale proteinei. Acest aspect este benefic în cazul moleculelor de masă mare cum sunt proteinele întrucât, în măsurătorile prin spectrometrie de masă este de dorit o stare de încărcare cât mai ridicată a proteinelor care conduce la semnale de m/z mici, în domeniul de mase al instrumentului utilizat. În plus, în cazul tuturor spectrometrelor de masă chiar și al celor de mare rezoluție, cu cât raportul m/z este mai mare, cu atât rezoluția și precizia în determinarea masei sunt mai mici. Prin urmare, sistemul NanoMate are capacitatea de a ioniza mult mai eficient, la stări de încărcare ridicate de asemenea, este mult mai avantajos pentru analiza biomoleculelor mari cum sunt proteinele, iar sensibilitatea analizei s-a dovedit mult superioară.

Având în vedere că spectrul din figura 6.2.13., a rezultat prin achiziționarea scanurilor timp de numai 1 minut, la o concentrație a probei de numai 5 pmol/ μ L și un debit de 100 nL/min cantitatea de probă consumată în acest experiment a fost de 0.5 pmol. Acest consum de probă pentru un spectru prin electrospray al unei proteine este printre cele mai reduse raportate în literatura până în prezent. Sensibilitatea analizei este o consecință atât a eficienței ionizării oferite de chip care nu necesită achiziționări de semnal îndelungate cât și a debitului de infuzie de 4-5 ori mai scăzut decât cel raportat pentru procesul de nanoelectrospray prin capilar.

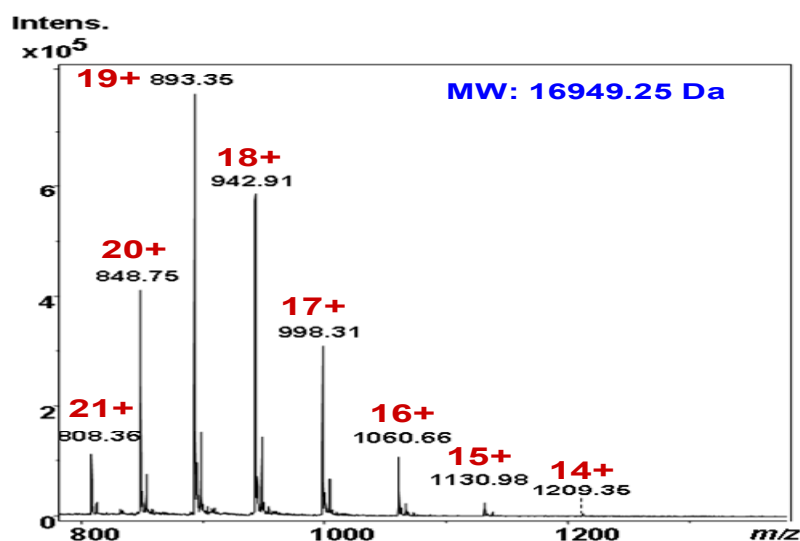


Fig. 6.2.13. Spectrul NanoMate HCT MS în positive ion mode al apomioglobinei. Condiții experimentale: solvent: H₂O/HCOOH 50/50 (v/v); concentrația 5 pmol/μL; potențial ESI 1.52 kV; tensiune capilar: 50 V; presiunea gazului: 0.50 psi; timp de achiziție: 1 min

Analiza structurii primare a proteinelor, ce presupune determinarea aminoacizilor din compoziția lanțurilor peptidice și respectiv stabilirea cu exactitate a secvenței acestora se poate realiza prin două procedee. Primul procedeu cunoscut sub numele *shotgun proteomics* sau *bottom-up* (de jos în sus) [117] presupune următoarele etape:

- i) digestia proteinei în urma căreia rezultă amestecul de peptide
 - ii) purificarea amestecului de peptide
 - iii) infuzia amestecului prin cromatografie lichidă cuplată cu spectrometrie de masă în vederea separării componentelor și detectării lor prin electrospray
 - iv) izolarea în capcana ionică a ionului precursor corespunzător fiecărei peptide
 - v) disocierea indusă prin ciocnire a fiecărui ion precursor de peptidă în vederea fragmentării acestuia și identificării fragmentelor de aminoacizi
 - vi) în anumite cazuri de peptide cu lanțuri lungi este necesară disocierea în stadii multiple (CID MSⁿ) până la identificarea fiecărui aminoacid din compoziția peptidei
- Deci, proteina se identifică de „jos în sus” prin peptidele rezultate în urma digestiei care sunt la rândul lor fragmentate prin tandem MS. Deși eficientă, metoda *shotgun proteomics* sau *bottom-up* prezintă dezavantajul de a fi relativ laborioasă și de a cuprinde etape de pregătire a probei care sunt atât consumatoare de timp, cât și de probă. Etapele de digestie și mai ales cele de purificare necesită cantități relativ mari de probă și induc pierderi ale acesteia. Din acest motiv, în ultimii ani s-a dezvoltat procedeul ultra eficient de analiză structurală a proteinelor prin spectrometrie de masă numit *top-down* („sus în jos”)[118-120]. Această metodă a putut fi implementată odată cu introducerea tehnicilor de disociere bazate pe captură electronică (ECD, *electron capture dissociation*) [118-120] și transfer de electroni (ETD) [121-124]. Prin aceste tehnici este posibil ca ionul multiplu încărcat al proteinei, detectat prin screening MS, să fie izolat și fragmentat direct în tandem MS fără a mai fi nevoie de digestionarea proteinei, separarea prin LC-MS și fragmentarea peptidelor rezultate din digestie. În urma procesului de fragmentare, prin tehnica ECD sau ETD, proteina intactă generează peptidele componente din

masele cărora se determină compoziția proteinei, în termeni de aminoacizi și secvența acestora. În acest fel identificarea are loc de „sus în jos” adică, prin fragmentarea, în tandem MS, a proteinei intacte.

Întrucât instrumentul HCT MS cu care s-a realizat cuplajul robotului NanoMate a dispus de facilitatea ultramodernă de *top-down proteomics* prin kitul ETD pe care îl are încorporat, analiza structurii primare a apomioglobinei s-a realizat prin ETD MS², în **prima încercare de a realiza un experiment top-down prin ETD cu introducerea probei prin chip**. În vederea realizării acestui experiment ionul corespunzător apomioglobinei detectat ca multiplu protonat $[M+19H^+]^{19+}$ la m/z 893.35 a fost izolat într-o fereastră de izolare de 4 u și supus interacțiunii cu reactantul care în acest caz a fost fluorantena. Spectrul de fragmentare rezultat este prezentat în figura 6.2.14. Se poate observa că, ionul $[M+19H^+]^{19+}$ a fost complet disociat rezultând un spectru de fragmentare deosebit de complex, ce conține semnalele aferente ionilor peptidelor disociate, purtând diferite stări de încărcare. Interpretarea spectrului a fost asistată de software-ul MASCOT (www.matrixscience.com), care permite identificarea proteinelor pe baza spectrelor de masă MS și tandem MS. Acest software larg utilizat de comunitatea științifică internațională, implicată în analiza proteinelor prin spectrometrie de masă, are trei module de căutare: Peptide Mass Fingerprint, Sequence Query, și MS/MS Ion Search.

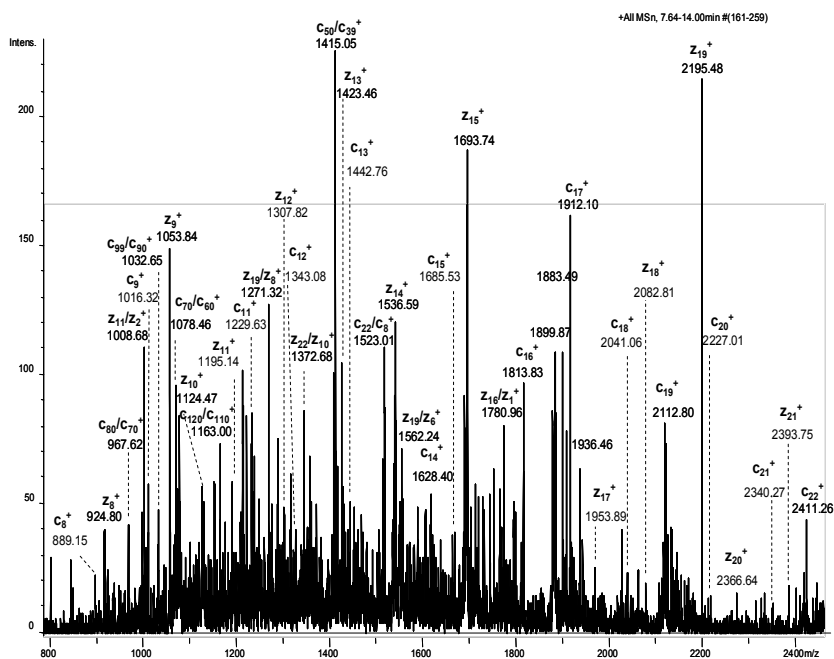


Fig. 6.2.14. Spectrul NanoMate HCT ETD MS² al apomioglobinei, ion precursor: $[M+19H^+]^{19+}$ detectat în spectrul MS la m/z 893.35. Condiții experimentale: solvent H₂O/HCOOH 50/50 (v/v); concentrația probei de 5 pmol/μL; potențial ESI 1.52 kV; capillary exit: 50 V; presiunea gazului: 0.50 psi; timp de achiziție: 5 min; fereastra de izolare 4 u; reactant: fluorantena; timp de reacție 100 ms. Nomenclatura ionilor fragment este în conformitate cu [94]

Ultimul modul, folosit în această teză pentru interpretarea spectrului prezentat în figura 6.2.14., identifică secvențele peptidice și constituția acestora (aminoacizii componenți și secvența lor) din valorile de m/z înregistrate în spectrele de tandem

MS. Aceste valori obținute prin spectrul amintit au fost introduse în modulul MS/MS Ion Search al programului MASCOT, iar programul a furnizat secvențele prezentate în schema 6.2.15. Datele astfel obținute identifică apomioglobina ceea ce demonstrează că spectrul ETD a conținut suficienți ioni diagnostic pentru identificarea proteinei.

Combinăția NanoMate HCT s-a dovedit în acest caz o condiție fundamentală pentru identificarea apomioglobinei prin procedeul *top-down*. Dincolo de sensibilitatea și viteza de analiză remarcabile, două elemente esențiale au contribuit la obținerea unor rezultate viabile prin ETD în acest caz. Primul element se referă **la stabilitatea semnalului de electrospray furnizată de infuzia prin chip.**

În cazul fragmentării prin ETD este necesar un semnal constant, fără întreruperi și fără diminuări ale intensității, timp relativ îndelungat. Acest deziderat a putut fi îndeplinit numai prin ionizarea cu chip electrospray. Cel de al doilea element este legat de **starea de încărcare în modul ionilor pozitivi a ionului precursor.** În cazul ETD, cu cât starea de protonare (cationizare) este mai înaltă, cu atât disocierea prin transfer de electroni este mai eficientă.

Schema 6.2.15. Secvența de aminoacizi din constituția apomioglobinei determinată prin experimentul top-down ETD MS²

GLSDGEWQQV LNVWGKVEAD IAGHGQEVLI RLFTGHPETL EKFDKFKHLK

TEAEMKASED LKKHGTVVLT ALGGILKKKG HHEAELKPLA QSHATKHKIP

IKYLEFISDA IIHVLHSHKHP GDFGADAQGA MTKALELFRN DIAAKYKELGFQO

Așa cum am arătat mai sus, **ionizarea prin chip a putut oferi stări de încărcare mult mai înalte decât ionizarea clasică prin vârf metalic sau nanocapilar.** Ionul multiplu protonat $[M+19H^{+}]^{19+}$, detectat la m/z 893.35, ales ca precursor pentru fragmentare a prezentat avantaje din ambele puncte de vedere: a avut o stare de încărcare înaltă și, în același timp, o intensitate ridicată de 7.7×10^5 counts/sec fiind cel mai abundent din seria de ioni ai apomioglobinei. Din aceste considerații se poate observa atât importanța stării de încărcare, cât și cea a centrării distribuției ionice în jurul semnalului cu stare de încărcare ridicată.

6.3. Analiza glicopeptidelor

Testarea și optimizarea cuplajului NanoMate HCT MS pentru glicopeptide, s-a realizat pe un amestec complex de peptide *O*-glicozilate (*O*-glicopeptide), obținute din urina unor pacienți suferind de boala lui *Schindler*. În acest scop, un eșantion de probă, sub forma de pulbere liofilizată, a fost dizolvat la o concentrație de 1 pmol/ μ L în H₂O/MeOH 50/50 v/v, pentru detecția în modul ionilor negativi. După dizolvare, proba a fost omogenizată prin amestecare, timp de 5 minute și apoi supusă centrifugării (5000 rps), timp de 60 min. După centrifugare supernatantul a fost pipetat, în orificiul plăcii de microtitrare a robotului NanoMate și injectată prin ESI, în HCT MS.

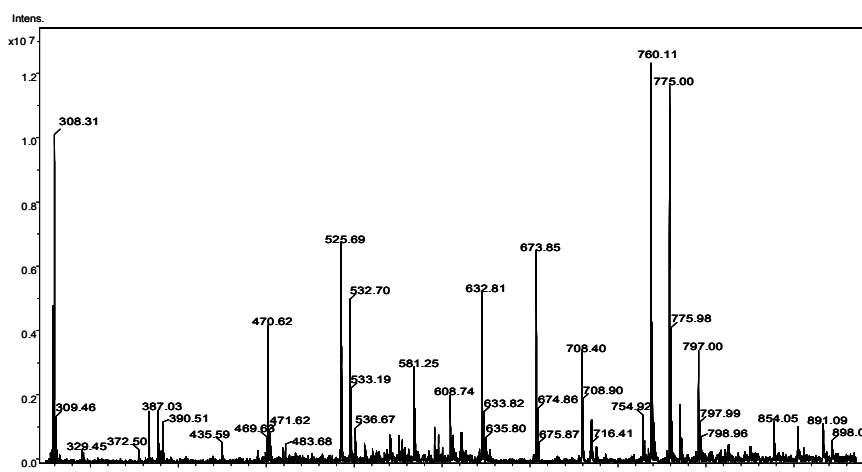


Fig. 6.3.1. Spectrul NanoMate HCT MS, în modul ionilor negativi, al amestecului de O-glycopeptide sialilate extrase și purificate din urina unui pacient suferind de boala lui *Schindler*. Condiții experimentale: solvent H₂O/MeOH 50/50 v/v; concentrația probei de 1 pmol/□L; potențial ESI 1.40 kV; tensiune capilar: 50 V; presiunea gazului: 0.30 psi; timp de achiziție: 1 min.

Spectrul de masă obținut, prin achiziționarea semnalului timp de numai 1 minut, este prezentat în figura 6.3.1, de mai sus, iar speciile identificate în acest spectru sunt cuprinse în tabelul 6.3.2.

Tabelul 6.3.2. Principalele structuri detectate prin experiment NanoMate HCT MS, în amestecul de glicopeptide din urina unui pacient suferind de boala lui *Schindler*

[M-2H⁺]²⁻	[M-H⁺]⁻	Compoziție
	308	NeuAc
435	871	NeuAcGalGalNAc-Thr-Pro
	469	GalGalNAc-Ser
	470	NeuAcGal
481		NeuAc ₂ GalGalNAc
	483	GalGalNAc-Thr
525		NeuAc ₂ GalGalNAc-Ser
532		NeuAc ₂ GalGalNAc-Thr
563		NeuAcGal ₂ GlcNAcGalNAc-Ser
571		NeuAcGal ₂ GlcNAcGalNAc-Thr
581		NeuAc ₂ GalGalNAc-Thr-Pro
633		NeuAc ₂ GalGlcNAcGalNAc-Thr

671		NeuAc ₃ GalGalNAc-Ser
	673	NeuAcGalGalNAc
678		NeuAc ₃ GalGalNAc-Thr
708		NeuAc ₂ Gal ₂ GlcNAcGalNAc-Ser
715		NeuAc ₂ Gal ₂ GlcNAcGalNAc-Thr
	760	NeuAcGalGalNAc-Ser
	775	NeuAcGalGalNAc-Thr
	835	NeuAcGal ₂ GalNAc

Tabelul 6.3.2 prezintă desemnarea ionilor simplu și dublu încărcăți, derivați din peptidele legate de di-, tri-, tetra-, penta- și hexazaharide detectate în probă. Se poate observa, că prin aceasta metodă, s-a putut identifica pentru aceste structuri: natura componentelor din probă, toate fiind peptide *O*-glicozilate, sialilate cu grad relativ ridicat de sialilare conținând pînă la 3 unitati de NeuAc, într-un timp mai scurt de achiziționare a semnalului și la o sensibilitate mult mai ridicată a analizei, decât în cazul sistemului NanoMate QTOF MS. Ionii cei mai proeminenți sunt desemnați ca aparținând speciilor pseudomoleculare, simplu încărcate (trizaharida), legate prin legături glicozidice de oxigen, de serină sau de treonină. Ionii pseudomoleculari, dublu încărcăți, derivând din tetra- și hexazaharida legată de serină, treonină sau treonină-prolină au fost deasemenea, detectați la o intensitate destul de mare a semnalului înregistrat.

6.4. Analiza polizaharidelor funcționalizate

Așa cum am arătat analiza polizaharidelor neutre prin spectrometrie de masă utilizând metoda ionizării prin electrospray este dificilă din cauza lipsei grupărilor ușor ionizabile la această clasă de compuși. Problema poate fi depășită prin introducerea unei strategii de derivatizare a eșantionului de polizaharide cu masă mare, strategie bazată pe funcționalizarea acestora cu amine aromatice [84, 85]. Pentru testarea fezabilității cuplajului NanoMate HCT MS pentru analiza polizaharidelor maltodextrinele au fost funcționalizate cu 4,4'-diamina-difenil-metan printr-o reacție de aminare reductivă. Polizaharidele derivatizate astfel obținute au fost purificate, izolate și supuse analizei prin NanoMate-HCT MS utilizând sistemul descris anterior. Toate spectrele de masă au fost achiziționate utilizând tehnica ionilor pozitivi, pentru toată gama de mase, de la 100 la 3000 *m/z*. Fragmentarea ionilor precursori în vederea analizei structurale detaliate de la MS până la MS³ s-a bazat și în acest caz pe tehnica disocierilor induse prin ciocnire (CID), folosind drept gaz de coliziune, heliul. Fiecare spectru de fragmentare a fost obținut printr-o acumulare a scanărilor, la valori diferite ale tensiunii aplicate, cuprinse între 0.40 - 0.75 V.

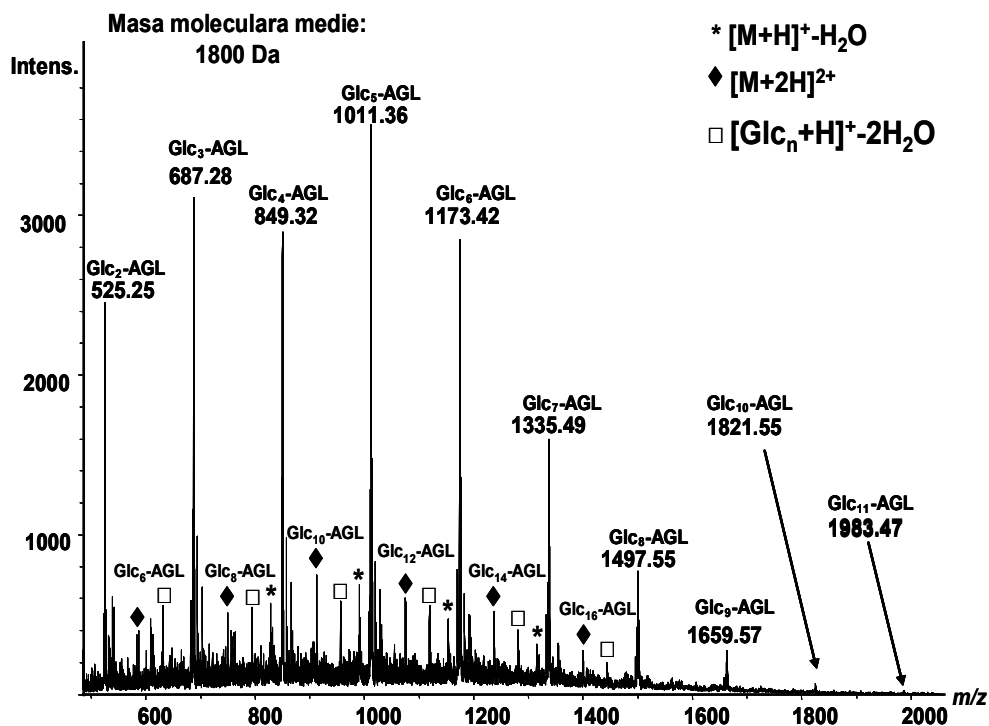


Fig. 6.4.1. Spectrul MS¹ al maltodextrinei, funcționalizată, cu masă moleculară medie 1800 Da, obținut cu sistemul complet automat bazat pe chip de siliciu de tip NanoMate-HCT MS. Condiții experimentale: solvent H₂O; concentrație 10 pmol/μL; timp de achiziție 2 min; Chip ESI -0.60 kV; tensiune capilar -20 V.

În figurile 6.4.1. și 6.4.2. sînt prezentate spectrele maltodextrinelor funcționalizate cu amine aromatice, având mase moleculare medii cuprinse între 1800 și 2800 de Da. Capătul aminei aromatice prezintă o afinitate pentru protoni, fapt care a condus la o îmbunătățire a detecției prin ESI HCT MS, în cazul polizaharidelor cu lanțuri lungi. Prin urmare, abordarea actuală a permis identificarea unor componente unice în amestecuri cu eterogenitate mare ce au un grad ridicat de polimerizare, fără a mai fi nevoie de separarea cromatografică înainte de MS. Componentele care conțin lanțuri cu 2 până 22 glucoze (Glc) au fost detectate și fragmentate, mergând până la MS³ (figurile 6.4.3 și 6.4.4).

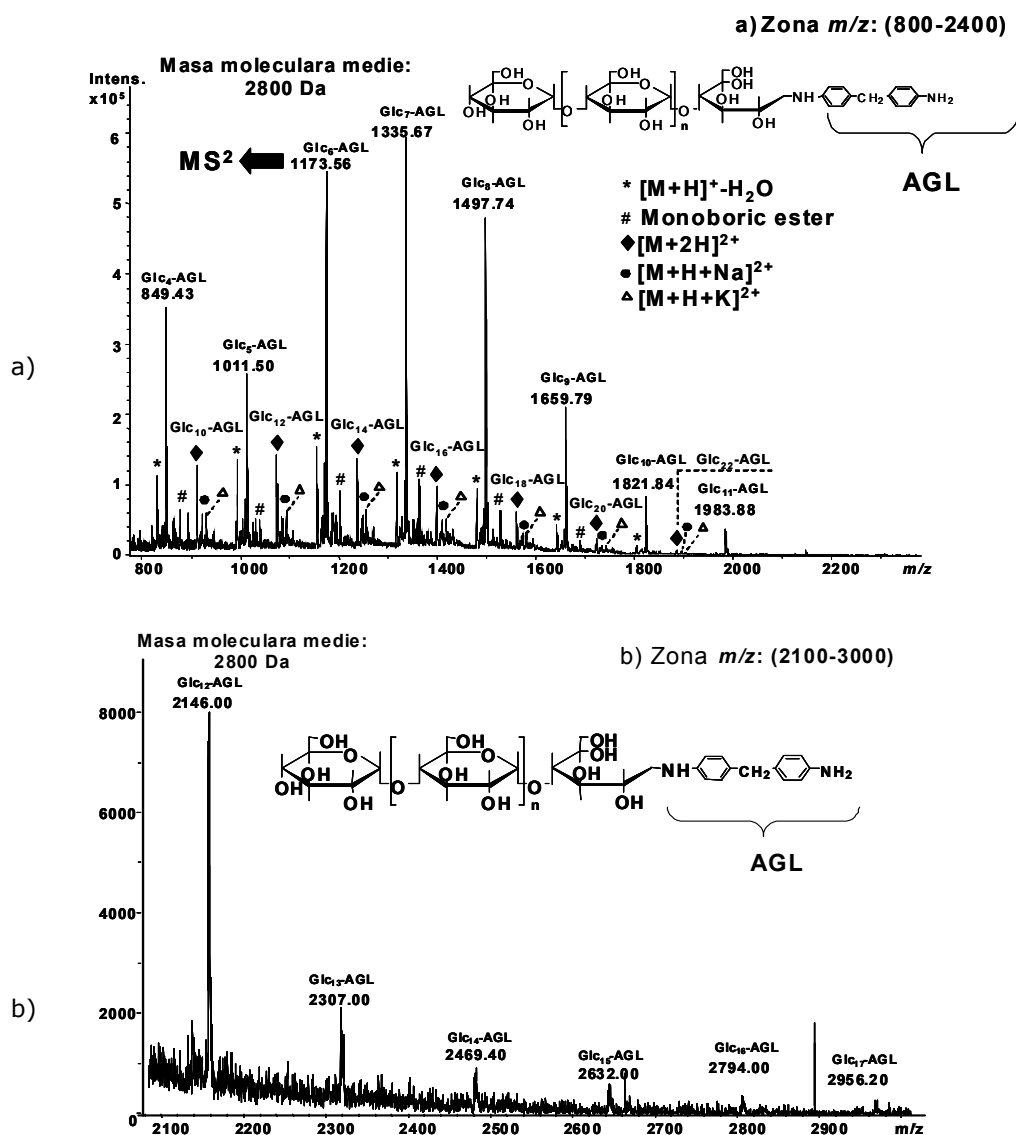


Fig.6.4.2. Spectrul MS¹ al maltodextrinei funcționalizate cu masă moleculară medie 2800, obținut cu sistemul complet automat bazat pe chip de siliciu de tip NanoMate-HCT MS. a) zona m/z (800-2400) și b) zona m/z (2100-300). Condiții experimentale: solvent H₂O; concentrație 10 pmol/μL; timp de achiziție 2 min; Chip ESI -0.60 kV; tensiune capilar -20 V.

Prin optimizarea condițiilor de detecție și fragmentare s-au putut genera spectre MS²-MS³ a polizaharidelor modificate ce conțin lanțuri 6 unități repetitive de Glc, fragmentele prezentând întregul set de ioni diagnostic de tip Y⁺ și B⁺, din care structura lanțului a putut fi dedusă fără echivoc.

În mod remarcabil, aceste date asupra compoziției și structurii, prin NanoMate CID MS² și MS³, au fost obținute într-un regim automatizat, de transfer ultra rapid (*high throughput*), cu un consum extrem de redus de probă-eșantion, lucru ce confirmă sensibilitatea de analiză în domeniul picomolar. Astfel, la o concentrație a probei de 10 pmol/μL (calculată pentru masă moleculară medie) și un timp de infuzie a probei de 2 min, având în vedere debitul de 100 nL/min livrat de chipul NanoMate 400 rezultă, că pentru înregistrarea unui spectru de screening au fost consumați 200 nL soluție. Acest consum este echivalent cu o cantitate de numai 4 pmol de probă pentru o analiză completă, adică 2 pmol pentru spectrul MS și 2 pmol pentru un spectru tandem MS (MS²).

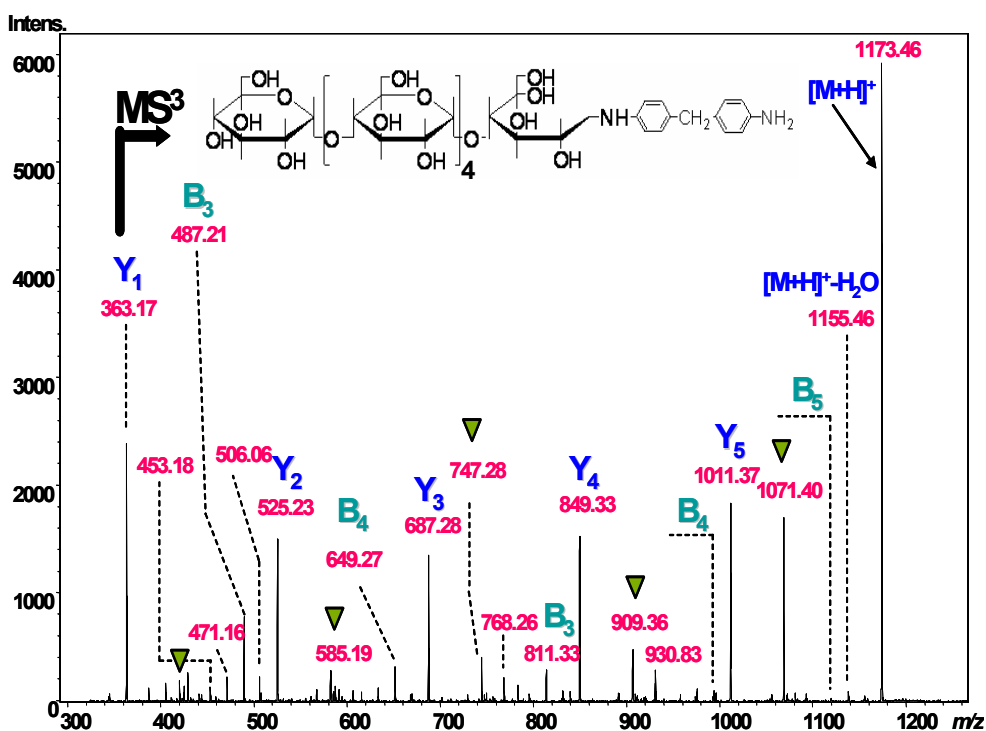


Fig.6.4.3. Spectrul MS² al ionului simplu încărcat, având m/z 1173.46, corespunzător Glc₆-AGL, obținut cu sistemul complet automat NanoMate-HCT, prin CID. Condiții experimentale: solvent H₂O; concentrație 10 pmol/μL; timp de achiziție 2 min; Chip ESI-0.60 kV; tensiune capilar -20 V; fereastra de izolare a ionului precursor 2 u; fragmentare la amplitudini variabile ale semnalului de RF între 0.2-0.4 V. Nomenclatura de atribuire a fragmentelor este în conformitate cu cea propusă de Domon și Costello [95].

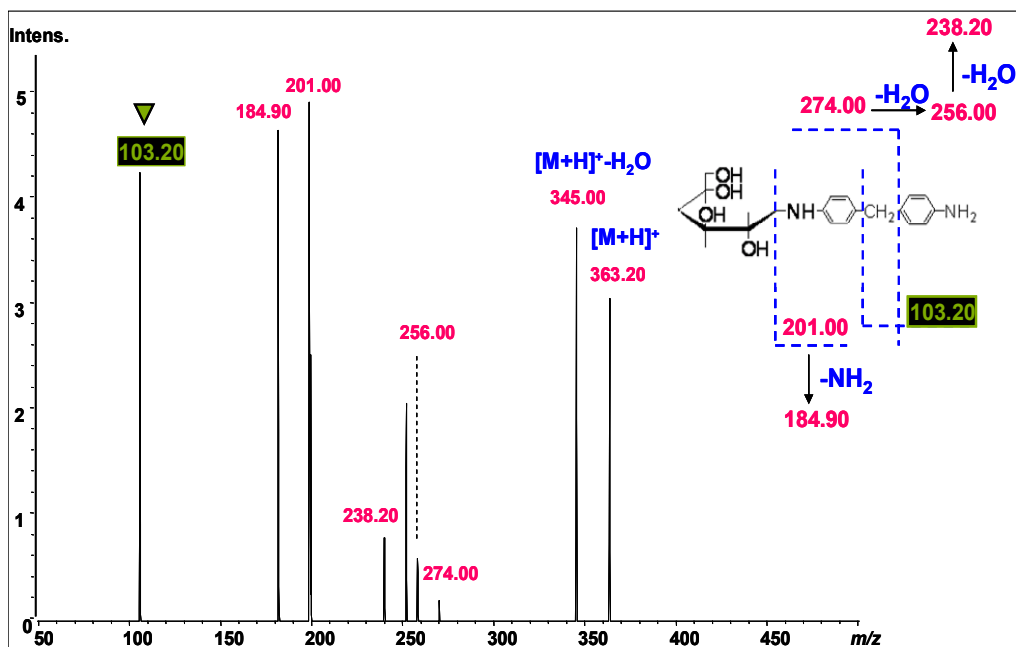


Fig.6.4.4. Spectrul MS³ al ionului simplu încărcat detectat în MS², având m/z 363.20, obținut cu sistemul complet automat NanoMate HCT, prin CID. Condiții experimentale: solvent H₂O; concentrație 10 pmol/μL; timp de achiziție 2 min; Chip ESI -0.60 kV; tensiune capilar -20 V; fereastra de izolare a ionului precursor 2 u; fragmentare la amplitudini variabile ale semnalului de RF între 0.2-0.4 V. Nomenclatura de atribuire a fragmentelor este în conformitate cu cea propusă de Domon și Costello [95]

De aceea putem spune că, NanoMate-HCT MS reprezintă o nouă și viabilă metodă analitică de mare sensibilitate pentru investigarea structurală a polizaharidelor derivatizate. Prin introducerea acestui nou protocol a fost posibilă pentru prima dată identificarea unor lanțuri lungi care conțin, până la 22 de unități repetitive de glucoza. Întrucât metoda propusă este foarte rapidă, sensibilă, reproductibilă și exactă atât în determinările de screening compozițional, cât și în cele legate de identificarea structurală „*de novo*”, aceste avantaje o recomandă ca o posibilă opțiune analitică, chiar de rutină, în glicomica modernă.

CONCLUZII

Având în vedere scopul stabilit al tezei, precum și obiectivele prezentate în introducerea lucrării, rezultatele experimentale obținute permit formularea următoarelor concluzii:

1. În cadrul acestei teze de doctorat s-au **realizat și implementat pentru prima dată în studii de glicomică și proteomică, două cuplaje utilizând un robot NanoMate, pentru ionizarea prin chip electrospray complet automată, și două spectrometre de masă**, ce funcționează fiecare pe principii diferite și au caracteristici tehnice complementare. Primul spectrometru, QTOF MS este un instrument hibrid, bazat pe separarea ionilor în funcție de timpul de zbor. Având o rezoluție și acuratețe ridicată în determinarea masei, el este capabil să funcționeze în regim de tandem MS, într-un singur stadiu de disociere (MS/MS).

Cel de-al doilea instrument cu care s-a realizat interfațarea robotului NanoMate este un spectrometru de tip capcană ionică de mare capacitate (HCT MS), în care ionii se separă în funcție de raportul m/z pe baza oscilațiilor create de aplicarea unui câmp de radiofrecvență. În ceea ce privește HCT MS, rezoluția și acuratețea acestuia sunt mai slabe decât cele ale spectrometrului QTOF, însă are o viteză de scanare deosebit de ridicată, o sensibilitate mult superioară și poate realiza stagii multiple de fragmentare (MS^n) astfel încât, pentru analizele structurale în care este utilizat, acestea sunt compensate.

2. **Cuplajul robotului NanoMate cu instrumentul de tip QTOF MS a necesitat montarea interfeței robot-spectrometru și adaptarea atât a spectrometrului cât și a robotului pentru funcționarea în conexiune.**

3. **În cazul instrumentului HCT MS, cuplajul a presupus, de asemenea, și construirea unei interfețe**, întrucât acest tandem fiind pentru prima dată realizat, nu a fost concepută și deci, nici nu este disponibilă o interfață comercială. La fel ca și în cazul spectrometrului QTOF MS, **dupa realizarea cuplajului fizic dintre aparate, au fost optimizați** parametrii funcționali ai celor două dispozitive, lucrul necesar pentru a putea permite funcționarea în regim cuplat.

4. Cele două platforme analitice și-au dovedit **capacitățile și performanțele superioare în comparație cu metodele tradiționale** bazate pe electrospray prin capilar. Avantajele derivă în special din aceea că, oferă o viteză de lucru mult mărită prin automatizarea/robotizarea manipulării probei și a injectării acesteia, un semnal de electrospray stabil pe timp îndelungat, de intensitate constantă și totodată reproductibil. Eficiența foarte ridicată a ionizării permite detectarea speciilor minore, care foarte des reprezintă biomarkeri relevanți și care altfel nu ar putea fi detectați/identificați. Comparând cu micro- și nanospray, un alt avantaj major al experimentului realizat cu tehnologia MS, bazată pe chip, este acuratețea și precizia superioare, de până la 10^2 ori. În cazul extractelor biologice complexe, acestea fiind date de cantitățile sub-picomolare de probă necesară pentru o investigare structurală completă pot influența sensibilitatea și specificitatea unei analize.

5. **Ambele platforme bazate pe chip ESI au putut fi optimizate, testate și aplicate pe o varietate largă de compuși** în scopul verificării fezabilității lor, precum și pentru elaborarea protocoalelor adecvate care să permită abordarea cât mai multor tipuri de biomolecule (pentru screening și identificare compozițională și structurală în detaliu).

6. **Sistemul NanoMate-QTOF a oferit rezultate de screening și analiză structurală asupra unor compuși cu rol biologic semnificativ.** Astfel, prin NanoMate-QTOF MS au fost studiate **glicosfingolipidele sialilate (ganglioziide)**

din meningiomul benign uman, hemangiomul uman și **glicopeptidele sialilate** extrase din urina unui pacient suferind de boala lui Schindler. Pentru ambele tipuri de biomolecule extrase, din cele două tipuri de matrici biologice umane, rezultatele au permis **postularea posibilului rol de biomarker al unor specii.**

7. **Sistemul NanoMate-QTOF a fost de asemenea optimizat și aplicat cu succes pentru investigarea polizaharidelor lungi și funcționalizate** ce au putut fi apoi caracterizate și prin MS/MS, folosind tehnica disocierilor induse prin ciocnire (CID). Acest studiu are o importanță deosebită pentru obținerea produșilor de reacție și a verificării structurii zaharidei modificate (funcționalizate). De asemenea, metoda dezvoltată în cadrul tezei poate fi considerată un model în ceea ce privește derivatizarea carbohidraților cu lanțuri lungi, care nu prezintă grupuri ușor ionizabile și care în stare naturală nu ar fi putut fi investigate prin spectrometria de masă.

8. **Sistemul NanoMate-HCT MS, o premieră,** a fost succesiv optimizat, atât pentru funcționarea în tehnica de detecție a ionilor pozitivi, cât și în tehnica ionilor negativi, în combinație fie cu CID, fie cu disociere prin transfer de electroni (ETD).

9. **Prima aplicație a NanoMate-HCT MS a vizat implementarea platformei în proteomică.** Experimentele au debutat cu analiza unor peptide mici și medii pentru a testa conceptul analitic și principiul de lucru. **Rezultatele obținute pe peptide mici și medii, au dovedit că sistemul este capabil să genereze spectre de masă de calitate superioară, cu o eficiență a ionizării, a vitezei și a sensibilității mult mărite comparativ cu tehnicile de ionizare, analiză și detecție existente până în prezent.**

10. **În combinație cu CID, platforma NanoMate-HCT MS** a permis identificarea peptidelor analizate prin intermediul ionilor diagnostic formați și apoi detectați în procent mare și la intensități, relativ ridicate.

11. Aceste date au încurajat **aplicarea metodei pentru peptide conjugate Dau-GnRH III, modificate și mai complexe.** Și în acest caz, comparând cu tehnica clasică de injectare prin seringă-pompă sau capilar, s-au obținut rezultate superioare, în special cu privire la gradul de ionizabilitate, dar și la reducerea fragmentării nespecifice în sursă. Aceste observații au susținut **introducerea tehnicii ETD în combinație cu NanoMate-HCT MS** în urma căreia biogonjugatul Dau-GnRH III a putut fi fragmentat cu succes și identificat structural.

12. Rezultatele obținute utilizând drept analit, peptidele medii, au demonstrat că tehnica nou introdusă are capacitatea de a rezolva problema spinoasă a proteomicii prin „top-down”. În acest sens, **experimentele de top-down prin ETD efectuate pentru prima dată pe o proteină au arătat că prin NanoMate-HCT MS se pot asigura condițiile de ionizare ale ionului precursor, precum și că se pot asigura condițiile de stabilitate pentru semnalul ESI, atât de necesar efectuării fragmentării top-down a proteinei intacte.** Aplicația pe o proteina de masă moleculară medie, în urma căreia s-a înregistrat identificarea proteinei cu un procent de „acoperire” în ioni diagnostic de peste 80%, se constituie în primul experiment reușit de top-down proteomică, prin ETD. **Un asemenea studiu sistematic, folosind microtehnologia pe un chip și HCT ETD, în proteomica, nu a mai fost întreprins până acum, de aceea caracterul novator al acestor rezultate este evident.**

13. **Pentru a valida conceptul NanoMate-HCT MS în modul ionilor negativi și a demonstra aplicabilitatea sa pentru categorii cât mai diverse de biomolecule, experimentele au fost dirijate în continuare spre screening-ul glicopeptidelor sialilate** din urina pacientului suferind de boala lui Schindler. Si acest caz rezultatele au dovedit ca metoda este fezabilă și pe amestecuri complexe,

ionizabile în acest mod. Astfel, au fost detectate 20 de specii de peptide O-glicozilate, cu grade diferite de sialilare și lungimi diferite ale lanțurilor (până la hexazaharidă).

14. In final, metoda a fost testată și pe produși sintetici. Astfel, au fost analizate atât prin screening MS, cât și prin stagii multiple de disociere (de până la MS³), polizaharide de tip maltodextrin, funcționalizate cu 4,4'-diamina-difenil-metan printr-o reacție de aminare reductivă. Prezenta metodă a permis identificarea unor componente unice în amestecuri eterogene și de mare complexitate, cu grad ridicat de polimerizare. Au fost detectate componente care conțin lanțuri de la 2 până 22 de unități repetitive de glucoza. În plus, **datorită semnalului stabil și a eficienței ridicate a ionizării, a fost posibilă analiza prin fragmentare a compusului din amestecul complex, fără a mai fi nevoie de separarea cromatografică înainte de MS.**

* *
*

Rezultatele remarcabile obținute cu aceste noi platforme analitice și metodologii de lucru permit o estimare pozitivă cu privire la posibilitățile lor de a se constitui într-o alternativă viabilă a metodelor și canonanelor analitice existente, în prezent, pentru cercetarea din domeniu.

În ceea ce privesc rezultatele cercetărilor experimentale prezentate în teza de doctorat, acestea au condus la redactarea unor lucrări științifice publicate în reviste cotate ISI și ISI proceedings și/sau comunicate în cadrul conferințelor naționale și internaționale menționate mai jos.

Articole în reviste cotate ISI și ISI proceedings

1. Coupling of fully automated chip-based electrospray ionization to high capacity ion trap mass spectrometer for ganglioside analysis
R. Almeida, C. Moșoarcă, M. Chiriță, **V. Udrescu**, N. Dincă, Ž. Vukelić, M. Allen, A. D. Zamfir, *Anal. Biochem.* 378, 43–52, **2008**

2. Synthesis and structural characterization of amino-functionalized polysaccharides
I. Șișu, **V. Udrescu**, C. Flangea, S. Tudor, N. Dincă, L. Rusnac, A.D. Zamfir, E. Șișu, *Cent. Eur. J. Chem.* 7, 66-73, **2009**

3. Fully automated chip-based electrospray ionization multistage mass spectrometry of long chain polysaccharides functionalized with aromatic amines
V. Udrescu, E. Șișu, I. Șișu, L. Rusnac, M. Allen, R. Almeida, A.D. Zamfir
Proceedings of the 56th American Society for Mass Spectrometry Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, June 1-6, **2008**, Denver, Colorado, USA

Prezentări la conferințe naționale și internaționale

1. NanoESI QTOF and MALDI TOF MS of modified maltodextrins and dextrans
V. Udrescu, I. Sisu, N. Dinca, A. Lascu, C. Neanu, E. Sisu, L. Rusnac, A. D. Zamfir
1st Advanced Research Workshop on Applications of Mass Spectrometry in Life Safety under NATO auspices, Sept. 23-27, **2007**, Herculane, România

2. Fully automated chip-based electrospray ionization multistage CID/ETD mass spectrometry for glycoconjugate analysis

- V. Udrescu**, R. Almeida, F. Harja, N. Dincă, L. Rusnac, M. Allen, A. D. Zamfir
Austrian Mass Spectrometry Forum, Feb. 18-22, **2008**, Vienna, Austria
3. A novel method to enhance mass spectrometric analysis of long chain polysaccharides
V. Udrescu, L. Rusnac, I. Şişu, E. Şişu, R. Almeida, A. D. Zamfir
Conferința Internațională de Chimie, 29-31 Mai **2008**, Timișoara, România
4. NanoMate/HCT MS o nouă tehnică pentru analiza carbohidraților, cu aplicații în biomedicină
A. D. Zamfir, **V. Udrescu**, C. Flangea, E. Şişu, N. Dincă, L. Rusnac
Simpozionul Național al Academiei de Ştiințe Medicale din România, 28-30 Sept. **2008**, Sinaia, România
5. A novel procedure for derivatization of long chain polysaccharides to enhance fully automated chip-based nanoelectrospray multistage mass spectrometric analysis
E. Şişu, I. Şişu, C. Flangea, **V. Udrescu**, N. Dincă, A. D. Zamfir
2nd International Symposium Research and Education in Innovation, ERA, 20-21 Nov., **2008**, Arad, România
6. A novel derivatization method to enhance chip-nanoelectrospray analysis of long chain polysaccharides
V. Udrescu, Şişu, I. Şişu, N. Dincă, I. Pancan, L. Rusnac, A.D. Zamfir
1st International Conference of the Romanian Society for Mass Spectrometry, April 25-29, **2010**, Sinaia, România
7. Chip-based nanoESI multistage mass spectrometry in neuroglycolipidomics: characterization of ganglioside composition specificity in defined regions of fetal human brain
L. Zăgrean, A. Şerb, **V. Udrescu**, E. Şişu, A. M. Zăgrean, V. Belengeanu, Z. Vukelic, A.D. Zamfir,
7th FENS Forum of European Neuroscience Society, July 3-7, **2010**, Amsterdam, Netherlands
8. Chip-nanoelectrospray ion trap mass spectrometry of lactones
V. Udrescu, E. Sisu, I. Sisu, L. Rusnac, A.D. Zamfir
3rd International Symposium Research and Education in Innovation, ERA, Nov. 10-12, **2010**, Arad, România
9. Screening and sequencing of modified maltodextrins and dextrans by quadrupole time-of-flight and ion trap mass spectrometry
V. Udrescu, E.Şişu, I.Şişu, L. Rusnac, A.D. Zamfir
2nd International Conference of the Romanian Society for Mass Spectrometry, May 1-5, **2011**, Timișoara, România

Bibliografie

- [1] M. Yamashita, J. B. Fenn Electro spray ion source. Another variation on the free-jet theme, *J. Phys. Chem.* 88, 4451, 1984
- [2] M. Aleksandrov, L. Gall, V. Krasnov, V. Nikolaev, V. Pavlenko, V. Shkurov Ion extraction from solutions at atmospheric pressure - a method for mass-spectrometric analysis of bioorganic substance, *Dokl. Acad. Nauk SSSR* 277,378-379,1984
- [3] M. Dole, L. Mack, R. Hines, R. Mobley, L. Ferguson, M. Alice Molecular Beams of Macroions, *J. Chem. Phys.* 49, 2240,1968
- [4] J.B.Fenn, M. Mann, C.K. Meng, S.F. Wong, C.M. Whitehouse Electro spray ionization for mass spectrometry of large biomolecules *Science.* 246,64-71,1989
- [5] J.B. Fenn Electro spray wings for molecular elephants (Nobel lecture) *Angew. Chem. Int. Ed.* 42,3871-3894, 2003
- [6] S.N. Jayasinghe Bio-electrosprays: from bio-analytics to a generic tool for the health sciences *Analyst.* 136, 878-890, 2011
- [7] <http://biochem.ncsu.edu/MassSpec/>
- [8] S.Nguyen, J.B. Fenn Gas-phase ions of solute species from charged droplets of solutions *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 104,1111-1117, 2007
- [9] D.P.H. Smith Electrohydrodynamic atomization of liquids *IEEE Trans. Ind. Appl.*, 22, 527, 1986
- [10] J.F. Mora, G.J. Van Berkel, C.G. Enke, R.B. Cole, M. Martinez-Sanchez, J.B. Fenn Electrochemical processes in electro spray ionization mass spectrometry *J. Mass Spectrom.* 35,939-952, 2000
- [11] D. Taflin, T. Ward, E. J. Davis Electrified droplet fission and the Rayleigh limit, *Langmuir* 5, 376, 1989
- [12] M.Wilm Principles of electro spray ionization *Mol. Cell Proteomics.* 10, M111.009407, 2011
- [13] J.V. Iribarne, B.A. Thompson On the evaporation of small ions from charged droplets *J. Chem. Phys.* 64, 2287,1976
- [14] B. A. Thompson, J.V. Iribarne Field induced ion evaporation from liquid surfaces at atmospheric pressure *J. Chem. Phys.* 71, 4451, 1979
- [15] J.B. Fenn Ion Formation from Charged Droplets: Roles of Geometry, Energy, and Time *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 4, 524,1993
- [16] H.D. Beckey, F.W. Röllgen Chemical reactions under the influence of extremely high electric fields *Naturwissenschaften* 58, 23-31, 1971
- [17] I.G. Loscertales, J. Fernandez de la Mora Experiments on the kinetics of field-evaporation of small ions from droplets *J. Chem. Phys.* 103, 5041, 1995
- [18] P. Kebarle, L. Tang Dependence of ion intensity in electro spray mass spectrometry on the concentration of the analytes in the electro sprayed solution *Anal. Chem.* 65, 3654, 1993
- [19] M. Wilm, M. Mann Analytical properties of the nanoelectrospray ion source *Anal. Chem.* 68,1-8, 1996
- [20] <http://biochem.ncsu.edu/MassSpec/>
- [21] A.D. Zamfir, J. Peter-Katalinic Glycoscreening by sheathless on-line capillary electrophoresis/electrospray quadrupole time-of flight tandem mass spectrometry *Electrophoresis* 22, 2448-2457, 2001
- [22] A.D. Zamfir, S. König, J. Althoff, J. Peter-Katalinic Capillary electrophoresis and off-line CE/ESI-QTOF tandem MS of carbohydrates *J. Chromatogr. A* 895, 291-299, 2000
- [23] A.D. Zamfir Recent advances in sheathless interfacing of capillary

- electrophoresis and electrospray ionization mass spectrometry *J. Chromatogr. A* 1159, 2-13, 2007
- [24] A.D. Zamfir Sisteme avansate de ionizare prin microchip pentru spectrometria de masa si aplicatii Ed. Canonica, Cluj-Napoca, 2008, ISBN 978-973-88608-7-2
- [25] I.M. Lazar, J. Grym, F. Foret Microfabricated devices: A new sample introduction approach to mass spectrometry *Mass Spectrom Rev.* 25, 573-594, 2006
- [26] F. Kitagawa, K. Otsuka Recent progress in microchip electrophoresis-mass spectrometry *J. Pharm Biomed Anal.* 55, 668-678, 2011
- [27] T. Sikanen, S. Franssila, T.J. Kauppila, R. Kostianen, T. Kotiaho, R.A. Ketola. Microchip technology in mass spectrometry *Mass Spectrom Rev.* 29, 351-391, 2010
- [28] M. Napoli, J.C. Eijkel, S. Pennathur Nanofluidic technology for biomolecule applications: a critical review *Lab Chip.* 10, 957-985, 2010
- [29] S. Koster, E. Verpoorte A decade of microfluidic analysis coupled with electrospray mass spectrometry: an overview *Lab Chip.* 7, 1394-1412, 2007
- [30] W.C. Sung, H. Makamba, S.H. Chen Chip-based microfluidic devices coupled with electrospray ionization-mass spectrometry *Electrophoresis* 26, 1783-1791, 2005
- [31] B.H. Weigl, R.L. Bardell, C.R. Cabrera Lab-on-a-chip for drug development *Adv Drug Deliv Rev.* 55, 349-377, 2003
- [32] L.Y. Yeo, H.C. Chang, P.P. Chan, J.R. Friend Microfluidic devices for bioapplications *Small* 7, 12-48, 2011
- [33] S.J. Maerkl Next generation microfluidic platforms for high-throughput protein biochemistry *Curr. Opin. Biotechnol.* 22, 59-65, 2011
- [34] P. Liu, R.A. Mathies Integrated microfluidic systems for high-performance genetic analysis *Trends Biotechnol.* 27, 572-581, 2009
- [35] D. Eicher, C.A. Merten Microfluidic devices for diagnostic applications *Expert Rev Mol Diagn.* 11, 505-519, 2011
- [36] A.D. Zamfir, J. Peter-Katalinić Capillary electrophoresis-mass spectrometry for glycoscreening in biomedical research *Electrophoresis* 25, 1949-1963, 2004
- [37] A.D. Zamfir, N. Lion, Ž. Vukelic, L. Bindila, J. Rossier, H. Girault, J. Peter-Katalinić Thin chip microsyringe system coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometer for glycoconjugate analysis *Lab. Chip* 5, 298-307, 2005
- [38] R.S. Ramsey, J.M. Ramsey Generating electrospray from microchip devices using electroosmotic pumping *Anal Chem.* 69, 2617, 1997
- [39] Q. Xue, F. Foret, Y.M. Dunayevskiy, P.M. Zavracky, N.E. McGruer, B.L. Karger Multichannel microchip electrospray mass spectrometry *Anal Chem.* 69, 426-430, 1997
- [40] J. Wen, Y. Lin, F. Xiang, D.W. Matson, H.R. Udseth, R.D. Smith Microfabricated isoelectric focusing device for direct electrospray ionization-mass spectrometry. *Electrophoresis.* 21, 191-197, 2000
- [41] D. Figeys, S.P. Gygi, G. McKinnon, R. Aebersold An integrated microfluidics-tandem mass spectrometry system for automated protein analysis *Anal Chem.* 70, 3728-3734, 1998
- [42] T. Wachs, J. Henion Electrospray device for coupling microscale separations and other miniaturized devices with electrospray mass spectrometry *Anal Chem.* 73, 632-638, 2001
- [43] Y. Yang, J. Kameoka, T. Wachs, J.D. Henion, H.G. Craighead Quantitative mass spectrometric determination of methylphenidate concentration in urine using an electrospray ionization source integrated with a polymer microchip *Anal Chem.* 76, 2568-2574, 2004
- [44] Y. Deng, H. Zhang, J. Henion Chip-based quantitative capillary

- electrophoresis/mass spectrometry determination of drugs in human plasma *Anal Chem.* 73,1432-1439, 2001
- [45] B. Zhang, F. Foret, B.L. Karger High-throughput microfabricated CE/ESI-MS: automated sampling from a microwell plate *Anal Chem.* 73, 2675-2681, 2001
- [46] Y. Deng, J. Henion, J. Li, P. Thibault, C. Wang, D.J. Harrison Chip-based capillary electrophoresis/mass spectrometry determination of carnitines in human urine *Anal Chem.* 73, 639-646, 2001
- [47] J. Kameoka, R. Orth, B. Ilic, D. Czaplewski, T. Wachs, H.G. Craighead An Electro spray Ionization Source for Integration with Micro fluidics *Anal Chem.* 74, 5897-5901, 20023
- [48] V. Gobry, J. van Oostrum, M. Martinelli, T.C. Rohner, F. Reymond, J.S. Rossier, H.H. Girault Microfabricated polymer injector for direct mass spectrometry coupling *Proteomics* 2, 405-412, 2002
- [49] M.A. Roberts, J.S. Rossier, P. Bercier, H. Girault UV Laser Machined Polymer Substrates for the Development of Microdiagnostic Systems *Anal Chem.* 69, 2035-2042, 1997
- [50] Y. Liu, B. Liu, P. Yang, H.H. Girault Microfluidic enzymatic reactors for proteome research *Anal. Bioanal. Chem.* 390, 227-229, 2008
- [51] J. Kameoka, H.G. Craighead, H. Zhang, J. Henion A polymeric microfluidic chip for CE/MS determination of small molecules *Anal Chem.* 73, 1935-1941, 2001
- [52] W. C. Sung, S. Y. Huang, P. C. Liao, G. B. Lee, C. W. Li, S. H. Chen Poly(dimethylsiloxane)-based microfluidic device with electrospray ionization-mass spectrometry interface for protein identification *Electrophoresis* 24, 3648-3654, 2003
- [53] L. Licklider, X. Q. Wang, A. Desai, Y. C. Tai, T. D. Lee A micromachined chip-based electrospray source for mass spectrometry *Anal. Chem.* 72, 367-375, 2000
- [54] G. A. Schultz, T. N. Corso, S. J. Prosser, S. Zhang A fully integrated monolithic microchip electrospray device for mass spectrometry *Anal. Chem.* 72, 4058-4063, 2000
- [55] C. H. Yuan, J. Shiea, Sequential Electrospray Analysis Using Sharp-Tip Channels Fabricated on a Plastic Chip *Anal. Chem.* 73, 1080-1083, 2001
- [56] S. L. Gac, S. Arscott, C. Cren-Olive, C. Rolando, Two-dimensional microfabricated sources for nano-electrospray, *J. Mass Spectrom.* 38, 1259-1264, 2003
- [57] J. Kameoka, R. Orth, B. Ilic, D. Czaplewski, T. Wachs, H. G. Craighead, An Electrospray Ionization Source for Integration with Microfluidics *Anal. Chem.* 74, 5897-5901, 2002
- [58] K. Tang, Y. Lin, D. W. Matson, T. Kim, R.D. Smith, Generation of multiple electrosprays using microfabricated emitter arrays for improved mass spectrometric sensitivity *Anal. Chem.* 73, 1658-1663, 2001
- [59] Q. Xue, Y. M. Dunayevskiy, F. Foret, B. L. Karger Integrated multichannel microchip electrospray ionization mass spectrometry: analysis of peptides from on-chip tryptic digestion of melittin *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 11, 1253-1256, 1997
- [60] J. Li, T. Leriche, T. L. Tremblay, C. Wang, E. Bonneil, D. J. Harrison, P. Thibault Application of microfluidic devices to proteomics research: identification of trace-level protein digests and affinity capture of target peptides *Mol Cell. Proteomics* 1, 157-168, 2002
- [61] A. Tan, S. Benetton, J. D. Henion Chip-Based Solid-Phase Extraction Pretreatment for direct electrospray mass spectrometry analysis using an array of monolithic columns in a polymeric substrate *Anal. Chem.* 75, 5504-5511, 2003

- [62] I. M. Lazar, L. Li, Y. Yang, B. L. Karger Microfluidic Device for Capillary Electro-Chromatography Mass Spectrometry *Electrophoresis* 24, 3655–3662, 2003
- [63] www.agilent.com
- [64] <http://www-leti.cea.fr>
- [65] A.D. Zamfir, S. Vakhrushev, A. Sterling, H. Niebel, M. Allen, J. Peter-Katalinić Fully automated chip-based mass spectrometry for complex carbohydrate system analysis *Anal. Chem.* 76, 2046-2054, 2004
- [66] A.D. Zamfir, L. Bindila, N. Lion, M. Allen, H. H. Girault, J. Peter-Katalinic, Chip electrospray mass spectrometry for carbohydrate analysis *Electrophoresis* 26, 3650-3673, 2005
- [67] A.Serb, C. Schiopu, C. Flangea, E. Sisu, A. D. Zamfir Top-down glycolipidomics: fragmentation analysis of ganglioside oligosaccharide core and ceramide moiety by chip-nanoelectrospray collision-induced dissociation MS²-MS⁶ *J. Mass Spectrom.* 44, 1434–1442, 2009
- [68] C. Flangea, C. Schiopu, E. Sisu, A.Serb, M. Przybylski, D. G. Seidler, A. D. Zamfir Determination of sulfation pattern in brain glycosaminoglycans by chip-based electrospray ionization ion trap mass spectrometry *Anal. Bioanal. Chem.* 395, 2489-2498, 2009
- [69] C. Flangea, A. Serb, E. Sisu, A.D. Zamfir Chip-based mass spectrometry of brain gangliosides *Biochim. Biophys. Acta (Molec & Cell Biol. of Lipids)* 1811, 513–535, 2011
- [70] E. Sisu, C. Flangea, A. Serb, A. Rizzi, A. D. Zamfir High-performance separation techniques hyphenated to mass spectrometry for ganglioside analysis *Electrophoresis* 32, 1591-1609, 2011
- [71] C.K. Van Pelt, S. Zhang, E. Fung, I. Chu, T. Liu, C. Li, W.A. Korfmacher, J. Henion A fully automated nanoelectrospray tandem mass spectrometric method for analysis of Caco-2 samples *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 17, 1573-1578, 2003
- [72] S. Zhang, C.K. Van Pelt, D.B. Wilson Quantitative determination of noncovalent binding interactions using automated nanoelectrospray mass spectrometry *Anal Chem.* 75, 3010-3018, 2003
- [73] J. Müthing, U. Distler Advances on the compositional analysis of glycosphingolipids combining thin-layer chromatography with mass spectrometry *Mass Spectrom. Rev.* 29, 425-479, 2010
- [74] J. Peter-Katalinić Methods in enzymology: O-glycosylation of proteins *Methods Enzymol.* 405, 139-171, 2005
- [75] J.B. Fenn, M. Mann, C.K. Meng, S.F. Wong, C.M. Whitehouse Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules *Science* 246, 64-71, 1989
- [76] M. Froesch, L. Bindila, A.D. Zamfir, J. Peter-Katalinić Sialylation analysis of O-glycosylated sialylated peptides from urine of patients suffering from Schindler's disease by Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry and sustained off-resonance irradiation collision-induced dissociation *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 17, 2822-2832, 2003
- [77] L. Bindila, M. Froesch, N. Lion, Ž. Vukelic, J. Rossier, H. Girault, J. Peter-Katalinić, A.D. Zamfir A thin chip microsyrayer system coupled to Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry for glycopeptide screening *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 18, 2913-2920, 2004
- [78] A.D. Zamfir, Ž. Vukelic, J. Peter-Katalinić A capillary electrophoresis and off-line capillary electrophoresis/electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry approach for ganglioside analysis *Electrophoresis* 23, 2894-2903, 2002

- [79] A.D. Zamfir, D. Seidler, E. Schonherr, H. Kresse, J. Peter-Katalinić On-line sheathless capillary electrophoresis/nanoelectrospray ionization-tandem mass spectrometry for the analysis of glycosaminoglycan oligosaccharides *Electrophoresis* 25, 2010-2016, 2004
- [80] Ž. Vukelić, S. Kalanj Bogнар, M.Froesch, L. Bindila, B. Radić, M. Allen, J. Peter Katalinić, A.D. Zamfir Human gliosarcoma-associated ganglioside composition is complex and highly distinctive as evidenced by high-performance mass spectrometric determination and structural characterization *Glycobiology* 17, 504-515, 2007
- [81] C. Schiopu, A. Serb, F. Capitan, C. Flangea, E. Sisu, Z. Vukelic, M. Przybylski, A. D. Zamfir Determination of ganglioside composition and structure in human brain hemangioma by chip-based nanoelectrospray ionization tandem mass spectrometry *Anal. Bioanal. Chem.* 395, 2465-2477, 2009
- [82] E. Sisu, C. Flangea, A.Serb, A. D. Zamfir Modern developments in mass spectrometry of chondroitin and dermatan sulfate glycosaminoglycans *Amino Acids*, 41, 235-256, 2011
- [83] L. Svennerholm, P. Fredman A procedure for the quantitative isolation of brain gangliosides *Biochim Biophys Acta.* 617, 97-109, 1980
- [84] E. Sisu, W. T. E. Bosker, W. Norde, T. M. Slaghek, J. W. Timmermans, J. P. Katalinic, M. A. Cohen-Stuart, A. Zamfir Electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometric analysis of hexamethylene diamine-modified maltodextrin and dextran *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* 20, 209-218, 2006
- [85] I. Perdivara, E. Sisu, I. Sisu, N. Dinca, K.B. Tomer, M. Przybylski, A.D. Zamfir Enhanced electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry of long-chain polysaccharides *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 22, 773-782, 2008
- [86] I. Sisu, V. Udrescu, C. Flangea, S. Tudor, N. Dinca, L. Rusnac, A.D. Zamfir, E.Sisu Synthesis and structural characterization of amino-functionalized polysaccharides *Cent. Eur. J. Chem.* 7, 66-73, 2009
- [87] www.waters.com
- [88] <http://biochem.ncsu.edu/MassSpec/>
- [89] A.D. Zamfir Studiul ionizarii prin electrospray in spectrometria de masa. Teza de doctorat, Universitatea Babeş-Bolyai, Cluj-Napoca, 2001
- [90] K.R. Jonscher, J.R. 3rd Yates The quadrupole ion trap mass spectrometer-a small solution to a big challenge *Anal Biochem.* 244,1-15, 1997
- [91] <http://biochem.ncsu.edu/MassSpec/>
- [92] http://commons.wikimedia.org/wiki/Category:Mass_spectrometry
- [93] <http://www.asms.org/whatisms/p15.html>
- [94] P. Roepstorff, J. Fohlman Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides *Biomed. Mass Spectrom.* 11, 601-609, 1984
- [95] B. Domon, C. Costello A systematic nomenclature for carbohydrate fragmentations in FAB-MS/MS spectra of glycoconjugates *Glycoconj. J.* 5, 397-409, 1988
- [96] L. Svennerholm, Ganglioside designation *Adv. Exp. Med. Biol.* 125,111-114, 1980
- [97] IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature, *Eur. J. Biochem.* 257-293, 1998
- [98] S. Hakomori Tumor-associated carbohydrate antigens defining tumor malignancy: basis for development of anti-cancer vaccines *Adv Exp Med Biol.* 491, 369-402, 2001
- [99] Ž. Vukelić, S. Kalanj Bogнар, M.Froesch, L. Bindila, B. Radić, M. Allen, J. Peter

- Katalinić, A.D. Zamfir Human gliosarcoma-associated ganglioside composition is complex and highly distinctive as evidenced by high-performance mass spectrometric determination and structural characterization *Glycobiology* 17, 504-515, 2007
- [100] L. Romero-Ramirez, M. Nieto-Sampedro Inhibiting human astrocytoma growth: structure-activity relationships in neurostatin related glycolipids. *J. Med Chem.* 47, 4983-4984, 2004
- [101] S. Hakomori, K. Handa Glycosphingolipid-dependent cross-talk between glycosynapses interfacing tumor cells with their host cells: essential basis to define tumor malignancy *FEBS Lett.* 531, 88-92, 2002.
- [102] O.P. van Diggelen, D. Schindler, W.J. Kleijer, J.M. Huijmans, H. Galjaard, H.U. Linden, J. Peter-Katalinic, H. Egge, U. Dabrowski, M. Cantz Lysosomal alpha-N-acetylgalactosaminidase deficiency: a new inherited metabolic disease. *Lancet.* 2, 804, 1987
- [103] R.J. Desnick, A.M. Wang Schindler disease: an inherited neuroaxonal dystrophy due to alpha-N-acetylgalactosaminidase deficiency *J. Inherit Metab. Dis.* 13, 549-559, 1990, Review.
- [104] A.M. Wang, D. Schindler, R. Desnick Schindler disease: the molecular lesion in the alpha-N-acetylgalactosaminidase gene that causes an infantile neuroaxonal dystrophy *J. Clin. Invest.* 86, 1752-1756, 1990
- [105] J. Zaia Mass spectrometry and glycomics *OMICS.* 14, 401-418, 2010
- [106] J. Zaia Mass spectrometry of oligosaccharides *Mass Spectrom Rev.* 23, 161-227, 2004
- [107] M. Pabst, F. Altmann Glycan analysis by modern instrumental methods *Proteomics.* 11, 631-643, 2011
- [108] C. Robbe, J.C. Michalski, C. Capon Structural determination of O-glycans by tandem mass spectrometry *Methods Mol Biol.* 347, 109-123, 2006
- [109] G. Ziegast, B. Pfannemuller Linear and star-shaped hybrid polymers Part IV. Phosphorolytic syntheses with di-, oligo- and multifunctional primers *Carbohydr. Res.* 160, 185, 1987
- [110] H.Q. Xie, D. Xie Molecular design, synthesis and properties of block and graft copolymers containing polyoxyethylene segments, *Prog. Polym. Sci.*, 24, 275-313, 1999
- [111] S. Caioli, L. Curcio, M. Pieri, A. Antonini, R. Marolda, C. Zona Substance P receptor activation induces downregulation of the AMPA receptor functionality in cortical neurons from a genetic model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurobiol Dis.* [Epub ahead of print], 2011
- [112] M.C. Lagerström, K. Rogoz, B. Abrahamsen, A.L. Lind, C. Olund, C. Smith, J.A. Mendez, Å. Wallén-Mackenzie, J.N. Wood, K. Kullander A sensory subpopulation depends on vesicular glutamate transporter 2 for mechanical pain, and together with substance P, inflammatory pain *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 5789-5794, 2011
- [113] N.P. Sargaeva, C. Lin, P.B. O'Connor Unusual fragmentation of β -linked peptides by ExD tandem mass spectrometry, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 22, 480-491, 2011
- [114] M. Dragusanu, B.A. Petre, S. Slamnoiu, C. Vlad, T. Tu, M. Przybylski On-line bioaffinity-electrospray mass spectrometry for simultaneous detection, identification, and quantification of protein-ligand interactions, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2, 1643-1648, 2010
- [115] M. Manea, U. Leurs, E. Orbán, Z. Baranyai, P. Ohlschläger, A. Marquardt, A. Schulcz, M. Tejeda, B. Kapuvári, J. Tóvári, G. Mező Enhanced Enzymatic Stability

- and Antitumor Activity of Daunorubicin-GnRH-III Bioconjugates Modified in Position 4, *Bioconjug Chem.* 22, 1320-1329, 2011
- [116] K. Alving, H. Paulsen, J. Peter-Katalinic Characterization of O-glycosylation sites in MUC2 glycopeptides by nanoelectrospray QTOF mass spectrometry *J. Mass Spectrom.* 34, 395-407, 1999
- [117] J.M. Gilmore, M.P. Washburn Advances in shotgun proteomics and the analysis of membrane proteomes *J. Proteomics* 73, 2078-2091, 2010
- [118] D. Calligaris, C. Villard, D. Lafitte Advances in top-down proteomics for disease biomarker discovery, *J. Proteomics* 74, 920-934, 2010
- [119] F.W. McLafferty, K. Breuker, M. Jin, X. Han, G. Infusini, H. Jiang, X. Kong, T.P. Begley Top-down MS, a powerful complement to the high capabilities of proteolysis proteomic *FEBS J.* 274, 6256-6268, 2007
- [120] X. Han, A. Aslanian, J.R. 3rd Yates Mass spectrometry for proteomics *Curr. Opin. Chem. Biol.* 12, 483-490, 2008
- [121] M.S. Kim, J. Zhong, K. Kandasamy, B. Delanghe, A. Pandey Systematic evaluation of alternating CID and ETD fragmentation for phosphorylated peptides *Proteomics.* 11, 2568-2572, 2011
- [122] C.W. Liu, C.C. Lai Effects of electron-transfer coupled with collision-induced dissociation (ET/CID) on doubly charged peptides and phosphopeptides *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 22, 57-66, 2011
- [123] H. Hahne, B. Kuster A novel two-stage tandem mass spectrometry approach and scoring scheme for the identification of O-GlcNAc modified peptides *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 22, 931-942, 2011
- [124] Z. Darula, R.J. Chalkley, A. Lynn, P.R. Baker, K.F. Medzihradszky Improved identification of O-linked glycopeptides from ETD data with optimized scoring for different charge states and cleavage specificities *Amino Acids.* 41, 321-328, 2011

Abrevieri

APCI - atmospheric pressure chemical ionisation, ionizare chimică la presiune atmosferică)

CAD - collision activated decomposition, descompunere activată prin ciocnire

CE - capillary electrophoresis, electroforeză capilară

Cer - ceramida

CI - chemical ionisation, ionizarea chimică

CID - collision induced dissociation, disocierea indusă prin ciocnire

EI - electron impact ionisation, ionizarea prin impact electronic

ESI - electrospray ionisation, ionizare prin electropulverizare

ETD - electron transfer dissociation, disocierea prin transfer electronic

FAB - fast atom bombardment, bombardament cu atomi rapizi

FTICR-MS - Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometer, spectrometru de masă cu rezonanță ciclotronică cu transformata Fourier

Fuc - fucoza

FWHM - full width at half of the maximum height

Gal - galactoza

GalCer - galactozilceramida

GC - gas chromatography, cromatografie gazoasă

GalNAc - N-acetilgalactozamina

GGs - ganglioziide

Glc - glucoză

GlcCer - glucozilceramidă

GlcNAc - N-acetilglucozamină

GSL - glicosfingolipide

HPLC - high performance liquid chromatography, cromatografie lichidă de înaltă performanță

IT - ion trap, capcană ionică

LacCer - lactozilceramidă

MALDI - matrix assisted laser desorption ionisation, ionizare prin desorbție de pe matrice cu laser

Micro-TAS (μ -TAS)- micrototal analysis systems, micro sisteme de analiză totală

MS - mass spectrometry, spectrometrie de masă, spectrometru de masă

MS/MS - tandem mass spectrometry, spectrometrie de masă în tandem

MSⁿ - spectrometrie de masă cu fragmentare în stadii multiple

Neu5Ac - acidul N-acetil-neuraminic

Neu5Gc - acidul N-glicolil-neuraminic

O-Ac - O-acetil, O-acetilare

ppm - parts per million, părți pe milion

QIT - quadrupole ion trap, analizor cu capcană ionică quadrupolar

QTOF MS - quadrupole time-of-flight mass spectrometry, spectrometru de masă quadrupolar hibrid cu timp de zbor

TIC - total ion chromatogram, cromatograma curentului total de ioni

TLC - thin layer chromatography, cromatografie în strat subțire

TOF MS - time-of-flight mass spectrometry, spectrometru de masă cu timp de zbor

u.a.m - unitate atomică de masă

Termeni generali și fundamentali

APCI Ionizare chimica la presiunea atmosferică: proces de ionizare chimică ce are loc cu ajutorul unui lichid aflat în faza de gaz și la presiune atmosferică datorită descărcării electrice de tip Corona (ionizare chimică care are loc la presiune redusă).

API de ionizare cu presiune atmosferică: orice proces de ionizare, în care ionii se formează dintr-un lichid în faza de gaz aflat la presiune atmosferică.

APPI presiunea atmosferică de fotoionizare: proces de ionizare chimică la presiunea atmosferică în care ionii de reactant sunt generați prin fotoionizare.

CI ionizare chimica: Formarea unor ioni noi în faza gazoasă ca urmare a unei reacții chimice, între o specie chimică neutră și un ion. Procesul poate implica transferul unui electron, unui proton sau altor specii, între reactanți.

Mod de ionizare: metodă de ionizare utilizată pentru a produce ioni de probă, în vederea separării acestora în analizorul unui spectrometru de masă.

Ion Trap: capcană ionică, de obicei acest termen se referă la o capcană ionică de tip quadrupol (cu patru electrozi). FT-ICR și Orbitrap sunt, de asemenea, tipuri de capcane ionice- analizoare.

FT-ICR: ciclotron cu rezonanță ionică ce folosește transformata Fourier; analizor de ioni, de tip capcană ionică de masă; aparat, instalație, accelerator ciclic de particule elementare sau atomice grele, electrizate, care descriu traiectorii tip spirale într-un câmp electric alternativ, și care după ce părăsesc acceleratorul au energii foarte mari: se bazează pe principiul rezonanței ionice, în care un ion se deplasează într-un câmp magnetic pe o orbită circulară în funcție de frecvența caracteristică a ionului și de valoarea raportului m/z .

Izotopi: specii ale aceluiași element chimic care au același număr de protoni, dar un număr diferit de neutroni în nucleu și, în consecință au mase diferite (de exemplu, ^{12}C și ^{13}C - ambele au 6 protoni în nucleu, dar ^{12}C are 6 neutroni pe când ^{13}C are 7 neutroni, deci mase atomice diferite).

Sector magnetic: un tip de analizor de masă, care accelerează ionii, printr-un câmp magnetic perpendicular pe direcția de mișcare, pe traiectorii circulare pentru a separa ionii de mase diferite (în funcție de impuls). Pentru măsurarea exactă a masei se realizează o dublare a sectorului de câmp magnetic, prin cuplarea cu un sector electric, (în cadrul aceluiași spectrometru de masă; de aceea se folosește termenul de "sector" sau "spectrometru cu fascicul dublu"), în vederea reducerii la minimum a dispersiei de energie, atingându-se astfel o rezoluție mai mare.

MALDI ionizare prin desorbție cu laser: proces de ionizare prin formarea de ioni în fază gazoasă (desorbție= îndepărtare a unei substanțe absorbite de pe suprafața unui adsorbant), de la molecule care sunt prezente într-o matrice solidă sau lichidă, sub acțiunea iradierii cu o lumină laser pulsatorie.

Analizor de masă: parte dintr-un spectrometru de masă care separă un amestec de ioni în funcție de masa lor, mai exact în funcție de raportul m/z , prin aplicarea unor câmpuri electrice și magnetice.

Rezoluție de masa: cea mai mică diferență de masă (Δm) dintre două vârfuri de înălțime egală, astfel încât distanța în partea inferioară dintre ele, este o fracție, o parte specifică dată de înălțimea vârfului.

Spectrul de masă: reprezintă trasarea abundenței relative a unui fascicul de ioni colectați în funcție de valorile date de raportul m/z . O succesiune de "vârfuri" de peak-uri.

Ion molecular: un ion format prin eliminarea unuia sau mai multor electroni pentru a forma un ion pozitiv sau acceptarea de unul sau mai mulți electroni pentru a forma un ion negativ.

Regula azotului: regula prin care se stabilește că într-o moleculă organică care conține elementele C, H, O, S, P, sau un halogen, molecula are o masă nominală impară dacă conține un număr impar de atomi de azot.

Orbitrap: un tip de capcană ionică în care ionii sunt prinși pe traiectorii închise circulare și oscilează armonic de-a lungul axei capcanei. Frecvența de oscilație este invers proporțională cu radacina pătrată a raportului m/z .

Quadrupole: un tip de analizor de masă, constând din patru electrozi (tip tije) metalici dispusi central și paraleli între ei, a căror dispunere se aseamănă cu colțurile unui pătrat și ai căror poli sunt legați opus, astfel încât separă ionii pe baza oscilațiilor acestora într-un câmp electric de radiofrecvență (câmpul quadrupole).

Capcană ionică de tip Quadrupole (adesea numit doar "capcană ionică"): un tip de analizor al unui spectrometru de masă în care mișcarea ionilor este determinată prin utilizarea de câmpuri magnetice și/sau electrice și apoi separarea selectivă pentru diferite valori ale tensiunii de RF- radiofrecvență și extragerea lor în funcție de raportul m/z . Capcana de ioni este utilizată frecvent pentru studii de fragmentare ("MSⁿ"), deoarece permite ca serii succesive de ioni să fie prinși în capcană și apoi fragmentați.

Detector parte dintr-un spectrometru de masă care detectează ionii, după separarea în funcție de masă.

EI ionizare cu electroni: proces de ionizare a unui atom sau molecule, de către electroni, accelerați, având energia între 10 și 150 electron-volti (eV), în scopul de a elimina unul sau mai mulți electroni din moleculă; 70eV este valoarea acceptată pentru achiziționarea unui spectru.

ESI ionizare prin electrospray: proces prin care speciile chimice aflate în fază lichidă într-o substanță sunt pulverizate printr-un orificiu, la presiunea atmosferică, și aduse în fază gazoasă prin desolvatare (trecere printr-un gaz inert, uscat), astfel încât picăturile, (încărcate cu sarcină electrică extrem de mare), sînt ionizate, fragmentate, datorită prezenței unui câmp electric foarte intens (energii cuprinse între 1000 la 10000 eV).

Anexe

Anexa1. Rezumatul modurilor de ionizare

	Ioni formați în vid		Ioni formați la presiune atmosferică			Ioni formați în vid sau presiune atmosferică
Tipuri de ionizare	Ionizarea prin ciocnire cu electroni (EI)	Ionizarea chimică(CI)	Ionizarea prin electrospray (ESI)	Ionizare la presiune atmosferică (APCI)	Fotoionizare la presiune atmosferică (APPI)	Ionizare prin desorbție asistată cu matrice laser (MALDI)
Tipuri de compuși	Non polari și specii moderat polare cum sunt hidrocarburile aromatice. Moleculele trebuie să fie volatile și stabile termic.	La fel ca la EI. Se intensifică modul de detectare a ionilor moleculari. Este necesară alegerea adecvată a unui gaz reactiv.	Orice compus suficient de bazic, în fază de gaz care acceptă un proton sau un alt cation (la modul pozitiv), sau suficient de acid pentru a pierde un proton (la modul negativ).	Mulți compuși prezenți în sursa care nu pot fi ionizați prin ESI vor fi protonați prin APCI foarte puternic de către acidul în fază de gaz.	Optimă pentru compuși non polari. Tehnica oferă o gamă de aplicații care pot fi evaluate.	O gamă largă de molecule de la non polare la ionice pot fi analizate. Recomandat pentru molecule mari.
Natura mecanisme -lor de ionizare	Pierderea de electroni duce la apariția cationilor radical. Energia internă poate duce la o fragmentare considerabilă.	<u>+ve ion</u> : ionizare prin reacție cu gaz reactiv. De cele mai multe ori ionizarea are loc cu atașare de cationi. <u>-ve ion</u> : captura de electroni sau atașare de anioni.	<u>+ve ion</u> : adiție de cationic (de exemplu H^+ , Na^+ , NH_4^+). <u>-ve ion</u> : pierdere de protoni sau atașare de anioni. Grupările molecular sunt obișnuite.	<u>+ve ion</u> : adiția de protoni este obișnuită. <u>-ve ion</u> : captura de electroni.	<u>+ve ion</u> : adiție de protoni. <u>-ve ion</u> : captura de electroni.	<u>+ve ion</u> : cation radical sau adiție de proton. Se formează clusteri moleculari. <u>-ve ion</u> : captura de electroni sau pierdere de protoni.
Ioni tipici observați	<u>+ve ion</u> : H^+ , $[M-H]^+$, <u>-ve ion</u> : EI nu este posibilă în modul negativ.	<u>+ve ion</u> : $[M+H]^+$, $[M+NH_4]^+$. <u>-ve ion</u> : M^-	<u>+ve ion</u> : $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$, $[M+nH]^{n+}$ <u>-ve ion</u> : $[M-H]^-$, $[M+X]^-$	<u>+ve ion</u> : $[M+H]^+$ <u>-ve ion</u> : M^- , $[M-H]^-$	<u>+ve ion</u> : M^+ , $[M+H]^+$ <u>-ve ion</u> : M^-	<u>+ve ion</u> : M^+ , $[M+H]^+$, $[M_2+H]^+$, $[M+2H]^{2+}$ <u>-ve ion</u> : M^- , $[M-H]^-$
Fragmentare	Fragmentare semnificativă. Multe informații despre structura moleculelor.	Fragmentare mai scăzută decât în cazul EI; probabilitate mai mare de a observa ionii corelați cu molecula origine.	Proces cu energie scăzută; câteva fragmente. O mai mare fragmentare la MS-MS sau folosirea unei tensiuni mai înalte în sursă.	Asemănător cu ESI.	Asemănător cu ESI.	Fragmentare slabă sau chiar lipsa fragmentare. Cele mai multe fragmente necesită MS-MS.

Introducere probă	Printr-o sondă la temperatura controlată sau prin coloana de la GC.	Asemănător cu ESI.	Proba dizolvată într-un solvent adecvat.	Asemănător cu ESI.	Asemănător cu ESI.	Proba trebuie aplicată într-o matrice corespunzătoare.
Solvent tipic	GCMS necesită solvent volatil non polar. Temperatura la care GC injectează proba poate influența reușita. Proba nedizolvată poate fi introdusă dacă este volatilă și stabilă termic.	Asemănător cu ESI.	Amestec de apă / solvent organic cu adaos opțional de electroliți (de exemplu, acid formic sau de acetat de amoniu). Amestecuri tipice frecvent inversate datorită variației fazei HPLC. Alegerea solventului ar putea fi decisivă.	Asemănător cu ESI. Amestecurile de hidrocarburi/ alcool la fel ca pentru faza normal HPLC.	Asemănător cu APCI.	Solventul de la care proba va forma un amestec cristalin cu matricea. Alegerea matricei și prepararea probei pot fi dificile.

Anexa 2. Componentele spectrometrului de masă

	ADMISIE		MOD DE IONIZARE		ANALIZOR*	REZOLUȚIA POSSIBILĂ	
Exemple	CROMATOGRAF DE GAZ (GC) SONDĂ INSERȚIE DIRECTĂ (DIP) SONDĂ PROBĂ SOLIDĂ (SP) SONDA DE DESORBTIE (DEI/DCI)	⇒	IONIZARE PRIN CIOCNIRE CU ELECTRONI (EI) IONIZARE CHIMICĂ (CI)	⇒	QUADRUPOLE CU TIMP DE ZBOR (TOF)	Scazută/ Medie	⇔
	DEBIT/ORIFICIU INJECTARE (FIA) INFUZIE ELECTROFOREZA CAPILARA (CE) CROMATOGRAFIE LICHIDĂ (HPLC)		IONIZARE LA PRESIUNE ATMOSFERICĂ (APCI) FOTOIONIZARE LA PRESIUNE ATMOSFERICĂ (APPI) ELECTROSPRAY (ESI)		CAPCANĂ IONICĂ	Scazută Medie	
	PLACA (n) SUPRAFAȚA/ȚINTĂ		IONIZARE PRIN DESORBTIE ASISTATĂ CU MATRICE LASER (MALDI) MS CU IONI SECUNDARI ÎN FAZĂ LICHIDĂ (LSIMS) BOMBARDAMENT CU ATOMI RAPIZI (FAB)		CU SECTOR MAGNETIC	Înaltă	
					CICLCOTRON CU REZONANȚĂ IONICĂ CU TRANSFORMATĂ FOURIER (FTICR)	Foarta înaltă	
					ORBITRAP	Înaltă	
					* cele mai multe analizoare permit combinații hibride de tip "MS tandem" sau "MS ⁿ " (capcană ionică / FT-ICR)		
							DETECTOR

Factori cheie în alegerea probei	Proprietățile compusului supus analizei: Solubilitate Volatilitate Stabilitate termică		Proprietățile compusului supus analizei: Polaritate Solubilitate Stabilitate termică Masa moleculară Este necesară fragmentară?	Registrul / categoria maselor Rezoluția de masă Viteza de scanare Limita de detectare Registrul dinamic	
Factori cheie care influențează performanța	Ca mai sus Efecte de memorie		Tensiunea aplicată Solvent utilizat Aditivi utilizați	Calibrarea maselor Rezoluția de masă Energia folosită Cantitatea și concentrația probei	

