

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Chemie životního prostředí



Bc. Petra Macháčková

NOVÉ MATRICE PRO MALDI-MS ANALÝZU LIPIDŮ

NEW MATRICES FOR MALDI-MS ANALYSIS OF LIPIDS

Diplomová práce

Vedoucí závěrečné práce/Školitel: RNDr. Josef Cvačka, Ph.D.

Konzultantka: RNDr. Karolina Pecková, Ph.D.

Praha, 2011

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze a pracoviště RNDr. Josefa Cvačky, Ph.D. je možné pouze po písemném souhlasu těchto institucí.

V Praze dne 29. dubna 2011

.....
podpis

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli RNDr. Josefu Cvačkovi, Ph.D. za odborné vedení, všestrannou pomoc a cenné připomínky při vypracovávání této diplomové práce. Dále své školitelce-konzultantce RNDr. Karolině Peckové, Ph.D. za odbornou pomoc. Nemalé poděkování také patří všem kolegům z laboratoře hmotnostní spektrometrie Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i., zvláště pak RNDr. Vladimíru Vrkoslavovi, Ph.D., za pomoc, podporu a čas, který mi věnovali. Současně bych ráda poděkovala Doc. RNDr. Petru Rychlovskému, CSc., Doc. RNDr. Jiřímu Mosingerovi, Ph.D., Ing. Kamilu Langovi, CSc. a Mgr. Miroslavu Hylišovi, Ph.D. za umožnění instrumentálních analýz v jejich laboratořích, za práci a čas, který tomuto museli věnovat. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat své rodině, přátelům a Karlovi za jejich podporu a pochopení během mého studia.

Tato práce byla finančně podporována MŠMT ČR (projekt MSM 0021620857), projektem SVV 2011- 263204 a GA ČR (projekt 203/09/0139).

Abstrakt

V této práci zaměřené na výzkum nových matic pro MALDI-MS analýzu lipidů bylo otestováno několik solí organických kyselin jako potenciálních matic pro analýzu uhlovodíků a voskových esterů. Již dříve se ukázalo, že k efektivní ionizaci lipidů je možno využít lithných kationtů za vzniku aduktu $[M+Li]^+$. Syntetizovány byly lithné soli aromatických kyselin. Byly vyhodnocené MALDI vlastnosti syntetizovaných matic a porovnány s vlastnostmi 2,5-dihydroxybenzoanu lithného, který je ověřenou maticí pro analýzu těchto lipidů. Bylo zjištěno, že účinnost matrice je závislá na přítomnosti hydroxylové skupiny v molekule matrice. Nejlepších výsledků bylo dosaženo s vanilanem lithným a to i ve srovnání s 2,5-dihydroxybenzoanem lithným.

Abstract

In this work focused on research of new matrices for MALDI-MS analysis of lipids several organic salts were tested as potential matrices for hydrocarbons and wax esters. It was shown previously that the effective ionization of lipids occurs in conjunction with a lithium cation to form adducts $[M + Li]^+$. Therefore, lithium salts of aromatic acids were synthesized. Matrices were evaluated according to their MALDI properties and compared with lithium 2,5-dihydroxybenzoate, which is proven matrix for MALDI analysis of lipids. It was found that effectiveness of matrix depends on presence of hydroxyl group in matrix molecule. The best results were achieved with lithium vanillate, even in comparison with lithium 2,5-dihydroxybenzoate.

Předmětová hesla:

Desorpce/ionizace laserem za spoluúčasti matrice ve spojení s analyzátozem doby letu (MALDI-TOF)

MALDI matrice

Analýza lipidů

Klíčová slova:

Voskové estery

Nepolární lineární uhlovodíky

MALDI matrice

Obsah

1	ÚVOD	11
2	TEORETICKÁ ČÁST	12
2.1	Lipidy	12
2.1.1	Uhlovodíky a voskové estery.....	13
2.1.1.1	Význam a výskyt uhlovodíků a voskových esterů.....	13
2.2	Analýza lipidů	15
2.2.1	Desorpce/ionizace laserem za spoluúčasti matrice nepolárních lipidů.....	16
2.3	Desorpce/ionizace laserem za spoluúčasti matrice	17
2.3.1	Vývoj desorpce/ionizace laserem za spoluúčasti matrice.....	17
2.3.2	Analýza metodou desorpce/ionizace laserem za spoluúčasti matrice.....	18
2.3.2.1	Příprava vzorku.....	18
2.3.2.2	Ionizační mechanismus.....	18
2.3.2.3	Separace a detekce.....	20
2.4	Matrice pro desorpce/ionizaci laserem za spoluúčasti matrice	22
2.4.1	Role matrice.....	22
2.4.2	Používané matrice.....	24
2.4.3	Analýza nepolárních lipidů pomocí 2,5-dihydroxybenzoanu lithného.....	28
3	CÍL PRÁCE	29
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	30
4.1	Použité chemikálie	30
4.2	Přístroje a zařízení	31
4.2.1	Reflex IV.....	31
4.2.2	Deska pro nanesení vzorků.....	32
4.2.3	Další přístroje.....	32
4.3	Pracovní postupy	33
4.3.1	Syntéza matric.....	33
4.3.1.1	Syntéza 2,5-dihydroxytereftalanu lithného.....	34
4.3.1.2	Syntéza 2,5-dimethoxybenzoanu lithného.....	35
4.3.1.3	Syntéza α -kyano-4-hydroxycinnamanu lithného.....	36
4.3.1.4	Syntéza sinapanu lithného.....	36
4.3.1.5	Syntéza benzoanu lithného.....	37
4.3.1.6	Syntéza salicylanu lithného.....	38
4.3.1.7	Syntéza vanilanu lithného.....	39
4.3.1.8	Shrnutí syntézy matric.....	39
4.3.2	Příprava vzorků.....	40
4.3.3	Čištění desky.....	41
4.3.4	Nanášení vzorků.....	41
4.4	Ověřování struktury a vlastností matric	42
4.4.1	Stanovení C, H, N.....	42
4.4.2	Stanovení Li.....	42
4.4.3	Spektrometrie v ultrafialové oblasti záření.....	43
4.5	Rozpustnost	43
4.6	Určení minimální a optimální intenzity laserového paprsku	44
4.7	Určení optimální metody nanášení	45
4.8	Měření matričních iontů	45
4.9	Detekční limit	46

4.10	Intenzita signálu	47
5	VÝSLEDKY A DISKUSE	49
5.1	Elementární analýza	49
5.1.1	Stanovení C, H, N	49
5.1.2	Stanovení Li	50
5.2	Spektra matric v ultrafialové oblasti záření	52
5.3	Vyhodnocení matričních iontů	54
5.4	Rozpustnost	56
5.5	Optimální podmínky MALDI analýzy	58
5.5.1	Minimální a optimální intenzita laserového paprsku	58
5.5.2	Metoda nanášení	61
5.5.3	Molární poměr matrice a analytu	65
5.6	Detekční limit	66
5.6.1	Detekční limit pro voskový ester	66
5.6.2	Detekční limit pro uhlovodík	68
5.7	Intenzita signálu	70
5.8	Vztahy mezi strukturou matrice a její účinností	74
6	ZÁVĚR	75
7	LITERATURA	76
8	PŘÍLOHY	Error! Bookmark not defined.

Seznam použitých zkratk a symbolů

9-AA	9-aminoakridin	Li₂DHT	dihydroxytereftalan
a.u.	arbitrární jednotka		dilithný
Ag⁺TFA⁻	trifluoracetát stříbrný	LiBA	benzoan lithný
APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku	LiDHB	dihydroxybenzoan lithný
AV ČR	Akademie věd České republiky	LiDMB	dimethoxybenzoan lithný
b₁	směrnice kalibrační přímky	LiHCCA	α-kyano-4-hydroxy cinnaman lithný
BA	kyselina benzoová	LiSA	sinapan lithný
c	koncentrace	LiSalA	salicylan lithný
Da	dalton	LiVA	vanilan lithný
DHB	kyselina 2,5-dihydroxybenzoová	m	hmotnost
DHT	kyselina 2,5-dihydroxytereftalová	m/z	poměr hmotnosti ku náboji
DMAN	1,8-bis(dimethylamino) naftalen	M:A	poměr matrice ku analytu
DMB	kyselina 2,5-dimethoxybenzoová	MALDI	desorpce/ionizace laserem za spoluúčasti matrice
E_{pot}	potenciální energie	M_r	relativní molekulová hmotnost
ESI	ionizace elektrosprejem	[M+Li]⁺	molekulární iont s navázaným kationtem lithia
GS/MS	plynová chromatografie s hmotnostní detekcí	MS	hmotnostní spektrometrie
HCCA	kyselina α-kyano- 4-hydroxyskořicová	MTPFPP	<i>meso</i> -tetrakis (pentafluorfenyl)porfyrin
HPLC/MS	vysokoučinná kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí	NMR	nukleární magnetická rezonance
I	intenzita signálu	pH	záporný dekadický logaritmus aktivity oxoniových kationtů
IR	infračervená oblast světla	pK_A	záporný dekadický logaritmus kyselé disociační konstanty
l	délka	PNA	<i>para</i> -nitroanilin
LC/MS	kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí	R-	alkyl
LDI	desorpce/ionizace laserem		

RSD	relativní směrodatná odchylka	μJ	mikrojoul
		μl	mikrolitr
s	směrodatná odchylka	μmol	mikromol
SA	kyselina sinapová	U	elektrický potenciál
SalA	kyselina salicylová	ÚOCHB	Ústav organické chemie a biochemie
SB	stearyl behenát		
t	čas	UV	ultrafialová oblast světla
TG	triacylglycerol	V	objem
THA	2',4',6'-trihydroxy acetofenon	v	rychlost
		VA	kyseliny vanilové
TLC	tenkovrstvá kapalinová chromatografie	Vis	viditelná oblast světla
		X_D	detekční limit
TOF	analyzátor doby letu	z	náboj

Bezpečnost práce

Během této diplomové práce byl často používán chloroform. Vzhledem k jeho negativnímu působení na lidský organismus a životní prostředí byla veškerá manipulace s chloroformem prováděna v digestoři v ochranných rukavicích a laboratorním plášti. Zbylé odpadní rozpouštědlo či roztoky obsahující chloroform byly skladovány ve speciálním neprůsvitném kanystru pro odpadní rozpouštědla obsahující chlor a následně přemístěny na místo určené k likvidaci těchto chemikálií.

1 ÚVOD

Lipidy tvoří velmi důležitou součást buněčných organismů. V živých organismech plní celou řadu klíčových funkcí, např. slouží pro ukládání energie, mají signální funkce, jsou součástí membrán a slouží při ochraně povrchů těl živých organismů. Vzhledem k těmto důležitým funkcím zájem o lipidy v současné době roste a s ním i vývoj vhodných analytických metod a postupů.¹⁻³

Přírodní lipidy tvoří obvykle velice komplexní směsi. Jejich analýza není snadná a hraje důležitou roli v lipidomice, která se zabývá komplexními vztahy lipidů v živých organismech. Desorpce/ionizace laserem za účasti matrice (MALDI) je účinná metoda pro rychlou charakterizaci lipidových směsí. Data získaná z hmotnostních spekter z MALDI jsou užitečná např. pro rychlé porovnávání složení vzorků nebo pro chemotaxonomické účely. Metodou MALDI je možné analyzovat všechny třídy lipidů od komplexních polárních lipidů až po jednoduché a zcela nepolární lipidy.¹

Nejdůležitějším krokem při MALDI analýze je příprava vzorku, zejména klíčová je volba matrice. Matrice rozhoduje nejen o kvalitě výsledných MS spekter, ale v mnoha případech i o tom, zda analyt bude vůbec ionizován. Každá matrice je účinná jen pro určité typy látek a proto se vyvíjí množství rozličných matic, aby pokryly široký rozsah vzorků.⁴ V oblasti lipidů, zejména u nízkomolekulárních nepolárních lipidů, bylo zatím popsáno jen málo účinných matic. Proto je v této oblasti nutný další výzkum, který by přispěl k zlepšení MALDI-MS analýzy nepolárních lipidů, jako jsou například voskové estery a uhlovodíky. Výzkumem nových matic pro analýzu nepolárních lipidů se zabývá i tato diplomová práce.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Lipidy

Lipidy jsou jednou z nejdůležitějších tříd látek v živých organismech.⁵ Jsou hlavními stavebními jednotkami biomembrán, hrají klíčovou roli v přenosu signálu a jsou důležitými energetickými zásobníky v biologických systémech. V důsledku těchto důležitých funkcí lipidů v organismech vzrůstá velmi výrazně význam lipidomiky v biologických vědách.³

Lipidy reprezentují obrovskou a velmi rozmanitou skupinu biomolekul, které mají jednu nebo obě z následujících vlastností: Jsou rozpustné v organických rozpouštědlech a obsahují dlouhý uhlovodíkový řetězec.³ Termín lipid se používá obecně pro všechny přírodní nepolární sloučeniny, které jsou téměř nebo zcela nerozpustné ve vodě, avšak rozpustné v jiných organických rozpouštědlech. Z důvodu strukturní a funkční rozmanitosti lipidů není možné formulovat exaktnější definici tohoto pestrého souboru biologicky aktivních látek.⁶

Lipidy lze rozdělit z mnoha hledisek, dle struktury se lipidy dělí na:⁷

- Mastné acyly
- Glycerolipidy
- Glycerofosfolipidy
- Sfingolipidy
- Steroly
- Prenoly
- Sacharolipidy
- Polyketidy

Dle složení se lipidy dělí na:⁸

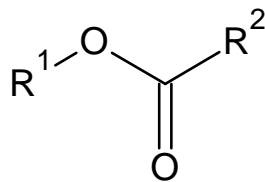
- jednoduché či neutrální lipidy – jsou složené z jedné nebo dvou různých tříd lipidů a patří sem všeobecně neutrální sloučeniny a mastné kyseliny
- komplexní lipidy – obsahují nejčastěji tři různé složky
- proteolipidy – sloučeniny proteinů a mastných kyselin

Do skupiny jednoduchých lipidů patří studované voskové estery a uhlovodíky.

2.1.1 Uhlovodíky a voskové estery

Uhlovodíky jsou nejjednoduššími lipidy⁷ tvořené z lineárních či větvených řetězců. Patří sem alkany, alkeny, cyklické uhlovodíky a karotenoidy.⁸ Obecná struktura voskového esteru je znázorněna na *Obr. 1*.

Voskové estery jsou důležitou třídou lipidů, skládající se z dlouhého řetězce mastného alkoholu esterifikovaného mastnou kyselinou. Přírodní voskové estery jsou různorodé molekuly s rozličnou délkou řetězce a počtem dvojných vazeb v alkoholové i kyselinové části molekuly.⁹



Obr. 1: Obecná struktura voskového esteru.

2.1.1.1 Význam a výskyt uhlovodíků a voskových esterů

Živé organismy často obsahují uhlovodíky, které jsou přímo odvozené od mastných kyselin. Toto je známé již od roku 1892, kdy byl identifikován uhlovodík undekan v tělech mravenců a eikosan v posedu dvoudomém (*Bryonia dioica*). Tyto látky jsou odlišné od terpenických uhlovodíků, obvykle mají delší rovný řetězec, ale mohou být také větvené. U hmyzu lze nalézt uhlovodíky různorodě větvené methylovými skupinami, naopak nevětvené uhlovodíky – n-alkany – převládají u rostlin. Vyskytují se na povrchu rostlin, v kutikulách hmyzu a u některých mořských organismů. Slouží jako ochranná bariéra před pronikáním vody do organismu, také mají funkci jako sexuální atraktanty, brání absorpci chemikálií a před napadením mikroorganismy. Rozličné uhlovodíky se také nacházejí u fotosyntetizujících prokaryotních organismů, ale jen v malých koncentracích.⁸

Téměř všechny organismy biosyntetizují voskové estery, které jsou hlavními složkami vosků.¹⁰ Jejich funkce je hlavně ochranná a zásobní. Jsou důležitými zásobními lipidy u některých prokaryotních organismů. U rostlin je lze nalézt v epikutikulární vrstvě, která zabraňuje nadměrným ztrátám vody a chrání před ultrafialovým zářením.^{9, 11} Rostlinné vosky jsou důležitými průmyslovými surovinami.

Hmyz je chráněn před vysycháním, klimatickými vlivy a mikrobiálním působením kutikulární voskovou vrstvou. Voskové estery lze také nalézt u ptáků i savců. U lidí lze voskové estery nalézt v produktech mazových žláz, které chrání vlasy a kůži. Významnou roli také hraje ušní maz v ušním kanálku či maz ve žlázách na okraji očních víček, který mimo jiné zabraňuje vysychání očí.^{9, 12}

Voskové estery jsou součástí komerčních výrobků přírodního nebo syntetického původu užívaných především v kosmetice, leštidlech, povrchových nátěrech a v mnoha dalších aplikacích.¹⁰

2.2 Analýza lipidů

Pro důkladnou charakterizaci přírodních směsí lipidů jsou nutné spolehlivé analytické metody.⁵ Analýza lipidů je tradičně založená na chromatografických metodách (např: TLC, HPLC-UV, GC/MS). Kromě chromatografických technik se využívá i nukleární magnetická rezonance (NMR), zde však dochází ke komplikacím při analýze složitých směsí lipidů.² Nepochopitelné látky jsou obvykle analyzovány plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí (GC/MS).¹³ Touto metodou lze získat informace o celkovém složení mastných kyselin a alkoholů, ale již nelze získat informace o struktuře původních voskových esterů. Tyto analýzy jsou poměrně časově náročné a vyžadují velké množství vzorku. Voskové estery lze analyzovat i dalšími metodami, jako je plynová chromatografie za vysoké teploty, HPLC/MS, APCI, ESI, nízkotlaká LC/MS.⁹

Hmotnostní spektrometrie je pro svou citlivost vhodnou metodou pro zkoumání všech tříd lipidů ve fyziologicky relevantním rozsahu koncentrací. Metoda MALDI umožňuje přímé zkoumání biomolekul, včetně lipidů.⁴ Tato metoda je vhodná pro výzkum lipidových směsí přírodního původu a nabízí velké množství výhod ve srovnání s jinými analytickými metodami. Příprava vzorků je rychlá a snadná, bez nutnosti derivatizace, spotřeba vzorku je nízká, metodu lze automatizovat a je tolerantní k malému obsahu nečistot.⁵ Zjevnou nevýhodou této metody je horší reprodukovatelnost měření, která je závislá na homogenitě vzorku.¹⁴

Každá z ionizačních metod má své silné i slabé stránky a použitelnost je limitována konkrétními problémy a typy analytů.¹

2.2.1 Desorpce/ionizace laserem za spoluúčasti matrice nepolárních lipidů

Ionizace/desorpce laserem za spoluúčasti matrice je stále důležitější ionizační technikou pro analýzu látek s nízkou polaritou a molekulární hmotností, jako jsou např. nepolární lipidy a uhlovodíkové polymery.¹⁶ Ionizace nízkomolekulárních nepolárních látek je možná pomocí iontů různých kovů.¹ Během MALDI analýz neutrálních lipidů dochází k tvorbě aduktů s alkalickými kovy, hlavně ke vzniku sodných a draselných iontů, pocházejících ze skleněného nádoby, MALDI desky, matrice nebo rozpouštědel.¹⁷ MALDI-MS se používá pro profilování a analyzování směsí triacylglycerolů (TG). Triacylglyceroly i další lipidy jsou ionizovány pomocí iontů alkalických kovů (jako matrice se používá sůl daného kovu), ale stejně tak i matricemi jako kyselina 2,5-dihydroxybenzoová, 2,4,6-trihydroxyacetofenon či kyselina α -kyano-4-hydroxyskořicová. MALDI zcela nepolárních uhlovodíků nebo uhlovodíkových polymerů je značně náročnější, jelikož tyto sloučeniny postrádají polární skupinu vhodnou k protonaci nebo k vazbě s kationtem.¹⁸ Již dříve bylo prokázáno, že monovalentní kationty přechodných kovů ve formě svých solí (Ag^+TFA^-)¹⁸ nebo přechodné kovy (Fe, Co, Ni, Ag, Cr, Mn, Cu), pokud jsou spolu s uhlovodíky nanесeny na MALDI desku, tvoří adukty, které lze analyzovat hmotnostní spektrometrií.¹⁶ Přechodné kovy jsou však vysoce reaktivní a u uhlovodíků byla pozorována značná fragmentace. Konkrétně u běžně používaných stříbrných solí dochází k eliminaci vodíku. Analýza směsi uhlovodíků je ztížena izotopickým zastoupením stříbra – ^{107}Ag a ^{109}Ag . Tyto izotopy jsou zastoupeny v poměru cca 1:1. Jelikož se liší o dvě hmotnostní jednotky, stejně jako nasycený a nenasycený uhlovodík, interpretace spektra je velice komplikovaná. Později byla uvedena jako vhodná metoda ionizace lithnými kationty s využitím lithné soli kyseliny 2,5-dihydroxybenzoové (LiDHB).^{9,19} O LiDHB více v kapitole 2.4.3.

2.3 Desorpce/ionizace laserem za spoluúčasti matrice

Metoda MALDI je založená na využití UV-absorbující matrice, která je smísena se vzorkem a nanесena na ocelovou MALDI desku.¹³ Ta je poté vložena do spektrometru a vzorky jsou ozařovány laserem.

Tato metoda je tradičně využívána pro kvalitativní analýzu proteinů. Používá se však také pro analýzu dalších biomolekul, syntetických polymerů, velkých organických molekul a organokovových komplexů a dále pro analýzu nízkomolekulárních organických i anorganických látek.²⁰

Současně přitahuje pozornost jako velmi účinná metoda analýzy lipidů. MALDI v kombinaci s detektorem doby letu (TOF) poskytuje jednoduše dostupnou a rychlou ionizaci s vysokým rozlišením (za použití reflektoru), která je použitelná také pro široké spektrum nízkomolekulárních látek.¹

2.3.1 Vývoj desorpce/ionizace laserem za spoluúčasti matrice

UV-MALDI metoda se vyvíjela společně s ESI v osmdesátých letech dvacátého století a je modifikací desorpce/ionizace laserem hmotnostní spektrometrie (LDI-MS).²¹

Jsou-li molekuly vzorku ionizovány laserem přímo, většinou se štěpí nežádoucím způsobem. Proto se začala používat matrice – látka, jejímž prostřednictvím se energie laseru přenáší na molekuly vzorku bez přebytečné vnitřní energie. Tím matrice brání štěpení vzorku.²⁰

MALDI byla vyvíjena téměř současně Koichi Tanakou a Franzem Hillenkampem spolu s Michaelem Karasem.³ V Tanakově studii bylo jako matrice použito jemných kobaltových částic v glycerolu. Pomocí této matrice byly analyzovány proteiny a polymery nad 100 000 Da.⁴⁴ Ve stejném roce skupina F. Hillenkampa uvedla použití kyseliny nikotinové pro analýzu proteinů nad 67 000 Da.⁴⁵ Tanaka obdržel v roce 2002 Nobelovu cenu za vývoj této metody.³

Brzy byla tato metoda aplikována na analýzu proteinů a rozšířila se do dalších výzkumných skupin. Metoda MALDI byla zkombinovaná s TOF.²¹

2.3.2 Analýza metodou desorpce/ionizace laserem za spoluúčasti matrice

Úspěšná MALDI analýza zahrnuje několik zásadních kroků: Přípravu vzorku, excitaci vzorku a odpaření, tvorbu a separaci ionizovaných molekul analytu a nakonec extrakci a analýzu iontů dle poměru m/z a detekci,²² z čehož přípravu vzorku, volbu matrice a intenzitu laserového záření lze považovat za nejdůležitější kroky pro úspěšnou MALDI analýzu.

2.3.2.1 Příprava vzorku

Pro získání reprodukovatelných výsledků je důležitá homogenita matrice a analytu. Homogenita je závislá jednak na typu matrice, analytu a systému rozpouštědel a dále na způsobu přípravy vzorku.¹ Proto je nutné zvolit správný způsob přípravy, zvláště pak vhodný způsob nanesení matrice a analytu na MALDI terčik. Prvním způsobem je tzv. jednovrstvá metoda nanášení. Při této metodě je smísení roztoku matrice a analytu prováděno ještě před nanesením na terčik. Poté je směs nanesena v jedné vrstvě na terčik a ponechána kokrystalizovat. Rozdělení molekul analytu by mělo být rovnoměrnější než u jiných metod nanášení, avšak v některých případech je vhodnější použít tzv. dvouvrstvou metodu. Zde je nejdříve na desku nanesen analyt a po odpaření rozpouštědla je překryt vrstvou matrice, či naopak. Vhodnost té které metody je pro různé matrice a analyty rozdílná.

Po nanesení vzorku je MALDI terč vložen do spektrometru a připraven k ozařování laserem.

2.3.2.2 Ionizační mechanismus

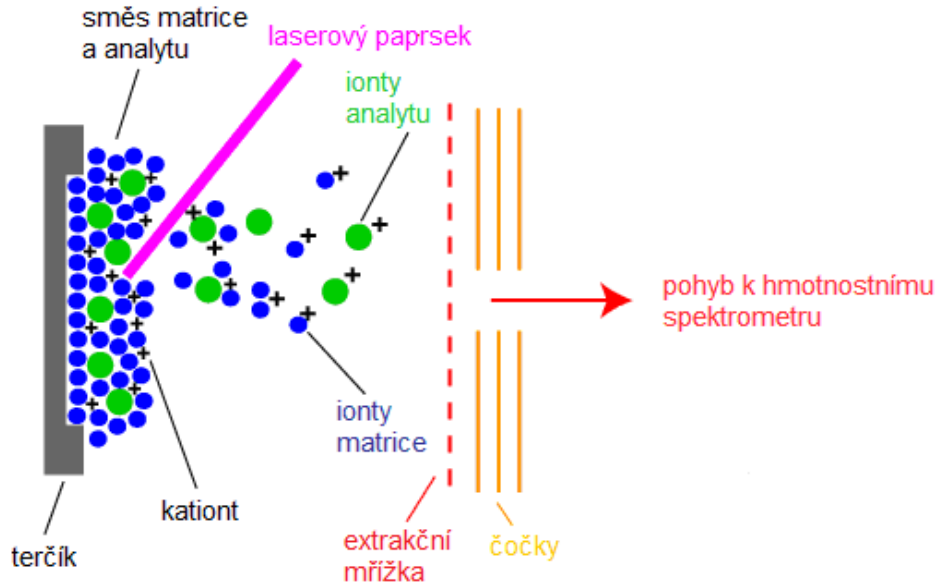
MALDI proces je velice komplikovaný komplex chemických jevů probíhající během několika málo nanosekund a dosud nebyly zcela objasněny všechny mechanismy, které při tomto procesu probíhají.²¹

Zdrojem energie je nejčastěji dusíkový laser o vlnové délce 337 nm.²¹ Energie laserového paprsku musí být dostatečná pro ionizaci/desorpci vzorku, avšak co možná nejnižší, jelikož při zvýšené energii vzrůstá generace klastrů či dochází k nežádoucí fragmentaci.¹³

Po ozáření je energie laserového pulsu primárně absorbována molekulami matrice, kterých je ve vzorku 100 – 100 000 násobný nadbytek.¹ Energie laseru způsobí desorpci vzorku z povrchu terčíku.²³ V prvním kroku vzniká hustý oblak, tvořený z neutrálních molekul matrice, z radikálů matrice, neutrálních molekul analytu, elektronů a atomů vodíku. V tomto oblaku dochází k ionizaci analytu, kdy neutrální molekuly analytu jsou nabity přenosem protonu (či kationtu) reakcí s reaktivními částicemi matrice. Tímto je přenesena energie laserového pulsu z molekul matrice na molekuly analytu. Nejdříve tedy dochází k přechodu z pevné do plynné fáze a následně k iontově-molekulárním interakcím a vzniku molekulárních aduktů.²¹ Proces desorpce a ionizace je znázorněn na *Obr. 2*.

Molekuly analytu jsou obvykle ionizovány protonizací nebo tvorbou aduktů s alkalickými kovy, při které se tvoří $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$ atd., v pozitivním módu nebo deprotonací v negativním módu ($[M-H]^-$). MALDI produkuje především jednou nabitě ionty²⁴, a to i u velkých molekul, ale mohou se tvořit i několikanásobně nabitě ionty nebo jednou nabitě dimery a trimery.²³

Proces tvorby iontů je výrazně komplikovanější a existuje více teorií. Podrobnější popis by výrazně přesahoval rámec této práce. Bližší informace lze získat z odborných publikací, jako např.^{21, 22, 25, 27, 28}



Obr. 2: Schéma desorpce a ionizace v MALDI zdroji.²⁹

2.3.2.3 Separace a detekce

MALDI je často spojována s analyzátozem doby letu. Jedná se o pulzní hmotnostní analyzátor (ideální pro spojení s MALDI). Nejdříve jsou vzniklé ionty urychleny velmi krátkým pulzem na vstupu do analyzátorové trubice. Po průchodu elektrickou mřížkou ionty putují analyzátorovou trubicí a dochází k separaci dle molekulové hmotnosti, kdy ionty s nižší molekulovou hmotností dorazí k detektoru za kratší dobu než ionty s vyšší molekulovou hmotností. Přesně se měří čas, za který ionty urazí konstantní dráhu k detektoru, podle čehož se určí jejich m/z .^{1,30} Schéma MALDI-TOF je znázorněno na *Obr. 3*.

Ionty se stejným nábojem získají při průchodu elektrickým gradientem stejnou potenciální energii dle rovnice:

$$E_{pot} = zU$$

kde z je náboj a U elektrický potenciál. Jejich rychlost pak závisí na hmotnosti m podle rovnice:³¹

$$E_{kin} = \frac{1}{2}mv^2$$

Spojením těchto rovnic získáme:

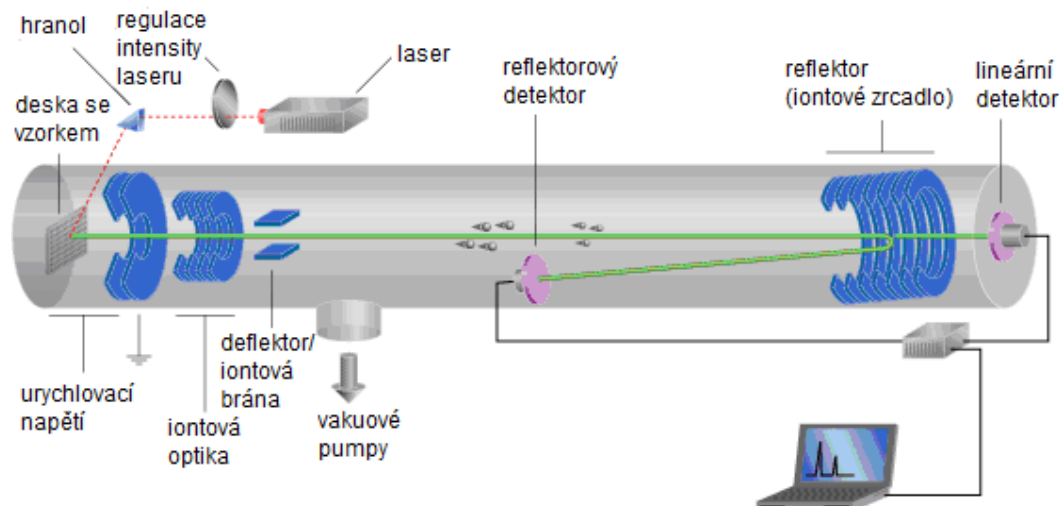
$$zU = \frac{1}{2}mv^2$$

Doba letu t je definovaná jako:

$$t = \frac{l}{v}$$

kde l je délka trubice (= dráha letu) a v je rychlost iontu. Řešením rovnic získáme vztah pro výpočet m/z .²³

$$\frac{m}{z} = 2U \frac{t^2}{l^2}$$



Obr. 3: Schéma hmotnostního spektrometru na principu MALDI-TOF s reflektorem.³¹

Iontová optika a deflektor umožňují zaostřit ionty stejného poměru m/z a odklonit ionty matrice. Reflektrom, tzv. iontové zrcadlo, umožňuje zvýšit přesnost měření tím, že prodlužuje dráhu letu (zlepší se separace iontů) a také soustředěním stejných iontů v duté části prstencovitých elektrod. Má stejnou elektrickou polaritu jako deska se vzorkem a obrací směr letu iontů směrem k druhému detektoru.³¹ Reflektorem se také kompenzují rozdíly v počáteční rychlosti iontů, jelikož při ionizaci získají ionty kinetickou energii s určitou distribucí, což vede k rozšíření píků při detekci a tím ke zhoršení rozlišení.¹ Výhodou TOF je teoreticky neomezený rozsah hmotností, které lze detekovat.³²

2.4 Matrice pro desorpci/ionizaci laserem za spoluúčasti matrice

Při ionizaci vzorku je třeba zajistit efektivní a kontrolovatelný přenos energie a zároveň zamezit tepelnému rozkladu vzorku. K tomuto účelu slouží matrice. Ačkoliv detailní role matrice není ještě zcela jasná, pečlivý výběr matrice je při analýze rozhodujícím krokem.¹ Volba matrice určuje kvalitu výsledného spektra i to, zda bude analyt vůbec ionizován.

Objevením ionizační techniky MALDI se také začaly vyvíjet a zkoumat matrice. Neexistuje universální matrice, která by byla vhodná pro všechny typy analytů. Každá matrice je vhodná jen pro určité typy látek a proto je nutné nalézt množství rozličných matric, aby pokryly široký rozsah vzorků.²¹ I přes snahy předpovídat vhodnost chemické sloučeniny jako MALDI matrice na základě teoretických úvah, nejvíce matric bylo (a stále je) objeveno náhodou nebo „metodou pokus-omyl“.¹ V současné době je používáno a testováno mnoho matric pro různé typy látek, avšak v oblasti lipidů je známo jen málo vhodných matric, zejména pro nepolární lipidy.⁵

2.4.1 Role matrice

Účinná MALDI matrice je charakterizovaná následujícími vlastnostmi:

1. Zajišťuje kontrolovatelný přenos energie do kondenzované fáze směsi matrice a analytu, který vyvolává rovnoměrnou a jemnou desorpci.^{1,22}
2. Molekula matrice absorbuje při vlnové délce laseru, to znamená, že energie fotonů laseru je rovna energii potřebné k vybuzení dané molekuly a tím i k její ionizaci. Matrice tedy podporuje ionizaci analytu bez předání přebytečné energie, která by vedla k fragmentaci analytu.^{1,22}
3. Matrice by měla být stabilní ve vakuu.^{1,22}
4. Optimální matrice je charakterizovaná nízkým pozadím – signál matrice by měl být velice nízký, aby se zabránilo interferenci mezi ionty matrice a analytu.¹
5. Ideální matrice by měla poskytovat jen jeden adukt analytu nebo vykazovat jen slabou tendenci k tvoření klastrů, jelikož tvorba klastrů matrice s analytem může vážně komplikovat analýzu dat.¹
6. Vhodná matrice by měla poskytovat vysoký poměr signálu analytu k šumu, tedy měla by být dosažena vysoká citlivost.¹

Většina matric nesplňuje všechny podmínky. Často se stává, že v plynné fázi jsou klastrové ionty matrice. Proto většina matric poskytuje signál o m/z vyšším, než je molekulová hmotnost matrice.¹ Matrice by měla izolovat molekuly analytu a předcházet tak jejich přímé fotoionizaci a to je také důvodem proč je nutné použití přebytku matrice nad analytem.¹³

2.4.2 Používané matrice

Mezi stovkami látek navrhovanými jako účinné matrice je jen několik z nich využíváno v praxi.¹ V dnešní době je možné vybírat matici z relativně malého množství látek. Aktuální výběr závisí na typu analytu.²²

Běžně používané pevné matrice jsou obvykle nízkomolekulární organické kyseliny se silnou absorpcí při vlnové délce laseru.³ Anorganické sloučeniny, jako grafit³³ nebo částice oxidů kovů³⁴, mohou být také použity jako matrice, jejich použití však není tak časté. Vyvíjené jsou i kapalně matrice a matrice na bázi iontových kapalin.¹⁴

Jak již bylo uvedeno, matrice musí vykazovat silnou absorpci při vlnové délce laserového záření³ (337 nm v případě nejčastěji používaného dusíkového laseru). To je důvod proč téměř všechny běžně používané organické matrice obsahují aromatické jádro s delokalizovanými π elektrony. Organickými maticemi bývají nejčastěji deriváty kyseliny benzoové (kyselina 2,5-dihydroxybenzoová), kyseliny skořicové (kyselina α -kyano-4-hydroxyskořicová, kyselina sinapová), heterocykly (9-aminoakridin, 5-chloro-2-merkaptobenzothiazol) a další aromáty (např. 2,4,6-trihydroxyacetofenon).¹

Jednoznačně nejběžněji používanou UV maticí v oblasti lipidů je kyselina 2,5-dihydroxybenzoová (DHB).⁵ DHB je vzhledem ke své kyselosti zvláště užitečná jako matrice v pozitivním módu.³⁵

Pro ionizaci zcela nepolárních lipidů, jako je například uhlovodík skvalen, je používáno přídavku pomocného činidla, které je přidáno k matici. Takovým činidlem je např. trifluoracetát stříbrný (Ag^+TFA^-).¹ Pro zcela nepolární látky byla také vyvinuta matrice 2,5-dihydroxybenzoan lithný (LiDHB), která má oproti stříbrným solím řadu výhod.¹⁹ Účinnost matrice LiDHB byla také prokázána u voskových esterů⁹ a uhlovodíků z kutikuly hmyzu.³⁶ Další podrobnosti jsou uvedeny v kapitole 2.4.3.

MALDI analýza volných mastných kyselin je s použitím běžných matic poměrně obtížná. Hlavním důvodem je překrývání signálu volných mastných kyselin se signály matrice. Tento problém je vyřešen použitím *meso*-tetrakis(pentafluorofenyl)porfyriu (MTPFPP), který má poměrně vysokou molekulovou hmotnost a nevykazuje signál pod 500 m/z v pozitivním módu.³⁷

Volné mastné kyseliny se dají také velice dobře analyzovat v negativním módu při použití matrice 9-aminoakridin (9-AA).¹ Další matricí pro analýzu v negativním módu je 1,8-bis(dimethylamino)naftalen (DMAN). Tato matrice je vhodná nejen pro mastné kyseliny, ale obecně pro nízkomolekulární kyselé látky. DMAN je silně bazická látka, která má schopnost „vtáhnout“ na sebe všechny dostupné protony. Ionizace probíhá na základě acidobazických rovnováh³⁸ a výsledkem je deprotonovaný analyt viditelný v negativním módu. Výhodou je čisté spektrum bez přítomnosti matričních iontů.³⁹

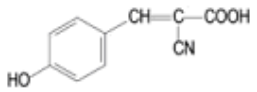
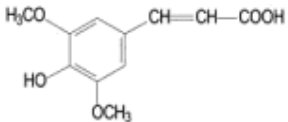
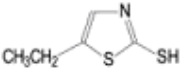
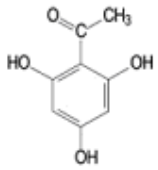
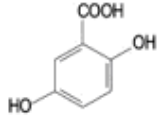
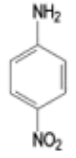
Dále je možné analyzovat volné mastné kyseliny pomocí anorganických matric, jako je grafit a porézní křemík.¹

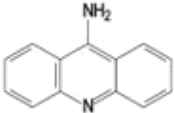
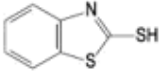
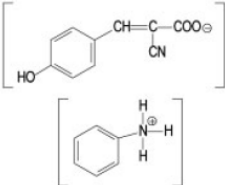
Pro MALDI fosfolipidů byly testovány různé matrice, jako například kyselina sinapová (SA), HCCA a DHB, která poskytuje nejlepší výsledky v pozitivním módu. V negativním módu poskytují nejlepší výsledky matrice 9-AA a *para*-nitroanilin (PNA). Použití PNA je limitováno nestabilitou ve vakuu a spektra vykazují změny závislé na čase analýzy.^{1, 40} V nedávné studii byla testována matrice 1H-pteridin-2,4-dion (lumazin) pro analýzu směsi lipidů obsahující fosfolipidy, která je účinná pro použití jak v pozitivním, tak v negativním módu. V porovnání s DHB bylo dosaženo stejných výsledků, avšak při použití nižší laserové energie a s nižším detekčním limitem.²

Pro flavonoidy a karotenoidy je vhodnou matricí 2',4',6'-trihydroxyacetofenon (THA), kdy dochází k fragmentaci v menším rozsahu než při použití DHB. Diacylglyceroly a triacylglyceroly lze detekovat s matricí DHB či HCCA.¹

V *Tab. 1* jsou uvedeny nejběžněji používané matrice v oblasti lipidů.

Tab. 1: Přehled nejčastěji používaných matric v oblasti lipidů.¹⁴

<i>Chemická struktura</i>	<i>Název</i>	<i>Sumární vzorec/ M_r</i>	<i>Poznámka</i>
	kyselina α-kyano-4-hydroxy skořicová (HCCA nebo CHCA)	C ₁₀ H ₇ NO ₃ 189,04	Běžná matrice pro výzkum proteinů. Použitelná i v oblasti lipidů, avšak produkuje mnoho rušivých signálů.
	kyselina sinapová (SA)	C ₁₁ H ₁₂ O ₅ 224,07	Zatím jen zřídka používaná matrice v lipidomickém výzkumu. Stejně nevýhody jako u HCCA. Obtížná detekce negativních iontů.
	5-ethyl-2-merkaptothiazol	C ₅ H ₇ NS ₂ 145,00	Vynikající vlastnosti pro detekci TG.
	2,4,6-trihydroxyacetofenon (THA)	C ₈ H ₈ O ₄ 168,04	Neutrální matrice použitelná při negativním módu, hlavně pro neutrální či záporně nabitě lipidy. Velmi užitečná pro selektivní indikaci určitých tříd lipidů ve směsi.
	kyselina 2,5-dihydroxy benzoová (DHB)	C ₇ H ₆ O ₄ 154,03	Zatím nejvíce používaná matrice v oblasti lipidů. Použitelná v pozitivním i negativním módu (zde poměrně vysoké pozadí).
	para-nitroanilin (PNA)	C ₆ H ₆ N ₂ O ₂ 138,04	Vzhledem ke své bazicitě, je tato matrice vhodná pro detekci v negativním módu. Není příliš stabilní ve vákuu.

	9-aminoakridin (9-AA)	$C_{13}H_{10}N_2$ 194.08	Slibná matrice pro výzkum lipidů. Vyšší citlivost než DHB, ale spektra jsou výrazně ovlivněna typem rozpouštědla.
	2-merkaptobenzothiazol	$C_7H_5NS_2$ 166.99	Uvádí se lepší vlastnosti pro detekci lipidů a fosfolipidů z tkáňových řezů. Vhodná pro zobrazovací MS.
C_x	grafit	C_x 12.00	Používán především pro detekci malých sloučenin, jako jsou volné mastné kyseliny. Grafit neposkytuje žádné pozadí. Použití v IR-MALDI.
	Matrice ve formě „tekutých krystalů“. Jedná se o soli mezi kyselými a zásaditými matricemi.	$C_{16}H_{14}N_2O_3$ 282.10	Ačkoli tyto matrice by měly mít oproti pevným matricím řadu výhod, jsou ještě poněkud „exotické“ a ne příliš často používané. Některé sloučeniny jsou však již komerčně vyráběny.

Mnoho prací již prokázalo, že MALDI-TOF je účinnou metodou pro analýzu polárních i nepolárních lipidů. Tato metoda je schopná poskytnout spolehlivé výsledky nehledě na polaritu lipidů, které jsou srovnatelné s metodami jako je ESI a APCI. Je však také zřejmé, že je zde nutný další vývoj a nezbytná zlepšení, rozšíření metody do neprozkoumaných oblastí. Zejména v oblasti hledání nových účinnějších matric je třeba dalšího výzkumu.¹⁴

2.4.3 Analýza nepolárních lipidů pomocí 2,5-dihydroxybenzoanu lithného

Během výzkumů, uskutečněných skupinou hmotnostní spektrometrie na ÚOCHB AV ČR a ICE MPI Jena, bylo testováno několik matric ve směsi s glyceroltripalmitátem a hexatrikontanem jako analyty. Mimo jiné byl testován soubor kovových solí ve spojení s kyselinou 2,5-dihydroxybenzoovou (alkalické kovy – Li, Na, K, Rb, Cs a přechodné kovy – Cu, Ag). Nejlepších výsledků bylo dosaženo při použití lithné soli kyseliny 2,5-dihydroxybenzoové (LiDHB). Dále byly výše zmíněné kovové soli kyseliny 2,5-dihydroxybenzoové testovány jako potenciální matrice pro MALDI-MS analýzu voskových esterů. LiDHB s izotopy lithia ${}^6\text{Li}$ a ${}^7\text{Li}$ – tedy ${}^6\text{LiDHB}$ nebo ${}^7\text{LiDHB}$, byla vyhodnocena jako nejlepší matrice vhodná pro voskové estery. Tato matrice usnadňuje kationizaci voskových esterů při relativně nízkém výkonu. Matriční ionty jsou v rozsahu do 200 m/z a neruší tedy signály voskových esterů. Při srovnání voskových esterů, lišících se délkou řetězce a počtem dvojných vazeb, bylo zjištěno, že preferenčně jsou ionizovány voskové estery s kratším řetězcem a/nebo s dvojnými vazbami. Tvorba lithných iontů není provázena eliminací vodíku nebo jinou fragmentační reakcí. Lithium má jednoduchý izotopický klastr a tato skutečnost zjednodušuje vyhodnocení spekter směsi uhlovodíků. Další výhodou je její snadná příprava - smísením kyseliny 2,5-dihydroxybenzoové s uhlíčitánem lithným či hydroxidem lithným a odpařením rozpouštědla.

Lithná sůl kyseliny 2,5-dihydroxybenzoové se tedy ukázala jako velmi efektivní matrice pro MALDI-TOF analýzu voskových esterů, nepolárních lipidů s dlouhým řetězcem a uhlovodíků, jejichž ionizace byla dříve obtížná. Je také vhodná pro analýzu polymerů. Výsledkem je vznik lithných iontů $[\text{M}+\text{Li}]^+$. Tato matrice byla aplikována na analýzu hmyzích kutikulárních uhlovodíků a také na analýzu dalších nepolárních lipidů, včetně voskových esterů.^{9, 19}

Ionizace lithiem má své výhody. Tvorba uhlovodíků s lithiem není provázena eliminací vodíku nebo jinými fragmentačními reakcemi a z důvodu jednoduché izotopické distribuce lithia se zdá být lépe použitelná pro analýzu směsi uhlovodíků, než dříve používané stříbrné kationty.¹⁹ Přírodní izotopické zastoupení lithia je ${}^6\text{Li}$ (5%) a ${}^7\text{Li}$ (95%) a při použití komerčně vyráběného ${}^7\text{Li}$ (99%) se významně zjednodušuje vyhodnocování hmotnostních spekter směsi analytů.¹⁹

3 CÍL PRÁCE

Cílem této práce je otestovat chemické sloučeniny, které mají vysoký potenciál být vhodnými MALDI matricemi pro vybrané třídy nepolárních lipidů, zvláště pro nasycené vyšší uhlovodíky a voskové estery. Zkoumanými látkami jsou zejména lithné soli aromatických kyselin.

- Syntéza lithné soli 2,5-dihydroxytereftalové kyseliny
- Syntéza dalších lithných solí vybraných kyselin s navázaným alkoholem a/nebo hydroxylovou skupinou
- Testování syntetizovaných matric se standardy uhlovodíků a voskových esterů
- Vyhodnocení matric dle jejich MALDI vlastností

MALDI vlastnosti matric jsou porovnávány s matricí LiDHB, která je ověřenou matricí pro analýzu uhlovodíků i voskových esterů.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité chemikálie

- *n*-Triakontan – 99%, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- 2,2,4-Trimethylpentan – $\geq 99,5\%$, LAB-SCAN (Gliwice, Polsko)
- Aceton – p.a., Penta (Chrudim, ČR)
- Acetonitril – Chromasolv[®] pro HPLC, gradient grade, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- Deionizovaná voda – Milli Q, Millipore (Milford, MA, USA)
- Diethylether – p.a. destilovaný, Penta (Chrudim, ČR)
- Ethylacetát – čistý, Lach-Ner (Neratovice, ČR)
- Hexan – SupraSolv[®] pro plynovou chromatografii, Merck (Darmstadt, Německo)
- Chloroform – p.a. stabilizovaný 1% ethanolu, Penta (Chrudim, ČR)
- Kyselina α -kyano-4-hydroxyskořicová – 97%, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- Kyselina benzoová – 99,5%, Lach-Ner (Neratovice, ČR)
- Kyselina 2,5-dihydroxybenzoová – $\geq 98\%$, Fluka Chemie AG (Buchs, Švýcarsko)
- Kyselina 2,5-dihydroxyterftalová – $\geq 98\%$, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- Kyselina 2,5-dimethoxybenzoová – $\geq 98\%$, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- Kyselina octová – 99%, Lach-Ner (Neratovice, ČR)
- Kyselina salicylová – 99%, Lach-Ner (Neratovice, ČR)
- Kyselina sinapová – p.a., Fluka Chemie AG (Buchs, Švýcarsko)
- Kyselina vanilová – 97,0%, Fluka Chemie AG (Buchs, Švýcarsko)
- LiDHB (2,5-Dihydroxybenzoan lithný) – syntetizovaný v laboratoři školitele¹⁹
- Lithné ionty – 1000 ppm, standard pro AAS, Analytika (Praha, ČR)
- Methanol – HPLC super gradient, Lach-Ner (Neratovice, ČR)
- Methanol – LC-MS, $\geq 99,9\%$, Fluka Chemie AG (Buchs, Švýcarsko)
- Propan-2-ol – Lichrosolv[®] pro HPLC, gradient grade, Merck (Darmstadt, Německo)
- Stearyl behenát – 99%, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- Toluen – p.a., Penta (Chrudim, ČR)
- Uhličitan lithný – p.a., Lachema (Brno, ČR)

4.2 Přístroje a zařízení

4.2.1 Reflex IV

MALDI-TOF experimenty byly uskutečněny na přístroji Reflex IV (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Německo) pracujícím v reflektroновém módu (*Obr. 4*). Kladně nabití ionty byly urychleny napětím 20 kV. Desorpce a ionizace byla umožněna použitím dusíkového UV laseru s vlnovou délkou 337,1 nm, délkou pulsu 4 ns o energii 300 μ J, s frekvencí 9 Hz a s nastavitelnou intenzitou laserového záření 0 – 100%. Data byla sbírána a analyzována pomocí programu FlexAnalysis 3.0 (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Německo).⁹ Reflex IV má hmotnostní rozsah do 100 kDa (reflektroновý mód) nebo >750 kDa (lineární mód). V reflektroновém módu je rozlišení vyšší než 25 000.

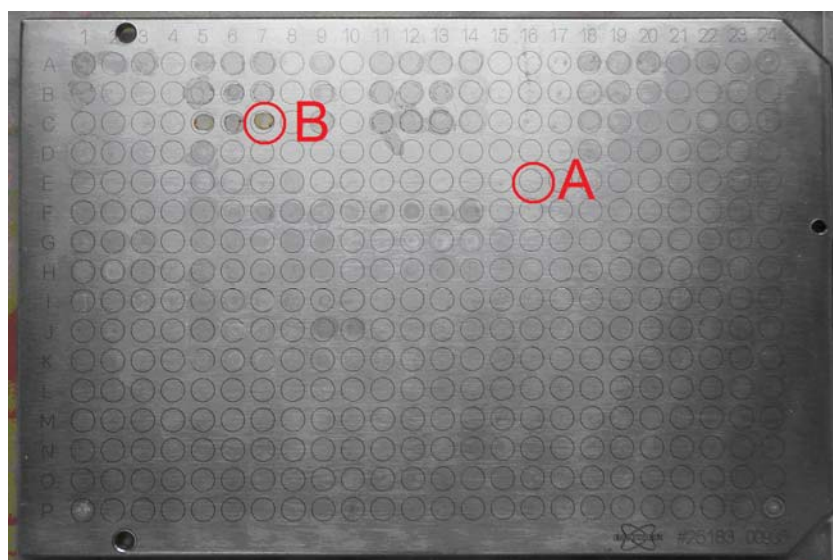


Obr. 4: Přístroj Reflex IV⁴²

4.2.2 Deska pro nanesení vzorků

Vzorky byly nanášeny na nerezovou ocelovou MALDI desku s 384 pozicemi. Deska byla nejdříve důkladně vyčištěna (viz. kap. 3.3.3). Po nanesení vzorků byla umístěna do MALDI zdroje.

Dále v textu bude uváděn termín „bod v rámci jedné pozice“. Tímto bodem je míněno místo na jedné pozici desky, kam dopadne laserový paprsek.



Obr. 5: Ocelová MALDI deska. Na obrázku jsou patrné jednotlivé pozice pro nanesení vzorků. A – prázdná pozice; B – pozice s naneseným vzorkem.

4.2.3 Další přístroje

- Analytické váhy Mettler-Toledo AB204-S (Greifensee, Švýcarsko)
- Atomový absorpční spektrometr AAS 3 (Zeiss-Jena, Německo)
- C, H, N analyzátor PE 2400 Series II CHNS/O (Perkin Elmer, USA, 1999)
- pH metr HI 9321 HANNA Instruments (Rhode Island, USA)
- Refrigerated CentriVap concentrator (LABCONCO, USA)
- Spektrofotometr LAMBDA 35 UV/Vis Systems (PerkinElmer, USA)

4.3 Pracovní postupy

4.3.1 Syntéza matric

Všechny matrice byly připraveny neutralizační reakcí příslušné kyseliny s uhličitánem lithným s použitím vody jako rozpouštědla. Některé kyseliny se ve vodě jen velmi špatně rozpouštěly. Po přidání uhličitánu lithného, který se ve vodě také téměř nerozpouští, se obě složky začaly pozvolna rozpouštět. Toto je jeden z důkazů, že docházelo k reakci těchto látek a vzniku produktu, který je již ve vodě lépe rozpustný. Při reakci docházelo k uvolňování oxidu uhličitého (u různých kyselin různě intenzivnímu). Průběh reakce byl sledován pomocí změn pH. Pro kontrolu pH byl použit pH metr.

Před syntézou matric bylo na základě pK_A kyselin vypočítáno výsledné pH reakční směsi, tedy určen bod ekvivalence, kdy je kyselina právě kvantitativně zneutralizována na požadovanou sůl.

Předpokládané pH vodného roztoku matrice bylo počítáno dle vzorce:

$$\text{pH} = 7 + 1/2 (\text{p}K_A + \log c_A^-)$$

V Tab. 2 jsou uvedeny vypočítané hodnoty pH pro jednotlivé roztoky matric.

Tab. 2: Vypočítané hodnoty pH roztoků matric.

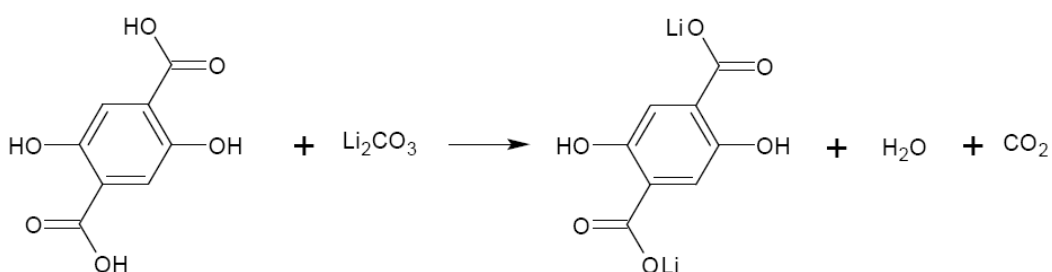
<i>Matrice</i>	<i>pK_A kyseliny</i>	<i>Koncentrace matrice v mol/l</i>	<i>Předpokládané pH roztoku matrice</i>
Li ₂ DHT	-	0,082	-
LiDMB	-	0,050	-
LiHCCA	2,93	0,053	7,82
LiSA	4,90	0,179	9,08
LiBA	4,19	1,045	9,10
LiSalA	2,97	0,966	8,48
LiVA	4,51	0,813	9,21

U matric Li_2DHT a LiDMB nebyla zjištěna disociační konstanta a proto nebylo možné vypočítat předpokládané pH roztoků matric.

V praxi však nebylo možné vypočítané hodnoty pH dosáhnout, jelikož již kolem pH 7 docházelo v roztoku k oxidaci kyselin. Pro získání žádaných produktů bylo nutné ponechat slabě kyselé pH roztoku.

4.3.1.1 Syntéza 2,5-dihydroxytereftalanu lithného

Reakce probíhala dle následující rovnice:



Rovnice č.1: Neutralizace kyseliny 2,5-dihydroxytereftalové uhličitánem lithným.

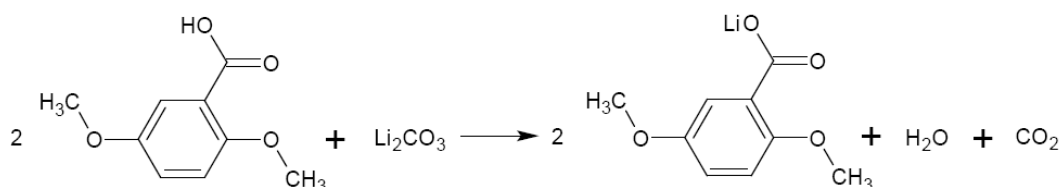
K 0,5 g kyseliny 2,5-dihydroxytereftalové (DHT) bylo přidáno 15 ml vody. Tato suspenze byla pozvolna zahřívána přibližně na 90 °C, aby se zvýšilo množství rozpuštěné kyseliny. Při zahřívání se krystalky kyseliny pomalu vznášely k hladině a tvořily drobné vločky, poté se pozvolna rozpouštěly. I po dlouhém zahřívání (10 min) a přidavku vody, bylo dosaženo rozpuštění kyseliny přibližně jen z 30%. K 0,185 g uhličitánu lithného bylo přidáno 5 ml vody. Získaná suspenze uhličitánu lithného byla postupně přidávána k suspenzi DHT, směs byla míchána a průběžně bylo měřeno pH na pH metru. Oba reaktanty se pozvolna rozpouštěly, ale k úplnému rozpuštění bylo třeba reakční směs ještě zahřát na cca 100 °C. Výsledný roztok byl žluté barvy. Roztok byl ponechán velmi slabě kyselý – pH 6, jelikož i velice malý přídavek uhličitánu lithného by způsobil posun hodnoty pH přes 7 a došlo by k oxidaci kyseliny, což se projeví hnědnutím roztoku. Z této směsi již nelze získat krystaly požadovaného produktu.

Získaný žlutý roztok byl odpařen na minimální objem (cca 3 ml), kdy stoupla jeho hustota a poté prudce zchlazen v mrazáku. Pro iniciaci krystalizace bylo nutné

škrábat tyčinkou o dno a stěnu kádinky. Tímto byla získána směs krystalů a zbytku rozpouštědla, která byla ihned přefiltrována přes fritu s malými póry. Získané krystaly byly vysušeny do konstantní hmotnosti v exikátoru. Výsledným produktem byly žluté krystaly 2,5-dihydroxytereftalanu lithného (Li_2DHT).

4.3.1.2 Syntéza 2,5-dimethoxybenzoanu lithného

Reakce probíhala dle následující rovnice:



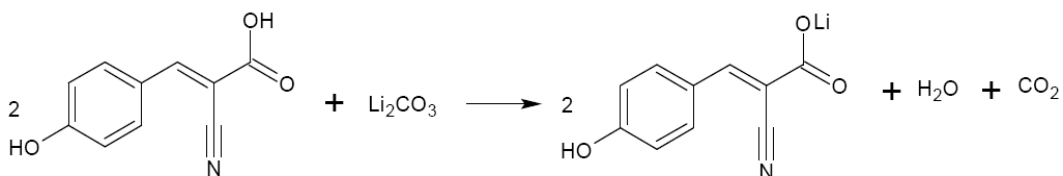
Rovnice č.2: Neutralizace kyseliny 2,5-dimethoxybenzoové uhličitanem lithným.

K 0,5 g kyseliny 2,5-dimethoxybenzoové (DMB) bylo přidáno 50 ml vody a směs byla míchána skleněnou tyčinkou asi 3 minuty. Pozvolna se rozpustila asi polovina množství kyseliny. Po zahřátí na cca 60 °C se postupně rozpustil i zbytek kyseliny. K roztoku kyseliny byla přimíchávána suspenze uhličitanu lithného, připravená přidáním 5 ml vody k 0,101 g uhličitanu lithného. Na pH metru bylo průběžně měřeno pH. Roztok byl ponechán slabě kyselý – pH 5,52.

Čirý roztok byl odpařen na minimální objem (cca 8 ml), zchlazen v mrazáku a krystalizace byla podpořena škrábáním o dno a stěny kádinky. Získané krystaly byly ihned přefiltrovány přes fritu, aby byl odstraněn zbytek rozpouštědla a přefiltrované krystaly byly vysušeny do konstantní hmotnosti v exikátoru. Výsledným produktem byly bílé krystaly 2,5-dimethoxybenzoanu lithného (LiDMB).

4.3.1.3 Syntéza α -kyano-4-hydroxycinnamanu lithného

Reakce probíhala dle následující rovnice:

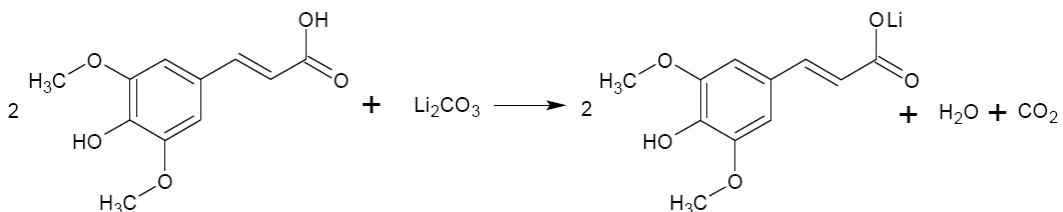


Rovnice č.3 : Neutralizace kyseliny α -kyano-4-hydroxyskořicové uhličitanem lithným.

0,5 g kyseliny α -kyano-4-hydroxyskořicové (HCCA) bylo suspendováno v 50 ml vody. Světle žluté krystaly byly ve vodě velice špatně rozpustné. K roztoku kyseliny byla přimíchávána suspenze uhličitanu lithného, připravená přidáním 5 ml vody k 0,098 g uhličitanu lithného. Poté se krystaly HCCA pozvolna rozpouštěly a roztok přešel z bezbarvého na světle žlutý. Pro úplné rozpuštění bylo třeba roztok ještě mírně zahřát, přibližně na 40 °C. Výsledné pH roztoku bylo ponecháno slabě kyselé. Roztok byl odpařen na cca 5 ml, zchlazen v mrazáku a krystalizace byla podpořena škrábáním o dno a stěny kádinky. Vznikající světle žluté krystaly byly přefiltrovány a vysušeny do konstantní hmotnosti v exikátoru. Výsledným produktem byly krystaly α -kyano-4-hydroxycinnamanu lithného (LiHCCA).

4.3.1.4 Syntéza sinapanu lithného

Reakce probíhala dle následující rovnice:



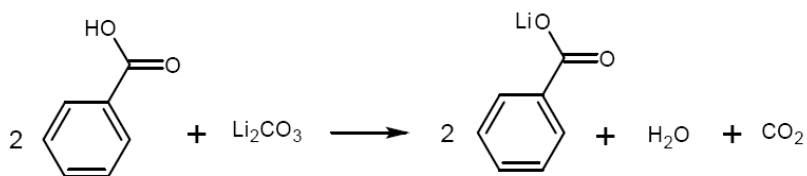
Rovnice č. 4: Neutralizace kyseliny sinapové uhličitanem lithným.

Příprava lithné soli kyseliny sinapové byla z důvodu tepelné nestability odlišná. Samotná kyselina se ve vodě příliš nerozpouštěla. Až po přidání uhličitanu lithného se za laboratorní teploty pozvolna rozpouštělo přibližně 50% reagujících látek. Po zahřátí se zbytek reaktantů rychle rozpustí, avšak roztok již při velmi malém zvýšení teploty (27°C) přecházel z původně bezbarvého, přes temně rudý až do hnědého zbarvení. Takto zoxidovaný roztok již nešlo dále použít. Proto bylo nutné reakci provést za laboratorní teploty.

K 0,2 g kyseliny sinapové (SA) bylo přidáno 5 ml vody, kádinka byla umístěna na automatickou míchačku a za stálého míchání bylo po velmi malých dávkách přidáván uhličitan lithný (cca 0,03g) a průběžně kontrolováno pH na pH metru. Výsledné pH roztoku bylo ponecháno slabě kyselé. Po přidání uhličitanu lithného byla směs ponechána 4 hodiny míchat za laboratorní teploty. Po této době byly téměř všechny reaktanty rozpuštěny. Zbylé pevné částice byly odfiltrovány a dále se pracovalo jen se získaným roztokem. Ten byl rozdělen do čtyř mikrozkušavek a odpařen na vakuové rotační odparce na minimální objem – cca 1 ml v každé mikrozkušavce. Po vyjmutí z odparky byl obsah mikrozkušavek ponechán za laboratorní teploty roztát. Na stěně jedné mikrozkušavky se vytvořil velký krystal, kterým byly „naočkovány“ zbylé mikrozkušavky. Došlo k velice rychlé iniciaci krystalizace a hustá směs krystalů se zbytkem rozpouštědla byla okamžitě přefiltrována na fritě. Takto získané krystaly byly vysušeny v exikátoru do konstantní hmotnosti. Výsledným produktem byly světle okrové krystaly sinapinanu lithného (LiSA).

4.3.1.5 Syntéza benzoanu lithného

Reakce probíhala dle následující rovnice:



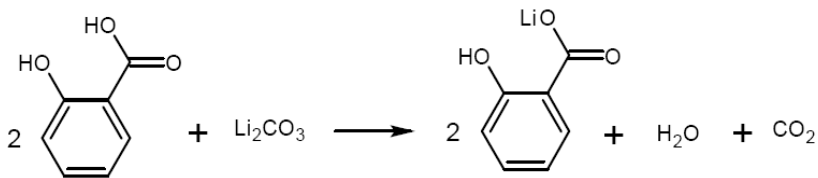
Rovnice č. 5: Neutralizace kyseliny benzoové uhličitanem lithným.

K 5,2 g kyseliny benzoové (BA) bylo přidáno 20 ml vody a suspenze byla míchána. Kyselina benzoová se ve vodě velice špatně rozpouštěla i při zahřívání.

Objem byl zvýšen na cca 40 ml a poté bylo ke kyselině přidáno cca 1,53 g uhličitanu lithného. Vznikající sůl se ve vodě pozvolna rozpouštěla. Výsledné pH roztoku bylo ponecháno slabě kyselé. Poté byl roztok odpařen na cca 5 ml, zchlazen v mrazáku a krystalizace byla podpořena škrábáním o dno a stěny kádinky. Vznikající bílé krystaly byly přefiltrovány a vysušeny do konstantní hmotnosti v exikátoru. Výsledným produktem byly krystaly benzoanu lithného (LiBA).

4.3.1.6 Syntéza salicylanu lithného

Reakce probíhala dle následující rovnice:

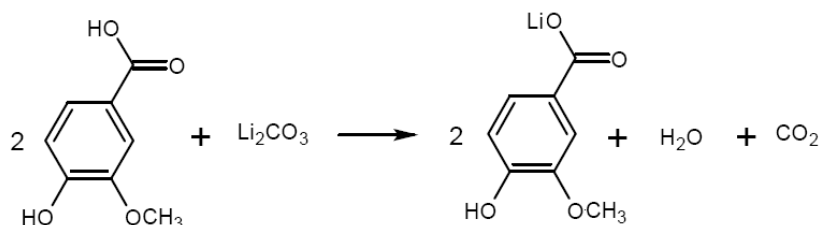


Rovnice č. 6: Neutralizace kyseliny salicylové uhličitanem lithným.

K 4,0 g kyseliny salicylové (SalA) bylo přidáno cca 30 ml vody. Kyselina salicylová je také ve vodě špatně rozpustná, k rozpouštění došlo až po přidání cca 1,14 g uhličitanu lithného. Výsledné pH roztoku bylo ponecháno slabě kyselé. Roztok byl zahuštěn na vakuové odparce na cca 6 ml a krystalizace byla podpořena zchlazením v mrazáku a škrábáním o dno a stěny kádinky. Vznikající bílé krystaly byly přefiltrovány a vysušeny do konstantní hmotnosti v exikátoru. Výsledným produktem byly krystaly salicylanu lithného (LiSalA).

4.3.1.7 Syntéza vanilanu lithného

Reakce probíhala dle následující rovnice:



Rovnice č. 7: Neutralizace kyseliny vanilové uhličitanem lithným.

K 4,1 g kyseliny vanilové (VA) bylo přidáno 30 ml vody a následně cca 0,90 g uhličitanu lithného. Směs byla míchána a vzniklý roztok zakonzentrován na vakuové odparce na cca 5 ml. Výsledné pH roztoku bylo ponecháno slabě kyselé. Krystalizace byla podpořena zchlazením roztoku v mrazáku a škrábáním o dno a stěny kádinky. Vznikající bílé krystaly byly přefiltrovány a vysušeny do konstantní hmotnosti v exikátoru. Bílé krystaly byly poté znovu překrystalizovány z vodného roztoku, jelikož elementární analýza ukázala obsah nečistot. Výsledným produktem byly krystaly vanilanu lithného (LiVA).

4.3.1.8 Shrnutí syntézy matric

Všechny uvedené matrice poměrně špatně krystalizovaly z vodného roztoku, proto bylo nutné odpaření na menší objem, ochlazení a škrábání dna a stěny kádinky i několikrát opakovat. Při neutralizaci bylo důležité zamezit oxidaci produktu, ke které dochází vlivem vyššího pH nebo vyšší teploty. Vzniklé krystaly bylo třeba přefiltrovat od zbytkového rozpouštědla velmi rychle, aby nedošlo k jeho úplnému odpaření a případné nečistoty a nezreagovaná kyselina nezůstaly rozpuštěné ve zbytkovém roztoku.

4.3.2 Příprava vzorků

Roztoky uhlovodíku *n*-triakontanu o koncentraci 47,2 $\mu\text{mol/l}$ a voskového esteru stearyl behenátu o koncentraci 0,43 mmol/l byly připraveny v chloroformu (1 ml). Roztoky matric byly připraveny ve směsi methanol/chloroform, přičemž přesné koncentrace matric, použitá rozpouštědla a poměry methanolu/chloroformu jsou uvedeny v následující tabulce (Tab. 3). Koncentrace Li₂DHT je z důvodu špatné rozpustnosti v methanolu (1 mg/ml) nižší než u ostatních matric. U Li₂DHT je poměr methanolu/chloroformu ve prospěch methanolu z důvodu již nízké koncentrace matrice v samotném methanolu, při přidání více chloroformu by byla koncentrace matrice příliš nízká.

Tab. 3: Přehled koncentrací matric a použitých rozpouštědel.

<i>Matrice</i>	<i>Koncentrace matrice (mg/ml)</i>	<i>Poměr MeOH/CHCl₃</i>
Li ₂ DHT	0,75	4/1
LiDMB	10,00	1/3
LiHCCA	10,00	1/3
LiSA	10,00	1/3
LiBA	10,00	1/3
LiSalA	10,00	1/3
LiVA	10,00	1/3
LiDHB	10,00	1/3

4.3.3 Čištění desky

Nerezová MALDI deska byla omyta ethanolem a povrch desky byl otřen filtračním papírem pro odstranění největších nečistot. Poté byla deska důkladně opláchnuta v methanolu/chloroformu v poměru 2:1 a vložena na 15 minut do ultrazvukové vany s methanolvou lázní. Po skončení sonifikace byla deska opláchnuta chloroformem a usušena na vzduchu.

4.3.4 Nanášení vzorků

Vzorky byly na desku nanášeny třemi způsoby. Dvouvrstvou technikou, kdy nejdříve byla na pozici na desce nanášena matrice (1,5 μ l) a po odpaření rozpouštědla byla vrstva matrice překryta vrstvou analytu (1,5 μ l) a nechána usušit na vzduchu – Ma/Vz metoda. Druhý způsob nanášení byl opačný, kdy na terčík byl nejdříve nanášen analyt a po odpaření rozpouštědla překryt vrstvou matrice – Vz/Ma metoda. Třetím způsobem nanášení byla MIX metoda. Matrice a analyt byly před nanášením smíseny a na desku byla tato směs nanášena jako jedna vrstva. Po odpaření rozpouštědla se na desce vytvořily směsné krystaly a takto připravená deska byla vložena do spektrometru.

K nanášení analytů a matric byla používána automatická pipeta se speciálně upravenou špičkou, a to z důvodu zabránění kontaminace vzorků nečistotami z plastu. Konec plastové špičky byl oříznut a dovnitř zasunuta úzká skleněná kapilára. Plast kolem kapiláry byl zataven. Kapilára byla po každém použití o kus zkrácena, aby nedošlo ke kontaminaci roztoků matric a analytů a také již nanášených vrstev na desce.

4.4 Ověřování struktury a vlastností matric

4.4.1 Stanovení C, H, N

U syntetizovaných matric byla provedena elementární analýza pro potvrzení prvkového složení a zjištění obsahu vody. Tato analýza byla provedena laboratoří organické elementární analýzy ÚOCHB. Na automatickém analyzátoru PE 2400 Series II CHNS/O byl stanoven stechiometrický poměr prvků C, H a N v matrici. Analýza probíhala na klasickém spalovacím principu, kdy je vzorek spálen a stanovované prvky jsou převedeny do plynného stavu. Následuje separace a detekce oxidačních produktů (CO_2 , NO_2 , H_2O).⁴³

4.4.2 Stanovení Li

Množství lithia bylo stanoveno metodou AES na přístroji AAspektrometr AAS 3 (Zeiss-Jena, Německo) metodou kalibrační přímky. Ze standardu lithných iontů (1000 ppm) byly připraveny roztoky o koncentracích 0,0; 0,3; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 a 3,0 ppm v MeOH/H₂O 1:1. Roztoky matric (MeOH/H₂O 1:1) byly připraveny o koncentraci kolem 1 ppm (přesné koncentrace pro jednotlivé matrice jsou uvedeny v kapitole 5.1.2 v Tab. 7). Matrice byly navažovány na analytických vahách v řádech stovek µg do vialek o objemu 1,5 ml. Poté byly kvantitativně převedeny do lékovek o objemu 20 ml a přidáno 10 ml rozpouštědla. Při výpočtu koncentrací byl brán v úvahu obsah krystalové vody v matricích.

Nejdříve byl proměřen koncentrační rozsah změřením standardu o nejvyšší koncentraci Li^+ (3,0 ppm) a následně o nulové koncentraci (0,0 ppm). Poté byly postupně proměřeny intenzity spektrální čáry lithia (670,7 nm) u všech standardů a matric. Jako budící zdroj zde byl použit plamen acetylen/vzduch.

4.4.3 Spektrometrie v ultrafialové oblasti záření

Byla naměřena UV spektra pro ověření, zda matrice absorbují UV záření v požadované vlnové délce 337 nm. Spektra byla naměřena na přístroji LAMBDA 35 UV/Vis Systems (PerkinElmer, USA). Měření probíhalo jak v pevné tak v kapalně fázi. Při odrazovém měření matric v pevné fázi za použití integrační koule byl přístroj v jednopaprskovém uspořádání. Nejprve bylo proměřeno odrazové spektrum standardu síranu barnatého v rozsahu 200-500 nm. Odrazivost síranu barnatého byla určena jako 100%, na stupnici hodnot 0-100%. Následně byly proměřeny krystaly matric, přičemž mezi jednotlivými měřeními byl opět proměřen standard. Krystalky matric byly umístěny do šroubovací kyvety s křemenným sklem a poté umístěny do stroje. Některé matrice bylo nutné drtit či naředit (LiSalA) s hydroxidem barnatým.

Vodné roztoky matric byly měřené v křemenné kyvetě při dvouprskovém uspořádání. Standardem byla kyveta s destilovanou vodou. Nejdříve byla změřena základní linie, kdy obě kyvety byly naplněny destilovanou vodou. Poté byly proměřeny roztoky matric. Koncentrace roztoků nebyla zcela přesně definovaná, jelikož cílem měření bylo pouze zjistit rozmezí absorbance jednotlivých roztoků matric.

4.5 Rozpustnost

Další z vlastností, která byla u matric určována, byla rozpustnost v organických rozpouštědlech. Stanovení rozpustnosti bylo provedeno přípravou přesyceného roztoku v daném rozpouštědle a odebráním určitého množství kapalné složky (10 – 100 μ l) do zvážené vialky. Následně bylo rozpouštědlo odpařeno a obsah vialky vysušen v exsikátoru do konstantní hmotnosti. Ze známého odebraného objemu a hmotnosti odparku byla vypočítána rozpustnost v mg/ml.

4.6 Určení minimální a optimální intenzity laserového paprsku

Pro jednotlivé matrice byla určena minimální a optimální intenzita laserového paprsku. Minimální intenzitou laserového paprsku je míněna nejnižší možná intenzita paprsku, kdy je již patrný signál analytu. Optimální intenzita laserového paprsku je naopak taková intenzita, kdy signál analytu dosahuje maxima, avšak nedochází ke zhoršení kvality spektra, tedy píky se nerozšiřují a nevzrůstá hladina šumu. Intenzity laserového paprsku jsou uváděny v procentech, kdy uváděná procenta jsou laboratorní stupnice závislá na typu a stáří laseru.

Na MALDI desku byly naneseny matrice a analyty – uhlovodík *n*-triakontan a voskový ester stearyl behenát. Matrice a analyty byly na desku nanášeny třemi způsoby – Ma/Vz, Vz/Ma, MIX. Koncentrace *n*-triakontanu byla 0,43 mmol/l a stearyl behenátu 47,2 μ mol/l. Nanášený objem byl jak u matric tak u analytů 1,5 μ l.

Pro určení minimální intenzity laseru byl vzorek ozářen 1000 pulsy při intenzitě laserového paprsku 30%. Intenzita laserového paprsku byla zvyšována či snižována a měření pokračovalo vždy na novém bodě v rámci dané pozice v blízkosti bodu předcházejícího. Určená minimální intenzita byla vždy ověřena v 3-5 bodech v rámci jedné pozice. Tímto způsobem byly určeny hodnoty pro danou matici, analyt a způsob nanášení.

Hodnota optimální intenzity laserového paprsku bývá přibližně o 10 procentních jednotek vyšší než hodnota minimální intenzita laserového paprsku. Počáteční intenzita laserového paprsku byla nastavena o 10 jednotek vyšší než určená minimální intenzita a bod byl ozářen 1000 pulsy. Intenzita laserového paprsku byla postupně zvyšována či snižována a byla porovnávána intenzita píků a kvalita spektra. Pro měření každého nového spektra bylo vždy ozařován nový bod, většinou v blízkosti toho předchozího. Ze získaných dat byla zvolena optimální intenzita laserového paprsku pro danou matici, analyt a způsob nanášení.

4.7 Určení optimální metody nanášení

Matrice se standardy byly na desku nanášeny třemi možnými způsoby nanášení – Ma/Vz, Vz/Ma, MIX. Takto připravené vzorky byly ozařovány laserovým paprskem o intenzitě 50% pro voskové estery a 55% pro uhlovodíky. Suprese (potlačení) matrice byla zadána do hodnoty 210 m/z . Pro LiBA byla intenzita laserového paprsku nastavena na 70% pro voskové estery i uhlovodíky. Měření probíhalo v automatickém režimu. Výsledná spektra byla snímána po 100 pulsech do celkového počtu 600 pulsů pro každou pozici. Posun laseru na další bod v rámci pozice byl nastaven po 200 pulsech. Jedno výsledné spektrum tedy bylo získáno sečtením 6 jednotlivých spekter ze 3 bodů v pozici. Celkově bylo nasnímáno 18 výsledných spekter pro každý vzorek a způsob nanášení.

4.8 Měření matričních iontů

U testovaných matric byl určen rozsah matričních iontů ve spektru a vyhodnoceny jejich fragmenty. Jednou z důležitých vlastností matrice je, aby její ionty nezasahovaly do oblasti m/z analytu. Oblast matričních iontů by měla být co nejužší, ideálně do hmotnosti molekuly matrice. Vznik klastrů či dalších vyšších aduktů je nežádoucí. Při běžné analýze jsou píky matrice potlačovány nastavením rozsahu hodnot m/z , které jsou deflektorem potlačovány, tzv. suprese matrice. Pokud by se poměr m/z analytu blížil k rozsahu hmotností matričních iontů, mohl by být iont analytu ovlivněn touto supresí matrice a nemusel by být ve spektru vůbec patrný.

Matrice rozpuštěné v MeOH/CHCl₃ o koncentraci 10 mg/ml, Li₂DHT o koncentraci 0,75 mg/ml, byly nanášeny na desku a proměřeny při optimálního intenzitě laserového paprsku. Spektra byla snímána do celkové hodnoty 500 pulsů. Z naměřených dat byl určen rozsah matričních iontů a fragmenty byly vyhodnoceny.

4.9 Detekční limit

Pro stanovení detekčního limit byl použit standard uhlovodíku *n*-triakontan a standard voskového esteru stearyl behenát. Koncentrace matric, rozpuštěných v MeOH/CHCl₃, byla 10 mg/ml, kromě Li₂DHT, kde koncentrace byla 0,75 mg/ml. Detekční limit byl stanoven pomocí dvoubodové kalibrační přímky a směrodatné odchylky šumu, dle vzorce:

$$X_D = \frac{3s}{b_1}$$

kdy X_D je detekční limit, s je směrodatná odchylka šumu a b_1 je směrnice kalibrační přímky.

Směrodatná odchylka šumu s byla počítána, dle vzorce:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n}}$$

Koncentrace standardů byla u *n*-triakontanu 0,43 mmol/l a u stearyl behenátu 47,2 μmol/l. Data pro výpočet detekčního limitu byla získána ze souhrnného srovnávacího měření, blíže kapitola 3.8, kde jsou popsány konkrétní podmínky měření. Směrodatná odchylka šumu byla získána z průměru tří hodnot, získaných z tří vybraných měření pro každou matici.

4.10 Intenzita signálu

Pro srovnání vlastností a účinnosti matric pro voskový estery a uhlovodík bylo provedeno souhrnné srovnávací měření, kdy matrice s analyty byly změřeny v rámci jednoho měření probíhajícího za stejných podmínek. Matrice byly srovnávány mezi sebou a také s LiDHB, která byla popsána pro ionizaci uhlovodíků a voskových esterů v literatuře (viz. kapitola 2.4.3) a slouží jako „standard“ ke srovnání ostatních matric. Jako standard voskového esteru byl použit stearyl behenát a pro uhlovodíky *n*-triakontan. Matrice byly měřeny při svých optimálních podmínkách.

Srovnávací měření bylo prováděno v automatickém módu, který zajistil objektivní měření. Matrice a analyty byly na desku nanášeny v optimálních molárních poměrech (blíže kapitola 4.5.3). Matrice byly v koncentracích 10 mg/ml, kromě Li₂DHT, kde koncentrace byla 0,75 mg/ml. Koncentrace standardů byla u *n*-triakontanu 0,43 mmol/l a u stearyl behenátu 47,2 μmol/l. Pro splnění optimálních molárních poměrů bylo pouze upraveno množství nanášených matric. Konkrétní hodnoty jsou uvedeny v Tab. 4 a Tab. 5. Matrice byly rozpuštěny v MeOH/CHCl₃ a standardy v CHCl₃.

Tab. 4: Shrnutí podmínek nanášení pro voskové estery. *M:A* – molární poměr nanesené matrice ku analytu; *SB* – stearyl behenát; *c* – koncentrace; *V* – objem.

<i>Matrice</i>	<i>Optimální mol. poměr M:A</i>	<i>c matrice (mg/ml)</i>	<i>V matrice (μl)</i>	<i>c SB (mg/ml)</i>	<i>V SB (μl)</i>	<i>Způsob nanášení</i>
LiDHB	100:1	10	1,14	0,28	1,50	Ma/Vz
Li ₂ DHT	10:1	0,75	1,97	0,28	1,50	MIX
LiDMB	100:1	10	1,33	0,28	1,50	Ma/Vz
LiHCCA	100:1	10	1,42	0,28	1,50	Vz/Ma
LiSA	100:1	10	1,65	0,28	1,50	Ma/Vz
LiBA	100:1	10	0,91	0,28	1,50	Ma/Vz
LiSaIA	100:1	10	1,02	0,28	1,50	Ma/Vz
LiVA	100:1	10	1,23	0,28	1,50	MIX

Matrice spolu se stearyl behenátem byly nanášeny třikrát – na tři různé pozice MALDI desky. Měření probíhalo v automatickém módu. Výsledná spektra byla sbírána po 100 pulzech a sčítána do celkového počtu 1000 pulsů z každé pozice. Posun laseru byl nastaven po 200 pulzech. Jedno výsledné spektrum tedy bylo získáno sečtením 10 jednotlivých spekter z 5 bodů v pozici. Měření proběhlo v deseti kolech a celkově bylo zaznamenáno 30 výsledných spekter pro každou matici. Intenzita laseru pro voskové estery byla 50%, pro matici LiBA byla intenzita laserového paprsku nastaven na 70%. Suprese matrice byla zadána do hodnoty 210 m/z .

Tab. 5: Shrnutí podmínek nanášení pro uhlovodíky. $M:A$ – molární poměr nanesené matrice ku analytu; $C_{30}H_{62}$ – n -triakontan; c – koncentrace; V – objem.

Matrice	Optimální mol. poměr $M:A$	c matrice (mg/ml)	V matrice (μ l)	c $C_{30}H_{62}$ (mg/ml)	V $C_{30}H_{62}$ (μ l)	Způsob nanášení
LiDHB	10:1	10	0,65	1,69	1	Vz/Ma
Li ₂ DHT	2:1	0,75	2,22	1,69	1	MIX
LiDMB	10:1	10	0,75	1,69	1	Vz/Ma
LiHCCA	10:1	10	0,80	1,69	1	MIX
LiSA	10:1	10	0,93	1,69	1	MIX
LiBA	10:1	10	0,51	1,69	1	MIX
LiSalA	10:1	10	0,58	1,69	1	Ma/Vz
LiVA	10:1	10	0,70	1,69	1	MIX

Matrice s n -triakontanem byly nanášeny na desku stejným způsobem jako voskový ester, tedy na tři pozice na MALDI desce. Měření probíhalo v automatickém módu. Spektra byla sbírána po 100 výstřelech a sčítána do celkového počtu 1000 výstřelů z každé pozice. Posun laseru byl nastaven po 200 výstřelech. Jedno výsledné spektrum tedy bylo získáno sečtením 10 jednotlivých spekter z 5 bodů v pozici. Měření proběhlo v deseti kolech a celkově bylo zaznamenáno 30 spekter pro každou matici. Intenzita laserového paprsku pro uhlovodíky byla nastavena na 55%, pro matici LiBA na 70%. Suprese matrice byla zadána do hodnoty 210 m/z .

5 VÝSLEDKY A DISKUSE

5.1 Elementární analýza

5.1.1 Stanovení C, H, N

U syntetizovaných matric byla provedena elementární analýza pro zjištění obsahu uhlíku, vodíku, dusíku (u LiHCCA) a dopočítání obsahu krystalové vody. Stanovení prvků proběhlo na automatickém analyzátoru PE 2400 Series II CHNS/O, kde přesnost stanovení CHN je 0,30% absolutní hodnoty. Změřené výsledky, uvedené v Tab. 6, odpovídají teoretickým hodnotám v rozmezí této přesnosti stanovení.

Tab. 6: Obsah uhlíku, vodíku a dusíku v syntetizovaných matricích.

Matrice	C (%)		H (%)		N (%)		Počet
	skut.	teor.	skut.	teor.	skut.	teor.	molekul krystalové H ₂ O
Li ₂ DHT	44,87	44,80	2,10	2,11	-	-	1/4
LiDMB	52,68	52,44	5,30	5,38	-	-	1
LiHCCA	56,06	56,36	3,69	3,78	6,48	6,57	1
LiSA	48,09	48,01	5,85	5,86	-	-	2,5
LiBA	65,58	65,66	3,95	3,94	-	-	0
LiSalA	52,11	51,88	4,36	4,35	-	-	1
LiVA	46,02	45,73	5,25	5,28	-	-	2

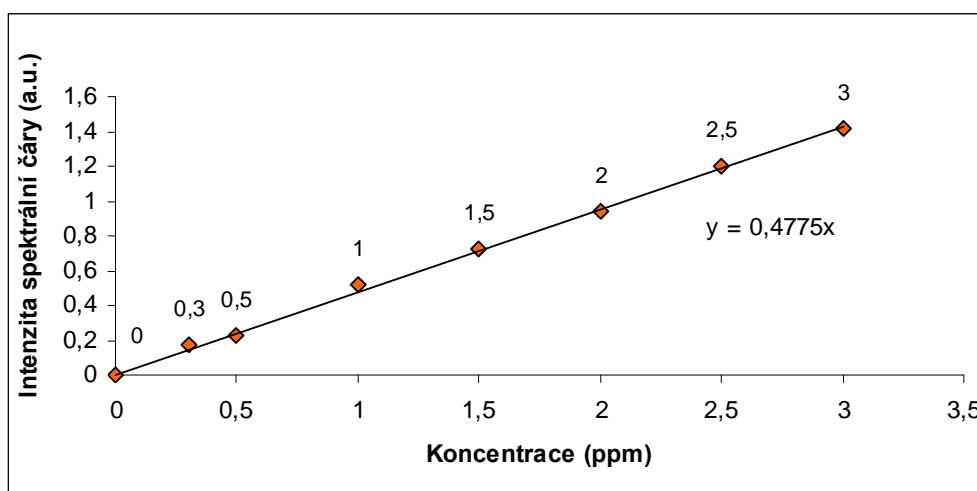
Počet molekul vody byl vypočítán v programu ChemSketch. V tomto programu byly spočítány hodnoty C, H, N pro různé počty molekul krystalové vody. Počet molekul krystalové vody ve vzorku byl určen na základě shody teoretických dat s daty naměřenými.

5.1.2 Stanovení Li

Lithium je prvek s výraznou emisí záření při přechodu z excitovaného do nižšího energetického stavu. Díky této vlastnosti mohlo být lithium stanoveno metodou AES. Lithium, stejně jako ostatní alkalické kovy, barví specificky plamen. Při měření bylo pozorováno výrazné zbarvení plamene do malinově červena.

Lithium obsažené v roztoku bylo v budícím zdroji převedeno do excitovaného atomárního stavu. Při přechodu z excitovaného stavu do energeticky chudšího stavu dochází k excitaci polychromatického, nespojitého záření. Po průchodu monochromátorem získáváme čárové spektrum. Pro lithium je typická spektrální čára o vlnové délce 670,7 nm. Kvantitativní zastoupení lithia v matricích bylo zjištěno ze závislosti mezi koncentrací lithia a intenzitou jeho spektrální čáry.

Pro stanovení koncentrace lithia v matricích byla nejdříve na spektrometru proměřena sada standardů s koncentrací lithia 0,0 až 3,0 ppm. Ze získaných hodnot byla sestavena následující kalibrační závislost.



Obr. 6: Kalibrační závislost intenzity spektrální čáry lithia na koncentraci lithia.

Hodnoty nad jednotlivými body znázorňují koncentraci lithia.

Následně byly proměřeny roztoky matric o teoretické koncentraci lithia kolem 1 ppm. Ze získaných dat a dle rovnice regrese uvedené v Obr. 6 byly vypočítány skutečné koncentrace lithia. Výsledky jsou uvedeny v Tab. 7.

Tab. 7: Naměřené koncentrace lithia a výsledný počet atomů Li v syntetizovaných maticích.

<i>Matrice</i>	<i>Koncentrace Li teoretická (ppm)</i>	<i>Koncentrace Li skutečná (ppm)</i>	<i>Odchylka hodnot (%)</i>	<i>Počet atomů Li na molekulu matrice</i>
Li ₂ DHT	1,17	1,27	7,43	2
LiDMB	1,09	1,14	4,79	1
LiHCCA	1,08	1,16	6,41	1
LiSA	0,99	1,09	9,16	1
LiBA	1,20	1,32	8,70	1
LiSalA	1,04	1,10	5,90	1
LiVA	0,90	0,96	6,42	1

Do výpočtů teoretické koncentrace lithia byl brán v úvahu obsah krystalové vody v maticích. Z Tab. 7 je patrné, že skutečná koncentrace lithia je vždy vyšší, než koncentrace teoretická. Tato skutečnost je pravděpodobně způsobena soustavnou chybou při přípravě vzorku (podrobně viz. kapitola 4.4.2), zejména ztrátami na stěnách vialek, nepřesností vážení (navazováno na setiny mg) či odpařováním rozpouštědla při transportu roztoků.

Skutečné hodnoty koncentrací lithia odpovídají teoretickým hodnotám do rozsahu chyby $\pm 10\%$. Lze tedy říci, že syntetizované matrice mají požadovanou čistotu.

5.2 Spektra matric v ultrafialové oblasti záření

Pro ověření absorpce matric při vlnové délce laseru (337 nm) byla změřena absorpční spektra matric v pevné a kapalné fázi. Pro matrice v pevné fázi byla odrazovým měřením získána reflexní spektra, ta byla převedena na absorpční. Naměřená UV spektra matric v pevné i kapalné fázi jsou uvedeny v příloze A a B, odečtené hodnoty absorpčních maxim a hodnota absorpce při 337 nm jsou shrnuty v následujících tabulkách *Tab. 8* a *Tab. 9*.

Tab. 8: Parametry absorpčních spekter matric v pevné fázi.

<i>Matrice</i>	<i>Absorpční maximum v nm</i>	<i>Hodnota absorpce při 337 nm</i>
Li ₂ DHT	324 - 393	0,86
LiDMB	321	0,37
LiHCCA	230 - 392	1,12
LiSA	318	0,66
LiBA	295	0,20
LiSalA	-	-
LiVA	240 - 305	0,72
LiDHB	339	0,59

U matrice LiSalA se nepodařilo spektrum v pevné fázi změřit. Látka vykazovala vyšší odrazivost než síran barnatý, který byl použit jako standard se 100% odrazivostí, tedy s nulovou absorpcí. Krystaly LiSalA byly drceny v třecí misce, ředěny hydroxidem barnatým a překrystalizovány z vodného roztoku. Spektra naměřená po těchto úpravách však zůstala nezměněna. Na změření UV spektra pevné LiSalA se dále pracuje.

Z uvedených hodnot absorpčních vyplývá, že při 337 nm slabě absorbují matrice bez přítomnosti hydroxylové skupiny ve struktuře (LiDMB, LiBA). Silně absorbují matrice LiHCCA, která obsahuje kyano skupinu a jednu hydroxylovou skupinu a matrice Li₂DHT se dvěma hydroxylovými skupinami ve struktuře. Matrice s jednou hydroxylovou skupinou ve struktuře (LiSA, LiVA, LiDHB) mají srovnatelnou absorpční hodnotu.

Tab. 9: Parametry absorpčních spekter matric v kapalné fázi.

<i>Matrice</i>	<i>Absorbční maximum v nm</i>	<i>Absorbance při 337 nm</i>
Li ₂ DHT	215, 246 a 352	Ano
LiDMB	296	Ne
LiHCCA	235 a 325	Ano
LiSA	229 a 305	Ano
LiBA	224	Ne
LiSalA	209, 231 a 297	Ne
LiVA	205, 251 a 286	Ne
LiDHB	208 a 320	Ano

Měření UV absorpce vodných roztoků matric je zde uváděné jako doplňující informace. Pouze UV absorpce v pevné fázi určuje absorpční vlastnosti během MALDI podmínek. Absorpce určené v kapalné a pevné fázi mohou být výrazně odlišné.²⁶ Hodnoty absorbance uvedené v tabulce *Tab. 9* jsou pouze orientační a nelze je porovnávat, jelikož koncentrace roztoků matric nebyla definována.

V kapalné fázi absorbují matrice se dvěma hydroxylovými skupinami – LiDHB, Li₂DHT, matrice s kyano a hydroxylovou skupinou – LiHCCA a matrice s jednou hydroxylovou a dvěma methoxylovými skupinami ve struktuře – LiSA. Matrice bez hydroxylové skupiny – LiBA, LiDMB, matrice s jednou hydroxylovou skupinou – LiSalA a matrice s hydroxylovou a methoxylovou skupinou nevykazují téměř žádnou absorpci.

5.3 Vyhodnocení matričních iontů

Po ozáření matric laserovým pulsem byl pozorován vznik matričních iontů. Byl vyhodnocen rozsah spektra, ve kterém se tyto ionty vyskytovaly a byla snaha charakterizovat hlavní matriční ionty. Interpretace spekter je založena na nominálních hmotnostech iontů.

Rozsah matričních iontů je důležitou vlastností matrice, kdy nejžádanější je co nejužší rozmezí – ideálně do poměru m/z odpovídajícímu molekulárnímu iontu aduktu či matrice. Tvorba klastrů matrice při vyšších hodnotách m/z je nežádoucí.

Bylo nalezeno několik typů iontů společných pro všechny matrice. Matrice poskytly jednou nabitě ionty $[\text{Matrice} + \text{H}]^+$ (kromě LiDMB) a $[\text{Matrice} + \text{Li}]^+$. Lithium snadno nahradilo vodík v $-\text{OH}$ skupině za tvorby iontu $[\text{Matrice} - \text{H} + 2\text{Li}]^+$, kromě Li₂DHT se tento iont tvořil u všech matric. Spektra obsahovala také ionty kovů jako $[\text{Li}]^+$, $[\text{Na}]^+$, $[\text{K}]^+$. Při použití vysoké intenzity laserového paprsku (70%) v případě matric LiBA a LiDMB byl ve spektrech přítomen iont $[\text{Cr}]^+$. Adukty s K a Cr nebyly patrné, vyskytl se pouze iont $[\text{LiBA} + \text{Na}]^+$ při 70% intenzitě laserového paprsku. Ve většině spekter byla pozorována ztráta CO_2 z karboxylové skupiny a ztráta H_2O , u LiHCCA i ztráta HCN. Ion $[2\text{Li}]^+$ se vyskytl pouze ve spektru Li₂DHT. Dále byla pozorována tvorba těchto klastrů: $[2\text{LiDMB} + \text{Li}]^+$, $[3\text{LiDMB} + \text{Li}]^+$, $[2\text{LiSalA} - 2\text{H} + 3\text{Li}]^+$, $[2\text{LiBA} + \text{Li}]^+$ (intensita laserového paprsku 70%), $[3\text{LiBA} + \text{Li}]^+$ (intensita laserového paprsku 70%). Ve spektrech se také vyskytovaly další neobjasněné ionty zejména v oblasti nad m/z molekulárního iontu. MALDI spektra všech matric jsou zařazena v příloze C. Rozsahy matričních iontů ve spektrech jsou uvedeny v *Tab. 10*.

Spektra matričních iontů byla změřena při dvou intenzitách laserového paprsku odpovídající optimální intenzitě pro voskový ester a uhlovodík. V případě matrice LiVA nejsou při intenzitě laseru 36% patrné žádné matriční ionty, proto byla tato matrice změřena při intenzitě 41%, kdy již bylo možné získat spektrum. Skutečnost, že při analýze nejsou produkovány matriční ionty je velkou výhodou. Navíc spektrum LiVA naměřené při 41% intenzity laseru má nejužší rozpětí ze všech testovaných matric. Pro srovnání, matriční spektrum LiDHB má rozsah 0 – 200 m/z .

Tab. 10: Rozsah matričních iontů v hmotnostním spektru.

<i>Matrice</i> <i>M_r</i>	<i>Intenzita</i> <i>laserového</i> <i>paprsku pro</i> <i>voskový ester</i>	<i>Rozsah</i> <i>matričních</i> <i>iontů (m/z)</i>	<i>Intenzita</i> <i>laserového</i> <i>paprsku pro</i> <i>uhlovodík</i>	<i>Rozsah</i> <i>matričních</i> <i>iontů (m/z)</i>	<i>Počet</i> <i>laserových</i> <i>pulsů</i>
Li ₂ DHT 210	43	0 - 205	50	0 - 285	500
LiDMB 188	44	0 - 571	70	0 - 585	500
LiHCCA 195	42	0 - 309	45	0 - 309	500
LiSA 230	42	0 - 243	43	0 - 243	500
LiBA 128	70	0 - 391	70	0 - 391	500
LiSaIA 144	50	0 - 307	57	0 - 307	500
LiVA 174	36 41	- 0 - 187	36 41	- 0 - 187	500

5.4 Rozpustnost

V následující *Tab. 11* jsou uvedeny rozpustnosti jednotlivých matic. Rozpouštědla jsou řazena dle klesající polarity.

Tab. 11: Rozpustnost matic v organických rozpouštědlech. Hodnoty koncentrací jsou uvedeny v mg/ml.

<i>Matrice</i>	<i>Li₂DHT</i>	<i>LiDMB</i>	<i>LiHCCA</i>	<i>LiSA</i>	<i>LiBA</i>	<i>LiSalA</i>	<i>LiVA</i>
<i>Rozpouštědlo</i>							
Voda	63,3	169,1	74,8	70,4	220,8	330,6	265,8
Kys. octová (konc.)	2,2	46,8	14,7	24,8	35,8	15,5	7,4
Acetonitril	2,9	10,1	12,5	5,0	0,3	83,2	0,7
Ethanol	9,8	26,3	24,2	19,9	25,8	237,7	61,2
Methanol	1,0	187,5	162,5	66,7	58,9	168,0	69,3
Aceton	0,4	1,7	4,3	4,9	0,8	94,0	15,1
Ethylacetát	3,8	2,7	5,3	10,0	2,4	87,4	2,8
Chloroform	0,1	0,1	1,0	0,0	2,3	1,1	10,0
2-propanol	6,4	5,8	10,0	1,8	3,1	9,5	15,3
Diethylether	3,8	6,5	8,4	20,0	30,0	7,9	4,0
Hexan	2,1	0,6	0,3	0,0	1,1	20,0	19,8

Obecně lze říci, že pro matrice jsou vhodná spíše polární rozpouštědla jako je voda, methanol či ethanol. Li₂DHT je hůře rozpustná v polárních i nepolárních rozpouštědlech. Většina matic je špatně rozpustná v méně polárních rozpouštědlech, jen pro LiSA a LiBA v diethyletheru a LiSalA a LiVA v hexanu jsou koncentrace vyšší v porovnání s ostatními maticemi. Matrice rozpustné v málo polárních rozpouštědlech zajišťují dobrou mísitelnost s nepolárními analyty.

Analyty používané v této práci byly rozpuštěné v chloroformu, pro lepší mísitelnost analytu a matrice je tedy vhodná kombinace chloroformu a dalšího rozpouštědla, v kterém je daná matrice dobře rozpustná.

Pro analýzu vzorků je používaná koncentrace matrice 10 mg/ml. Matrici Li₂DHT lze o této koncentraci připravit pouze ve vodě, voda však není mísitelná s chloroformem a při nanášení na MALDI desku se rozpívá. Jelikož optimální poměr Li₂DHT:analyt je přibližně o jeden řád nižší než u ostatních matric, lze analyzovat srovnatelné koncentrace analytů jako u ostatních matric i při koncentraci Li₂DHT kolem 1 mg/ml. Nejvhodnějšími rozpouštědly pro Li₂DHT se zdají být ethanol či 2-propanol. Pro ostatní matrice je nejvhodnějším rozpouštědlem methanol, případně ethanol (LiSalA). Požadovanou koncentraci matric lze připravit i v kyselině octové (mimo LiVA) a ve vodě. Koncentrace 10 mg/ml matrice LiHCCA se dá také připravit acetonitrilu, LiSA a LiBA v diethyletheru, LiSalA v acetonitrilu, acetonu, ethylacetátu a hexanu a LiVA v acetonu, isopropanolu, chloroformu a hexanu. Všechna uvedená rozpouštědla, kromě vody, jsou mísitelná s chloroformem.

5.5 Optimální podmínky MALDI analýzy

5.5.1 Minimální a optimální intenzita laserového paprsku

Nalezení optimální a minimální intenzity laserového paprsku bylo důležité pro další specifikaci podmínek měření.

Při stanovování minimální intenzity laserového paprsku bylo nutné nejdříve bod ozářit vyšším počtem pulsů. Signál byl patrný po cca 150 – 300 pulsech u voskového esteru a po cca 300 – 600 pulsech u uhlovodíku. Spektrum často obsahovalo nečistoty pocházející z desky, které byly více patrné ve spektrech uhlovodíku. Jelikož intenzita laserového paprsku byla relativně nízká, nečistoty byly většinou ve spektru patrné i po delším ostřelování. Výjimkou byla matrice LiVA, kde signál voskového esteru byl patrný téměř okamžitě a spektrum bylo i bez předchozího ozáření bez dalších signálů. Signál uhlovodíku s matricí LiVA byl patrný již po 100 – 200 pulsech, během nichž vymizely ze spektra i případné nečistoty.

Při stanovování optimální intenzity laserového paprsku bylo nutné bod nejdříve ozářit jen v případě uhlovodíku a to 100 – 200 pulsy. Po této „aktivaci vzorku“ docházelo k rychlému nárůstu intenzity signálu uhlovodíku a k vymizení nečistot ze spektra (ve většině případů). U vzorků s voskovým esterem byl signál patrný bez předchozího ozařování. U matric LiHCCA, LiSA, LiSaLA byly ve spektrech s uhlovodíkem i voskovým esterem patrné nečistoty, které však vymizely po 50 – 100 pulsech. V matrici Li₂DHT nebyly nečistoty ve spektrech patrné téměř vůbec, případně vymizely během prvních několika pulsů.

V případě matrice LiVA docházelo k intenzivnímu nárůstu signálu uhlovodíku již po cca 80 pulsech, signál voskového esteru byl patrný okamžitě. V obou případech byla spektra bez nečistot a byl pozorován velice intenzivní signál analytů.

Poznatky zmíněné v předchozích odstavcích nejsou platné pro matrice LiBA a LiDMB. Tyto matrice velice špatně ionizují uhlovodík i voskový ester a bylo velice náročné získat jakákoliv data. Konkrétní naměřené hodnoty minimální a optimální intenzity laserového paprsku jsou uvedeny *Tab. 12* a *Tab. 13*.

Tab .12: Minimální a optimální intenzita laserového paprsku pro voskový ester.

<i>Matrice</i>	<i>Metoda nanášení</i>	<i>Minimální intenzita laserového paprsku (%)</i>	<i>Optimální intenzita laserového paprsku (%)</i>
Li ₂ DHT	Ma/Vz	34	44
	Vz/Ma	35	44
	MIX	31	43
LiDMB	Ma/Vz	33	44
	Vz/Ma	- *	- *
	MIX	- *	- *
LiHCCA	Ma/Vz	28	41
	Vz/Ma	30	41
	MIX	32	43
LiSA	Ma/Vz	31	42
	Vz/Ma	29	40
	MIX	28	40
LiBA	Ma/Vz	60	70
	Vz/Ma	60	71
	MIX	62	72
LiSalA	Ma/Vz	39	50
	Vz/Ma	39	51
	MIX	35	46
LiVA	Ma/Vz	38	50
	Vz/Ma	39	49
	MIX	22	36

* data nebyla získána z důvodu velice špatné ionizace analytu

Optimální intenzity laserového paprsku pro voskový ester jsou pro většinu matic srovnatelné a dosahují 40 – 51%. Pouze matrice LiBA dosahuje vyšší intenzity laserového paprsku (70%) v porovnání s ostatními testovanými maticemi a LiVA

u metody nanášení MIX dosahuje nižší intenzity (36%) a to hlavně v porovnání s ostatními metodami nanášení u této matrice (50% a 49%). U ostatních testovaných matric je rozdíl intenzity laserového paprsku mezi metodami nanášení nepatrný.

Tab. 13: Minimální a optimální intenzita laserového paprsku pro uhlovodík.

<i>Matrice</i>	<i>Metoda nanášení</i>	<i>Minimální intenzita laserového paprsku (%)</i>	<i>Optimální intenzita laserového paprsku (%)</i>
Li2DHT	Ma/Vz	38	51
	Vz/Ma	40	51
	MIX	38	50
LiDMB	Ma/Vz	- *	- *
	Vz/Ma	- *	- *
	MIX	- *	- *
LiHCCA	Ma/Vz	36	45
	Vz/Ma	35	45
	MIX	34	45
LiSA	Ma/Vz	32	43
	Vz/Ma	33	41
	MIX	31	43
LiBA	Ma/Vz	- *	- *
	Vz/Ma	- *	- *
	MIX	- *	- *
LiSalA	Ma/Vz	45	57
	Vz/Ma	44	54
	MIX	44	57
LiVA	Ma/Vz	48	59
	Vz/Ma	48	57
	MIX	25	36

* data nebyla získána z důvodu velice špatné ionizace analytu

Intenzity laserového paprsku pro uhlovodík jsou také pro většinu matic víceméně srovnatelné a dosahují 41 – 59%. Nižší intenzity, zejména v porovnání s ostatními metodami nanášení, dosahuje opět matrice LiVA u metody MIX (36%). U matic LiDMB a LiBA nebyla data získána.

5.5.2 Metoda nanášení

Pro další měření bylo nutné vybrat nejvhodnější metodu nanášení matrice a analytu. Matrice se standardy byly na desku nanášeny třemi způsoby nanášení – Ma/Vz, Vz/Ma, MIX a byly ozařovány laserovým pulsem o intenzitě 50% pro voskový ester a 55% pro uhlovodík. Pro LiBA byla intenzita laserového pulsu nastavena na 70% pro voskový ester i uhlovodík, jelikož při hodnotách 50% a 55% by nebyl patrný žádný signál. Spektra byla sčítána do celkového počtu 600 pulsů a pro každý vzorek bylo nasnímáno 18 spekter. Optimální metoda nanášení byla vybrána dle porovnání průměrných hodnot intenzit signálu a relativní směrodatné odchylky. Naměřené hodnoty jsou uvedeny v *Tab. 13* a *Tab. 14*.

Při nanášení metodou MIX se ukázalo, že je vhodnější nejdříve do vialky přidat matici a následně roztok uhlovodíku. Po smísení dochází u některých matic k rychlé tvorbě krystalů a to ještě před nanášením směsi na desku. Při opačném pořadí, kdy je do vialky nejdříve přidán roztok uhlovodíku, k viditelné tvorbě směsných krystalů nedochází a po nanášení směsi na desku je patrná hladká vrstva. Bylo také experimentálně zjištěno, že u matrice LiVA má pořadí mísení roztoků analytu a matrice vliv na intenzitu signálu voskového esteru. V případě, kdy je do vialky přidán nejdříve analyt, byl patrný pokles intenzity signálu. Toto je způsobeno pravděpodobně tím, že dochází k rychlému odpaření rozpouštědla a tím k zakoncentrování roztoku matrice a po přidání analytu nastává rychlá kokrystalizace, tzn. zabudování analytu do krystalu matrice, z důvodu koncentrovaného roztoku matrice. V opačném případě, kdy byla matrice přidána do vialky až po analytu je její koncentrace nižší a reakce probíhá pomaleji a za odlišných podmínek. Může zde tedy být odlišný mechanismus zabudování analytu do krystalů matrice, což může ovlivnit způsob a účinnost ionizace. Začlenění analytu do maticních krystalů je důležitým předpokladem pro úspěšnou MALDI analýzu, proto byly zkoumány různé způsoby nanášení.

Tab. 14: Průměrné intenzity signálu pro voskový ester. Tučně a podtržením jsou zvýrazněny vybrané optimální metody nanášení.

Matrice	Způsob nanášení	Průměrná intenzita signálu (a.u.)	RSD %	Počet spekter bez signálu*
Li ₂ DHT	Ma/Vz	8738	126	0
	Vz/Ma	1048	108	1
	MIX	<u>7609</u>	<u>65</u>	<u>0</u>
LiDMB	<u>Ma/Vz</u>	<u>541</u>	<u>101</u>	<u>3</u>
	Vz/Ma	402	75	9
	MIX	258	61	10
LiHCCA	Ma/Vz	14618	141	0
	<u>Vz/Ma</u>	<u>22688</u>	<u>78</u>	<u>2</u>
	MIX	369	75	2
LiSA	<u>Ma/Vz</u>	<u>16383</u>	<u>147</u>	<u>0</u>
	Vz/Ma	12085	148	1
	MIX	9814	120	0
LiBA	<u>Ma/Vz</u>	<u>461</u>	<u>45</u>	<u>0</u>
	Vz/Ma	447	80	3
	MIX	572	78	11
LiSalA	<u>Ma/Vz</u>	<u>13511</u>	<u>69</u>	<u>0</u>
	Vz/Ma	5624	104	4
	MIX	6945	91	0
LiVA	Ma/Vz	31457	62	0
	Vz/Ma	31536	70	0
	MIX	<u>46242</u>	<u>62</u>	<u>0</u>

* z celkového počtu 18ti spekter

Tab. 15: Průměrné intenzity signálu pro uhlovodík. Tučně a podtržením jsou zvýrazněny vybrané optimální metody nanášení.

<i>Matrice</i>	<i>Způsob nanášení</i>	<i>Průměrná intenzita signálu (a.u.)</i>	<i>RSD %</i>	<i>Počet spekter bez signálu*</i>
Li ₂ DHT	Ma/Vz	2070	170	0
	Vz/Ma	2849	101	0
	<u>MIX</u>	<u>3719</u>	<u>84</u>	<u>0</u>
LiDMB	Ma/Vz	283	49	4
	<u>Vz/Ma</u>	<u>468</u>	<u>61</u>	<u>0</u>
	MIX	510	154	4
LiHCCA	Ma/Vz	505	47	3
	Vz/Ma	436	58	5
	<u>MIX</u>	<u>974</u>	<u>76</u>	<u>0</u>
LiSA	Ma/Vz	2790	23	0
	Vz/Ma	4728	33	0
	<u>MIX</u>	<u>5549</u>	<u>31</u>	<u>0</u>
LiBA	Ma/Vz	741	45	15
	Vz/Ma	292	61	7
	<u>MIX</u>	<u>470</u>	<u>93</u>	<u>3</u>
LiSalA	<u>Ma/Vz</u>	<u>707</u>	<u>52</u>	<u>0</u>
	Vz/Ma	388	67	1
	MIX	510	43	0
LiVA	Ma/Vz	2342	42	0
	Vz/Ma	2506	50	0
	<u>MIX</u>	<u>6040</u>	<u>43</u>	<u>0</u>

* z celkového počtu 18ti spektra

Ze získaných hodnot byl vybrán nejvhodnější způsob nanášení, kdy určujícími prvky byla v první řadě hodnota relativní směrodatné odchylky a intenzita signálu, následně pak počet spekter bez signálu.

V tomto měření byly získány poměrně vysoké hodnoty RSD. Hodnota RSD často přesahuje 100%, jelikož výsledky z MALDI měření velice zásadně ovlivňuje homogenita naneseného vzorku. Při špatné homogenitě vzorku mohou být výsledná data velice různorodá a to způsobuje vysoké hodnoty RSD. Pro MALDI měření je toto běžné a široký rozptyl dat je očekávaný.

Při srovnávacím měření (kapitola 5.7) byly hodnoty RSD nižší. Tyto rozdíly byly pravděpodobně způsobeny poškozeným digitizérem, který musel být krátce po měření optimální metody nanášení vyměněn a na srovnávací měření byl použit již nový. Na hodnotu RSD má vliv i počet spekter, z kterých jsou vyhodnocovány intenzity vzorků. Čím větší počet spekter, tím reprodukovatelnější by měly být výsledky a tím i nižší RSD. V tomto měření byla RSD počítána z 18ti spekter, zatímco ve srovnávacím měření jich bylo 30.

5.5.3 Molární poměr matrice a analytu

Pro optimální metodu nanášení byl stanoven vhodný molární poměr matrice a analytu. Studované matrice o koncentracích 10 mg/ml a Li₂DHT o koncentraci 0,75 mg/ml byly naneseny na desku se stearyl behenátem o koncentracích 2,36; 0,47; 0,24; 0,05; 0,02 mmol/l a s *n*-triakontanem o koncentracích 3,00; 1,50; 0,60; 0,43; 0,30 mmol/l. Koncentrace analytů, které dosáhly nejvyšší intenzity signálu, byly porovnány s molární koncentrací matrice a byl vypočítán molární poměr matrice a analytu. Výsledné poměry jsou uvedené v *Tab. 16*.

Tab. 16: Optimální molární poměr matrice ku analytu pro vybraný způsob nanášení.

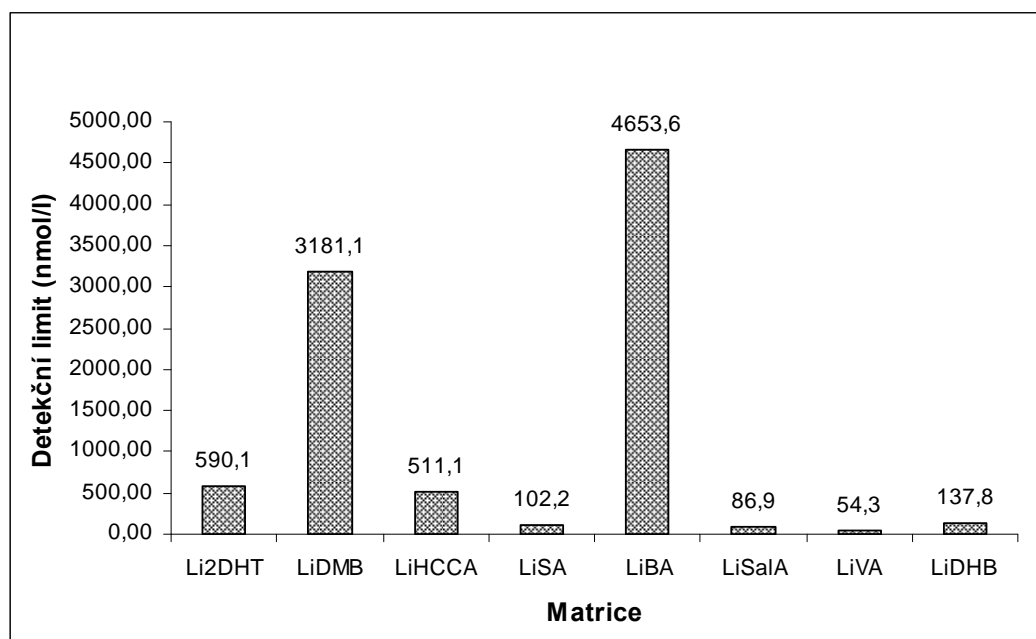
<i>Matrice</i>	<i>Analyt</i>	<i>Optimální molární poměr matrice ku analytu</i>	<i>Metoda nanášení</i>
Li ₂ DHT	Stearyl behenát	10:1	MIX
	<i>n</i> -triakontan	2:1	MIX
LiDMB	Stearyl behenát	100:1	Ma/Vz
	<i>n</i> -triakontan	10:1	Vz/Ma
LiHCCA	Stearyl behenát	100:1	Vz/Ma
	<i>n</i> -triakontan	10:1	MIX
LiSA	Stearyl behenát	100:1	Ma/Vz
	<i>n</i> -triakontan	10:1	MIX
LiBA	Stearyl behenát	100:1	Ma/Vz
	<i>n</i> -triakontan	10:1	MIX
LiSalA	Stearyl behenát	100:1	Ma/Vz
	<i>n</i> -triakontan	10:1	Ma/Vz
LiVA	Stearyl behenát	100:1	MIX
	<i>n</i> -triakontan	10:1	MIX

5.6 Detekční limit

Detekční limit byl stanoven jako podíl trojnásobku směrodatné odchylky šumu a směrnice kalibrační přímky. Detekčním limitem je míněna nejnižší koncentrace analytu, kdy je analytický signál statisticky významně odlišný od šumu.

5.6.1 Detekční limit pro voskový ester

Na *Obr. 7* jsou znázorněny hodnoty detekčních limitů pro stearyl behenát a v *Tab. 17* jsou uvedena data použitá k výpočtu.



Obr. 7: Detekční limity pro stearyl behenát.

Tab. 17: Směrodatné odchyly šumu a směrnice kalibrační přímky použité při výpočtu detekčního limitu pro stearyl behenát. I značí intenzitu signálu, c je koncentrace analytu.

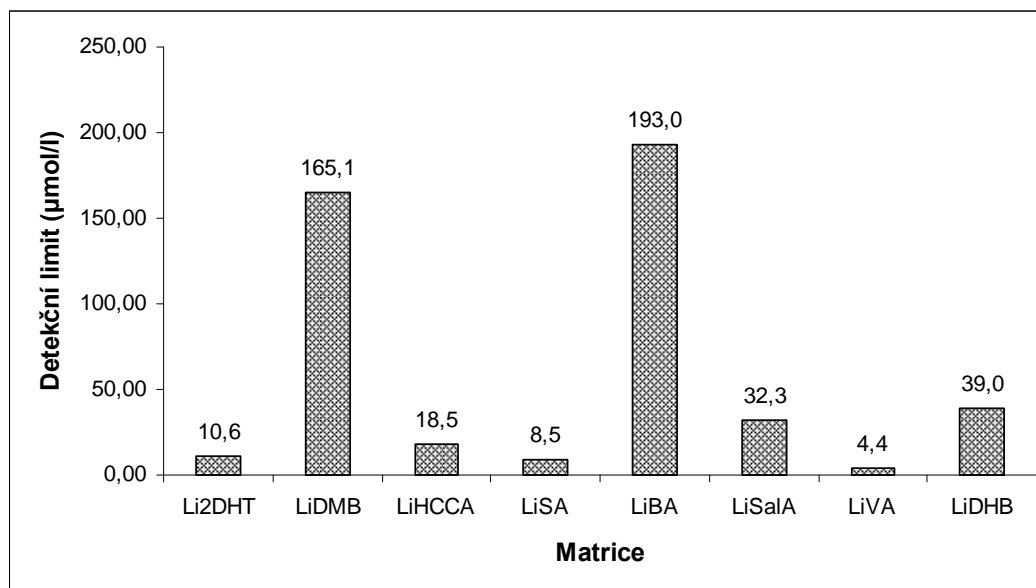
Matrice	Směrodatná odchylnka šumu (a.u.)	Směrnice kalibrační přímky I/c (a.u./ $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)
Li ₂ DHT	37,9	193
LiDMB	34,8	33
LiHCCA	36,1	212
LiSA	37,1	1090
LiBA	38,0	25
LiSalA	33,6	1161
LiVA	35,1	1937
LiDHB	31,9	695

Získané hodnoty detekčních limitů se pohybují v řádech desítek až tisíců nmol/l. Nejnížší hodnota detekčního limitu pro voskové estery byla stanovena pro matrici LiVA, v řádu desítek nmol/l. Nejvyšší hodnota detekčního limitu pro voskové estery byla stanovena pro matrici LiBA, v řádu tisíců nmol/l. Hodnoty směrodatných odchylek šumu v Tab. 17 jsou pro všechny matrice srovnatelné, detekční limity analytů s jednotlivými matricemi se tedy liší pouze z důvodu rozdílné citlivosti.

Ačkoliv měření detekčního limitu probíhalo na stejném přístroji, který byl použit v článku ⁹, hodnota detekčního limitu voskového esteru s matricí LiDHB naměřená v této práci je o jeden řád nižší než je uvedeno v článku. Důvodem pravděpodobně bude výměna MCP detektoru a laserové jednotky, která proběhla po naměření dat z článku. Rozdílnost dat může být také způsobena použitím jiných standardů voskových esterů. V případě článku byly použity jako standardy palmityl-palmitát, stearyl-stearát, arachid-arachidát a behenyl-behenát. V této práci byl použit stearyl behenát.

5.6.2 Detekční limit pro uhlovodík

Hodnoty detekčních limitů pro *n*-triakontan jsou znázorněny na Obr. 8 a data použitá k jeho výpočtu jsou uvedeny v Tab. 18.



Obr. 8: Detekční limity pro *n*-triakontan.

Tab. 18: Směrodatné odchyly šumu a směrnice kalibrační přímky použité při výpočtu detekčního limitu pro *n*-triakontan. *I* značí intenzitu signálu, *c* je koncentrace analytu.

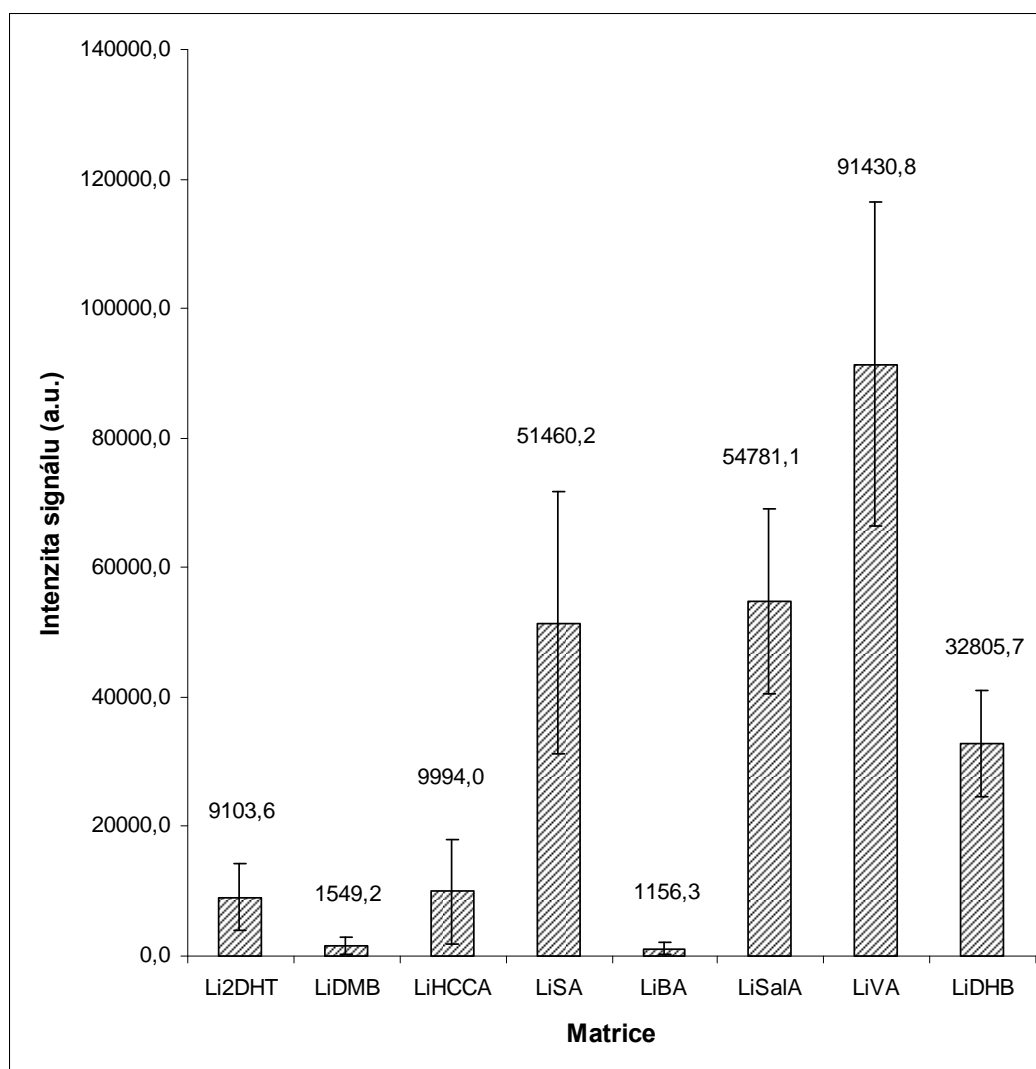
Matrice	Směrodatná odchylna šumu (a.u.)	Směrnice kalibrační přímky I/c (a.u./µmol.l ⁻¹)
Li ₂ DHT	36,6	10347
LiDMB	35,1	639
LiHCCA	37,1	6015
LiSA	38,2	13442
LiBA	34,3	533
LiSalA	37,5	3479
LiVA	36,8	25213
LiDHB	37,8	2913

Pro *n*-triakontan se hodnoty detekčních limitů pohybují v řádech jednotek $\mu\text{mol/l}$, u matrice LiVA, až po řády stovek $\mu\text{mol/l}$ u matrice LiBA. Hodnoty směrodatných odchylek šumu v *Tab. 18* jsou pro všechny matrice srovnatelné, detekční limity analytů s jednotlivými matricemi se tedy liší pouze z důvodu rozdílné citlivosti.

Hodota detekčního limitu uhlovodíku s matricí LiDHB naměřená v této práci odpovídá řádově hodnotě detekčního limitu pro uhlovodíky uvedené v článku¹⁹.

5.7 Intenzita signálu

Data získaná srovnávacím měřením byla vyhodnocena pro každou matici a analyt určením průměru intenzity signálu, směrodatné odchylky a relativní směrodatné odchylky signálu. Výsledky jsou znázorněny na následujících obrázcích (Obr. 9 a Obr. 10) a v tabulkách (Tab. 19 a Tab. 20).



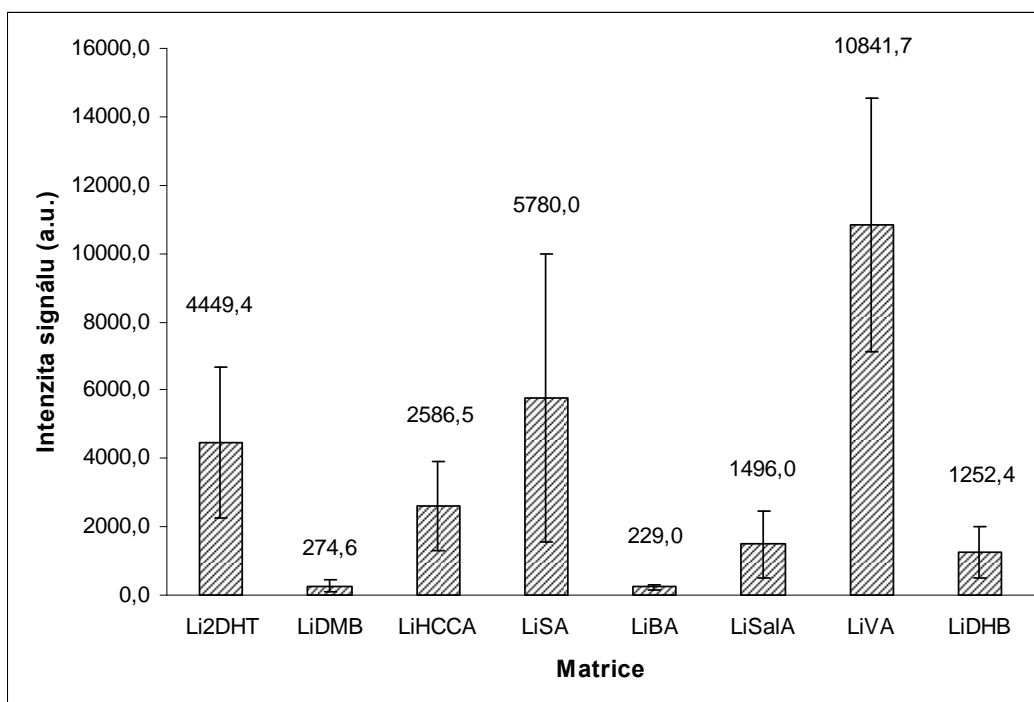
Obr. 9: Průměrné intenzity signálu stearyl behenátu při měření v jednotlivých maticích. Chybové úsečky v grafu znázorňují směrodatné odchylky.

Tab. 19: Parametry signálu stearyl behenátu pro jednotlivé matrice. Průměrné hodnoty intenzit signálu pro každou matici byly získány z 30 spekter naměřených na třech různých pozicích na MALDI terči, kdy z každé pozice bylo získáno 10 spekter.

Matrice	Průměrná intenzita signálu (a.u.)	Směrodatná odchylka (a.u.)	Relativní směrodatná odchylka (%)	Počet spekter bez signálu*
Li ₂ DHT	9103,6	5202,6	57,1	0
LiDMB	1549,2	1412,9	91,2	0
LiHCCA	9994,0	8114,6	81,2	0
LiSA	51460,2	20154,5	39,2	0
LiBA	1156,3	881,3	76,2	0
LiSalA	54781,1	14242,8	26,0	0
LiVA	91430,8	24921,9	27,3	0
LiDHB	32805,7	8163,8	24,9	0

* z celkového počtu 30ti spekter

Matrice LiVA dosáhla nejlepších výsledků – nejvyšší intenzity signálu pro stearyl behenát a relativně nízké RSD srovnatelné s RSD matrice LiSalA a LiDHB, která má hodnotu RSD nejnižší ze všech porovnávaných matic. Avšak oproti LiSalA a LiDHB má LiVA výrazně vyšší intenzitu signálu, jak je patrné z Obr. 9. Ostatní matrice dosáhly nižších intenzit s relativně velkými RSD. Jako zcela nevhodné matrice se ukázaly LiBA a LiDMB, kde je intenzita signálu výrazně nejnižší a RSD okolo 80%. Z uvedených výsledků se zdá být nejvhodnější matricí pro voskové estery vanilan lithný (LiVA).



Obr. 10: Průměrné intenzity signálu *n*-triaktanonu při měření v jednotlivých maticích. Chybové úsečky v grafu znázorňují směrodatné odchylky.

Tab. 20: Parametry signálu *n*-triaktanonu pro jednotlivé matrice. Průměrné hodnoty intenzit signálu pro každou matrici byly získány z 30 spekter naměřených na třech různých pozicích na MALDI terči, kdy z každé pozice bylo získáno 10 spekter.

Matrice	Průměrná intenzita signálu (a.u.)	Směrodatná odchylka (a.u.)	Relativní směrodatná odchylka (%)	Počet spekter bez signálu*
Li ₂ DHT	4449,4	2210,6	49,7	0
LiDMB	274,6	157,6	57,4	12
LiHCCA	2586,5	1305,3	50,5	1
LiSA	5780,0	4209,8	72,8	0
LiBA	229,0	69,1	30,2	27
LiSalA	1496,0	972,5	65,0	1
LiVA	10841,7	3696,1	34,1	0
LiDHB	1252,4	749,3	59,8	0

* z celkového počtu 30ti spekter

Pro *n*-triakontan dosáhla nejvyšší intezity signálu matrice LiVA s druhou nejnižší RSD. Nejnižší hodnotu RSD dosáhla matrice LiBA, která je však pro velice nízkou intenzitu signálu, v porovnání s ostatními testovanými matricemi, pro MALDI-MS uhlovodíku nevhodná. Nízká hodnota RSD je v tomto případě způsobena tím, že v převážné části naměřených spekter (27 ze 30) není patrný žádný signál analytu. LiDMB je také pro uhlovodíky nevhodnou matricí, pro nízkou intenzitu signálu. Hodnota relativní směrodatné odchylky ukazuje na špatnou reprodukovatelnost měření. To je pravděpodobně způsobeno tvorbou tzv. sweet spots, bodů bohatých na signál. Znamená to tedy, že nanesená matrice a analyt vytvoří na terčiku místa, kde je vysoká koncentrace analytu a naopak místa, kde je koncentrace analytu tak nízká, že signál je nepatrný či dokonce vymizí. Tvorba těchto bodů je závislá na mechanismu kokrytalizace matrice s analytem, který je specifický pro každou matrici, analyt i způsob nanášení. Rozmístění analytu na desce, tedy tvorba sweet spots, či rovnoměrnější rozložení, je velice důležitou vlastností, která je u matric hodnocena.

Celkově lze říci, že z testovaných matric je vanilan lithný (LiVA) nejvhodnější pro testovaný uhlovodík i voskový ester a to i v porovnání s běžně používanou matricí LiDHB. Naopak zcela nevhodnými matricemi jsou LiBA a LiDMB.

5.8 Vztahy mezi strukturou matrice a její účinností

Uvedené výsledky ukazují, že účinné matrice pro ionizaci uhlovodíků a voskových esterů jsou ty, které obsahují volnou hydroxylovou skupinu ve své molekule. Naopak ty matrice, které volnou hydroxylovou skupinu neobsahují se jeví jako velice málo účinné, či neionizují analyt vůbec. Zdá se tedy, že přítomnost hydroxylové skupiny v molekule matrice je pro ionizaci nepolárních lipidů nezbytná. Hlavním důvodem pravděpodobně bude, že matrice bez přítomnosti hydroxylové skupiny ve struktuře (LiDMB, LiBA) velice slabě absorbují UV záření ve vlnové délce používaného dusíkového laseru (337 nm).

Podobná tendence byla prokázána i v práci M.Svobody a M. Kodíčka⁴¹, kde zjistili, že přítomnost volné hydroxylové skupiny v molekule matrice je nezbytným aspektem pro redukci azo skupiny v cyklických peptidech a k ionizaci lineární formy těchto peptidů. Vodíkové atomy potřebné k redukci azo skupiny pocházejí právě z hydroxylových skupin matrice.

Při porovnání množství krystalové vody připadající na molekulu matrice v *Tab. 6* a výsledků srovnávacího měření v kapitole 5.7 je patrné, že účinnější matrice vážou více krystalové vody.

6 ZÁVĚR

Během této práce zaměřené na hledání efektivních matric pro analýzu vybraných tříd lipidů metodou MALDI-TOF bylo syntetizováno několik nových matric, které byly testovány s *n*-triakontanem jako zástupcem uhlovodíků a stearyl behenátem jako zástupcem voskových esterů. Studovanými matricemi byly lithné soli kyselin 2,5-dihydroxytereftalové, 2,5-dimetoxybenzoové, α -kyano-4-hydroxyskořicové, sinapové, benzoové, salicylové a vanilové. U těchto látek byly vyhodnoceny jejich MALDI vlastnosti, včetně rozpustnosti v organických rozpouštědlech. Byla určena hranice laserové síly, která může být použita pro úspěšnou desorpci/ionizaci voskových esterů a nepolárních uhlovodíků. Dále byly změřeny a vyhodnoceny matriční ionty a jejich hmotnostní rozsah, stanoveny optimální podmínky měření, ověřena schopnost absorbovat ve vlnové délce 377 nm. Také byl určen detekční limit pro uhlovodíky a voskové estery v jednotlivých matricích. Na závěr byly matrice porovnány z hlediska intenzity signálu a relativních směrodatných odchylek. Zároveň bylo provedeno srovnání s lithnou solí kyseliny dihydroxybenzoové (LiDHB), která je ověřenou maticí pro analýzu lipidů.

Podářilo se najít několik účinných MALDI matric. Jsou to látky, které mají ve své struktuře hydroxylovou skupinu. Ukázala se i určitá korelace účinnosti a obsahu krystalové vody v matricích. Matrice s vyšší účinností obsahují vyšší počet molekul krystalové vody na molekulu matrice. Jako neúčinnější z porovnávaných matric byl vyhodnocen vanilan lithný, který dosáhl nejvyšší účinnosti ionizace jak pro studovaný voskový ester tak pro uhlovodík. Vanilan lithný tvoří s analyty homogenní směs krystalů a má nízkou RSD měření, což poukazuje na dobrou reprodukovatelnost měření. Detekční limit se pro studovaný voskový ester pohybuje v řádu desítek nmol/l a pro studovaný uhlovodík v řádu jednotek μ mol/l. LiVA dobře absorbuje ve vlnové délce laseru a k ionizaci analytu je potřebná nízká intenzita laserového paprsku – 36%. Zároveň při této intenzitě nejsou ve spektrech patrné ionty matrice a nedochází tedy k rušení signálu analytu signály matrice.

Vanilan lithný předčil svými MALDI vlastnostmi všechny testované matrice, tedy i ověřenou maticí LiDHB a zdá se být novou velice účinnou maticí pro analýzu voskových esterů a uhlovodíků. V budoucnosti bude tato matrice otestována na reálných vzorcích přírodního původu.

7 LITERATURA

- ¹ Fuchs, B., Süß, R., Schiller, J., *An update of MALDI-TOF mass spectrometry in lipid research*. Progres in Lipid Research, 2010. **49**: p. 450-475
- ² Calvano, D. C., Carulli, S., Palmisano, F., *1H-Pteridine-2,4-dione (lumazine): a new MALDI matrix for complex (phospho)lipid mixtures analysis*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2010. **398**: p. 499–507
- ³ Jackson, N. J., Woods, A. S., *Direct profiling of tissue lipids by MALDI-TOFMS*. Journal of Chromatography B, 2009. **877**: p. 2822–2829
- ⁴ Armstrong, D.W., Zhang, L., He, L., Gross, M. L., *Ionic liquids as matrices for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry*. Analytical Chemistry, 2001. **73**: p. 3679-3686
- ⁵ Schiller, J., Arnhold, J., Bernard, S., Müller, M., Reich, S. and K. Arnold, *Lipid analysis by matrix-assisted laser desorption and ionization mass spectrometry: A methodological approach*. Analytical Biochemistry, 1999. **267**: p. 46-56
- ⁶ Hudeček, J., Tichá, M., Barthová, J., Stiborová, M., Krajhanzl, A., Sofrová, D., Entlicher, G., Hladík, J., Novák, F., *Biochemie: základní kurz*, 3. vyd. Praha, Karolinum 1999, s. 157
- ⁷ Fahy, E., Subramaniam, S., Brown, H.A., Glass, Ch.K., Merrill Jr., A.H., Murphy, R.C., Raetz, Ch.R.H., Russell, D.W., Seyama, Y., Shaw, W., Shimizu, T., Spener, F., van Meer, G., van Nieuwenhze, M.S., White, S.H, Witzum, J.L., Dennis, E.A., *A comprehensive classification system for lipids*. Journal of Lipid research, 2005. **46**: p. 839-861
- ⁸ <http://www.cyberlipid.org/cyberlip/home0001.htm> (citováno dne 1.4.2010)
- ⁹ Vrkoslav, V., R. Míková, Cvačka, J., *Characterization of natural wax esters by MALDI-TOF mass spectrometry*. Journal of Mass Spectrometry, 2008. **44**(1): p. 101 - 110
- ¹⁰ Kolattukudy, P. E. (ed.), *Chemistry and biochemistry of natural waxes*. Elsevier, Oxford, 1976
- ¹¹ Kunst, L., Samuels, A. L., *Biosynthesis and secretion of plant cuticular wax*. Progress in Lipid Research, 2003. **42**: p. 51

- ¹² Hamilton, R.J., (ed.), *Waxes: Chemistry, molecular biology and functions*. Oily press: Dundee, 1995
- ¹³ Schiller, J., Süß, R., Arnhold, J., Fuchs, B., Leßig, J., Müller, M., et al., *Matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry in lipid and phospholipid research*. Progress in Lipid Research, 2004. **43**: p.449–88
- ¹⁴ Fuchs, B., Schiller, J., *Application of MALDI-TOF mass spectrometry in lipidomics*. European Journal of Lipid Science and Technology, 2009. **111**: p. 83–98
- ¹⁶ Chen, R., Yalcin, T., Wallace, W.E., Guttman, C.M., Li, L., *Laser desorption ionization and MALDI time-of-flight mass spectrometry for low molecular mass polyethylene analysis*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2001. **12**: p. 1186 - 1192
- ¹⁷ Mostary, Z., et al., *Automated normal phase nano high performance liquid chromatography/matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometry for analysis of neutral and acidic glycosphingolipids*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2008. **391**: p. 289–297
- ¹⁸ Kuhn, G., Weidner, S., Just, U., Hohner, G., *Characterization of technical Waxes – Comparison of chromatographic techniques and matrix-assisted laser-desorption/ionization mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 1996.**732**: p. 111 - 117
- ¹⁹ Cvačka, J., Svatoš, A., *Matrix-assisted laser desorption/ionization analysis of lipids and high molecular weight hydrocarbons with lithium 2,5-dihydroxybenzoate matrix*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2003. **17**: p. 2203-2207
- ²⁰ Havlíš, J., *Hmotnostní spektrometrie MALDI TOF*. Vesmír, 1999. **78**: p. 448
- ²¹ Karas, M., Krüger, R., *Ion formation in MALDI: The cluster ionization mechanism*. Chemical Reviews, 2003. **103**: p. 427-439
- ²² Dreisewerd, K., *The desorption process in MALDI*. Chemical Reviews, 2003. **103**: p. 395-425
- ²³ Němcová, I., Engst, P., Jelínek, I., Sejbal, J., Rychlovský, P., *Spektrometrické analytické metody II*. Karolinum, Praha 1998

- ²⁴ Karas, M., Glückmann, M., Schäfer, J., *Ionization in matrix-assisted laser desorption/ionization: singly charged molecular ions are the lucky survivors*. Journal of Mass Spectrometry, 2000. **35**: p. 1–12
- ²⁵ Zenobi, R., Knochenmuss, R., *Ion formation in MALDI mass spectrometry*. Mass Spectrometry Reviews, 1998. **17**: p. 337–366
- ²⁶ Horneffer, V., Dreisewerd, K., Lüdemann, H.C., Hillenkamp, F., Läge, M., Strupat, K., *Is the incorporation of analytes into matrix crystals a prerequisite for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry? A study of five positional isomers of dihydroxybenzoic acid*. International Journal of Mass Spectrometry, 1999. **187**: p. 859–870
- ²⁷ Zhang, J., Zenobi, R., *Matrix-dependent cationization in MALDI mass spectrometry*. Journal of Mass Spectrometry, 2004. **39**: p. 808–816
- ²⁸ Knochenmuss, R., Zenobi, R., *MALDI Ionization: The role of in-plume processes*. Chemical Reviews, 2003. **103**: p. 441–452
- ²⁹ <http://www.chm.bris.ac.uk/ms/theory/maldi-ionisation.html>
(citováno dne 30.3.11)
- ³⁰ http://www.uochb.cz/web/document/cms_library/979.pdf
(citováno dne 13.2.2010)
- ³¹ <http://biomikro.vscht.cz/maldiman/cz/theory/basics.php>
(citováno dne 13.2.2010)
- ³² http://www.uochb.cz/web/document/cms_library/979.pdf
(citováno dne 13.2.2010)
- ³³ Black, C., Poile, C., Langley, J., Herniman, J., *The use of pencil lead as a matrix and calibrant for matrix-assisted laser desorption/ionisation*. Rapid Communication in Mass Spectrometry, 2006. **20**: p. 1053–1060
- ³⁴ Kinumi, T., Saisu, T., Takayama, M., Niwa, H., *Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry using an inorganic particle matrix for small molecule analysis*. Journal of Mass Spectrometry, 2000. **35**: p. 417–22
- ³⁵ Schiller, J., Süß, R., Fuchs, B., Müller, M., Zschörnig, O., Arnold, K., *MALDI-TOF MS in lipidomics*. Frontiers in Bioscience, 2007. **12**: p. 2568–2579

- ³⁶ Cvačka, J., Jiros, P., Sobotník, J., Hanus, R., Svatoš, A., *Analysis of insect cuticular hydrocarbons using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry*. *Journal of Chemical Ecology*, 2006. **32**: p. 409–434
- ³⁷ Ayorinde, F.O., Hambright, P., Porter, T.N., Keith Jr., Q.L., *Use of mesotetrakis(pentafluorophenyl)porphyrin as a matrix for low molecular weight alkylphenol ethoxylates in laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*. *Rapid Communication in mass Spectrometry*, 1999. **13**: p. 2474–2479
- ³⁸ Shroff, R., Rulíšek, L., Doubský, J., Svatoš, A., *Acid-base-driven matrix-assisted mass spectrometry for targeted metabolomics*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2009. **106**: p. 10092-10096
- ³⁹ Shroff, R., Svatoš, A., *Proton sponge: A novel and versatile MALDI matrix for the analysis of metabolites using mass spectrometry*. *Analytical Chemistry*, 2009. **81**: p. 7954-7959
- ⁴⁰ Fuchs, B., Schober, C., Richter, G., Süß, R., Schiller, J., *MALDI-TOF MS of phosphatidylethanolamines: different adducts cause different post source decay (PSD) fragment ion spectra*. *Journal of Biochemical and Biophysical methods*, 2007. **70**: p. 689–692.
- ⁴¹ Svoboda, M., Kодиíček, M., *Azo-group reduction during the matrix-assisted laser desorption/ionization process in the presence of 2,5-dihydroxybenzoic acid*. *Rapid Communication in Mass Spectrometry*, 2010. **24**: p. 3351–3356
- ⁴² <http://www.uochb.cz/web/structure/459.html?lang=cz>
(citováno dne 14.10.2010)
- ⁴³ <http://www.uochb.cz/web/structure/736.html?lang=cz>
(citováno dne 14.10.2010)
- ⁴⁴ Tanaka, K., Waki, H., Ido, Y., Akita, S., Yoshida, Y., Yoshida, T., *Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of flight mass spectrometry*. *Rapid Communication in Mass Spectrometry*, 1988. **2**: p. 151–3
- ⁴⁵ Karas, M., Hillenkamp, F., *Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons*. *Analytical Chemistry*, 1988. **60**: p. 2299–301

