

## DESVELANDO EL ÉXITO DE LA MOVILIDAD IÓNICA A TRAVÉS DE SUS POSIBILIDADES

María Morán, Jorge Sáiz, Coral Barbas

Centro de Metabolómica y Bioanálisis (CEMBIO), Departamento de Química y Bioquímica.  
Facultad de Farmacia. Universidad San Pablo-CEU. MADRID

### 1. Introducción

La espectrometría de movilidad iónica es una técnica de separación de iones en fase gaseosa según su forma, tamaño y carga. Es una técnica rápida y su sensibilidad depende del detector utilizado, por lo que cada vez se usa más en diversos campos y cuenta con más aplicaciones. Recientemente, varias empresas han lanzado sus versiones comerciales de estos equipos, implantándose rápidamente y con éxito en muchos laboratorios de vanguardia. ¿Qué está aportando esta técnica a los flujos de trabajo actuales en análisis químico?

Esta técnica la introdujeron Karasek y Cohen en el año 1970 y la denominaron Cromatografía de Plasma y, posteriormente, pasó a denominarse espectrometría de movilidad iónica, como se conoce actualmente [1, 2]. En los años 90 comenzaron a aparecer los primeros espectrómetros comerciales y en los últimos 20 años empresas como Waters, Bruker y Agilent han sacado al mercado equipos que acoplan la movilidad iónica con técnicas de separación, ionización y espectrometría de masas [2], dotando a esta técnica de muchas más capacidades.

Gracias a todo esto, el estudio de moléculas mediante movilidad iónica ha crecido en los últimos años, desde las aplicaciones más simples, como la detección de explosivos en aeropuertos, hasta incluirlo en el diagnóstico clínico e investigaciones complejas sobre el papel de las proteínas y sus interacciones en enfermedades como el cáncer o Alzheimer o en tratamientos novedosos con anticuerpos monoclonales [3, 4, 5].

### 2. Funcionamiento

La separación de moléculas mediante movilidad iónica se basa en el movimiento de iones a lo largo de un *tubo de deriva*, favorecido por un campo eléctrico, a la vez que colisionan con moléculas del *gas de deriva* (helio o nitrógeno). En esta situación se generan dos fuerzas contrarias: la ejercida por el campo eléctrico, que hace avanzar a los iones, y la del roce producido por el gas de deriva, que los frena. Por lo tanto, y de forma similar a lo que ocurre en una electroforesis, las moléculas con mayor carga se desplazan con mayor velocidad y, a la vez, las moléculas más grandes avanzan más lentamente porque sufren mayor número de colisiones con el gas de deriva [6]. De esta manera, se llega a un equilibrio entre fuerzas y las moléculas adquieren una velocidad constante ( $v_d$ ), dependiente del campo eléctrico ( $E$ ) y del

coeficiente de movilidad iónica de la molécula ( $K$ ). Así, la velocidad de un ion viene determinada por el tiempo ( $t_d$ ) que tarda ese ion en recorrer la longitud del tubo de deriva ( $L$ ). Esta velocidad está relacionada con la movilidad iónica ( $K$ ) a través de la forma y del tamaño del ion.

$$V_d = K \cdot E = \frac{L}{t_d}$$

El coeficiente de movilidad iónica ( $K$ ) es característico de cada ion, en unas determinadas condiciones, y depende del número de colisiones entre el ion y el gas de deriva, así como de la temperatura, presión y masa del gas.

La movilidad del ion también se puede expresar a través de la ecuación de Mason-Schamp, derivada de la teoría de los gases.

$$K_0 = \left(\frac{3ez}{16N}\right) \cdot \left(\frac{2\pi}{\mu k_B T}\right)^{\frac{1}{2}} \cdot \left(\frac{1}{\Omega}\right)$$

Donde  $K_0$  es la constante de movilidad reducida, normalizada para presión y temperatura,  $\mu$  es la masa reducida,  $k_B$  es la constante de Boltzmann,  $ez$  la carga del ion y  $\Omega$  la sección transversal de colisión, explicada más a fondo en el siguiente punto.

### 3. CCS

La sección transversal de colisión,  $\Omega$ , o en sus siglas en inglés CCS (Collision Cross Section), es un valor presente en la ecuación de Mason-Schamp para la constante de movilidad iónica. Este parámetro es la sección media de colisión efectiva del ion con el gas de deriva. Es la media del área en todas las orientaciones del ion en la fase gaseosa que puede interactuar con el gas, lo que permite conocer la forma tridimensional del ion [4, 7].

Este valor, que es único para cada molécula y es independiente del equipo de análisis, se puede utilizar para compararlo con el calculado de manera teórica para discriminar entre distintos modelos. A efectos prácticos,  $\Omega$  se puede usar en conjunto con otros tres valores específicos de las moléculas, como son el tiempo de retención, la masa exacta y el espectro de fragmentación, para identificar moléculas. Hoy en día, ya se está utilizando en bases de datos como un cuarto apellido que aporta capacidades sin precedentes a la hora de distinguir moléculas con la misma masa, pero estructuras químicas diferentes, por ejemplo.



#### 4. Descripción del Instrumento

Los instrumentos de espectrometría de movilidad iónica, en general, están compuestos por 4 partes principales: zona de introducción de muestra, fuente de ionización, tubo de deriva y una zona de detección (Fig. 1).

La introducción de muestra debe asegurar que la molécula esté en estado gaseoso. Entre los principales sistemas de introducción de muestra se encuentran los muestreadores de espacio de cabeza, los sistemas de membrana, la microextracción en fase sólida (SPME), los sistemas de desorción térmica y las columnas multicapilares, entre otros [3]. Además, es posible acoplar la movilidad iónica a otras técnicas de separación, como HPLC o GC, para mejorar la resolución del análisis [2].

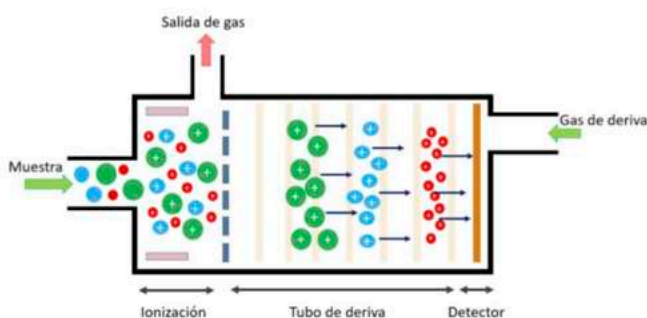


Figura 1. Representación esquemática general de un espectrómetro de movilidad iónica.

Las moléculas deben ser ionizadas, para lo que se cuenta con diferentes técnicas como la ionización radiactiva con  $^{63}\text{Ni}$  mediante partículas  $\beta$ , la fotoionización o la ionización química a presión atmosférica (APCI) [3, 6]. Sin embargo, cada vez es más común el uso de la ionización por electrospray (ESI) para generar iones en muestras líquidas o MALDI para generar iones en muestras sólidas. Además, estas son técnicas de ionización débiles que evitan la fragmentación y mantienen la estructura de las moléculas [2, 3].

Los iones pasan al tubo de deriva, que es la parte esencial para su separación. En esta zona se mueven desde la entrada hacia el detector impulsados por el campo eléctrico y en contra del gas de deriva. Normalmente, el tubo está formado por anillos concéntricos a los que se les aplica un voltaje, pero ciertas diferencias en el diseño y las condiciones de movilidad iónica dan lugar a los diferentes tipos de instrumentos [1].

Por último, el detector amplifica y convierte las señales producidas por los iones de manera que se pueden visualizar e interpretar. El más común es la placa de Faraday, pero la movilidad iónica también se puede acoplar a espectrómetros de masas, como el TOF, para analizar la masa de los iones y complementar la información obtenida con esta técnica [3].

#### 5. Tipos de Espectrómetro de movilidad iónica (IMS)

Hay varios métodos para separar iones por movilidad iónica, como Drift Tube Ion Mobility Spectrometer (DTIMS), Travelling Wave Ion Mobility Spectrometer (TWIMS), Field Assymetric (FAIMS), Trapped (TIMS), Overtone (OMS) y Transversal Modulation (TMIMS) entre otros. Entre estos, los más comunes son DTIMS y TWIMS (Fig. 2) [3, 4].

DTIMS se caracteriza por utilizar un campo eléctrico uniforme, homogéneo y lineal para mover los iones por el tubo de deriva. De esta manera, los iones siguen una trayectoria lineal desde la entrada hasta el detector (Fig. 2a). Este método permite calcular el CCS directamente, usando el tiempo de deriva y las condiciones experimentales gracias a la ecuación de Mason-Schamp. En este caso el CCS calculado es independiente del instrumento, universal, intrínseco y característico de la molécula y su configuración espacial [1, 3].

En TWIMS, por el contrario, se utilizan voltajes de viaje pulsados que crean ondas progresivas que guían los iones. Esto hace que los iones sigan trayectorias más complejas y que el análisis sea más sensible, pero a la vez más complicado (Fig. 2b). Sin embargo, este método no permite el cálculo directo de CCS, sino que se tiene que calcular mediante un calibrado [3, 8].

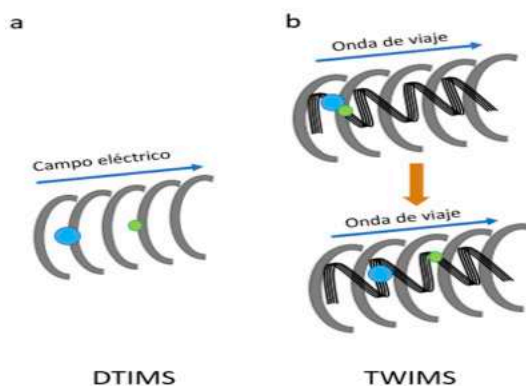


Figura 2. Representación esquemática de DTIMS y TWIMS. (a) DTIMS, en el que las moléculas siguen una trayectoria lineal. (b) TWIMS, en el que las moléculas siguen la trayectoria de las ondas creadas por los voltajes de viaje.

#### 6. Interpretación de datos e información proporcionada por la movilidad iónica

Los datos obtenidos a partir de una separación de movilidad iónica se pueden visualizar de varias maneras.

La visualización más básica es la del tiempo de llegada, en la que se representa el tiempo de deriva frente a la intensidad de cada señal (Fig. 3). Las moléculas más pequeñas aparecen por lo general a tiempos de deriva más bajos. La altura de los picos indica la intensidad de la señal, que se relaciona con la cantidad de iones producidos [4]. Es importante entender que, en equipos de movilidad iónica acoplados a espectrómetros de masas, el tiempo de llegada no corresponde realmente



con el tiempo de deriva, es decir, con el tiempo que necesita el ion para atravesar el tubo de deriva. En estos casos, el tiempo de llegada es la suma del tiempo de deriva y el tiempo que necesita el ion para atravesar el espectrómetro de masas (por ejemplo, un TOF) hasta llegar al detector. Esto se traduce en la necesidad de usar calibraciones con masas conocidas para calcular  $\Omega$  en estos equipos.

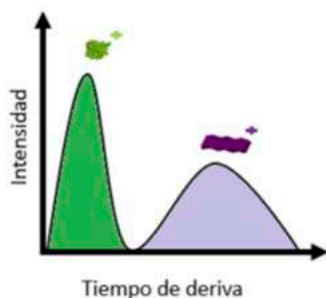


Figura 3. Ejemplo de espectro de movilidad iónica en el que se ve como las diferentes configuraciones de las moléculas afectan a su tiempo de deriva.

Al acoplar la movilidad iónica con un espectrómetro de masas se obtienen 3 dimensiones: el tiempo de deriva, la ratio  $m/z$  y la intensidad de la señal. Esto aporta mucha más información sobre las moléculas. En general, se suele representar la  $m/z$  frente al tiempo de deriva y las intensidades con una escala de color (Fig. 4).

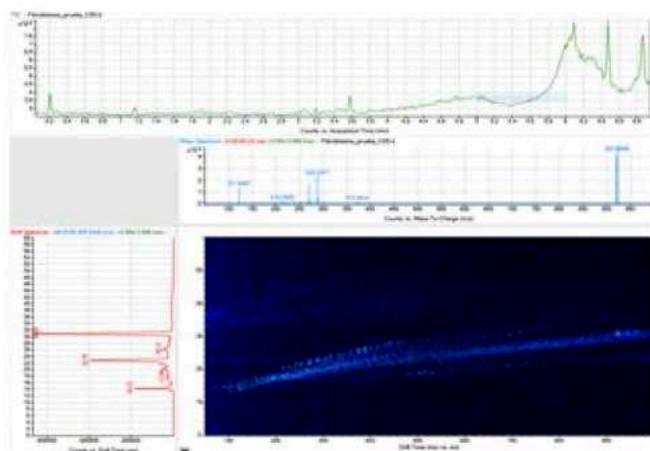


Figura 4. Ejemplo de IM-MS acoplado a HPLC en una muestra de fibroblastos.

Al incorporar una técnica previa de separación, como HPLC, se añade una cuarta dimensión (Fig. 4), que es la del tiempo de retención. En este momento, cada punto de lectura en el cromatograma (tiempo de retención, primera dimensión) tiene asociado un tiempo de deriva (segunda dimensión), en el que en cada punto de lectura (ms) existe un espectro de masas (tercera dimensión) con diferentes intensidades (cuarta dimensión). Los equipos actuales de movilidad iónica acoplados a otros espectrómetros suelen incorporar una celda de colisión, antes o después de la movilidad iónica, según la configuración, lo que permite a la vez generar un espectro de fragmentación. De esta manera se consiguen

los cuatro apellidos mencionados anteriormente (tiempo de retención, masa exacta, espectro de fragmentación y CSS) que se usan en las bases de datos y que se pueden incorporar a las librerías propias de cada laboratorio, para cada molécula. De la misma manera que para obtener un valor de CSS se requiere de un calibrado de las masas, el tiempo de retención también se suele normalizar con compuestos conocidos, de forma que se pueda usar universalmente en bases de datos y librerías [9].

Una información radicalmente diferente que se puede obtener a partir de la movilidad iónica es el desdoblamiento de proteínas inducido por colisión o CIU (Collision Induced Unfolding). En estos experimentos se activan las moléculas mediante el voltaje de colisión (V) lo que hace que las moléculas cambien de conformación. Las proteínas, por ejemplo, se despliegan adquiriendo nuevas conformaciones, que permiten su análisis estructural. De la misma manera, puede ocurrir que una proteína que une antígenos libere su ligando, lo que permite estudiar la estabilidad de los complejos proteína-ligando. Se pueden hacer barridos de voltajes y estudiar los desdoblamientos que ocurren en estas proteínas, de manera secuencial. Los resultados de este tipo de análisis se visualizan representando el voltaje de colisión frente al tiempo de deriva o CSS y en una tercera

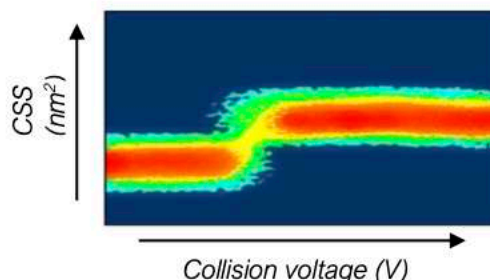


Figura 5. Experimento de CIU en el que se muestra un desdoblamiento sencillo de una proteína.

dimensión la intensidad de señal (Fig. 5) [4, 5, 10].

## 7. Aplicaciones

Los instrumentos sencillos de movilidad iónica se emplean frecuentemente para la detección de explosivos, drogas y armas químicas, especialmente en aeropuertos, ya que permiten un análisis rápido de pequeñas cantidades de sustancias ilegales. Por otra parte, la movilidad iónica tiene también aplicación en el campo medioambiental, para la determinación de contaminantes o en el campo farmacéutico en el control de calidad de la fabricación [3, 11].

Las aplicaciones más novedosas se encuentran en los campos biológicos y clínicos para los estudios de estructuras de moléculas, interacciones entre ellas y en estudios de metabolómica. En el campo clínico, tiene una gran aplicación en la detección de metabolitos que puedan estar relacionados con distintas enfermedades, permitiendo un diagnóstico rápido e incluso precoz [1, 11]. Existe una gran cantidad de enfermedades que



producen alguna alteración que se refleja en el aliento, en los llamados compuestos orgánicos volátiles (VOC), como pueden ser el EPOC, carcinoma bronquial, hígado graso y cáncer de colon entre otras, por lo que se podrían diagnosticar analizando los perfiles metabólicos del aliento mediante técnicas como IMS. Ya hay resultados prometedores en enfermedades como EPOC, sarcoidosis, cáncer de pulmón o fibrosis quística, en las que el principal sistema afectado es el respiratorio [11], y también en infecciones del tracto respiratorio, lo que permite no solo diagnosticar, sino identificar el agente patógeno causante, como la *Candida* o *Aspergillus* [1].

La IMS se puede emplear para el análisis de otros tipos de muestras como sangre o tejidos, para el análisis de suero en pacientes de trasplante de hígado, con la intención de estudiar su progresión, o incluso el estudio de la formación de placas de amiloide en la enfermedad de Alzheimer [4, 11].

Otras aplicaciones novedosas de la movilidad iónica son la metabolómica y la proteómica, ya que permiten el estudio de los metabolitos y proteínas alterados, cuya identificación a través de su CSS tiene más confianza. Su uso es muy interesante en proteómica, en el estudio de la estructura de proteínas, y en lipidómica por la gran cantidad de isómeros de lípidos existentes [1, 2]. Más concretamente, tiene una gran aplicación en el estudio de las interacciones entre proteínas y entre proteínas con otras moléculas. Gracias a los estudios de CIU se puede determinar la unión de proteína-ligando, como afectan esas interacciones a la estructura y finalmente ver si existe alguna relación con la salud o enfermedad [4, 8, 12].

### Conclusiones

La movilidad iónica ha venido a añadir una nueva capa de información en la identificación de compuestos, así como una capacidad de separación adicional en mezclas complejas, necesaria en aplicaciones como la metabolómica, la lipidómica o la proteómica. Esto cobra una relevancia mayúscula en el estudio moléculas muy similares que las técnicas habituales son incapaces de distinguir, como es el caso de muchos lípidos. Además, abre campos de mejora en investigación y en el diagnóstico de muchas enfermedades, de las que sabemos que faltan piezas para completar el puzzle. La creación de bases de datos y librerías que incluyan valores de CSS junto con el tiempo de retención normalizado, la masa exacta y el espectro de fragmentación impulsará en gran medida los flujos de trabajo en estos campos y sin duda nos brinda un futuro muy interesante en el campo de la Química Analítica.

### Bibliografía

[1] C. D. Chouinard, M. s. Wei, C. R. Beekman, R. H. J. Kemperman y R. A. Yost, «Ion Mobility in Clinical Analysis: Current Progress and Future

Perspectives,» *Clinical Chemistry*, nº 62:1, pp. 124-133, 2016.

- [2] C. B. Morris, J. C. Poland, J. C. May y J. A. McLean, «Fundamentals of Ion Mobility-Mass Spectrometry for the Analysis of Biomolecules,» de *Ion Mobility-Mass Spectrometry: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, vol. 2084, G. Paglia y G. Astarita, Edits., Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2020, 2020.
- [3] R. Cumeras, E. Figueras, C. E. Davis, J. I. Baumbach y I. Gràcia, «Review on Ion Mobility Spectrometry. Part 1: Current Instrumentation,» *Analyst*, vol. 140, nº 1376-1390, 2015.
- [4] G. Ben-Nissan and M. Sharon, "The application of ion-mobility mass spectrometry for structure/function investigation of protein complexes," *Current Opinion in Chemical Biology*, no. 42, pp. 25-33, 2018.
- [5] S. M. Dixit, D. A. Polasky y B. T. Ruotolo, «Collision induced unfolding of isolated proteins in the gas phase: past, present, and future,» *Current Opinion in Chemical Biology*, nº 42, pp. 93-100, 2018.
- [6] M. T. Odenkirk y E. S. Baker, «Utilizing Drift Tube Ion Mobility Spectrometry for the Evaluation of Metabolites and Xenobiotics,» de *Ion Mobility-Mass Spectrometry Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, vol. 2084, G. Paglia y G. Astarita, Edits., Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature, 2020, pp. 35-54.
- [7] V. Gabelica y E. Marklund, «Fundamentals of ion mobility spectrometry,» *Current Opinion in Chemical Biology*, nº 42, pp. 51-59, 2018.
- [8] M. Göth y K. Pagel, «Ion mobility-mass spectrometry as a tool to investigate protein-ligand interactions,» *Anal Bioanal Chem*, 2017.
- [9] Z. I. I. R. C. o. B. a. C. [ Zhiwei Zhou, «LipidIMMS Analyzer, To Support Lipid Identification for Ion Mobility-Mass Spectrometry based Lipidomics,» Chinese Academy of Sciences (CAS), [En línea]. Available: <http://imms.zhulab.cn/LipidIMMS/>. [Último acceso: 09 11 2020].
- [10] J. D. Eschweiler, R. M. Martini y B. T. Ruotolo, «Chemical probes and engineered constructs reveal a detailed unfolding mechanism for solvent-free multi-domain protein,» *Journal of the American Chemical Society*, 2016.
- [11] K. I. Romero y R. Fernandez-Maestre, «Ion mobility spectrometry: the diagnostic tool of third millennium medicine,» *Revista da Associação Médica Brasileira*, nº 64(9), pp. 861-868, 2018.
- [12] T. M. Allison, E. Reading, I. Liko, A. J. Baldwin, A. Laganowsky y C. V. Robinson, «Quantifying the stabilizing effects of protein-ligand interactions in the gas phase,» 2015.