



**TURUN
YLIOPISTO**

Matemaattis-luonnontieteellinen
tiedekunta

Ioniliikkuvuusmassaspektrometria saponiinien analytiikassa

Johanna Kaiti

Kemia
LuK-tutkielma
Laajuus: 6 op

28.4.2026
Turku

Turun yliopiston laatu järjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä.

Pääaine: Kemia

Tekijä: Johanna Kaiti

Otsikko: Ioniliikkuvuusmassaspektrometria saponiinien analytiikassa

Ohjaajat: Maarit Karonen, Juha-Pekka Salminen

Sivumäärä: 23 sivua

Päivämäärä: 28.4.2026

Saponiinit ovat kasvien ja joidenkin merieliöiden tuottamina erikoistuneita metaboliitteja. Niiden rakenne muodostuu hydrofobisesta aglykoniosasta, jota kutsutaan sapogeniiniksi, sekä hydrofiilisestä sokeriosasta. Sapogeniiniosaan voi olla kiinnittyneenä yksi tai useampi sokeriketju, jotka voivat olla lineaarisia tai haaroittuneita. Koska rakenne koostuu hydrofobisesta ja hydrofiilisestä osasta, saponiineilla on amfifiiliselle rakenteelle tyypillisiä kemiallisia ja fysikaalisia ominaisuuksia.

Kiinnostus saponiineja kohtaan on kasvanut vuosien kuluessa, kun niiden lääketieteellisesti merkittävistä ominaisuuksista on saatu enemmän tietoa. Saponiineilla on pinta-aktiivisia ominaisuuksia sekä monia lääketieteen kehityksen kannalta hyödyllisiä bioaktiivisia ominaisuuksia. Niillä on esimerkiksi antibakteerisia, sytotoksisia ja anti-inflammatorisia ominaisuuksia, joiden takia niitä käytetään lääkkeissä. Saponiinit ovat kuitenkin rakenteellisesti monimuotoinen yhdisteryhmä. Niillä esiintyy erityisesti isomeriaa, jonka takia niiden karakterisointi on vaikeaa pelkästään tavallisilla massaspektrometrian menetelmillä. Yksi keino rakenneisomeerien erottamiseen on ajateltu olevan ioniliikkuvuusmassaspektrometria (engl. ion mobility spectrometry–mass spectrometry, IMS-MS).

IMS-MS perustuu ionienliikkuvuuden mittaamiseen inertissä puskurikaasussa sähkökentän vaikutuksesta. Ionin kulkevat liikkuvuusalueella puskurikaasussa, jossa ne erotellaan koon, varauksen ja muodon mukaan. Liikkuvuusmittauksista saadaan tulokseksi törmäyspoikkipinta-alan arvoja, jotka kuvaavat ionien kolmiulotteista muotoa. Ionit kulkeutuvat liikkuvuusmittauksesta massa-analysointilaitteelle, jossa niistä saadaan massaspektrometrista dataa yhdistettynä ioniliikkuvuusdataan. IMS-MS on otettu keinoksi saponiinien rakenneisomeristen muotojen erotteluun toisistaan.

IMS-MS on nopea ja tehokas menetelmä ja sitä voidaan soveltaa kenttäolosuhteisiin pienentämällä laitteiston kokoa. IMS on suosittu yhdistelmä käytettäväksi LC-MS/MS-menetelmien kanssa ratkaistaessa saponiinien rakenteellisia isomeerejä. Menetelmän käytössä saponiinien analytiikassa on havaittu myös haasteita, joita yritetään ratkaista tulevaisuudessa.

Sisällysluettelo

Lyhenteet	1
1 Johdanto.....	3
2 Saponiinit	4
2.1 Saponiinien rakenne.....	4
2.2 Saponiinien käytön sovelluksia	5
2.3 Saponiinien analytiikan haasteet.....	6
3 Ioniliikkuvuusmassaspektrometria	7
3.1 Laitteisto ja toimintaperiaate.....	7
3.2 Tulosten tulkinta ja hyödynnettävyys.....	9
3.3 Ioniliikkuvuuden mittaustekniikat.....	10
4 Ionienliikkuvuusmassaspektrometria saponiinien analytiikassa	14
4.1 Menetelmän edut ja haasteet	15
4.2 Tulevaisuuden näkymät	18
5 Johtopäätökset.....	19
6 Viiteluettelo	21

Lyhenteet

ATD	Saapumisaikajakauma (engl. arrival time distribution)
CCS	Törmäyspoikkipinta-ala (engl. collision cross section)
CCS _{exp}	Kokeellisesti määritetty törmäyspoikkipinta-ala (engl. experimental collision cross section)
CID	Törmäyksen aikaansaama hajoaminen (engl. collision-induced dissociation)
cIMS	Syklinen ioniliikkuvuuspektrometria (engl. cyclic ion mobility spectrometry)
Cryo-IMS-MS	Kryogeeninen ioniliikkuvuusmassaspektrometria (engl. cryogenic ion mobility mass spectrometry)
DIMS	Differentiaalinen ionien liikkuvuuspektrometria (engl. differential ion mobility spectrometry)
DMS	Differentiaalinen liikkuvuuspektrometria (engl. differential mobility spectrometry)
DTIMS	Ajautumisputki-ioniliikkuvuusmassaspektrometria (engl. drift tube ion mobility mass spectrometry)
FAIMS	Kenttäasymmetrinen ioniliikkuvuuspektrometria (engl. field asymmetric ion mobility spectrometry)
IMS	Ioniliikkuvuuspektrometria (engl. ion mobility spectrometry)
IMS-MS	Ioniliikkuvuusmassaspektrometria (engl. ion mobility spectrometry-mass spectrometry)
LC-MS	Nestekromatografia-massaspektrometria (engl. liquid chromatography-mass spectrometry)
<i>m/z</i>	Massa-varaussuhde (engl. mass-to-charge ratio)
NMR	Ydinmagneettinen resonanssi (engl. nuclear magnetic resonance)
QQQ	Kolmoiskvadrupoli (engl. triple quadrupole)
SLIM	Tekniikka, joka mahdollistaa ionien häviöttömän siirron (engl. structures for lossless ion manipulation)
<i>t_D</i>	Ajautumisaika (engl. drift time)
TIMS	Loukkuun perustuva ioniliikkuvuusmassaspektrometria (engl. trapped ion mobility spectrometry)
TOF	Lentoaika (engl. time-of-flight)

QTOF	Kvadrupoli-lentoaika (engl. quadrupole time-of flight)
TWIMS	Kulkeutumisaaltoioniliikkuvuuspektrometria (engl. travel wave ion mobility spectrometry)
Å	Ångström

1 Johdanto

Saponiinit ovat muun muassa kasvien, merikurkkujen sekä meritähtien tuottamia erikoistuneita metaboliitteja. Saponiinit ovat saaneet nimensä latinasta. Niiden nimi juontaa juurensa latinan kielen sanasta ”sapo”, joka suomennettuna tarkoittaa saippuaa. Saponiinit voivatkin tuottaa vaahtoa, minkä takia saponiineja sisältäviä kasveja on käytetty jo tuhansia vuosia sitten muun muassa pyykin pesemiseen (Fordos et al., 2025). Saponiineilla on myös monia muita käyttökohteita elintarvikkeissa, lääketieteessä, kosmetiikassa sekä maataloudessa (Güçlü-Üstündağ and Mazza, 2007).

Lisääntyneen tutkimuksen ja teknologian kehityksen myötä kiinnostus saponiineja kohtaan on lisääntynyt viimeisten vuosien aikana. Tieto saponiinien ominaisuuksista, terveysvaikutuksista ja lääketieteellisesti merkittävistä sovelluksista on kasvanut, joten kiinnostus niiden analytiikankin kehittämiseen on lisääntynyt vuosien varrella (Decroo et al., 2017). Mullistava muutos analytiikassa oli massaspektrometrinen menetelmien kehitys. Tällä menetelmällä saatiin tarkkaa dataa yhdisteistä ja saponiineja pystyttiin erottelemaan niiden massan perusteella.

Ioniliikkuvuuden yhdistäminen massaspektrometriin tuo uuden ulottuvuuden analytiikkaan ja tarjoaa vielä tarkempaa dataa saponiinien karakterisointia varten. Ioniliikkuvuusmassaspektrometrialla saadaan eroteltua yhdisteet niiden koon, muodon sekä varauksen mukaan. Tekniikka perustuu ionien liikkuvuuteen inertissä kaasussa, kuten heliumissa tai työssä, voimakkuudeltaan tietynlaisen sähkökentän vaikutuksesta (Dodds and Baker, 2019). Tähän laitteistoon voidaan vielä liittää kromatografi, kuten nestekromatografi tai kaasukromatografi, joka pystyy erottelemaan yleensä seoksina näytteessä esiintyvät saponiinit. Nestekromatografia erottelee näytteen yhdisteet laitteiston kolonnissa olevan kiinteän faasin ja liikkuvan faasin kanssa muodostuvien vuorovaikutusten perusteella (Bird, 1989). Kaasukromatografiassa erona on, että kolonnin sisällä inertti kaasu kuljettaa yhdisteitä kohti massa-analysointia. Ioniliikkuvuusmassaspektrometrilla, johon on yhdistetty jokin kromatografi, saadaan erittäin tarkkaa tietoa saponiineista ja niiden eroavaisuuksista.

Suurin ongelma saponiinien analytiikassa on eri yhdisteiden välillä esiintyvä isomeria. Isomerialla tarkoitetaan, että yhdisteillä on sama molekyylikaava ja massa, mutta niiden rakenteet eroavat toisistaan. Tandemmassaspektrometrilla saponiineja tutkitaan ionisoimalla yhdisteitä ja altistamalla niitä törmäyksille kaasumolekyylejä vastaan, jolloin ionit fragmentoituvat (CID, engl. collision induced dissociation) (Decroo et al., 2017). Isomeeristen rakenteiden fragmentaatiot ovat kuitenkin usein samanlaisia ja massaspektrit näyttävät tällöin

samanlaisilta. Massaspektrometrialla on vaikea tunnistaa näitä eroavaisuuksia, minkä takia on tutkittu ioniliikkuvuuden hyödyntämistä saponiinien analytiikassa (Colson et al., 2019).

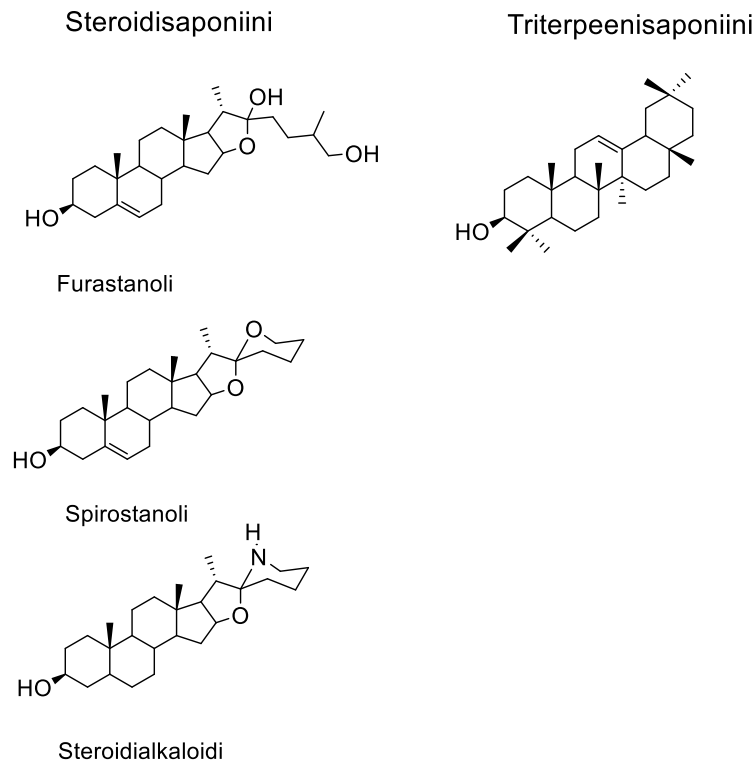
Tässä tutkielmassa esitellään ioniliikkuvuusmassaspektrometrian hyödyntämistä saponiinien analytiikassa. Tutkielmassa käsitellään ioniliikkuvuuden eri mittaamenetelmiä sekä niiden etuja ja haasteita ajatellen saponiinien karakterisointia. Lopuksi vielä katsotaan menetelmän tulevaisuuden näkymiä.

2 Saponiinit

2.1 Saponiinien rakenne

Saponiinit ovat kasvien ja joidenkin merieliöiden, kuten meritähtien ja merikurkkujen, tuottamia yhdisteitä (Faizal and Geelen, 2013). Ne ovat kasvien tuottamia erikoistuneita metaboliitteja eli ne eivät ole välttämättömiä kasvin aineenvaihdunnalle, toisin kuin primääriset metaboliitit, jotka osallistuvat tärkeisiin aineenvaihdunnallisiin prosesseihin. Saponiinit osallistuvat kasveissa niiden suojelemaan tuholaisia, loisia ja muita taudinaiheuttajia vastaan (Faizal and Geelen, 2013).

Saponiinien rakenne koostuu tyypillisesti aglykoniosasta, jota kutsutaan sapogeniiniksi, sekä siihen kiinnittyneistä sokeriosista, joita voi olla yhdestä jopa yhteentoista yksikköä (Güçlü-Üstündağ and Mazza, 2007). Saponiinien erottelu perustuu sapogeniinin biosynteesireittiin ja siitä muodostuvaan sapogeniiniosaan (Fordos et al., 2025). Saponiinit luokitellaan steroidisaponiineihin ja triterpeenisaponiineihin niiden sapogeniinin perusteella. Triterpeenisaponiineissa sapogeniinin runko koostuu 30 hiilen runkorakenteesta ja steroidisaponiineissa sapogeniininosa koostuu taas 27 hiilen rengasmaisesta runkorakenteesta (Faizal and Geelen, 2013). Steroidisaponiinit erotellaan vielä furastanoli-, spirostanoli- ja steroidialkaloidisaponiineihin. Kuvassa 1 on esitetty havainnollistavia rakenteita eri sapogeniiniolosien rakenteista.



Kuva 1. Esimerkkirakenteita saponiinien aglykoniosista.

Saponiinit voidaan myös luokitella niiden sokeriosien mukaan mono-, bi-, tri- ja polydesmosideihin (Güçlü-Üstündağ and Mazza, 2007). Tämä luokittelu siis kertoo, kuinka monta sokeriketjua saponiinin sapogeniiniosaan on kiinnittynyt. Sokeriketjut voivat olla haaroittuneita tai lineaarisia oligosakkarideista koostuvia ketjuja (Decroo et al., 2019).

Steroidisaponiineja on yleensä yksisirkkaisissa kasvilajeissa, kun taas triterpeenisisaponiineja on erityisesti kaksisirkkaisissa kasveissa (Güçlü-Üstündağ and Mazza, 2007). Saponiineja löytyy eri kasvien eri osista kuten kukista, siemenistä, juurista, varresta tai lehdistä ja ne esiintyvät yleensä seoksissa (Fordos et al., 2025). Merieliöissä saponiineja esiintyy muun muassa kehon eri seinämissä, sukupuolirauhasissa ja muissa elimissä (Decroo et al., 2017).

2.2 Saponiinien käytön sovelluksia

Saponiinien kaikkia ominaisuuksia ja biologista roolia kasveissa tai eläimissä ei vielä tiedetä, mutta niiden selvittäminen on tärkeää niiden käytettävyyden kannalta (Decroo et al., 2017). Saponiinien tunnetut fysikaaliset ja kemialliset ominaisuudet ovat peräisin niiden rakenteesta. Saponiinit koostuvat hydrofobisesta sapogeniiniosta ja siihen liittyneistä hydrofiilisista sokeriosista. Tämän rakenteen seurauksena saponiineilla on pinta-aktiivisia ominaisuuksia. Ne

voivat esimerkiksi muodostaa vaahtoa, emulsioita ja vesiliuoksessa misellejä (Güçlü-Üstündağ and Mazza, 2007). Tämän takia niitä käytetään hyödyksi muun muassa saippuoissa, kosmetiikassa ja pyykinpesemisessä. Vaahdonmuodostuksen takia niitä on myös hyödynnetty elintarvikkeissa, kuten virvoitusjuomissa, mutta saponiineilla on muitakin elintarvikkeissa hyödynnettäviä sovelluksia kuten emulgointiaineina tai makuaineena (Güçlü-Üstündağ and Mazza, 2007). Saponiineja voidaan käyttää hyödyksi ravintolisissä ja elintarvikkeissa, sillä niillä on todettu olevan kolesterolia sekä verenpainetta alentavia vaikutuksia (Fordos et al., 2025).

Saponiineja voidaan hyödyntää monilla eri teollisuuden aloilla. Saponiineja käytetään muun muassa lääke- ja kosmetiikkateollisuudessa sekä maataloudessa (Güçlü-Üstündağ and Mazza, 2007). Erityisesti lääketeollisuus on kiinnostunut saponiinien monipuolisista kemiallisista ja fysikaalisista ominaisuuksista sekä biologisista aktiivisuuksista. Lääkekehityksessä saponiineja käytetään hyödyksi muun muassa rokotekehityksessä (Güçlü-Üstündağ and Mazza, 2007). Niitä voidaan käyttää adjuvantteina eli tehosteaineina, sillä ne auttavat suurtenkin molekyylien imeytymisessä solukalvon läpi (Güçlü-Üstündağ and Mazza, 2007). Saponiineilla on todettu olevan monia hyödyllisiä farmakologisia ja terveyttä edistäviä vaikutuksia ja niitä pyritään löytämään yhä enemmän (Fordos et al., 2025). Joidenkin saponiinien on havaittu muun muassa ehkäisevän tulehdusta ja toisten syöpää (Fordos et al., 2025). Jotkin saponiineista voivat tuottaa myös aineita, joita voidaan hyödyntää sydän- ja verisuonitautien tai reuman hoidossa (Fordos et al., 2025).

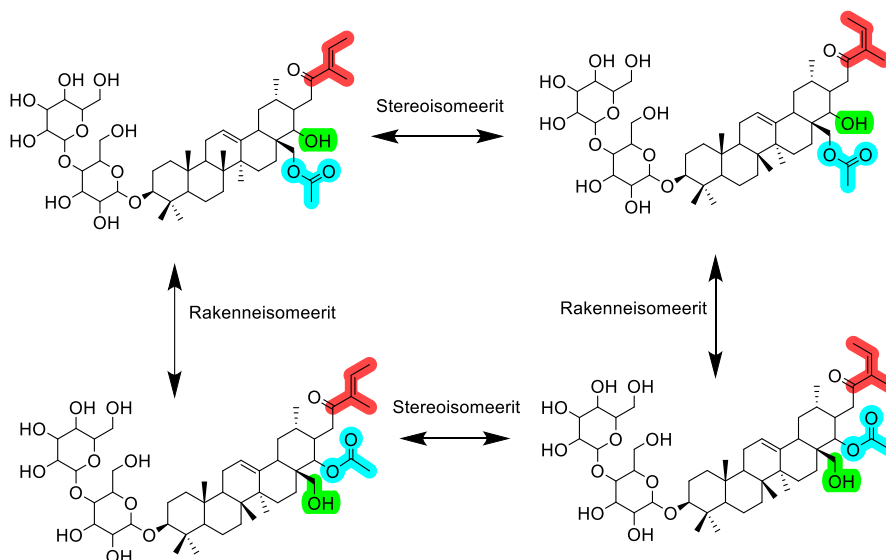
2.3 Saponiinien analytiikan haasteet

Saponiinit ovat hyvin monimuotoinen yhdisteryhmä. Niiden käyttösovellusten haasteena on niiden puhdistaminen ja rakenteellisen tiedon saaminen (Decroo et al., 2019). Rakenteellisen monimuotoisuuden takia niiden analysointi on osoittautunut vaikeaksi pelkillä tavanomaisilla massaspektrometrisillä menetelmillä, ja koko ajan kehitetään uudenlaisia keinoja niiden karakterisoimiseen (Colson et al., 2019). Saponiinit voivat myös esiintyä monien yhdisteiden seoksina, joka vaikeuttaa yhdisteiden erottelua toisistaan varsinkin, jos yhdisteet ovat rakenteellisesti lähellä toisiaan.

Saponiinien uuttaminen on haastavaa juurikin saponiinien rakenteellisen monimuotoisuuden takia (Fordos et al., 2025). Saponiinit esiintyvät seoksina, joissa on monia rakenteellisesti toisistaan eroavia yhdisteitä. Tämän rakenteellisen monimuotoisuuden takia

saponiineja on vaikea uuttaa, sillä niiden erilaiset liukoisuudet hankaloittavat liottimen valintaa (Fordos et al., 2025). Jotkut saponiinit ovat vesiliukoisempia ja toiset rasvaliukoisempia.

Edellä mainittujen ongelmien lisäksi haaste saponiinien analytiikassa on, että niillä esiintyy isomeriaa, eli eri yhdisteillä on sama molekyylipaino, jolloin massaspektrometriset menetelmät antavat niille saman massavaraussuhteen m/z , mutta yhdisteiden rakenteet ovat kuitenkin erilaiset. Esimerkiksi yksi saponiinien rakenneisomerian muodoista on, että funktionaalinen ryhmä sijaitsee eri kohdassa, jolloin puhutaan paikkaisomeriasta eli regioisomeerisistä rakenteista. Toinen saponiinien isomerian muoto on, että atomien keskinäinen sitoutumisjärjestys on sama, mutta niiden avaruudellinen suuntautuminen on eri. Tällöin kyseessä ovat stereoisomeeriset rakenteet (Colson et al., 2019). Esimerkki avaruudellisen aseman vaihtelusta on *cis-trans*-isomeria, jossa kaksoissidoksen hiilien funktionaaliset- tai atomiryhmät ovat samalla tai eripuolilla sidosta. Kuvassa 2 on esitelty esimerkkinä isomeeriset muodot ja iserialajit.



Kuva 2. Esimerkki saponiineilla esiintyvistä isomeriasta ja sen lajeista. Stereoisomeeriset rakenteet ovat värjätty punaisella ja paikkaisomeeriset rakenteet sinisellä ja vihreällä (Colson et al., 2019).

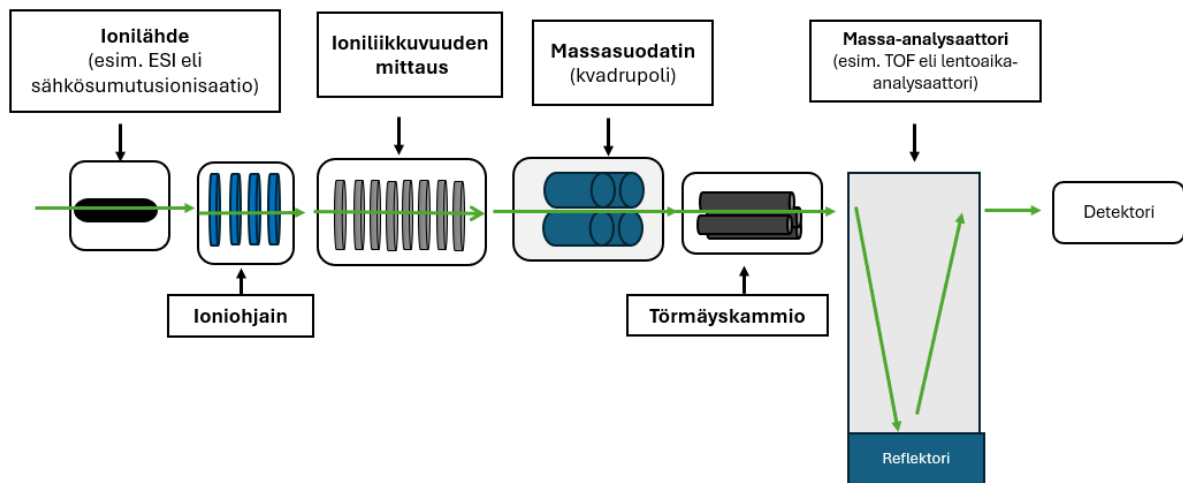
3 Ioniliikkuvuusmassaspektrometria

3.1 Laitteisto ja toimintaperiaate

Ioniliikkuvuuspektrometria (IMS eng. ion mobility spectrometry) määrittää ionien liikkuvuuden jossain inertissä kaasussa sähkökentän vaikutuksesta (Dodds and Baker, 2019). Inerttinä kaasuna toimii yleensä helium tai typpi. Ioniliikkuvuuspektrometriassa erottelu perustuu ionien kokoon, muotoon ja varaukseen. Kooltaan ja varukseltaan pienemmät ionit

liikkuvat nopeammin inertissä kaasussa kuin kooltaan tai varaukseltaan suuremmat ionit (Masike et al., 2021).

Ioniliikkuvuusmassaspektrometriassa IMS-yksikkö on yhdistetty massaspektrometriin, jolloin puhutaan IMS-MS-laitteistosta (engl. ion mobility spectrometry–mass spectrometry). Kuvassa 3 on esitetty esimerkki laitteiston rakenteesta. IMS-MS yhdistelmä mahdollistaa nopean ja tarkan ionien erottelun (Dodds and Baker, 2019).



Kuva 3. Esimerkkikuva ioniliikkuvuusmassaspektrometrin rakenteesta (May and McLean, 2015; Stow et al., 2017).

Ioniliikkuvuusputkeen voidaan yhdistää erilaisia massa-analysaattoreita (Kanu et al., 2008). Yleisin yhdistelmä on liikkuvuusputken yhdistäminen lentoaikamassa-analysaattoriin (TOF, engl. time of flight). TOF:n etuna on sen nopeus ja sen kyky muodostaa satoja massaspektrejä yhdessä liikkuvuusmittauksessa. Toinen massa-analysaattori, joka voidaan yhdistää liikkuvuusputkeen, on yksöiskvadrupoli. Tässä tapauksessa yksi kvadrupoli pystyy valitsemaan vain tietyt ionit. Tämän massa-analysaattorin skannausnopeus on hitaampi kuin TOF:ssa, mutta sitä voidaan hyödyntää paremmin yksittäisten ionien spesifiseen detektointiin. Yksöiskvadrupoli asetetaan seuraamaan vain tiettyjä ioneja, jolloin saadaan spesifisesti tietoa vain halutuista ioneista (Kanu et al., 2008). Kolmas vaihtoehto on yhdistää liikkuvuusputkeen ioneja loukuttava massaspektrometri, kuten esimerkiksi Orbitrap. Orbitrapilla on myös hitaampi skannausnopeus kuin TOF:illa, mutta se on tunnettu erittäin hyvästä massaresoluutiostaan ja tarkkuudestaan, minkä takia sitä käytetäänkin tarkan tiedon saamiseen (Ibrahim et al., 2016). On myös mahdollista yhdistää kaksi massa-analysaattoria peräkkäin. Tällöin voidaan käyttää kolmoiskvadrupolia (QQQ, engl. triple quadrupole) tai kvadrupoli-lentoaikamassa-analysaattoria (Q-TOF, engl. quadrupole-time of flight). Molemmissa

ensimmäinen analysaattori on kvadrupoli, jossa tunnistetaan spesifit ionit niiden m/z -arvojen perusteella (Bocxlaer et al., 2005). Q-TOF:ssa toinen analysaattori on lentoaika-analysaattori ja QQQ:ssa se on toinen kvadrupoli (Bocxlaer et al., 2005). Q-TOF sopii tuntemattomien yhdisteiden analysointiin, kun taas QQQ sopii paremmin fragmentaation tarkasteluun ja on herkempi tunnistamaan haluttuja yhdisteitä monimutkaisista seoksista (Bocxlaer et al., 2005). Laitteistoon voidaan myös lisätä nestekromatografi tai kaasukromatografi ennen ionienliikkuvuuslaitteistoa. Tämä mahdollistaa vielä paremman erottelukyvyn ennen yhdisteiden ionisointia ja auttaa yhdisteiden tunnistamisessa ja erottelussa toisistaan (Masike et al., 2021).

3.2 Tulosten tulkinta ja hyödynnettävyys

Ionienliikkuvuutta voidaan kuvata monilla eri tavoilla. Yksi tapa on kuvata ionien liikkuvuutta K :n avulla, joka on ionienliikkuvuuskerroin. Ionit kulkevat sähkökentän läpi jollain tietyllä nopeudella v_d , joka on yhteydessä ionien liikkuvuuden kanssa. Kaavalla 1 voidaan määrittää ionienliikkuvuuskerroin K ja saadaan yhteys liikkuvuuden, sähkökentän voimakkuuden E ja ionin ajautumisnopeuden v_d välille (Dodds and Baker, 2019).

$$K = \frac{v_d}{E} \quad (1)$$

Toinen tapa esittää ioniliikkuvuudesta saatuja tuloksia on muuttaa ne törmäyspoikkipinta-aloiksi (CCS, engl. collision cross-section), joita merkitään myös yhtälöissä omegalla Ω ja sen yksikkönä toimii Ångström potenssiin kaksi eli Å² (Dodds and Baker, 2019). Törmäyspoikkipinta-alat voidaan määrittää kokeellisesti ioniliikkuvuusmenetelmien avulla sekä laskennallisen kemian avulla. CCS-arvot perustuvat Mason-Schamp-yhtälöön, joka on esitetty kaavassa 2 (Stow et al., 2017). Molekyylidynamiikkaa hyödyntäen on mahdollista tuottaa stimulaatioiden pohjalta CCS-arvoja ja muodostaa eri yhdisteille teoreettiset CCS-arvot, joita voidaan vertailla kokeellisten arvojen kanssa (Colson et al., 2019).

$$CCS = \frac{(18\pi)^{1/2}}{16} \frac{ze}{(k_b T)^{1/2}} \left[\frac{1}{m_i} + \frac{1}{m_B} \right]^{1/2} \frac{t_{AE}}{L} \frac{760}{P} \frac{T}{273,15} \frac{1}{N} \quad (2)$$

missä z on ionin varaus, e = elektronin varaus, k_b = Boltzmannin vakio, T = ajautumisputken lämpötila, m_i = ionin massa, m_B = inertin kaasun massa, t_A = mitattu saapumisaika, E = sähkökentän voimakkuus, L = ajautumisputken pituus, P = ajautumisputkessa oleva paine ja N = inertin kaasun hiukkastiheys normaalilämpötilassa ja -paineessa (Stow et al., 2017).

Törmäyspoikkipinta-alat kertovat ionien kolmiulotteisesta muodosta ja koosta. Ne saadaan muodostettua kokeellisesti saaduista saapumisaikajakaumista (ATD engl. arrival time distribution) muodostuvista spektreistä. Törmäyspoikkipinta-alan määrittäminen perustuu ionien törmäyksiin liikkuvuusputkessa olevien kaasumolekyylien kanssa, jolloin niiden liike hidastuu putkessa (Marchand et al., 2017). Kooltaan suuremmat ionit törmäävät kaasumolekyyliin enemmän ja näin ollen niiden liike hidastuu enemmän kuin pienempien ionien, jotka saapuvat detektorille näin ollen nopeammin.

Ioniliikkuvuusmassaspektrometriaa voidaan soveltaa eri tarkoituksiin. Yksi käyttökohteista on isomeeristen yhdisteiden erottelu, jossa saadaan rakenteeltaan erilaiset yhdisteet eroteltua liikkuvuutensa avulla. Rakenteentutkimuksissa, kuten proteomiikassa tai lipidien analysoinnissa, hyödynnetään IMS-MS:ää proteiinien ja lipidien kolmiulotteisen muodon ja koon selvittämiseen (Márquez-Sillero et al., 2011).

Ioniliikkuvuusmassaspektrometriaa voidaan käyttää hyödyksi kemiallisten sodankäyntiaineiden sekä muiden ympäristöön päätyvien myrkyllisten yhdisteiden analysoinnissa ja havaitsemisessa (Mäkinen et al., 2010). Viranomaiset ja lääketeollisuus käyttävät menetelmää myös esimerkiksi aineiden turvallisuuksien ja laadun varmistamiseen (Mäkinen et al., 2010; Márquez-Sillero et al., 2011). IMS-MS:n avulla voidaankin tunnistaa muun muassa huumeita, kiellettyjä lääkkeitä ja räjähdysaineita. Ioniliikkuvuusmassaspektrometrejä on kehitetty myös kenttäolosuhteisiin. Ne toimivat ilmanpaineessa, niiden toimimiseen ei tarvita laboratorion välineistöä eivätkä ne ole kooltaan yhtä suuria kuin laboratorioissa käytettävät laitteet (Mäkinen et al., 2010). Kaikkiin edellä mainittuihin sovelluksiin IMS sopii sen nopeuden takia. IMS antaa nopeasti vasteen, jos jossain näytteessä on haettua yhdistettä (Márquez-Sillero et al., 2011).

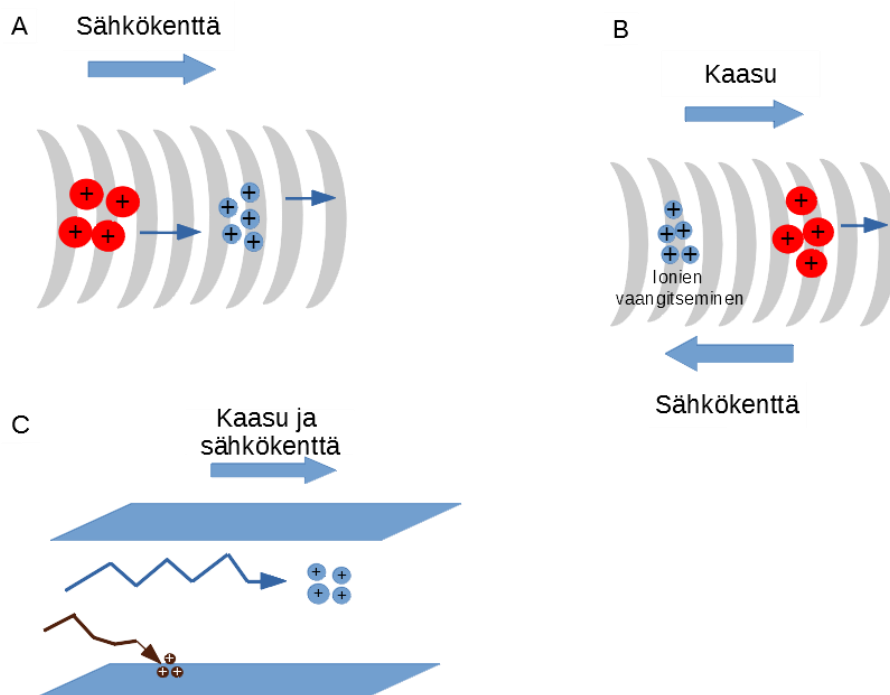
3.3 Ioniliikkuvuuden mittaustekniikat

Ionienliikkuvuutta voidaan mitata eri tavoin. Tekniikat voidaan jakaa kolmeen eri kategoriaan sen mukaan, miten ioniliikkuvuutta mitataan. Ensimmäinen kategoria (Kuva 4A) on aikaan perustuvat mittaustekniikat (May and McLean, 2015). Tällaisissa menetelmissä analyysissä

mitataan ionien kulkemiseen kulunutta aikaa ioniliikkuvuusalueella ja tuloksena saadaan saapumisaikajakaumat (Marchand et al., 2017). Tulokseksi saadaan siis saapumisaikaan pohjautuva spektri.

Toinen kategoria (Kuva 4B) on ionien vangitseminen ja valikoitu vapauttaminen (May and McLean, 2015). Tekniikka perustuu ionien vangitsemiseen liikkuvuusalueella. Tällaiset menetelmät ovat hieman uudempia verrattuna edellä mainittuihin menetelmiin. Tekniikassa sähkökenttä vangitsee ionit ja päästä ne vapautumaan kaasuun sähkökentän voimakkuutta muutettaessa (Michelmann et al., 2015).

Kolmas kategoria (Kuva 4C) on ionien paikkaan tai reittiin perustuva jaottelu (May and McLean, 2015). Tällaisissa analyyseissä erottelu tapahtuu ionien kulkeman reitin mukaan eikä vertailla ionien saapumisaikoja. Ionit kulkevat eri reittiä liikkuvuusalueella ja vain osa niistä päätyy massa-analysaattorille. Muut ionit törmäävät liikkuvuusputken seinämiin, joten kyseessä on valikoiva menetelmä, jolla tunnistetaan vain spesifisesti haluttuja ioneja (Dodds and Baker, 2019)



Kuva 4. Ioniliikkuvuuden mittaustekniikat. A kuvaa saapumisaikaan perustuvia menetelmiä, joissa inerti kaasu on paikallaan, B ionien vangitsemiseen perustuvia menetelmiä ja C ionien kulkemaan reittiin perustuvaa menetelmää. Kuvassa on esitetty nuolilla ionien kulkusuunta sekä sähkökentän ja kaasun kulkusuunta (Dodds and Baker, 2019; Mäkinen et al., 2010).

Käytännössä ioniliikkuvuuden mittaamenetelmiä on monia. Ne perustuvat kaikki edellä mainittuihin periaatteisiin. Tässä tutkielmassa keskitytään vain muutamaaan menetelmään monista. Tutkielmassa esitellään kaksi saapumisaikaan perustuvaan tekniikkaa, yksi ionien vangitsemiseen perustuva tekniikka ja yksi reittiin perustuva liikkuvuustekniikka. Kaikki käsitellyt tekniikat ovat kaupallisesti merkittäviä ja laajasti käytössä.

Ajautumisputki-ioniliikkuvuusspektrometria (DTIMS, engl. drift tube ion mobility spectrometry) on yksi ioniliikkuvuudenmittaustekniikoista, joka perustuu saapumisajan mittaamiseen (May and McLean, 2015). DTIMS-menetelmän periaatteena on, että paineistetussa ajautumisputkessa on paikallaan oleva puskurikaasu, jonka läpi kulkee tasainen sähkökenttä. Putkessa on rengaselektrodeja, jotka tuottavat jännitettä ja tämä jännite saa aikaan sähkökentän (Dodds and Baker, 2019). Ionit liikkuvat sähkökentän kuljettamina kohti massa-analysointia liikkuvuutensa perusteella, muodostaen saapumisaikajakauman, josta voidaan laskea ioneille CCS-arvot (Stow et al., 2017). DTIMS on ainoa ioniliikkuvuuden mittaamenetelmä, jolla saadaan mitattua CCS-arvoja ilman kalibrointia. Menetelmällä voidaan laskea CCS-arvot aiemmin esiteltyyn Mason-Schamp-yhtälön mukaisesti (kaava 2) käyttäen hyödyksi kokeellisesti mitattua saapumisaikaa (Dodds and Baker, 2019). DTIMS:n käytössä voi esiintyä haasteita, koska DTIMS käyttää ionien pulssittamista eli ionit kulkeutuvat liikkuvuusputkeen ionipulsseina. Tämä voi johtaa ionihäviöihin ja työjakson lyhenemiseen, mikä heikentää menetelmän herkkyyttä ja tehokkuutta (Shvartsburg and Smith, 2008).

Kulkeutumisaaltoioniliikkuvuusspektrometria (TWIMS, engl. traveling wave ion mobility spectrometry) on myös menetelmä, jossa mitataan saapumisaikaa ioneille. TWIMS on nykyään yksi suosituimmista ja käytetyimmistä kaupallisesti saatavilla olevista IMS-MS-menetelmistä. Menetelmässä liikkuvuusalueella kaasu on paikallaan ja putken läpi kulkee potentiaaliaaltoja (Shvartsburg and Smith, 2008). TWIMS-menetelmässäkin putken sisällä on rengaselektrodeja, joista muodostuu sähkökenttä. Värähtelevä sähkökenttä saa aikaan liikkuvuusputkessa potentiaaliaaltoja ja näiden aaltojen mukana ionit kulkeutuvat kohti massa-analysointia (Dodds and Baker, 2019). Kulkeutumisaaltoioniliikkuvuusspektrometrian sovellus on syklinen ioniliikkuvuusspektrometria (cIMS, engl. cyclic ion mobility spectrometry). Ioniliikkuvuutta mitattaessa halutaan päästä aina mahdollisimman hyvään erotuskykyyn. Tätä voidaan hahmottaa yhtälön 3 avulla (Giles et al., 2019).

$$R \sim \left(\frac{LEz}{T} \right)^{1/2} \quad (3)$$

missä R on erotuskyky, L on putken pituus, E on sähkökentän voimakkuus, z ionin varaus ja T inertin kaasun lämpötila.

Erotuskyvyn ajatellaan olevan riippuvainen muun muassa ajautumisputken pituudesta. Putkea pidentämällä saataisiin siis aikaan parempi erotuskyky kulkeutumisaaltoja käytettäessä. Tätä varten on kehitetty cIMS, jossa ajautumisputki on pyöreä ja ionit kulkevat sen läpi useita kertoja potentiaaliaaltojen mukana (Giles et al., 2019). Mitä useamman kierroksen ionit kulkevat pyöreässä ajautumisputkessa, sitä pidempi niiden kulkema matka on ja erotuskyky paranee. TWIMS-menetelmän heikkoutena on kuitenkin se, että sen avulla ei voida mitata suoraan CCS-arvoja, toisinkuin DTIMS-menetelmällä (Dodds and Baker, 2019). TWIMS tarvitsee kalibrointiin DTIMS:llä jo valmiiksi mitattuja ja määritettyjä CCS-arvoja kalibraatiokäyrän muodostamista varten. Saadun kalibraatiokäyrän avulla voidaan tunnistaa tuntemattomia yhdisteitä ja laskea niille CCS-arvoja (Dodds and Baker, 2019). TWIMS-tekniikoissa käytetään myös ionien pulssitusta siirrettäessä ioneja ionilähteestä liikkuvuusalueelle, joten sen haasteet työjaksossa ja ionien häviössä ovat samankaltaiset kuin edeltävällä DTIMS-menetelmällä (Shvartsburg and Smith, 2008).

Ionien loukuttamiseen perustuva ioniliikkuvuuden mittausmenetelmä (TIMS, engl. trapped ion mobility spectrometry) on uusi ionien liikkuvuuden mittaukseen kehitetty tekniikka. TIMS toimii päinvastaisesti edellisiin liikkuvuusmittauksiin verrattuna. Ionien liikkuvuusalueella inertti kaasu ei olekaan paikallaan, vaan tässä menetelmässä se on liikkuva. Kaasun liike kulkee kohti massa-analysointia, jossa massa-analyysi tapahtuu (Dodds and Baker, 2019). TIMS:ssä sähkökenttä on vastakkaisuuntainen kaasun kulkusuuntaan nähden ja se niin sanotusti vangitsee ionit ja pitää ne paikallaan kaasuvirtausta vasten. Sähkökenttä siis vastustaa liikkuvan kaasun mukana olevien ionien kulkua ja pitää ne paikallaan. Menetelmässä sähkökentän voimakkuutta muutetaan hiljattain, jolloin vangitut ionit vuorotellen liikkuvuutensa mukaan irtoavat sähkökentästä sekä eluoituvat kaasuun ja kulkevat massa-analysointia varten (Michelmann et al., 2015).

TIMS-menetelmällä pystytään laskemaan CCS-arvoja vapautumisjännitteen perusteella, mutta tämäkin menetelmä ei TWIMS:n tavoin pysty määrittämään niitä itsestään. Tästä pääsemmekin menetelmän heikkouksiin. TIMS tarvitsee kalibroinnin tunnetuilla standardeilla eli sillä ei saada suoraan selvitettyä CCS-arvoja toisin kuin DTIMS:llä (Dodds and Baker, 2019). TIMS:llä on myös paljon hyviä puolia, kuten sen parametrien muokattavuus, jolloin se toimii hyvin sopeutuvana menetelmänä eri tilanteissa. Lisäksi se pysyy erottelemaan yhdisteitä toisistaan, vaikka niiden K_n arvot olisivat lähekkäin (Michelmann et al., 2015).

Kenttäasymmetrinen ioniliikkuvuuspektrometria (FAIMS, engl. field asymmetric ion mobility spectrometry) on yksi esimerkki reittiin perustuvasta ioniliikkuvuuspektrometriasta. Muihin menetelmiin verrattuna FAIMS toimii ilmanpaineessa. Menetelmä perustuu liikkuvaan

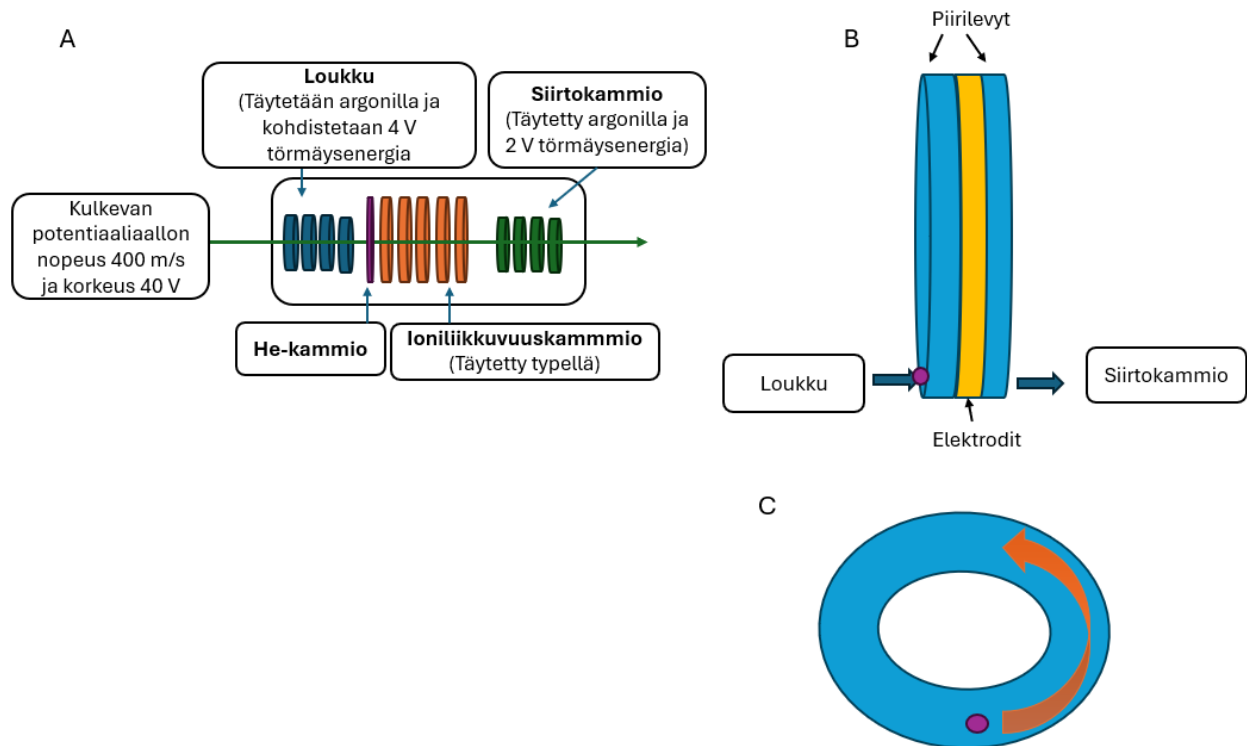
puskurikaasuun ja sähkökentän vaihteluun voimakkaan ja heikon kentän välillä. Kaasu virtaa kohti massa-analysointia ja kuljettaa ioneja sitä kohti (Mäkinen et al., 2010). FAIMS-laitteistossa on laattamaiset elektrodit, jotka muodostavat epäsymmetrisen sähkökentän. Vaihtelevat sähkökentät saavat ionit sivuttaisliikkeeseen ajautumisputkessa eli niin sanotusti pois suoralta reitiltään. Sähkökentän voimakkuudesta aiheutuva sivuttaisliike kompensoidaan eri voimaisilla kompensatiojännitteillä, milloin vain juuri oikean voimakkuuden kompensatiojännitteeseen reagoivat ionit palaavat takaisin entiselle kulkureitilleen (Márquez-Sillero et al., 2011). Vain ne ionit, jotka palautuvat kulkemaan suoraa reittiä, pääsevät massa-analysointia ja muut törmäyvät liikkuvuusalueen seiniin. FAIMS-yksikkö siis toimii niin sanottuna suodattimena ioneille (Dodds and Baker, 2019).

Tämän menetelmän heikkous on kuitenkin se, että sen avulla ei voida mitata yhdisteille CCS-arvoja (Dodds and Baker, 2019). Näin ollen tätä menetelmää ei voida verrata muihin edellä mainittuihin menetelmiin, eikä sen tuloksista saada vertailtavia tuloksia DTIMS:n, TWIMS:n tai TIMS:n kanssa. Positiivisena puolena menetelmällä on sen spesifisyys (Dodds and Baker, 2019). FAIMS:illa voidaan spesifisesti valita vain tietyt analysoitavat yhdisteet, joiden ionit pääsevät läpi sähkökentästä ja näin ollen analysointia. FAIMS vähentää taustakohinaa, kun se päästää läpi vain halutut ionit ja signaali-kohinasuhde paranee (Dodds and Baker, 2019). FAIMS:in kanssa samankaltaisia menetelmiä, jotka perustuvat sähkökentän vaihteluun ovat differentiaalinen liikkuvuuspektrometria (DMS, engl. differential mobility spectrometry) ja differentiaalinen ionien liikkuvuuspektrometria (DIMS, engl. differential ion mobility spectrometry). Niiden toimintaperiaate on sama, mutta menetelmät eroavat toisistaan ajautumisputken sisällä olevien elektrodien geometrian johdosta (Dodds and Baker, 2019).

4 Ionienliikkuvuusmassaspektrometria saponiinien analytiikassa

Aiemmin paras keino saponiinien monimutkaisten rakenteiden karakterisointiin oli ydinmagneettisen resonanssispektroskopian mittaukset (NMR, eng. nuclear magnetic resonance spectroscopy) niiden rakenteellisen eroavaisuuden erottamiseen. Nykypäivänä kuitenkin massaspektrometria on tuonut uusia keinoja saponiinien analytiikkaan (Decroo et al., 2019). Massaspektrometriaa käytetään NMR-mittausten tukena eri saponiimirakenteiden tunnistamisessa. NMR-spektroskopia on kuitenkin kallista ja aikaa vievä menetelmä, joten massaspektrometrian suosio ja käyttö on yhä vain yleistynyt. Viime vuosina on kehitetty uudenlaisia ja tehokkaampia massaspektrometrian menetelmiä ja yhdistetty niihin kromatografia tai muu uusi ulottuvuus, ja yksi näistä yhdistelmistä on IMS-MS.

Kokeellisena esimerkkinä saponiinien analytiikassa käytettyjen laitteistojen IMS-yksiköistä on esitetty niiden havainnollistavat rakenteet kuvassa 5 (Colson ym., 2019; Giles ym., 2019). Laitteistoina voivat olla muun muassa cIMS tai TWIMS, joista jälkimmäisessä hyödynnetään ioniliikkuvuusanalytiikassa suosittua Triwave-järjestelmää.



Kuva 5. Esimerkkikuva ioniliikkuvuuslaitteiston rakenteesta. (A) kuvaa kulkeutumisioniliikkuvuuspektrometrin triwave-yksikön rakennetta, (B) syklistä ioniliikkuvuuslaitetta ja (C) syklisen ioniliikkuvuuslaitteen rakennetta sivulta katsottuna. Nuolella on esitetty ionien kulkureitin suunta (Colson et al., 2019; Giles et al., 2019).

Molekyylidynamiikkaa voidaan hyödyntää laajalti IMS-MS-mittausten apuna saponiinien tunnistamiseen (Decroo et al., 2019). Stimulaatioiden avulla saadaan jokaiselle eri isomeerimuodolle ja varautuneelle kompleksille teoreettiset arvot. Nämä arvot kuvastavat matalimman energiatason rakenteita ja ionien eri geometrioita. Molekyylidynamiikalla voidaan mallintaa monia mahdollisia rakenteita. Näitä teoreettisia arvoja voidaan verrata sitten kokeellisten arvojen kanssa yhdisteiden tunnistamiseksi (Decroo et al., 2019).

4.1 Menetelmän edut ja haasteet

IMS-MS:n on uusi menetelmä, jonka käyttöön liittyy monia etuja, mutta myös haasteita. IMS-MS:n tuloksina toimivat CCS-arvot ovat menetelmän yksi merkittävimmistä eduista, mutta ne toimivat myös sen käytettävyyden haasteena (Colson et al., 2019). Menetelmä perustuu

periaatteessa kokeellisten ja teoreettisesti molekyyldynamiikkaa hyväksi käyttäen laskettuihin CCS-arvoihin. Hyvänä puolena on, että näin ollen pystytään saamaan moneen tulokseen pohjautuvaa tietoa yhdisteen rakenteesta vertaamalla saatuja kokeellisia arvoja laskettuihin tuloksiin. Kuitenkin haittapuolena on, että menetelmä nojaa vertailuun laskennallisten arvojen kanssa eikä pelkästään kokeellisesti saaduista arvoista voida päätellä oikeastaan yhdisteen rakenteesta mitään. Ilman laskennallista puolta tiedetään vain, että kyseessä on eri yhdisteet, sillä niiden CCS-arvot ovat erilaiset. Tämä sopii esimerkiksi isomeerien erotteluun, mutta ei tarkkaan yhdisteen karakterisointiin.

Haasteita isomeerien erottelussa CCS-arvoihin perustuen voi kuitenkin ilmetä. IMS-MS:n antamat ajautumisaikojen ja CCS-arvojen erot isomeerisille saponiinineille voivat olla liian pieniä eli kumpujen huiput ovat liian lähellä toisiaan ja niiden erottaminen toisistaan hankaloituu (Colson et al., 2019). Colsonin tutkimuksessa tarkasteltiin hevostakanjan siemenistä peräisin olevia eskiinejä eli saponiinien seoksia (Colson *ym.*, 2019). Esimerkkinä artikkelissa tutkittiin eskiinien seosta, joka koostui saponiineista eskiini 1a ja 1b sekä isoeskiini 1a ja 1b. Nämä rakenteet olivat toistensa isomeerejä. Yhdisteiden natriumaddukteille $[M+Na]^+$ oli mitattu ajautumisajat ja niitä oli hyödynnetty CCS-arvojen määrittämisessä kalibraatiomenettelyn avulla. Nämä arvot on esitetty taulukossa 1, josta nähdään, että ajautumisajat ovat lähekkäin toisiaan ja eskiini 1a:lla ja isoeskiini 1b:llä on samat CCS-arvot. Tässä tapauksessa erottelu ei siis onnistunut liian läheisten CCS-arvon takia. Taulukosta voidaan myös nähdä, että IMS-MS voi olla hyvä menetelmä sivuketjujen erottamiseen. Colson tutki ryhmänsä kanssa eskiinien sivuketjujen erottelua (Colson *ym.*, 2019). Eskiini 1a:n ja isoeskiini 1a:n sivuketjuna on tigliinihappo, kun taas eskiini 1b:n ja isoeskiini 1b:n sivuketjuna on angeliinihappo. Nämä sivuketjut erottuvat IMS-analyysissä eri ajautumisaikoina: eskiineillä 1a 9,83 ja 2b 9,75 ms ja isoeskiineillä 1a 9,97 ja 1b 9,83 ms. Tämä ero selittyy molekyylin pakkautumisella, jolloin tigliinihappoa sisältävät eskiini 1a ja isoeskiini 1a muodostavat löyhemmin pakatun kompleksin, jolloin niillä kestää kauemmin päästä ajautumisputken läpi. Sivuketjut siis erottuvat, mutta aika pienellä erolla toisistaan.

Taulukko 1. Ajautumisajat ja CCS-arvot hevoskastanjan saponiiniseokselle (Colson ym., 2019). Arvot ovat mitattu $[M+Na]^+$ -ioneille.

<i>Yhdiste</i>	<i>Ajautumisaika (ms)</i>	<i>CCS-arvo (\AA^2)</i>
<i>Eskiini 1a</i>	9,83	308
<i>Eskiini 1b</i>	9,75	306
<i>Isoeskiini 1a</i>	9,97	311
<i>Isoeskiini 1b</i>	9,83	308

Toinen menetelmän heikkous on CCS-arvojen eroavaisuudet eri kaasujen välillä (May et al., 2014). Puskurikaasuna toimii yleensä typpi tai helium, mutta näiden kaasujen käytöllä on kuitenkin eronsa. Helium ja typpi ovat kooltaan ja polaarisuudeltaan erilaisia. Typpi esiintyy kaksiatomisena molekyylinä, kun taas helium yksiatominen. Typpi on myös massaltaan suurempi verrattuna heliumiin, joka vaikuttaa sen käyttäytymiseen puskurikaasuna. Helium ja typpi käyttäytyvät siis hieman eri tavoilla törmätessään ioneihin, joten mittauksista saadut CCS-arvot eroavat toisistaan hieman, vaikka liikkuvuuden mittaamenetelmä olisikin sama. Näin ollen CCS-arvoja, jotka ovat mitattu heliumilla ja typpellä ei voida aivan luotettavasti vertailla toisiinsa, sillä arvoissa on hieman heittelyä kaasusta riippuen (May et al., 2014).

Kun tutkitaan luonnonyhdisteitä, kuten saponiineja, joskus niiden pitoisuudet näytteessä voivat olla todella pieniä tai seoksessa on monia rakenteellisesti samankaltaisia yhdisteitä seoksena (Márquez-Sillero et al., 2011). Tämä on haaste ioniliikkuvuuden mittaamiselle ilman nestekromatografista erottamista. IMS-MS tarvitsee tällaisessa tapauksessa usein nestekromatografisen erottelun ennen liikkuvuusmittausta, jotta yhdisteet olisi eroteltu kromatografisesti poolisuutensa perusteella. Tällaisissa tapauksissa IMS-MS on siis riippuvainen kromatografiasta eikä tunnista yhdisteiden eroja yksinään (Colson et al., 2019).

Saponiinit voivat muodostaa ionisoituessaan natriumin kanssa addukteja eli ne kiinnittyvät Na^+ -ioniin ja muodostavat komplekseja (Decroo et al., 2017). Decroo ryhmänsä kanssa huomasi, että saponiinit voivat kiinnittyä natriumkationiin ja taittua sen ympärille. Tällaiset ionit olivat eroteltavissa LC-MS-menetelmällä, mutta ero ajautumisaikojen ero oli vain 0,3 s. Saponiinien taittuminen estää ionien pienien rakenteellisten erojen huomaamisen

ioniliikkuvuusmittauksissa, mikä hankaloittaa tekniikan käytettävyyttä sellaisenaan (Decroo et al., 2017). Decroo ryhmänsä kanssa tutki myös kationin vaikutusta kokeellisiin CCS-arvoihin eli CCS_{exp} (Decroo et al., 2019). CCS-arvojen suuruus on verrannollinen kationin kokoon. Esimerkiksi natrium ja vety muodostavat löyhemmän kompleksin verrattuna kaliumin kanssa muodostuviin saponiinien komplekseihin. Tästä johtuen kaliumin kanssa kompleksin muodostaneet saponiinit ja rakenteet muodostavat yleensä pienempiä CCS_{exp} -arvoja kuin natriumin tai vedyn kanssa kompleksoituneet. Tämä on verrannollista ionien kokoon, jolloin suurempi ioni kompleksoituu tiiviimmin saponiinin rakenteen kanssa (Decroo et al., 2019).

IMS:n ajatellaan olevan suuremmassa roolissa topologisten isomeerien erottelussa. Sen avulla voidaan siis todennäköisemmin ja helpommin erotella isomeerejä toisistaan eikä niinkään tunnista rakenteellisesti lähekkäin olevia rakenteita. Se ei ole vielä kehittynyt niin tarkalle tasolle (Decroo et al., 2019).

4.2 Tulevaisuuden näkymät

Ioniliikkuvuusmassaspektrometria on nopeasti kehittyvä tekniikka ja sitä käytetään hyväksi monilla eri tieteenaloilla kuten lääketieteessä, biokemiassa ja kemiassa. Sillä on potentiaalia kehittyä merkittäväksi menetelmäksi, jota voidaan käyttää hyväksi esimerkiksi kemiassa, laadunvalvonnassa ja lääketeollisuudessa.

IMS-MS-menetelmillä ei ole vielä pysytty varmasti ja luotettavasti tunnistamaan aina kaikista näytteistä tuntemattomia saponiineja. Kun analysoidaan tuntemattomia, rakenteellisesti samankaltaisia saponiineja, IMS-MS ei ole vielä niin kehittynyt, että se pysyisi tunnistamaan kaikkien rakenteiden erot ja kertomaan tarkkaa tietoa niistä (Decroo et al., 2019). Tulevaisuudessa tavoitteena on kehittää tehokkaampia, nopeampia ja tarkempia analysointimenetelmiä. IMS-MS kohdalla pyritään kehittämään menetelmää suuntaan, jossa pysyttäisiin tunnistamaan tuntemattomia saponiineja ja muita yhdisteitä nopeammin ja helpommin. Tavoitteena on vakiinnuttaa IMS-MS-tekniikan rooli analytiikan työkaluna ja kasvattaa sen suosiota.

Kaavassa 3 kuvattiin erottelukykyä ja tulevaisuudessa saponiinien analytiikan kohdalla halutaankin parantaa sitä ja saada korkearesoluutioista dataa. Yksi tapa olisi kasvattaa liikkuvuusalueen pituutta. cIMS on yksi menetelmä jota jo käytetään, mutta menetelmät tarvitsevat vielä jatkokehitystä (Giles et al., 2019). Toinen uusi sovellus IMS:lle on ionioptiikkaa hyväksikäyttävä tekniikka, joka mahdollistaa ionien täydellisen siirtymisen (SLIM-IMS, engl. structures for lossless ion manipulations) (Huntley et al., 2023). Sitä on

hyödynnetty jo muun muassa biologisten aineiden analysoinnissa ja tulevaisuudessa sitä voisi hyödyntää myös saponiinien erottamisessa. SLIM:in on tutkittu parantavan herkkyyttä ja resoluutioita, sillä se vähentää ionien häviötä analyysin aikana ja sen avulla voidaan tunnistaa pieniäkin pitoisuuksia näytteistä (Huntley et al., 2023). SLIM-IMS:llä saadaan reittiä pidentämällä parannettua erotuskykyä ja tekniikka perustuu ionien vangitsemiseen peräkkäisiin ioniloukkuihin (Huntley et al., 2023). Tekniikalla voidaan myös manipuloida ionien reittiä loukkuun tai ohitusreitille ja toistaa reittejä monia kertoja (Huntley et al., 2023).

Erottelukykyä voitaisiin ehkä parantaa myös lämpötilaa laskemalla (Giles et al., 2019). Ohshimo ryhmänsä kanssa tutki kryogeenistä ioniliikkuvuusmassaspektrometriaa (Cryo-IMS-MS, engl. cryogenic ion mobility mass spectrometry) fullereeneille ja niiden muodostamille komplekseille (Ohshimo et al., 2023). Tekniikassa inertin kaasun lämpötilaa lasketaan ajautumisputkessa, jonka seurauksena muun muassa isomerisaation nopeus laskee sekä pystytään tutkimaan ionien konformaatiota paremmin kuin huoneenlämmössä (Ohshimo et al., 2023). Saponiinit voivat taittua Na-atomien ympärille, jolloin se muodostaa kompleksin, joten ehkä tulevaisuudessa tätä tekniikka voitaisiin hyödyntää saponiinien analytiikassa.

Yksi tulevaisuuden kehityskohde IMS-MS-menetelmissä on koneoppimisen hyödyntäminen laskennallisissa menetelmissä ja standardoinnissa. Tulevaisuudessa pyritään kehittämään laitteistoille kalibrointistandardit, jotka pätsivät jokaisessa laitteessa samalla tavalla. Näin saataisiin laitteistot yhdenmukaisiksi eikä hajontaa tuloksissa tulisi kalibroinnin takia. MS-mittauksista etenkin saponiinien kohdalla tulee paljon dataa, koska ne esiintyvät monimutkaisina seoksina (Decroo et al., 2017). Datan käsittely ja dokumentointi on vaativaa ja hidasta, mitä pyritään kehittämään tietotekniikan ja tekoälyn kehittyessä.

5 Johtopäätökset

Saponiinien käytön sovelluksissa, kuten lääketieteessä ja elintarviketeollisuudessa, on tärkeää saada tarkkaa tietoa saponiinien rakenteesta ja ominaisuuksista, jotta lääkkeiden ja elintarvikkeiden vaikutukset olisivat juuri halutut. Monimuotoisuuden ja hankalasti erotettavien rakenteiden takia saponiinien analysointi ja erottaminen toisistaan on hankalaa pelkästään tavanomaisilla massaspektrometrisilla menetelmillä. Saponiineilla muun muassa esiintyy isomeriaa ja ne esiintyvät usein saponiinien seoksina näytteissä. Isomeerisia rakenteita on hankala erottaa toisistaan pelkästään CID-fragmentaation avulla, sillä isomeerit tuottavat samoja fragmentteja keskenään ja nestekromatografia ei pysty aina erottamaan polaarisuuden perusteella seoksen yhdisteitä toisistaan selvästi.

Näiden vaikeuksien takia massaspektrometriaan onkin lisätty uusi ulottuvuus, ioniliikkuvuus. IMS-MS on otettu käyttöön saponiinien analytiikassa, sillä sen yksi merkittävimmistä eduista on sen kyky erottaa ionit niiden varauksen, muodon ja koon perusteella, mutta sekään ei kuitenkaan kaikkia yhdisteitä pysty erottamaan. Se on myös helppo yhdistää LC-MS-laitteisiin, jolloin saadaan polaarisuudesta, liikkuvuudesta ja massa-varaussuhteesta tietoa.

IMS-MS tarjoaa myös edun saponiinien erottamiseen, sillä mittauksista saadaan tietoa ionien kolmiulotteisesta muodosta CCS-arvojen ja saapumisaikojen avulla, jotka auttavat erottelemaan saponiinien isomeerisiä muotoja. FAIMS-tekniikat taas antavat mahdollisuuden spesifiseen ionien tunnistukseen päästämällä liikkuvuusalueelta läpi vain tietyt ionit, joita halutaan tutkia, mutta tämä tekniikka ei anna tietoa CCS-arvoista. IMS-MS etuna on sen nopeus ja helppokäyttöisyys.

IMS-MS:n käyttöön liittyy kuitenkin myös haasteita. CCS-arvot eroavat hieman toisistaan mitattaessa CCS-arvoja heliumissa ja työssä kaasun käyttäytymisen takia. Näin ollen saatuja tuloksia ei voida vertailla luotettavasti keskenään. CCS-arvojen avulla tunnistettaessa yhdisteitä ollaan molekyyliidynamiikan avulla mallinnettujen CCS-arvojen varassa, sillä kokeellisia arvoja verrataan niihin. Kokeellisten arvojen perusteella ei siis voi suoranaisesti tunnistaa tuntemattomia yhdisteitä, mikä rajoittaa sen käytettävyyttä ja ajatellaankin, että se soveltuu paremmin topologisten isomeerien erottamiseen. CCS-arvot ovat kuitenkin tärkeä tulos liikkuvuusmittauksista K:n lisäksi.

IMS-MS-tekniikoissa on paljon hyvää, mutta niissä riittää myös kehitettävää. DTIMS toimii edelleen hyvänä menetelmänä CCS-arvojen mittauksessa, mutta uusia tekniikoita kehitetään, kuten esimerkiksi cIMS, jotka tuovat uudenlaisia mahdollisuuksia saponiinein analytiikkaan. Tulevaisuudessa yritetään parantaa menetelmien herkkyyttä, selektiivisyyttä ja erotuskykyä nykyistä paremmaksi ja kehittää uusia menetelmiä, kuten SLIM- ja Cryo-IMS-laitteita vanhan tiedon pohjalta. Myös muun muassa tekoälyn kehittymisen ja sen käytön tieteessä yleistyttyä, sitä voidaan hyödyntää monimutkaisien ja suuren datamäärän analysoimisessa ja dokumentoinnissa.

6 Viiteluettelo

- Bird, I.M., 1989. High performance liquid chromatography: principles and clinical applications. *BMJ* 299, 783–787. <https://doi.org/10.1136/bmj.299.6702.783>
- Bocxlaer, J.F.V., Castele, S.R.V., Poucke, C.J.V., Peteghem, C.H.V., 2005. Confirmation of the identity of residues using quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 529, 65–73. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2004.07.018>
- Colson, E., Decroo, C., Cooper-Shepherd, D., Caulier, G., Henoumont, C., Laurent, S., De Winter, J., Flammang, P., Palmer, M., Claereboudt, J., Gerbaux, P., 2019. Discrimination of Regioisomeric and Stereoisomeric Saponins from *Aesculus hippocastanum* Seeds by Ion Mobility Mass Spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 30, 2228–2237. <https://doi.org/10.1007/s13361-019-02310-7>
- Decroo, C., Colson, E., Demeyer, M., Lemaure, V., Caulier, G., Eeckhaut, I., Cornil, J., Flammang, P., Gerbaux, P., 2017. Tackling saponin diversity in marine animals by mass spectrometry: data acquisition and integration. *Anal. Bioanal. Chem.* 409, 3115–3126. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0252-7>
- Decroo, C., Colson, E., Lemaure, V., Caulier, G., De Winter, J., Cabrera-Barjas, G., Cornil, J., Flammang, P., Gerbaux, P., 2019. Ion mobility mass spectrometry of saponin ions. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 33, 22–33. <https://doi.org/10.1002/rcm.8193>
- Dodds, J.N., Baker, E.S., 2019. Ion Mobility Spectrometry: Fundamental Concepts, Instrumentation, Applications, and the Road Ahead. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 30, 2185–2195. <https://doi.org/10.1007/s13361-019-02288-2>
- Faizal, A., Geelen, D., 2013. Saponins and their role in biological processes in plants. *Phytochem. Rev.* 12, 877–893. <https://doi.org/10.1007/s11101-013-9322-4>
- Fordos, S., Amin, S., Abid, N., Pasha, I., Khan, M.K.I., Amin, A., Gulzar, M., Subtain, M., Abdi, G., 2025. Saponins: Advances in extraction techniques, functional properties, and industrial applications. *Appl. Food Res.* 5, 101146. <https://doi.org/10.1016/j.afres.2025.101146>
- Giles, K., Ujma, J., Wildgoose, J., Pringle, S., Richardson, K., Langridge, D., Green, M., 2019. A Cyclic Ion Mobility-Mass Spectrometry System. *Anal. Chem.* 91, 8564–8573. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b01838>
- Güçlü-Üstündağ, Ö., Mazza, G., 2007. Saponins: Properties, Applications and Processing. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 47, 231–258. <https://doi.org/10.1080/10408390600698197>

- Huntley, A.P., Hollerbach, A.L., Prabhakaran, A., Garimella, S.V.B., Giberson, C.M., Norheim, R.V., Smith, R.D., Ibrahim, Y.M., 2023. Development of a Structure for Lossless Ion Manipulations (SLIM) High Charge Capacity Array of Traps. *Anal. Chem.* 95, 4446–4453. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.2c05025>
- Ibrahim, Y.M., Garimella, S.V.B., Prost, S.A., Wojcik, R., Norheim, R.V., Baker, E.S., Rusyn, I., Smith, R.D., 2016. Development of an Ion Mobility Spectrometry-Orbitrap Mass Spectrometer Platform. *Anal. Chem.* 88, 12152–12160. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b03027>
- Kanu, A.B., Dwivedi, P., Tam, M., Matz, L., Hill, H.H., 2008. Ion mobility–mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* 43, 1–22. <https://doi.org/10.1002/jms.1383>
- Mäkinen, M.A., Anttalainen, O.A., Sillanpää, M.E.T., 2010. Ion Mobility Spectrometry and Its Applications in Detection of Chemical Warfare Agents. *Anal. Chem.* 82, 9594–9600. <https://doi.org/10.1021/ac100931n>
- Marchand, A., Livet, S., Rosu, F., Gabelica, V., 2017. Drift Tube Ion Mobility: How to Reconstruct Collision Cross Section Distributions from Arrival Time Distributions? *Anal. Chem.* 89, 12674–12681. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b01736>
- Márquez-Sillero, I., Aguilera-Herrador, E., Cárdenas, S., Valcárcel, M., 2011. Ion-mobility spectrometry for environmental analysis. *TrAC Trends Anal. Chem.* 30, 677–690. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2010.12.007>
- Masike, K., Stander, M.A., De Villiers, A., 2021. Recent applications of ion mobility spectrometry in natural product research. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 195, 113846. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113846>
- May, J.C., Goodwin, C.R., Lareau, N.M., Leaptrot, K.L., Morris, C.B., Kurulugama, R.T., Mordehai, A., Klein, C., Barry, W., Darland, E., Overney, G., Imatani, K., Stafford, G.C., Fjeldsted, J.C., McLean, J.A., 2014. Conformational Ordering of Biomolecules in the Gas Phase: Nitrogen Collision Cross Sections Measured on a Prototype High Resolution Drift Tube Ion Mobility-Mass Spectrometer. *Anal. Chem.* 86, 2107–2116. <https://doi.org/10.1021/ac4038448>
- May, J.C., McLean, J.A., 2015. Ion Mobility-Mass Spectrometry: Time-Dispersive Instrumentation. *Anal. Chem.* 87, 1422–1436. <https://doi.org/10.1021/ac504720m>
- Michelmann, K., Silveira, J.A., Ridgeway, M.E., Park, M.A., 2015. Fundamentals of Trapped Ion Mobility Spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 26, 14–24. <https://doi.org/10.1007/s13361-014-0999-4>

- Ohshimo, K., He, X., Ito, R., Tsunoda, K., Tainaka, S., Misaizu, F., 2023. Cryogenic ion mobility-mass spectrometry for the study of conformations of host-guest complexes. *EPJ Tech. Instrum.* 10, 11. <https://doi.org/10.1140/epjti/s40485-023-00098-1>
- Shvartsburg, A.A., Smith, R.D., 2008. Fundamentals of Traveling Wave Ion Mobility Spectrometry. *Anal. Chem.* 80, 9689–9699. <https://doi.org/10.1021/ac8016295>
- Stow, S.M., Causon, T.J., Zheng, X., Kurulugama, R.T., Mairinger, T., May, J.C., Rennie, E.E., Baker, E.S., Smith, R.D., McLean, J.A., Hann, S., Fjeldsted, J.C., 2017. An Interlaboratory Evaluation of Drift Tube Ion Mobility–Mass Spectrometry Collision Cross Section Measurements. *Anal. Chem.* 89, 9048–9055. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b01729>