

Enhanced separation in ambient mass spectrometry imaging

Citation for published version (APA):

Lamont - de Vries, L. (2021). *Enhanced separation in ambient mass spectrometry imaging: towards quantification of pharmaceuticals*. Ridderprint BV. <https://doi.org/10.26481/dis.20210527II>

Document status and date:

Published: 01/01/2021

DOI:

[10.26481/dis.20210527II](https://doi.org/10.26481/dis.20210527II)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

7.2 Summary

In the pharmaceutical industry the development and application of good separation methods is important to study the effect of a potential drug. These techniques allow us to expand our knowledge of the disease and the systemic reaction of a drug and corresponding metabolites. The effect of a potential drug is studied by executing pharmacodynamics and pharmacokinetic studies (pharmacology). Pharmacology determines what a drug in development does to the human body (pharmacodynamics) and what the human body does to the drug (pharmacokinetics). After administration, the aim of the drug is to metabolize and being transported to the site of disease. The desired effect is that the drug binds to the biological receptors following by the inhibition of the processes that cause the disease. The binding to these biological receptors has to occur for a certain amount of time at a high enough drug concentration. To monitor this process, analytical techniques have to meet certain criteria: i) being able to measure absolute concentrations, ii) the location of the potential drug has to be measurable, and iii) both the potential drug and related metabolites have to be separately measured in those pharmacological studies. This is currently done by whole body autoradiography (WBA), liquid chromatography mass spectrometry (LC-MS), and mass spectrometry imaging (MSI).

In the past two decades, MSI has developed to a technique with enormous additional value to the pharmaceutical industry because it is able to separate drug from metabolites and besides this able to measure both their location in tissue samples. MSI meets two of the three technical requirements for the pharmaceutical industry. The measurement of absolute concentrations is a challenge for the MSI community. A huge burden is the phenomenon ion suppression. This is caused by the presence (besides the drug and metabolites) of other surrounding sample molecules that interfere in the ionization process of the drug and metabolites, which leads to a less optimal detection of the drug and metabolites. This thesis presents a few novel technological developments in MSI that can contribute to improved quantitative MSI analyses of drugs and metabolites.

Chapter 2 presents a platform that combines LC-MS with MSI, called high resolution liquid extraction surface analysis micro liquid chromatography ion mobility separation data independent acquisition (HR-LESA- μ LC-IMS-MS^E). This platform shows the strength of complementary separation. First, HR-LESA sampling is performed with a spatial resolution of 400 μ m. Then, after a short online washing step to remove salts, a chromatographic separation (μ LC) is executed followed by an ion mobility spectrometry (IMS) analysis and data independent acquisition (MS^E). Two different neuropeptide applications are exhibited: the analysis of rat pituitary gland and the analysis of

knockout and control mice brain for an Alzheimer's disease model. The analytical platform is not only highly reproducible but more importantly also allows isobaric separation by μ LC and IMS and a significant increased number of detected neuropeptides due to the μ LC sample separation prior to ionization.

The use of high resolution IMS is further investigated in Chapter 3. Linear cyclic IMS (cIMS), linear trapped IMS (TIMS), and nonlinear field asymmetric waveform IMS (FAIMS) are compared for the isomeric separation of ten prostanoids, including the biologically relevant prostaglandin D₂ (PGD₂) and prostaglandin E₂ (PGE₂). These prostanoids are derivatized with Girard's reagent T to improve their ionization efficiency. A significant difference is observed between linear and nonlinear IMS in the IMS comparison. Linear IMS shows the highest intensity and nonlinear IMS the best resolution due to its orthogonality to MS. Another huge difference is that cIMS and TIMS occur in vacuum while FAIMS is executed at atmospheric pressure. This causes lower ion transmission in FAIMS due to collisions with surrounding molecules. That a high total transmission of ions is crucial for a technique that separates after ionization, is shown by the analysis of endogenous prostanoids in mini pig intestine tissue. The limited ion transmission in FAIMS causes, in combination with ion suppression, for a low number of detected ions. Linear IMS shows a higher intensity, however, no separation of the biologically relevant PGD₂ and PGE₂ is observed. Our research shows the potential of high resolution IMS as a tool for isomeric separation of prostanoids.

Chapter 4 introduces a targeted imaging strategy, named desorption electrospray ionization (DESI) multiple reaction monitoring (MRM) imaging. This work reports a lipid application and a drug and metabolite application which shows the benefit of MRM imaging. MRM imaging has the following advantages: i) increased specificity and selectivity due to the different MRM transitions of isobaric precursor ions, ii) by multiple MRM transitions from the same precursor ion, local distribution from the analyte can be confirmed, and iii) fast optical switching possibility in a triple quadrupole mass spectrometer (QqQ) allows positive and negative ions to be detected in one experiment. The measurement in tandem mass spectrometry (MS/MS) scan imaging mode is compared with by MRM imaging of the same precursor ions. Because the first and third quadrupole operate in selection mode rather than scanning mode in the same time period, sensitivity has significantly increased for these precursor ions.

The increased sensitivity of DESI-MRM is further investigated as technique for quantitative MSI (Q-MSI) in Chapter 5. Quantification is executed by use of an optimized mimetic tissue model. A gelatin block is prepared from a new designed 3D printed mold with 15 pillars to which calibration lines from tissue homogenates are added. MSI

experiments are performed with different mass spectrometers in different modes: i) Xevo G2 Q-TOF in MS scan mode, ii) Synapt G2-Si Q-TOF in MS scan, IMS-MS scan, and IMS-MS^E scan modes, and iii) Xevo TQS micro QqQ in MS scan and MRM modes. The limit of detection, linearity, precision, and accuracy are determined for each of the MS modes and compared with each other. Overall, the analytical performance of MRM imaging proved the best and, therefore, DESI-MRM is used for the quantitative analyses of four dog livers. The comparison of absolute concentrations from Q-MSI with LC-MRM is debatable because regional differences get lost in the homogenization of tissue samples in the LC-MRM analysis. For this reason we only compare regional liver parenchyma (due to its substantial contribution to liver homogenates) Q-MSI concentrations with the LC-MRM data: the absolute concentrations differ by a factor of <3.5.

The technological developments presented in this thesis contribute to an increased number of detected analytes, better isobaric and isomeric separation, higher selectivity and sensitivity, and ultimately in improved quantitative performance of ambient MSI.

7.3 Samenvatting

In de farmaceutische industrie is het van belang dat goede scheidingsmethode ontwikkeld en toegepast worden om het effect van een potentieel medicijn in kaart te brengen. Deze technieken staan ons toe om onze kennis van het ziektebeeld en de systemische reactie van een medicijn en bijbehorende metabolieten te vergroten. Het effect van een potentieel medicijn wordt gevolgd door het uitvoeren van farmacodynamische en farmacokinetische studies (farmacologie). In farmacologie wordt onderzocht wat een medicijn in ontwikkeling doet met het menselijk lichaam (farmacodynamiek) en wat het menselijk lichaam doet met dit potentiële medicijn (farmacokinetiek). Het doel van het medicijn is om na toediening gemetaboliseerd te worden en verplaatst naar de plaats van de ziekte. Hier is het gewenste effect dat het medicijn dan bindt aan biologische receptoren die vervolgens de processen die betrokken zijn bij de ziekte tegen werken. De binding aan de biologische receptoren moet voor een bepaalde tijd met een medicijnconcentratie die hoog genoeg is. Om dit goed te bestuderen moet de analytische techniek(en) aan een aantal criteria voldoen: i) de absolute concentratie moet gemeten kunnen worden, ii) de locatie van het potentiële medicijn moet gemeten kunnen worden, en iii) zowel het potentiële medicijn als gerelateerde metabolieten moeten in deze farmacologische studies gescheiden kunnen worden. Dit wordt momenteel gemeten door autoradiografie van het hele lichaam (WBA), vloeistofchromatografie-massaspectrometrie (LC-MS) en massaspectrometrie imaging (MSI).

MSI heeft zich in de afgelopen twee decennia ontwikkeld tot een techniek met een enorme toegevoegde waarde voor de farmaceutische industrie omdat het in staat is om medicijnen van metabolieten te scheiden en daarnaast in staat is om de locatie van deze moleculen in weefsels te meten. Hiermee is MSI in staat om aan twee van de drie vereisten voor de farmaceutische industrie te voldoen. Het meten van absolute concentraties met MSI is een uitdaging voor de MSI-gemeenschap. De grootste drempel hierin is het fenomeen ion suppressie. Dit wordt veroorzaakt doordat (naast het aanwezige medicijn en metabolieten) het monster ook bestaat uit andere moleculen die het ionisatieproces van het medicijn en zijn metabolieten kunnen verstoren waardoor deze minder goed ioniseren en daardoor deze minder goed te detecteren zijn. Om het effect van ion suppressie te minimaliseren presenteert dit proefschrift een aantal technologische ontwikkelingen in MSI die kunnen bijdragen aan een verbeterde kwantitatieve MSI-analyse van medicijnen en metabolieten.

Hoofdstuk 2 presenteert een platform dat LC-MS combineert met MSI, genaamd hoge resolutie vloeistof extractie oppervlakte analyse micro vloeistofchromatografie ionmobiliteitspectrometrie data onafhankelijke acquisitie (HR-LESA- μ LC-IMS-MS^E). Dit

platform laat de kracht van complementaire scheiding zien. Allereerst wordt aangetoond dat de monsterneming met HR-LESA uitgevoerd wordt met een lokale resolutie van 400 μm . Vervolgens wordt, na een korte online wasstap om zouten te verwijderen, een chromatografische scheiding (μLC) uitgevoerd welke opgevolgd wordt met een ionmobiliteitsspectrometrie (IMS) analyse en een data onafhankelijke acquisitie (MS^E). Twee verschillende neuropeptide applicaties worden getoond: de analyse van de hypofyse van ratten en de analyse van zieke en controle muishersenen uit een model waarin de ziekte van Alzheimer wordt onderzocht. Het analytische platform is niet alleen hoge reproduceerbaarheid maar vooral ook isobare scheiding door middel van μLC en IMS en een significante toename van het aantal gedetecteerde neuropeptiden door monsterscheiding voor de ionisatiestap door μLC .

Het gebruik van hoge resolutie IMS wordt verder bestudeerd in **Hoofdstuk 3**. Hierin worden lineaire cyclische IMS (cIMS), lineaire gevangen IMS (TIMS) en niet-lineaire veld asymmetrische golfvorm IMS (FAIMS) met elkaar vergeleken voor de isomere scheiding van een tiental prostanoiden, waaronder biologische relevante prostaglandine D_2 (PGD_2) en prostaglandine E_2 (PGE_2). Deze prostanoiden worden eerst gederiviseerd met Girard's reagens T om de ionisatie efficiëntie te vergroten. In de IMS-vergelijking wordt een significant verschil tussen lineaire en niet-lineaire IMS waargenomen. Lineaire IMS laat de hoogste intensiteit zien en niet-lineaire IMS de beste resolutie door zijn orthogonaliteit ten opzichte van MS. Een ander groot verschil is dat cIMS en TIMS in vacuüm plaatsvindt terwijl FAIMS bij atmosferisch druk uitgevoerd wordt. Dit zorgt ervoor dat de ion transmissie lager is in FAIMS door botsing met omgevingsmoleculen. Dat de totale transmissie van ionen cruciaal is in een techniek die na de ionisatiestap scheidt, blijkt uit de analyse van endogene prostanoiden in minivarken darmweefsel. De beperkte ion transmissie in FAIMS zorgt er, in combinatie met ion suppressie, voor dat een minimaal aantal ionen gedetecteerd wordt. Lineaire IMS laat een hogere intensiteit zijn maar er is daarentegen geen scheiding geobserveerd voor de biologische relevante isomeren PGD_2 en PGE_2 . Ons onderzoek laat zien dat hoge resolutie IMS een techniek kan zijn voor isomere scheiding van prostanoiden.

Hoofdstuk 4 introduceert een doelgerichte imaging analyse strategie, genaamd desorptie electrospray ionisatie (DESI) meerdere reactie monitoring (MRM) imaging. Dit werk rapporteert een lipiden en medicijn en zijn metabool applicatie waarin het voordeel van MRM imaging wordt gepresenteerd. MRM imaging heeft de volgende voordelen: i) vergrootte specificiteit en selectiviteit door de verschillende MRM overgangen van isobare moederionen, ii) met meerdere MRM overgangen van hetzelfde moederion kan de lokale distributie van dit analiet bevestigd worden, en iii) door de snelle optische omschakelingsmogelijkheid van een drievoudige quadrupool

massaspectrometer (QqQ) kunnen positieve en negatieve ionen in een experiment gedetecteerd worden. Het meten in een tandem massaspectrometrie (MS/MS) scan imaging modes wordt vergeleken met MRM imaging voor dezelfde moederionen. Doordat de eerste en derde quadrupool nu in selectie modes opereert in plaats van scanning modes in hetzelfde tijdsbereik, is de gevoeligheid significant toegenomen voor deze moederionen.

Deze gevoeligheidstoename van DESI-MRM wordt verder onderzocht als techniek voor kwantitatieve MSI (Q-MSI) in **Hoofdstuk 5**. Kwantificatie wordt uitgevoerd door middel van een geoptimaliseerd nabootsend weefselmodel. Hierin wordt een gelatineblok gemaakt uit een nieuw ontworpen 3D geprinte gietvorm met 15 pilaren waarin vervolgens kalibratielijnen van weefselhomogenaten wordt toegevoegd. MSI-experimenten worden uitgevoerd met verschillende massaspectrometers in verschillende modes: i) Xevo G2 Q-TOF in MS scan mode, ii) Synapt G2-Si Q-TOF in MS scan, IMS-MS scan en IMS-MS^E scan modes, en iii) Xevo TQS micro QqQ in MS scan en MRM modes. Het detectielimiet, lineariteit, precisie en accuraatheid wordt bepaald voor elk van de MS modes en vergeleken met elkaar. Over het algemeen is de analytische prestatie van MRM imaging het best en daarom is er voor de kwantitatieve analyse van vier hondenlevers gekozen voor DESI-MRM. De vergelijking van absolute concentraties uit Q-MSI met kwantitatieve LC-MRM experimenten is discutabel aangezien de LC-MRM analyse altijd op een gehomogeniseerde versie van het weefsel is waarin regionale verschillen verloren gaan. Om deze reden vergelijken we alleen regionale lever parenchym (door de substantiële bijdrage van lever parenchym aan de lever homogenaten) Q-MSI concentraties met de LC-MRM data: de absolute concentraties wijken een factor < 3,5 af.

De technologische ontwikkelingen die dit proefschrift presenteert dragen bij aan een toename in het aantal te detecteren analieten, betere isobare en isomere scheiding, hogere selectiviteit en gevoeligheid en uiteindelijk in een betere kwantitatieve presentatie van MSI in omgevingsomstandigheden.