

Bakalářská práce

**Využití vysoce energetických zdrojů záření
pro simulaci dopadu mimozemského tělesa do
atmosféry Země**

**Application of high power energy for
simulation of impacts of extraterrestrial body
into the early stage atmosphere**

Petra Macháčková

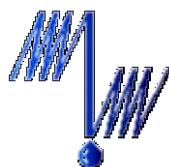
Školitel: Doc. RNDr. Svatopluk Civiš, CSc.



Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyzikální a makromolekulární chemie



Ústav fyzikální chemie Jaroslava Heyrovského

Akademie věd České republiky

Praha 2008

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem pod vedením Doc. RNDr. S. Civiše, CSc. pracovala samostatně a veškerou použitou literaturu jsem řádně citovala.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 26. srpna 2008

Petra Macháčková

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli Doc. RNDr. Svatoplukovi Civišovi, CSc. za vedení, pomoc a cenné připomínky při psaní této bakalářské práce. Současně bych ráda poděkovala Doc. RNDr. Evě Tesařové, CSc. a RNDr. Josefu Cvačkovi, PhD. za umožnění instrumentálních analýz v jejich laboratořích, za ochotu a čas, který mi věnovali. Dále chci poděkovat Ing. Liboru Juhovi, CSc. za odbornou pomoc a konzultace. Nemalé poděkování také patří všem kolegům z FTIR laboratoře Ústavu fyzikální chemie Jaroslava Heyrovského za všestrannou pomoc, trpělivost a podporu. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat své rodině a přátelům za jejich podporu a pochopení během mého studia.

OBSAH

1	ÚVOD	7
2	INSTRUMENTACE	9
2.1	PALS	9
2.1.1	Princip.....	10
2.1.2	Celkové uspořádání	12
2.2	Vaková linka.....	13
2.3	Skleněné kyvety.....	14
2.3.1	Čištění kyvet	15
2.3.2	Plnění kyvet	15
2.4	Měděná a teflonová fólie	16
3	POUŽITÁ METODIKA	17
3.1	Hmotnostní spektrometrie	17
3.1.1	Složení spektrometru	17
3.1.2	Princip.....	18
3.2	Hmotnostní spektrometrie s vybranými ionty v proudové trubici.....	19
3.2.1	Princip.....	20
3.2.2	Reakce H_3O^+	23
3.2.3	Reakce NO^+	24
3.2.4	Reakce O_2^+	24
3.3	Hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF	25
3.4	HPLC	27
3.4.1	Základní charakteristiky chromatografického procesu.....	27
3.4.2	Chromatografická kolona	29
3.5	UV/Vis HPLC detektory	30
3.6	Derivatizace	31
3.6.1	Derivatizace aminokyselin	32
4	VLASTNÍ EXPERIMENT	34
4.1	Příprava vzorku na analýzu	35
4.1.1	Kyveta bez fólie.....	35
4.1.2	Mineralizace	35
4.1.3	Dansylace.....	36
4.1.4	Kyvety s fóliemi	37
4.2	Analýza plynné složky metodou SIFT-MS	37
4.3	Analýza kapalně složky metodou HPLC-UV/Vis.....	38
4.4	Analýza povrchů pomocí metody MALDI-TOF.....	39
5	VÝSLEDKY A DISKUSE	40
5.1	Výsledky analýzy plynné složky	40
5.2	Výsledky analýzy kapalně vzorku	43
5.3	Výsledky analýzy povrchů	47
6	ZÁVĚR	50
7	LITERATURA	53

Seznam použitých symbolů a zkratek

[A]	koncentrace látky A
°C	stupeň Celsia
A	absorbance
AK	aminokyselina
Ala	alanin
Asn	asparagin
Asp	kyselina asparagová
c	koncentrace
CI	chemická ionizace
D_i	difúzním koeficientem
ε	molární absorpční koeficient
E_{kin}	kinetická energie
E_{pot}	potenciální energie
ESI	ionizace elektrosprejem
F_m	objemová rychlost
Gly	glycin
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
I	iontový signál
I_0	počáteční iontový signál
IE	ionizační energie
k	rychlostní konstanta
k	kapacitní poměr
K_D	distribuční konstanta
l	délka proudové trubice
l	tloušťkou absorbující vrstvy
λ	vlnová délka
LIDB	laserem indukovaný dielektrický průraz
m	hmotnost
MALDI	laserová desorpce/ionizace za asistence matrice
MeOH	methanol
n	látkové množství
N	počet částic
PA	protonová afinita
PALS	pražský laserový systém Asterix
PF	prostorový filtr
s	sekunda
Ser	serin
SIFT-MS	metoda proudové trubice s vybranými ionty s hmotnostním spektrometrem
β	fázový poměr
TEAA	triethylamin s kyselinou octovou

t_M	mrtvý retenční čas
TOF	detektor doby letu
t_r	reakční čas
t_R	retenční čas
U	elektrický potenciál
UV	ultrafialová část spektra
v	rychlost
v_i	střední průtoková rychlost
V_{is}	viditelná část spektra
V_M	mrtvý objem kolony
V_m	objem mobilní fáze
V_R	retenční objem
V_S	objem stacionární fáze
VUV	vakuová ultrafialová část spektra
XUV	extrémní ultrafialová část spektra
z	náboj
ε	korekce délky
λ	difúzní délka

1 ÚVOD

Lidé se od pradávna zabývají otázkou vzniku života. Dnes se předpokládá, že sekvence jednotlivých procesů vzniku života pravděpodobně začala syntézou jednoduchých organických molekul. Tyto jednoduché molekuly spolu reagovaly za vzniku polymerů a dále na stále více a více komplikovanější struktury až vznikl první systém, který mohl být nazýván živým.¹ V tuto chvíli se naskytá otázka, co je to vlastně život? Odpověď není jednoduchá. Velmi zjednodušeně můžeme říci, že život je chemický systém závislý na vodě, schopný vývoje, reprodukce, adaptace a přenosu molekulární informace mezi generacemi.

Zájem o výzkum prebiotické syntézy bioorganických látek zvýšil v roce 1952 Millerův experiment, kterému se podařilo pomocí elektrických výbojů syntetizovat ve směsi CH_4 , NH_3 , H_2O , H_2 jednoduché organické látky² (aminokyseliny, močovinu aj.). V následujících desetiletích bylo uskutečněno mnoho experimentů v několika různých systémech představujících primitivní atmosféry. Složení zemské atmosféry mělo pravděpodobně obrovský vliv na vznik života na Zemi a proto je již řadu let intenzivně zkoumáno. V současnosti se předpokládá, že s největší pravděpodobností, byla zemská atmosféra tvořena především směsí plynů $\text{CO}_2(\text{CO})\text{-N}_2\text{-H}_2\text{O}$ ³ s tím, že velké množství oxidu uhelnatého mohlo být dodáno do atmosféry dopadem komet a asteroidů, které obsahovaly značná množství tohoto plynu⁴, a odplyněním žhavého pláště Země.

Přímé zdroje energie umožňující syntézu organických látek na primitivní Zemi byly sluneční a kosmické záření, elektrické výboje, tepelná sopečná energie, radioaktivita a rázové vlny.^{5,6} Potenciálně nejdostupnějším zdrojem energie bylo dlouhovlnné ultrafialové záření, avšak největší specifickou účinností při jejich syntéze měly rázové vlny spojené s bleskovými výboji a dopady mimozemských těles do atmosféry.⁷

Při vysokorychlostním dopadu mimozemského tělesa do atmosféry dochází k uvolnění velkého množství energie. Simulací tohoto jevu je využití vysokoenergetického laseru, tedy v našem případě laserového systému PALS (Prague Asterix Laser System). Při fokusování laserového záření v plynném prostředí dochází v zužující se části svazku k dielektrickému průrazu plynu (laser-induced dielectric breakdown – LIBD). To způsobí vznik oblaku horkého a hustého plazmatu, které je jasně ohraničeno v prostoru a čase. V principu zde dochází ke kaskádové ionizaci plynu vytvářející plazma. Tento jev se navenek projeví vznikem jiskry.

Energie laserového svazku deponovaná v jiskře se do okolí dostává třemi cestami:

- rázovou vlnou, která se v určitém okamžiku oddělí od expandujícího plazmatu
- míšením a interakcí expandujícího plazmatu, charakterizovaného velmi vysokou teplotou a obsahem reaktivních částic (iontů, volných radikálů, atomů) v základních i excitovaných stavech, s okolním plynem
- krátkovlnným (UV-VUV/XUV) zářením a energetickými částicemi emitovanými plazmatem

Jejich podíl na chemických změnách je dán jednak parametry laserového pulzu, určujícími teplotu a další klíčové charakteristiky jím generovaného plazmatu, jednak rozdíly jejich účinnosti při iniciaci chemických reakcí v dané molekulární soustavě.⁸

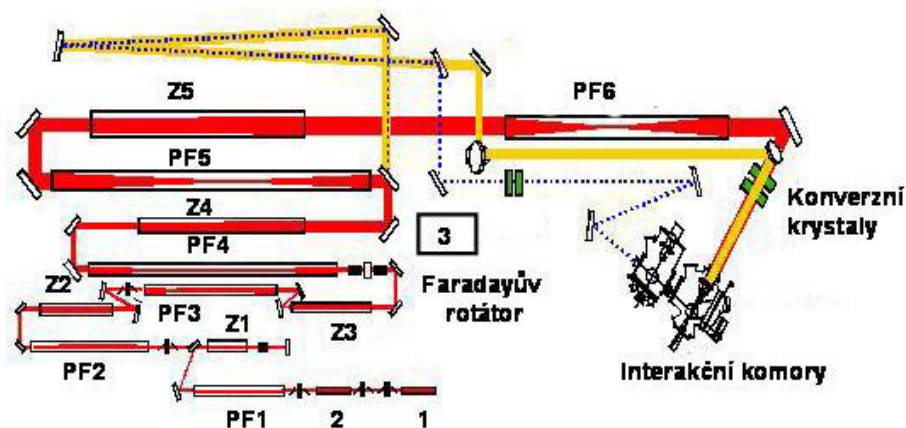
Naše dříve provedené experimenty potvrdily možnost vzniku jednoduchých organických látek ze směsi anorganických plynů pomocí vysoce energetických zdrojů záření. Pro tyto výzkumy byla v předchozích experimentech, probíhajících na UFCHJH, používána velkoobjemová skleněná kyveta. Množství aminokyselin v ní syntetizované však bylo velmi nepatrné a proto byla pro další experimenty vyrobena kyveta o několika násobně menším objemu, ve které se předpokládá kvantitativně účinnější syntéza aminokyselin. Dalším důvodem pro zhotovení nové kyvety byl zájem studovat interakci povrchů při syntéze látek, což v původní kyvetě, vzhledem k velikosti vznikající laserové jiskry (přibližně 10 cm), nebylo možné.

Cílem této práce je zjistit, zda je možné v takto nově zvolených podmínkách syntetizovat vyšší koncentrace jednoduchých organických látek ve směsi CO-N₂-D₂O, se zaměřením hlavně na aminokyseliny. A dále, jaký má vliv interakce s různým povrchem na množství a tvorbu produktů v ozařované směsi.

2 INSTRUMENTACE

2.1 PALS

Stěžejním nástrojem této práce je PALS (Prague Asterix Laser System), obří laserový systém, využívající atomů jódu ke generaci záření v blízké infračervené oblasti, viz. obr. 1 a 2. Základní vlnová délka je 1315 nm, tu je však možno konvertovat na druhou (658 nm, červenou) nebo třetí (438 nm, modrou) harmonickou frekvenci. Ve stávající konfiguraci a na základní vlnové délce 1315 nm laser poskytuje pulzy o energii až 1 kJ. Vzhledem k velmi krátké délce laserového pulzu (300 - 400 ps) je špičkový pulzní výkon laseru obrovský - až 3 TW. Laser je schopen dodat jeden takový impuls zhruba jednou za půl hodiny. Výstupní svazek laseru PALS je velmi kvalitní, tj. prostorově homogenní, a stabilní, tj. jeho energie se výstřel od výstřelu prakticky nemění. Optická dráha laseru je dlouhá přibližně 160 m. Po její délce se průměr laserového svazku zvětší desetkrát a jeho energie se zvýší stotisíckrát.⁹



Obr.1: Schéma PALS, 1- řídicí oscilátor, 2- předzesilovač, PF1-6-prostorové filtry, Z1-5-zesilovače.⁹



Obr. 2: Umístění PALS v laserové hale.

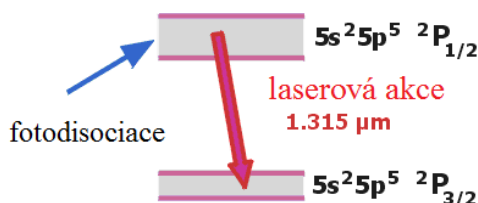
2.1.1 Princip

Jak už bylo zmíněno, PALS je plynový laser, využívající ke generaci záření přechodu v atomární struktuře jódu. Jódový atom je získáván z molekuly alkyljodidu C_3F_7I fotolýzou (fotodisociací). Atom se uvolňuje z chemické vazby prostřednictvím pulsního UV záření, které je dodáváno výbojkami. Elektronový obal jódu je excitován, čímž je zformována inverze populace vzhledem k níže ležícímu základnímu stavu. Tím jsou vytvořeny podmínky pro laserovou akci.



Obr. 3: Znárodnění fotodisociace alkyljodidu.

K laserové akci dochází mezi hladinami jemné struktury $^2P_{1/2}$ a $^2P_{3/2}$ základní konfigurace $5s^25p^5$ neutrálního atomu jódu. Přechodem mezi hladinami $^2P_{1/2}$ a $^2P_{3/2}$ dochází k emitaci záření o vlnové délce $1,315 \mu\text{m}$.



Obr. 4: Přechod mezi hladinami $^2P_{1/2}$ a $^2P_{3/2}$

Aktivní médium laseru je složeno kromě z isopropyljodidu C_3F_7I také z argonu (Ar), který působí jako tzv. nárazníkový (buffer) plyn. Argon samostatně k laserové akci nepřispívá, ve směsi má však tři významné funkce.

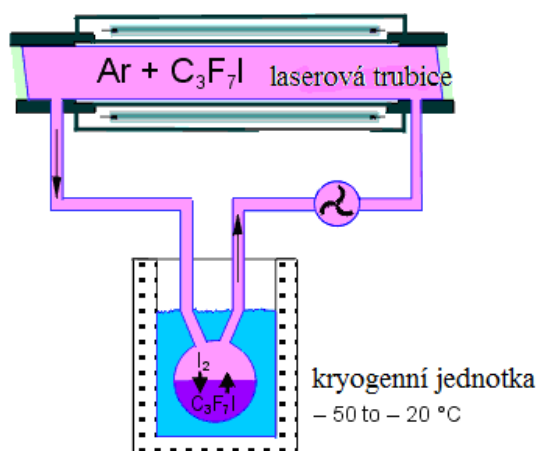
- I. Rozšiřuje atomovými srážkami šířku spektrální čáry emitovaného záření.
- II. Rozředí alkylijodid v aktivním prostředí a tím zlepšuje homogenitu čerpání v příčném směru.
- III. Působí jako tepelný rezervoár absorbující část tepelné energie deponované do aktivního prostředí výbojkami. To pomáhá výrazně omezovat nežádoucí tepelný rozklad aktivního média ve fotolyzované směsi.

Fotodisociací vzniklé alkylové radikály a jódové atomy jsou chemicky velmi reaktivní. Nejdůležitější reakce jsou znázorněny v *tab. 1*

$C_3F_7 + I \rightarrow C_3F_7I$	(rekombinace)
$C_3F_7 + C_3F_7 \rightarrow C_6F_{14}$	(dimerizace)
$I + I \rightarrow I_2$	(vznik molekuly jódu)

Tab. 1: Radikálové reakce ve fotodisociované směsi

Produkty dimerizace alkylových radikálů nemají vliv na další fungování pracovní směsi. Zatímco molekuly jódu, produkované především třetí z uvedených reakcí, zhášejí velmi účinně inverzi populace a mají silně korozivní účinky. Proto je směs po každém výstřelu laseru vedena do kryogenních jednotek obsahujících kapalný alkylijodid. Molekulární jód z ozářené směsi je zachycován v kapalném alkylijodidu a nové molekuly alkylijodidu jsou do ní z kapalně fáze doplněny. Takto dochází k regeneraci směsi viz *obr. 5*. Právě díky možnosti efektivní regenerace je volen isopropyl $i-C_3F_7I$.



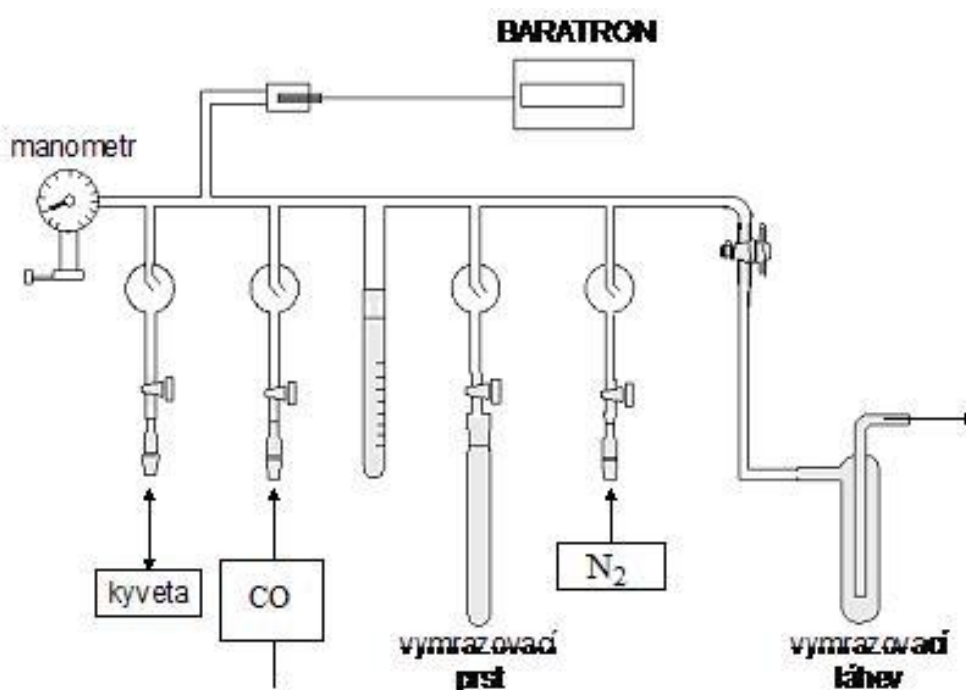
Obr.5: Regenerační proces pracovní směsi

2.1.2 Celkové uspořádání

PALS se skládá z oscilátorové sekce generující počáteční slabý světelný impuls a z řetězce pěti zesilovačů, které tento počáteční puls zesilují. Rozměr zesilovačů se od jednoho zesilovacího stupně k druhému zvětšuje, takže průměr zesilovaného laserového svazku postupně roste. Průměr svazku začíná na 8 mm a končí na 290 mm. Tím, že průměr svazku roste se udržuje plošná hustota výkonu laserového svazku na hodnotě, při které ještě nemůže dojít k poškození povrchu jednotlivých optických prvků vlivem přílišné světelné zátěže. Průměr laserového svazku se zvyšuje pomocí optických teleskopů - prostorových filtrů, které současně vylepšují kvalitu zesilovaného svazku. Dalším důležitým zařízením v zesilovací trase je Faradayův rotátor, jenž zabraňuje zpětnému zesilování odražených paprsků.¹⁰

2.2 Vaková linka

K plnění kyvet na požadovaný tlak byla používána vakuová linka znázorněná na obr. 6. Tato linka je vyrobena ze skla a k jejímu uzavírání slouží vakuové kohouty. Tlak uvnitř linky je měřen pomocí mechanického manometru PREMA s rozsahem od 760 do 0 Torr a elektrického manometru typu Baratron s rozsahem od 13,32 do 0,01 Torr.¹¹ Linka je evakuována pomocí rotační olejové pumpy EDWARDS 5 až do tlaku 10^{-3} Torr, ke které je připojena přes vymrazovací láhev, naplněnou kapalným dusíkem (zabránění vniknutí olejových par do kyvety).



Obr. 6: Schéma vakuové linky¹¹

Ostatní součásti jsou k vakuové lince připojovány hadicemi tygon přes zábrusové nebo kovové spojky cajon.¹²

2.3 Skleněné kyvety

Při experimentu byly používány dvě stejné skleněné kyvety ukázané na *obr. 7*.



Obr. 7: Jedna ze dvou skleněných kyvet upevněná ve stojánku.

Kyvety jsou válcovitého tvaru a jsou opatřeny dvěma vakuovými kohouty, které slouží k evakuaci a plnění. Vnitřní objem kyvet je cca 820 cm^3 . Délka kyvet bez vakuových kohoutů je 15,5 cm a jejich vnitřní průměr je 8,2 cm. Na spodní straně těla kyvet je prohlubeň, do které je vstříkována deuterovaná voda a slouží také jako místo pro kondenzaci vody po ukončení ostřelování laserem.

Kyvety se skládají ze vstupního skleněného okna, jehož tloušťka je 1 cm. Tímto oknem vstupuje laserový paprsek do kyvety. Okraje kyvet, na které dosedá vstupní okno jsou mírně zvednuty. Vstupní okno je k tělům kyvet připevněno nerezovými přírubami. Dvě půlměsíkové příruby dosedají přímo na spodní kruhovou přírubu. Mezi spodní přírubou a zvednutým skleněným okrajem kyvety je umístěna vložka, aby se zabránilo prasknutí okraje kyvety tlakem sešroubovaných přírub. Jako těsnění slouží wiltonový kroužek, který je vložen mezi tělo kyvety a vstupní okno. Mezi horní přírubu a vstupní okno je opět vložena vložka. Vše je spojeno šesti šrouby tak, aby žádná skleněná součást nebyla přílišným tlakem poškozena, ale zároveň, aby kyveta těsnila.

2.3.1 Čištění kyvet

Všechny skleněné součásti kyvet byly vždy před plněním vypláchnuty deionizovanou vodou a vypečeny v peci na 450 °C, aby se z vnitřních stěn spálily všechny organické látky. Po vyjmutí z pece byla co největší snaha, aby se zamezilo kontaminaci kyvety organickými nečistotami, proto jsme při manipulaci s kyvetami a vškerým nádobím a náčiním, potřebným k plnění, používali teflonové rukavice. Kyvety byly co nejdříve uzavřeny, evakuovány na vakuové lince a naplněny vzorkem. Všechno skleněné nádobí a skleněná injekční stříkačka byly vždy důkladně vyčištěné, vypláchnuté deionizovanou vodou a vypečené v peci. Teflonové hadičky a injekční jehly, potřebné k plnění a vysávání vody, byly použity vždy nové. Plastové a nerezové části byly omyty deionizovanou vodou a osušeny.

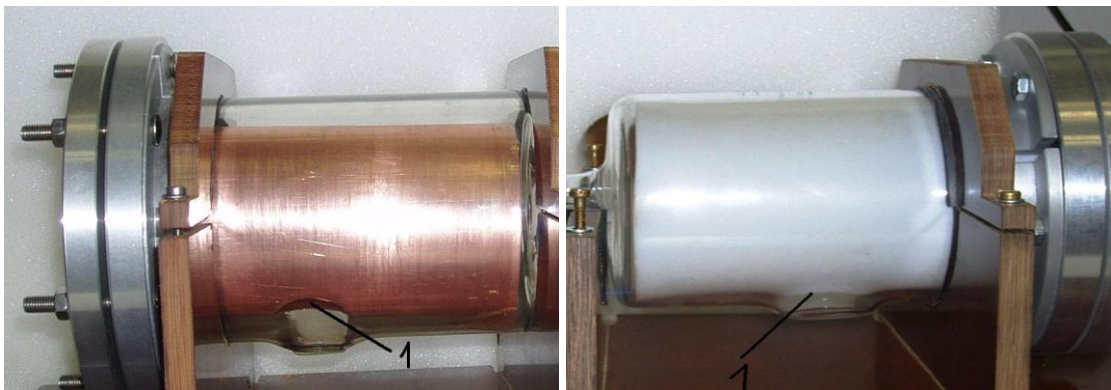
2.3.2 Plnění kyvet

Kyvety byly plněny přes vakuovou linku, ke které byly připojeny hadicí tygon a nerezovou spojkou cajon, přes jeden z vakuových kohoutů. Dále byla k vakuové lince zapojena zásobní bomba s dusíkem a oxidem uhelnatým dle *obr. 6* v kapitole 2.2.

Nejdříve jsme evakovali pouze vakuovou linku a k ní připevněné hadice – vakové kohouty kyvety zůstaly uzavřené. Poté jsme otevřeli kohout kyvety připevněný k lince a evakovali kyvetu. Evakuace trvala cca 30 – 45 minut. Evakuovanou kyvetu jsme 3x propláchli dusíkem tak, že jsme ji nejdříve naplnili dusíkem na 110 kPa a pak zcela zčerpali. Tento proces proběhl třikrát. Po čtvrtém naplnění dusíkem na 110 kPa jsme rychle odšroubovali druhý vakuový kohout a pomocí injekční stříkačky, jehly a teflonové hadičky jsme za proudu plynu zavedli na dno kyvety (do prohlubně) 1 ml D₂O, kohout jsme uzavřeli a tlak v kyvetě snížili na 50 kPa. Poté jsme doplnili kyvetu oxidem uhelnatým na atmosférický tlak. Tímto postupem jsme docílili, že všechny složky v kyvetě byly v molárním poměru 1:1:1.

2.4 Měděná a teflonová fólie

Pro výzkum interakce povrchů byla použita teflonová a měděná fólie, které byly vsunuty do kyvet, *obr.8 A,B*. Tloušťka teflonové fólie je 1 mm a měděné 0,5 mm . Reakční povrch fólií je 630 cm². Obě fólie mají uprostřed kruhový výřez, který dosedá na prohlubeň v kyvetě a umožňuje tak vodní páře snadno difundovat v systému.



A

B

Obr. 8: A- měděná fólie v kyvetě, 1- kruhový otvor nad prohlubní v kyvetě; B – teflonová fólie

Před vložením do kyvet byly fólie očištěny v 40% kyselině sírové a vypečeny v peci. Teflonová fólie byla vypečena při 250 °C a měděná byla vypečena při 500°C ve vakové peci. Stejným způsobem byly připraveny i referenční kousky fólií. Vakuová pec pro měděnou fólii, byla použita proto, aby se zamezilo nežádoucí oxidaci mědi. Plnění plyny a deuterizovanou vodou probíhalo u kyvety s teflonovou fólií stejným způsobem, který byl popsán v předchozí kapitole. Kyveta s měděnou fólií byla také naplněna stejným mechanismem, rozdílné však bylo použití H₂O místo vody deuterizované.

3 POUŽITÁ METODIKA

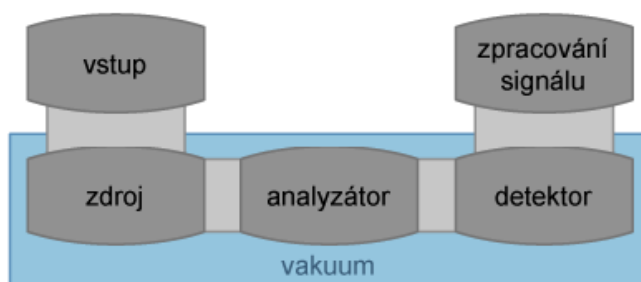
3.1 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je fyzikálně-chemická metoda, která využívá separace urychlených ionizovaných částic (iontů) ve vakuu, a to podle jejich hmotnosti při jejich průchodu magnetickými a elektrickými poli.

Tato metoda vyžaduje nepatrné množství měřené látky, a proto se hmotnostní spektrometrie často používá ve stopové analýze organických látek. Další důležitá vlastnost této techniky tkví v její schopnosti „poradit si“ i s velmi komplikovanými směsmi látek a strukturální informaci poskytnout rychle.¹³

3.1.1 Složení spektrometru

- Vstup - místo kudy se vzorek (pevná fáze, kapalina, plyn; deska se vzorkem, kapilára z HPLC...) dostává do systému
- Zdroj – zde dochází k přeměně složek vzorku na ionty (bombardováním fotony, elektrony, atomy...)
- Analyzátor – zde probíhá separace iontů dle m/z
- Detektor - detekce separovaných iontů
- Data procesor – ten slouží k příjmu a zpracování dat
- Vakuum – vytvořené výkonnými vakuovými pumpami



Obr. 9: Obecné schéma spektrometru.

3.1.2 Princip

Měření molekulových hmotností molekul (přesněji jejich různě nabitých iontů) má vždy několik kroků:

1. Molekula musí být převedena do plynné fáze (do vysokého vakua), přičemž získává charakteristický náboj.
2. Ionť je urychlen. Z charakteru jeho pohybu vakuovaným prostorem lze vypočítat poměr jeho hmotnosti a náboje.
3. Pomocí detektoru se určí parametry charakterizující dráhu iontu.
4. Navazující elektronický systém umožní zpracovat signál vycházející z detektoru a vypočítat poměr hmotnosti a náboje příslušných iontů (m/z).

Pro přechod částic do plynné fáze se dnes uplatňují především dva postupy.

Metoda ESI (electrospray ionization) se užívá v kombinaci s chromatografickými metodami nebo s kapilární elektroforesou. Na ústí kapiláry, z níž pomalu vytékají jednotlivé frakce separovaných molekul, se aplikuje vysoký elektrický potenciál, který umožní náhlé odpaření a ionizaci molekul. Tento způsob ionizace umožňuje studium nativních molekul, její nevýhodou je relativně vysoký náboj iontů.

Druhou možností je metoda Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation (MALDI), kde dochází k ionizaci laserem za asistence matrice (podrobněji viz. kapitola 3.3)

K určení hmotnosti iontu se využívá především těchto parametrů dráhy iontu ve vakuovaném prostoru:

- Doba letu iontu, který byl urychlen vysokým stejnosměrným elektrickým napětím, od místa ionizace k detektoru. Ionťy se stejným nábojem získají při průchodu elektrickým gradientem stejnou energii ($E_{pot} = zU$, kde z je náboj a U elektrický potenciál), jejich rychlost pak závisí na hmotnosti m (podle rovnice $E_{kin} = \frac{1}{2}mv^2$). Tento způsob určování hmotnosti se nazývá TOF (time of flight).
- Zakřivení dráhy v magnetickém poli, kolmém na pohyb iontu. Tento klasický typ detektoru využívá skutečnosti, že dráha nabitě částice se v magnetickém poli zakřivuje tím více, čím se částice pohybuje pomaleji, čím má vyšší náboj a nižší hmotnost. V nejmodernějším provedení vytváří magnetické pole supravodivý

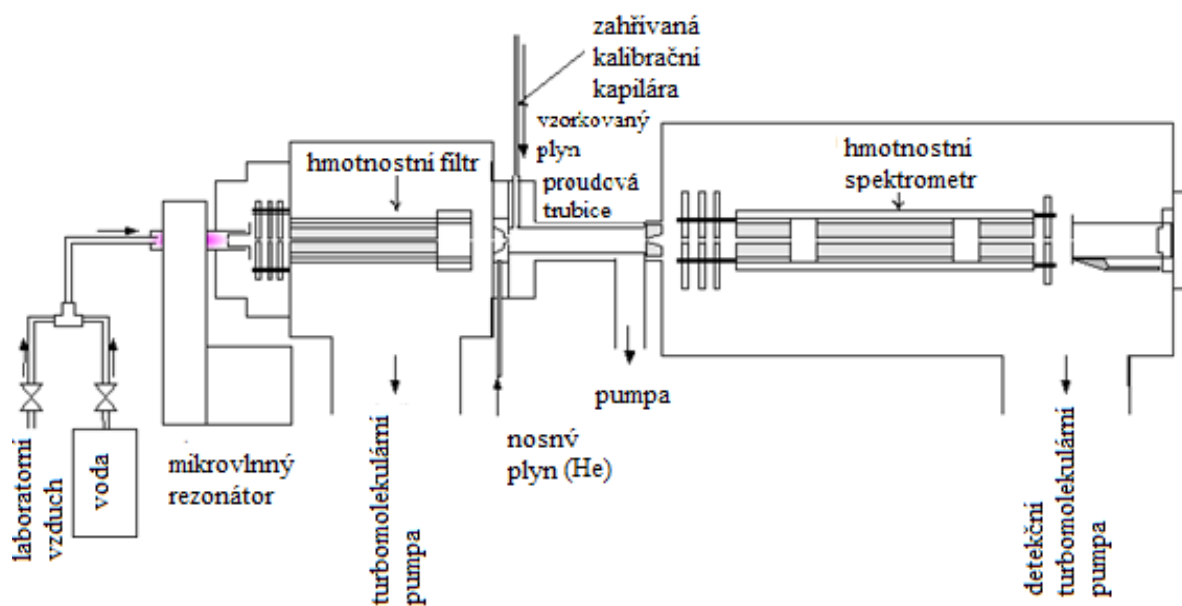
magnet; hledají se pak takové parametry pole, při nichž jsou jednotlivé druhy iontů uvedeny na stacionární kruhovou dráhu v tzv. cyklotronu.

- Charakteristiky pohybu iontů v prostoru, tvořeném čtyřmi nabitými tyčemi (tzv. kvadrupól). Hledá se takové rozložení elektrického pole, při němž ionty přecházejí do stacionárního vlnění; z parametrů pole lze pak určit poměr m/z jednotlivých iontů.
- Zachycení iontů v tzv. iontové pasti, tvořené prstencovou elektrodou (na kterou je přivedeno střídavé napětí) a vstupní a výstupní elektrodou (na které je přivedeno stejnosměrné napětí). Po nahromadění iontů v pasti se postupně zvyšuje střídavé napětí, což vede k postupnému vypuzení iontů o vzrůstající m/z .¹⁴

3.2 Hmotnostní spektrometrie s vybranými ionty v proudové trubici

Hmotnostní spektrometrie v proudové trubici s vybranými ionty (SIFT- MS) je metoda založená na reakci prekurzoru a stanovovaného plynu. Těmito prekurzory jsou ionty H_3O^+ , NO^+ a O_2^+ . Produkty těchto reakcí jsou detegovány hmotnostním spektrometrem.

Výhoda SIFT- MS vyplývá z přítomnosti proudové trubice. Díky definovanému času, kdy reakce probíhá, a rychlostní konstantě k , je možno stanovit koncentraci analyzované látky a to bez kalibrace přístroje.

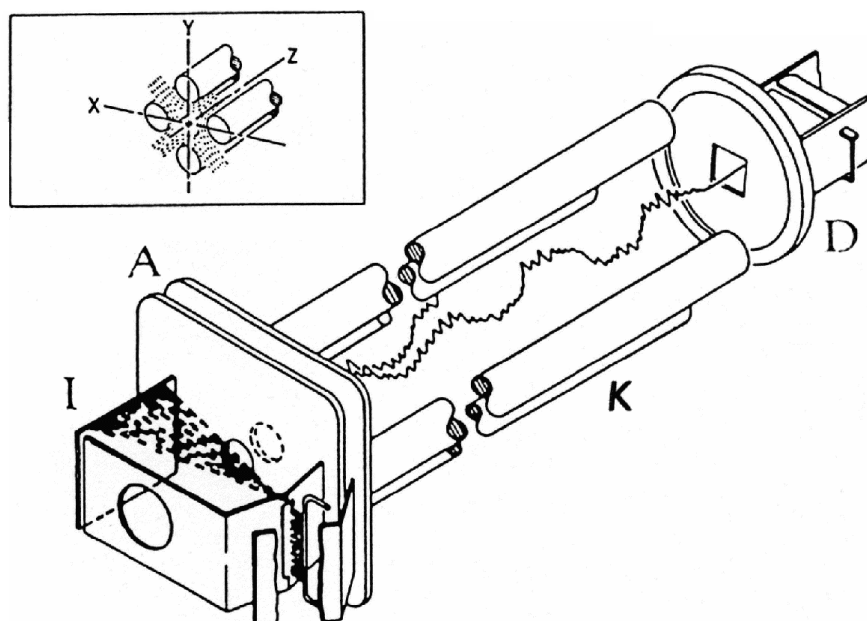


Obr.10 : Schéma SIFT-MS

3.2.1 Princip

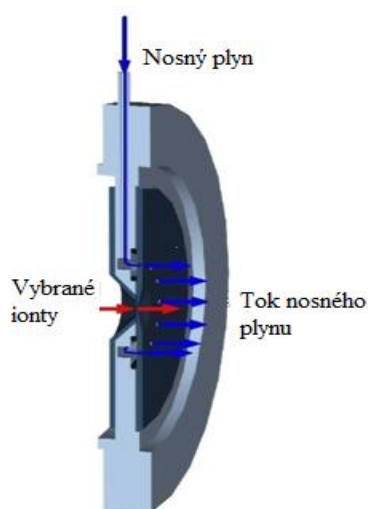
Ionty využívané k reakci s analytem jsou tvořeny v iontovém zdroji a jsou vybírány kvadrupólovým hmotnostním filtrem právě ty ionty, které se budou zrovna používat (H_3O^+ , NO^+ nebo O_2^+). Používanou ionizační technikou je chemická ionizace (CI), energie urychlených elektronů je tedy přenášena na vzorek přes reakční medium. Jako iontový zdroj slouží mikrovlnný výboj přes vlhký vzduch a jsou jím tvořeny všechny prekurzorové ionty.

Kvadrupólový hmotnostní filtr se skládá ze čtyř kovových tyčí hyperbolického nebo kruhového průřezu, které jsou připojeny ke zdrojům stejnosměrného a vysokofrekvenčního střídavého napětí. Ionty, které vletnou do prostoru mezi tyčemi, se dostanou do střídavého elektrického pole a začnou oscilovat. Při vhodně zvolených hodnotách stejnosměrného a střídavého napětí a jejich vhodném poměru projdou kvadrupólem pouze ionty o určitém poměru m/z , ostatní se dostanou na nestabilní dráhy a zachytí se na tyčích kvadrupólu nebo na stěnách přístroje (*obr.11*). Zařízení se chová jako hmotnostní filtr nastavený na určitou hodnotu m/z . Postupnou změnou napětí vkládaných na kvadrupól (skenování) je možno nechat tímto filtrem postupně projít ionty ve zvoleném intervalu hodnot m/z .



Obr.11: Hmotnostní spektrometr s kvadrupólovým analyzátozem. I-iontový zdroj, A-akcelerační sekce, K-kvadrupólový analyzátor, D-detektor

Prekurzorové ionty jsou vstříkovány do proudové trubice Venturiho vstupním otvorem do rychle plynoucího inertního plynu. Jako inertní plyn se obvykle používá helium o tlaku 1 Torr. Venturiho vstupní otvor je tvořen kruhovou štěrbinou, kterou vstupuje nosný plyn, středem do trubice pronikají prekurzorové ionty.



Obr.12: Znárodnění Venturiho vstupního otvoru.

Do nosného plynu je vstříkován vzorek a v proudové trubici dochází k reakcím analytu s prekurzorovými ionty. Na konci proudové trubice vstupují produkty otvorem (obvykle 0,5 mm) do hmotnostního spektrometru. Průchodem tímto otvorem se sníží tlak z 1 Torru v trubici na 10^{-4} Torru, který je třeba pro funkčnost kvadrupólového analyzátoru s násobičovým detektorem. Po hmotnostní analýze jsou produkty detegovány a čítány pomocí kvadrupólového hmotnostního spektrometru.

Úbytek primárně vstříknutých iontů a růst produkovaných iontů je zjišťován použitím hmotnostního spektrometru. Pokles koncentrace primárních iontů v proudové trubici v čase N_i , je dán rovnicí:

$$\frac{dN_i}{dt} = -N_i \frac{D_i}{\Lambda^2} - N_i k[A]$$

kde první část výrazu na pravé straně popisuje ztrátu primárních iontů na stěnách proudové trubice charakterizované difúzním koeficientem D_i a Λ , což je difúzní délka, a je závislá na průměru proudové trubice. Výraz $-N_i k[A]$ popisuje snížení koncentrace primárních prekurzorových iontů reakcí s analyzovanou látkou, kde k je rychlostní konstanta a $[A]$ je koncentrace analyzované látky.

Iontový signál v přítomnosti analyzované látky můžeme vypočítat podle vztahu:

$$I = I_0 \exp - k[A]t = I_0 \exp - k[A] \frac{l + \varepsilon}{v_i}$$

kde I je iontový signál v přítomnosti analyzované látky, I_0 je počáteční iontový signál, l je délka proudové trubice, ε je korekce délky, $[A]$ je koncentrace analytu, v_i je střední průtoková rychlost a k rychlostní konstanta. Rychlostní konstantu získáme vyjádřením k z tohoto výrazu.

Koncentraci jednotlivých látek je možné určit výpočtem z měřených iontových signálů prekurzorů (I_{i1} , I_{i2}) a produktů (I_{p1} , I_{p2}) rychlostních konstant probíhajících reakcí k a reakčního času t_r , kde D_{ep1} , D_{ep2} jsou příslušné koeficienty zvýšení difúze.^{15, 16}

$$[M] = \frac{1}{t_r} \frac{I_{p1}/D_{ep1} + I_{p2}/D_{ep2}}{I_{i1}k_1 + I_{i2} \frac{k_1 + k_2}{2}}$$

Základní podmínkou prekurzorových iontů je, aby byly málo reaktivní hlavní složkou analytu a bylo tak možno přesně určit koncentraci stopových látek.

Většina organických látek může být analyzována reakcí s H_3O^+ , neboť protonová afinita většiny látek M je vyšší než protonová afinita vody a z tohoto důvodu dojde k přenosu protonu za vzniku MH^+ iontů. Výjimkou jsou methan, ethan a propan, jejichž protonová afinita je nižší, a tudíž je k jejich detekci využívá jiného prekurzorového iontu.

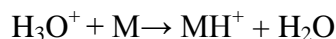
Reakce prekurzorových iontů jsou znázorněny v tabulce 2.

Reakce	H_3O^+	NO^+	O_2^+
Protonový přenos	×		
Přenos (H) a (OH ⁻)		×	
Přenos náboje		×	×

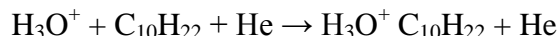
Tab. 2: Reakce prekurzorových iontů

3.2.2 Reakce H_3O^+

Většina organických látek (M) tvoří s H_3O^+ produkty:

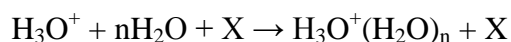


Zajímavý proces vykazuje reakce H_3O^+ s některými alifatickými uhlovodíky.

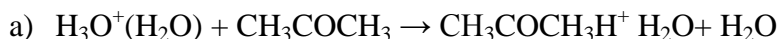


Tato trimolekulární reakce zřejmě nastává v případě, že protonová afinita akceptoru PA (M) je menší než protonová afinita vody PA (H_2O), tj. když je protonový přechod endotermní. U produktů těchto reakcí dochází často k reakci s vodou za vzniku $\text{H}_3\text{O}^+ \cdot \text{H}_2\text{OM}$ iontů. Když je PA (M) mnohem menší než PA (H_2O), jako je to například u n-alkanů - metanu, ethanu a propanu, k žádnému protonovému přenosu ani spojení nedochází. Proto není ion H_3O^+ vhodný k jejich stanovení a je výhodnější použití jiných prekurzorových iontů.

Pokud není vzorek úplně suchý, dochází k dalším reakcím s přebytečnou vodou:



kde X je atom helia, který stabilizuje shluk iontů proti disociaci zpět na reaktanty. Přítomnost těchto shluků je mnohdy využita jako přídatný analytický nástroj. Reagují totiž rychle s mnoha molekulami přítomnými ve stopovém plynu, hlavně s polárními molekulami procesem „ligand switching“:



V tomto případě polárnější aceton nahradil molekuly vody v hydratovaném oxóniovém kationtu a tyto ionty jsou hmotnostním spektrometrem pozorovány jako produkty. Může také dojít k uvolnění vody.

Obecně se dá říci, že polární molekuly s těmito ionty reagují, avšak nepolární molekuly s nimi reagují méně ochotně. Tudíž je nutné, ke správné kvantifikaci analytu, porozumět všem reakcím s hydratovanými H_3O^+ ionty.

3.2.3 Reakce NO^+

Reakce NO^+ jsou více proměnlivé, ale obvykle mívají jen jeden nebo dva produkty. Existuje několik reakčních mechanismů: přenos náboje produkující M^+ , hydridový přenos H^- produkující $(\text{M-H})^+$, hydroxidový přenos produkující $(\text{M-OH})^+$, alkoholátový přenos produkující $(\text{M-OR})^+$ a ion - molekulové sdružení produkující NO^+M . Organické molekuly většinou podstoupí jednu z těchto reakcí, někdy ale probíhají dvě vedle sebe.

Přenos náboje je uskutečněn ve chvíli, kdy ionizační energie analytu $\text{IE}(\text{M})$ je menší než ionizační energie NO , která je 9,26 eV. To nastává například u aromatických uhlovodíků nebo organosírných molekul.

Produkty NO^+ s analytem mohou někdy podlehnout „ligand switching“ reakci s vodou analogicky jako v případě H_3O^+ prekurzorů produkující $\text{NO}^+\text{H}_2\text{O}$ ionty.

3.2.4 Reakce O_2^+

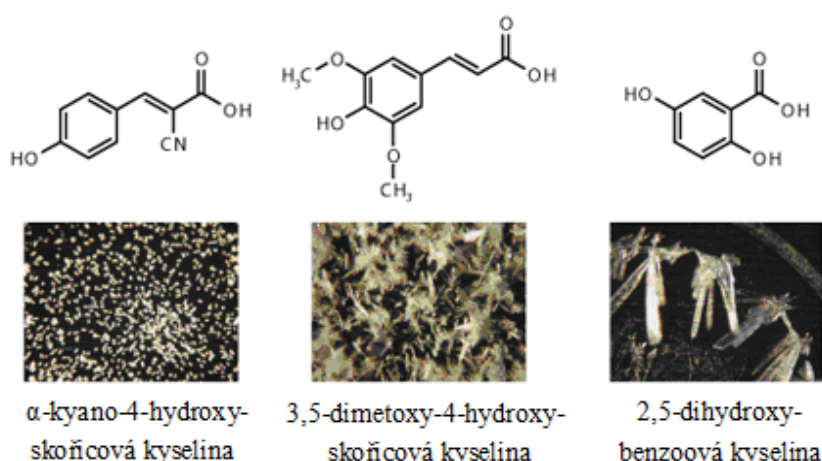
Ionizační energie O_2 (12,06 eV) je znatelně vyšší než u většiny organických molekul. Reakce jdou tedy buď cestou jednoduchého nedisociovaného přenosu náboje produkujícího ion M^+ , nebo cestou disociovaného přenosu náboje, jehož výsledkem jsou dva nebo i více fragmentů iontů. Tyto prekurzorové ionty reagují rychle s většinou organických molekul, je tedy možné je použít k ověření identifikace a kvantifikace analytů získaných reakcemi prekurzorových iontů H_3O^+ a NO^+ . Nevýhodou těchto iontů je skutečnost, že dojde často ke vzniku dvou a více produktů, což znesnadňuje analýzu.

O_2^+ prekurzorové ionty jsou velice výhodné pro detekci a kvantifikaci malých molekul, které nereagují s ostatními prekurzorovými ionty. U nich je protonový přenos z H_3O^+ endotermní. Další výhodou je využít tyto ionty k detekci amoniaku, který při reakci tvoří produkt NH_3^+ , což nám umožní srovnání s výsledky získanými reakcí s H_3O^+ .^{17, 16}

3.3 Hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF

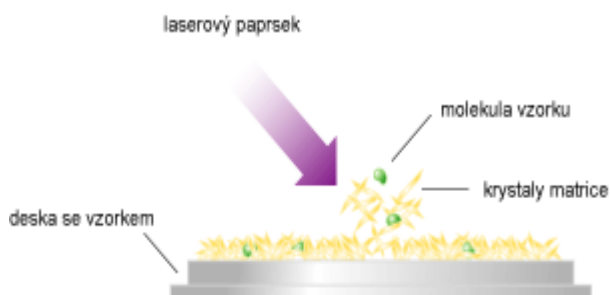
Teflonová a měděná fólie byla po vyjmutí z kyvet analyzována pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF (matrix assisted laser desorption/ionization – time of flight). Jak už sám název napovídá, jedná se o metodu, při které dochází k ionizaci vzorku laserem za asistence matrice. Jsou-li molekuly vzorku ionizovány laserem přímo, většinou se štěpí nežádoucím způsobem, proto se používá matrice – látka, jejímž prostřednictvím se energie laseru přenáší na molekuly vzorku a tím brání jejich štěpení. K stanovení vyšších molekulových hmotností se MALDI používá v kombinaci s detektorem doby letu (TOF).¹⁸

Při použití metody Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation (MALDI) se nechá studovaná látka (nebo směs látek) vykristalovat na kovové podložní desce s matricí. Tou bývají deriváty nízkomolekulárních aromatických kyselin, které mohou absorbovat energii laserového záření ve viditelné nebo blízké ultrafialové oblasti.



Obr.13 : Ukázky nejčastěji používaných typů matrice.

Po ozáření směsných krystalů nanosekundovým pulsem laseru absorbuje matrice energii pulzu a její rozklad ionizuje molekuly vzorku. Látky se prudce odpaří do vakua a ionty studovaných látek se pak již pohybují samostatně, jsou urychleny silným stejnosměrným elektrickým



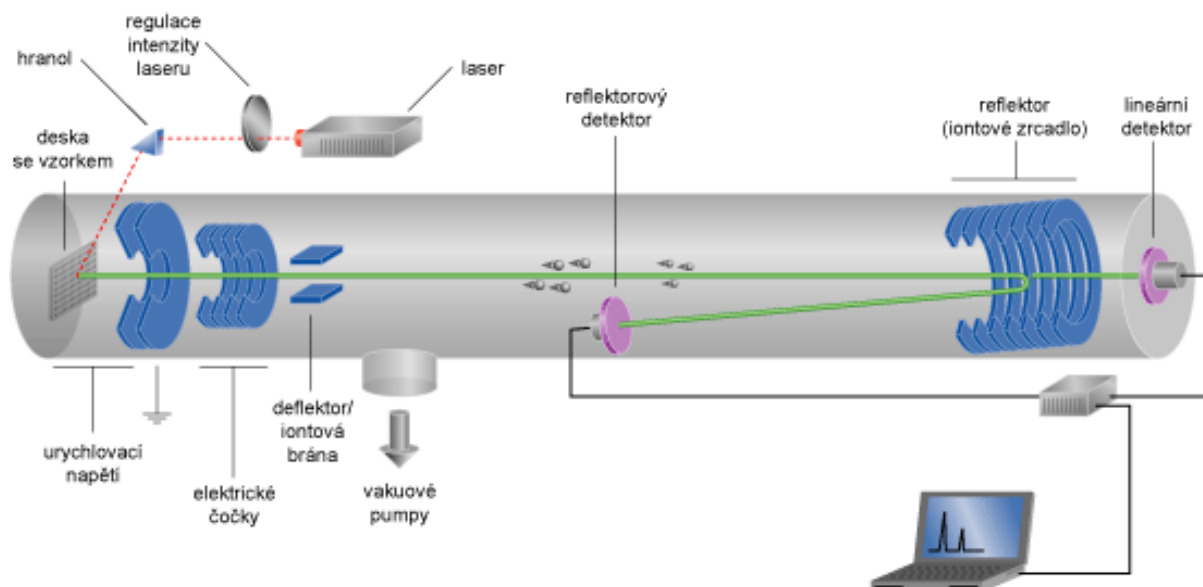
Obr.14: Schema laserové desorpce/ionizace.

polem (25-30 kV). V tomto uspořádání získává většina molekul náboj +1 nebo -1.¹⁴

Dále ionty vstupují přes uzemněnou mřížku do vakua v trubici detektoru letu, kde se pohybují rychlostí danou jejich hmotností a nábojem. Zde se měří doba letu částice, z níž se pak vypočte poměr molekulové hmotnosti a náboje částice. Hmotnostní spektroskopie MALDI byla původně vyvinuta pro kvalitativní analýzu peptidů a bílkovin, avšak nyní se využívá i pro analýzy nukleových kyselin nebo nízkomolekulárních organických i anorganických látek. Výhodou je vysoká citlivost a rychlost měření. Při analýze se vzorek nerozpadá, což umožňuje měření složitých směsí, zanedbatelný je i vliv pozadí.¹⁸

Průletový analyzátor – TOF je v principu nejjednodušším hmotnostním analyzátozem, tvořeným evakuovanou trubicí. K časovému rozdělení iontů dochází na základě jejich odlišné doby letu z iontového zdroje do detektoru. Ionty s různým poměrem m/z mají i různou rychlost, při stejné kinetické energii. Hmotnější iont se pohybuje pomaleji a tudíž dorazí k detektoru později. Časová diference a dosažitelné rozlišení závisí na délce dráhy letu. Hlavní předností tohoto analyzátoru je, že lze použít pro teoreticky neomezený hmotnostní dosah.¹⁹

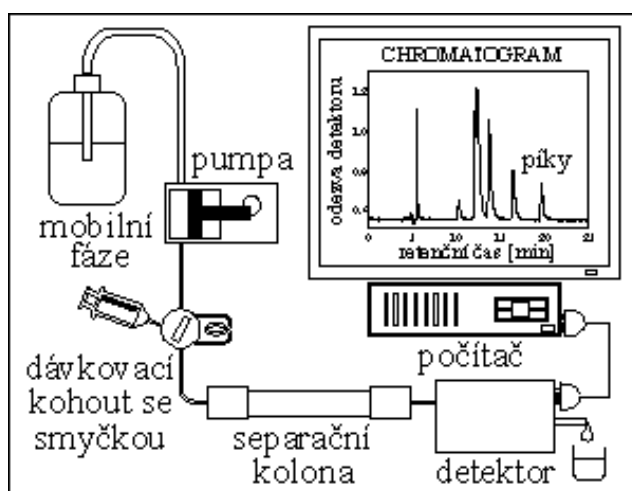
Princip metody MALDI-TOF je dobře vidět z *obr. 15*. Elektrická čočka a deflektor umožňují zaostřit ionty stejného poměru m/z a odklonit ty ionty, které nás v daném pokusu "nezajímají". Reflektor má stejnou elektrickou polaritu jako deska se vzorkem a obrací let iontů směrem k druhému detektoru; umožňuje zvýšit přesnost měření tím, že prodlužuje dráhu letu, a také soustředěním stejných iontů v duté části prstencovitých elektrod.¹⁴



Obr.15 : Schéma hmotnostního spektrometru na principu MALDI-TOF.

3.4 HPLC

High-performance liquid chromatography (HPLC) se vyvinula v sedmdesátých letech 20. století z plynové chromatografie. Vysoká účinnost této metody je dosažena použitím stacionárních fází, které obsahují malé částice pravidelného tvaru a jednotné velikosti, které homogenně vyplňují kolonu. Průtok mobilní fáze je zajištěn vysokým tlakem (jednotky až desítky MPa). Dávkované objemy analytu se pohybují řádově v mikrolitrech. Mezi výhody HPLC patří široká oblast použitelnosti a na rozdíl od plynové chromatografie, lze složením mobilní fáze ovlivňovat separaci látek.¹⁹



Obr.16 : Schéma kapalinového chromatografu.²⁰

3.4.1 Základní charakteristiky chromatografického procesu

3.4.1.1 Distribuční konstanta

Všechny chromatografické separační metody jsou založeny na rovnovážné distribuci složek vzorku mezi dvě fáze, z nichž jedna je mobilní a druhá stacionární, na základě fyzikálně-chemických interakcí, jako jsou adsorpce, rozpouštění, iontová výměna apod.²¹

Aby docházelo k této distribuci, musí existovat fázové rozhraní mezi stacionární a mobilní fází, která unášejí složky vzorku tak, aby obtékala stacionární fázi. Při dělení dochází k opakovanému vytváření rovnovážných stavů separovaných látek mezi mobilní a stacionární fází. Chromatografický systém se může natolik blížit rovnováze, že distribuci

složky A mezi dvě fáze můžeme popsat distribuční (rozdělovací) konstantou K_D , což je poměr rovnovážných koncentrací této složky [A] ve dvou fázích.

$$K_D = \frac{[A]_S}{[A]_m} = \frac{(n_A)_S}{(n_A)_m} \cdot \frac{V_m}{V_S}$$

kde $(n_A)_S$ a $(n_A)_m$ jsou látková množství složky A ve stacionární a mobilní fázi, V_S a V_m jsou objemy stacionární a mobilní fáze.

Čím je hodnota distribuční konstanty pro danou látku vyšší, tím její molekuly setrvávají ve stacionární fázi delší dobu a tím větší je její retence. Pro dělení jednotlivých složek je tedy nutné, aby se lišily svými distribučními konstantami.

Je-li látka rozdělována mezi dvě nemísitelné kapaliny ustaluje se rovnováha dle Nernstova rozdělovacího zákona:

$$K_D = \frac{c_S}{c_m}$$

kde c_m je koncentrace složky v mobilní fázi a c_S koncentrace složky ve stacionární.

3.4.1.2 Kapacitní poměr

Poměr látkového množství solutu ve stacionární fázi k jejímu látkovému množství ve fázi mobilní udává kapacitní poměr k (resp. kapacitní faktor):

$$k = \frac{(n_A)_S}{(n_A)_m} = K_D \cdot \frac{V_S}{V_m} = K_D \beta$$

kde poměr V_S/V_m udává tzv. fázový poměr β . Kapacitní poměr je tudíž mírou retence solutu v koloně, tzn. čím větší je hodnota k , tím více je solut v koloně zadržován a je eluován později.

3.4.1.3 Retenční čas

Charakteristickou veličinou pro každou separovanou látku v daném systému je eluční (retenční) čas t_R nebo eluční (retenční) objem V_R . Retenční čas je doba, která uplyne od nástřiku vzorku do dosažení maxima eluční křivky a retenční objem je proteklý objem kolonou za tuto dobu. Mezi retenčním časem a retenčním objemem existuje vztah:

$$V_R = F_m \cdot t_R$$

kde F_m je objemová rychlost [cm^3/s]. Objemová průtoková rychlost F_m je rovna součinu lineární rychlosti mobilní fáze (cm/s) a průřezu kolony (cm^2). Z této rovnice lze odvodit tzv. základní rovnici pro retenční objem:

$$V_R = V_M + K_D V_S$$

Dosažením za distribuční konstantu dostaneme:

$$V_R = V_M(1 + k)$$

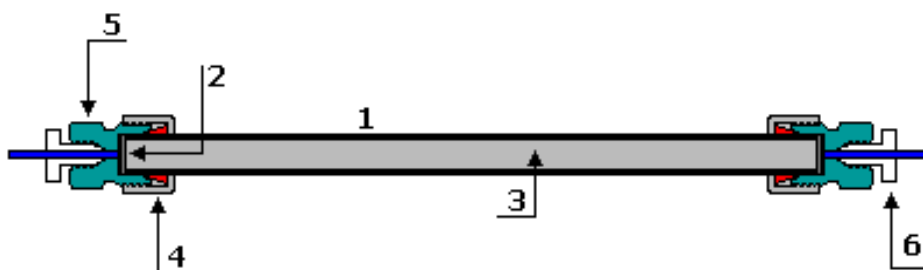
a pro retenční čas t_R

$$t_R = t_M(1 + k)$$

kde V_M je mrtvý objem kolony. Mrtvému retenčnímu objemu přísluší mrtvý retenční čas t_M , což je retenční čas složky (inertu), která není v koloně zadržována a pohybuje se stejnou rychlostí jako mobilní fáze.²²

3.4.2 Chromatografická kolona

Chromatografická kolona je trubice nebo kapilára rovnoměrně naplněná nebo pokrytá stacionární fází. Vlastní klasická HPLC kolona se skládá z kovového pláště, který je uzavřen porézní kovovou fritou, která zabraňuje uvolňování stacionární fáze z kolony a současně umožňuje plynulý průtok mobilní fáze. Oba konce kolony jsou ukončeny ochranným kroužkem a koncovou hlavicí, ve které je navrtán vstup pro kapiláru se šroubem.²²



Obr.17: Chromatografická kolona; 1-kovový plášť, 2-frita, 3-stacionární fáze, 4-ochranný kroužek, 5-koncová hlavice, 6-vstup pro kapiláru

3.5 UV/Vis HPLC detektory

Spektrofotometrické detektory jsou založeny na principu absorpce záření v oblasti vlnových délek od 190 do 800 nm. Kvantitativní vyhodnocení je založeno na Lambert-Beerově zákoně, který vyjadřuje vzájemný vztah mezi tloušťkou absorbující vrstvy (l), koncentrací absorbující složky (c) a vlastní velikostí absorpce, vyjádřenou jako absorbance (A):

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l$$

kde ε je molární absorpční koeficient ($\text{mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{cm}^{-1}$).

Podle konstrukčního typu se mohou rozdělit detektory na čtyři typy:

- Detektory s fixní vlnovou délkou (nejčastěji 253,7 nm), které používají jako zdroje záření nízkotlakou rtuťovou výbojku.
- Detektory s měnitelnou vlnovou délkou, a to pouze předem danými vlnovými délkami.
- Detektory s programovatelnou vlnovou délkou; vlnovou délku lze nastavovat v určitém rozmezí, nejčastěji od 190 do 700 nm. Vlnová délka je měnitelná během analýzy, některé typy detektorů dokáží snímat pak spektra látek v měrné cele při zastaveném průtoku mobilní fáze.
- Detektory diodového pole (photodiode-array, PDA, DAD) snímají celé spektrum v reálném čase bez přerušení chromatografické separace .²²

3.6 Derivatizace

Derivatizace analytů, tedy převedení analytu na vhodný derivát, se používá z několika důvodů. Derivatizací látky se zvýší citlivost nebo se umožní detekce vůbec. Dále se zvýší rozlišení nebo umožní separace a také se zamezí nežádoucí sorpci látek na koloně.

Podle místa derivatizace můžeme rozdělit derivatizační techniky na tři kategorie:

1. Předkolonová derivatizace (pre-column chromatography); chemická reakce probíhá před kolonou
2. Postkolonová derivatizace (post-column chromatography); chemická reakce probíhá za kolonou
3. Derivatizace na koloně; chemická reakce probíhá přímo v koloně

V našem případě byla provedena předkolonová derivatizace u které musí být splněno několik podmínek. A to:

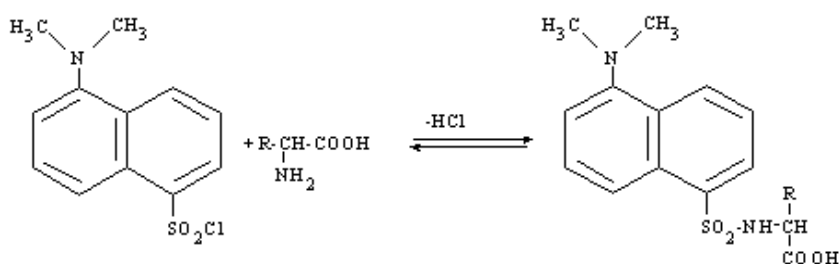
- derivát musí být chemické individuum a měl by být dostatečně stabilní
- derivatizační reakce musí probíhat kvantitativně
- derivatizační reakce nemusí probíhat rychle
- reakce by měla být pokud možno selektivní
- reakce by měla být bez vedlejších produktů a měla by probíhat za mírných reakčních podmínek (pH, teplota) tak, aby nebyla nutná předseparace vzniklého individua
- při použití nadbytku derivatizačního činidla musí být dobře separovatelné od svých produktů na koloně a pokud možno by mělo mít jiné fyzikálně-chemické vlastnosti (nevykazuje fluorescenční vlastnosti)²²

3.6.1 Derivatizace aminokyselin

Většinu aminokyselin nelze detekovat přímo. Je proto nutné provést jejich převedení na vhodné deriváty, tedy jejich reakci s vhodně zvoleným derivatizačním činidlem – látkou, která změní jejich vlastnosti a tím umožní jejich detekci či zvýší citlivost detekce.

3.6.1.1 5-*N,N'*-dimethylaminonafalen-1-sulfonylchlorid (Dns-Cl)

Dansylchlorid (Dns-Cl) je jedno z nejstarších a nejrozšířenějších derivatizačních činidel. Poskytuje deriváty s aminy i některými fenoly. Reakce s primárními, sekundárními aminy a aminokyselinami probíhá v mírně alkalickém, vodně-acetonovém prostředí za několikanásobného nadbytku činidla. Rychlost dansylační reakce vzrůstá se vzrůstajícím pH prostředí, ale současně vzrůstá rychlost hydrolýzy derivátů. Optimální pH prostředí se pohybuje od pH 9,5 do 10.



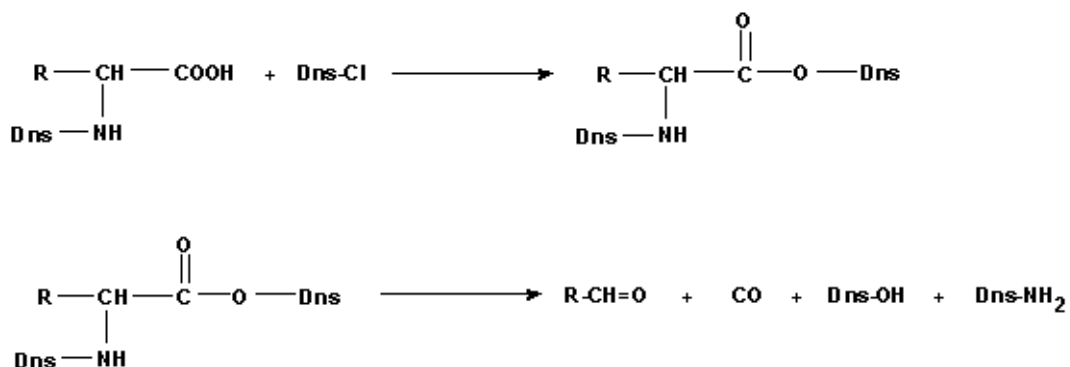
Obr.18 : Schéma dansylace

Dansylchlorid reaguje jak s primárními tak sekundárními aminokyselinami za vzniku příslušných sulfonamidů s absorpčním maximem při 298 nm. Derivatizace probíhá výhradně před kolonou. Největší nedostatek je velmi dlouhý reakční čas (2 až 60 minut) a vysoká reakční teplota (60 až 100 °C).²²

Výhodou je naopak jednoduchý derivatizační krok. Deriváty jsou stabilní až dva týdny při teplotě 4 °C.²²

Při reakci aminokyselin s Dns-Cl reaguje nejdříve aminoskupina. Při velkém nadbytku činidla však reakce směřuje ke vzniku směsných anhydridů, zejména při vyšším pH. Ty se poté rozpadají za vzniku oxidu uhelnatého, dansylaminu, aldehydu o

jeden uhlík chudší než mateřská aminokyselina a dimethylaminonaftalen-1-sulfonové kyseliny.²²



Obr.19 : Reakce probíhající v dansylované směsi za velkého nadbytku Dns

Dansylderiváty jsou žluté krystalické látky, rozpustné v organických rozpouštědlech a pouze mírně rozpustné ve vodě.²²

Pro tento experiment stanovení aminokyselin byla použita předkolonová derivatizace dansylchloridem.

4 VLASTNÍ EXPERIMENT

Naplňená kyveta byla odnesena do PALS laboratoře a umístěna přímo v laserové hale za čtvrtým zesilovačem, ze kterého byl odebírán laserový svazek. Svazek byl fokusován pomocí plankonvexní čočky s ohniskovou vzdáleností 250 mm. Čočka byla umístěna 14 cm od vstupního okna kyvety, aby ke vzniku LIBD docházelo přibližně ve středu kyvety. Energie generovaných pulsů byla taková, aby po odečtení ztrát na čočce (max 8%) a na vstupním okně kyvety (max 8%) dosahovala okolo 100 J.

Tab. 3: Energie pulsů v kyvetě bez fólií

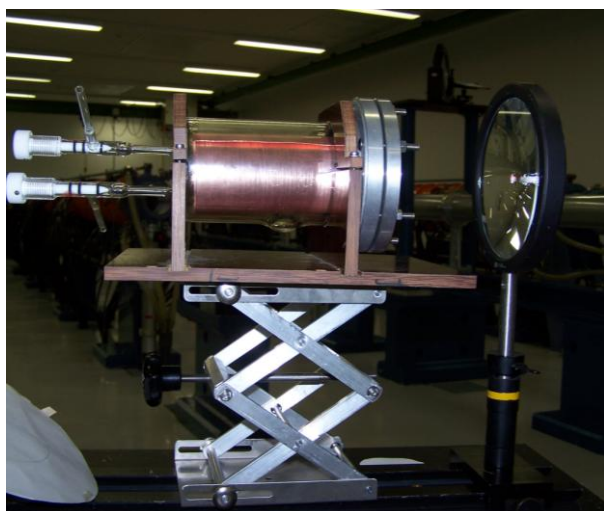
číslo výstřelu	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
energie pulsu (J)	121	108	116	91	92	125	118	110	115	120
číslo výstřelu	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
energie pulsu (J)	116	105	110	126	124	116	113	106	112	110

Tab. 4: Energie pulsů v kyvetě s teflonovou fólií

číslo výstřelu	1	2	3	4	5	6	7	8
energie pulsu (J)	134	89	93	100	115	114	107	105

Tab. 5: Energie pulsů v kyvetě s měděnou fólií

číslo výstřelu	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
energie pulsu (J)	93	107	99	96	91	98	100	94	107	99	94	105



Při experimentu s kyvetou bez fólie docházelo k zamlžování vstupního okna, proto muselo být okno po každém výstřelu zahříváno horkovzdušným vysoušečem. U kyvet s fóliemi tento problém nenastal.

Obr.20 : Umístění kyvety s měděnou fólií v laserové hale za čtvrtým zesilovačem.

4.1 Příprava vzorku na analýzu

Ozářené kyvety byly přeneseny zpět do laboratoře na ÚFCHJH a jejich obsah byl zpracován následujícím způsobem.

4.1.1 Kyveta bez fólie

Do kyvety, která neobsahovala fólii bylo jedním z kohoutů, pomocí injekční stříkačky a teflonové trubičky, vpraveno 5 ml deuterované vody. Kyveta byla touto vodou promyta a poté byla z kyvety odsáta a přenesena do čisté a vyžihané ampule, která byla ihned zatavena a uložena do lednice.

Dále bylo do kyvety vstříknuto 5 ml hexanu a opět jí byla kyveta promývána. Hexan byl z kyvety odsán a přenesen do ampule. Ampule byla ihned zatavena a uložena do lednice. Stejně množství hexanu bylo do kyvety vstříknuto ještě jedenkrát a za občasného promíchávání se nechala kyveta týden stát. Po týdnu byl hexan odsán, zataven do ampule a uložen do lednice k ostatním vzorkům.

Vzorek s hexanem byl analyzován na hmotnostním spektrometru.

Pro srovnání byl připraven i slepý vzorek. Kyveta byla naplněna stejným způsobem jako kyvety připravované k ozařování (viz. kapitola 2.3.2) a neozářená byla ponechána týden stát v laboratoři. Po týdnu byl vodný roztok opět odsán z kyvety a převeden do čisté ampule a uložen do lednice.

4.1.2 Mineralizace

Ampule s vodným vzorkem byla po vyndání z lednice otevřena a obsah byl mineralizován 6 M kyselinou chlorovodíkovou. K 2 ml vodného vzorku bylo přidáno 0,5 ml 6 M HCl a tento roztok byl hydrolyzován 24 hodin při 110 °C. Po ukončení mineralizace byl vzorek odpařen do sucha na vakuové odparce. Tímto jsme vzorek připravili k derivatizaci vhodným činidlem.

4.1.3 Dansylace

Vzhledem k předpokladu, že ve vodném vzorku budou obsaženy některé z proteinogenních aminokyselin a také, že nejcitlivější stanovení aminokyselin je po jejich převedení na dansylderiváty, byl jako derivatizační činidlo zvolen dansylchlorid (5-*N,N'*-dimethylaminonafalen-1-sulfonylchlorid).

Dansylchlorid poskytuje signál jak na UV (absorpční maximum 298 nm) tak i na fluorescenčním detektoru (excitační maximum od 340 do 380 nm a emisní maximum od 470 do 530 nm) a je i vhodným činidlem pro možnou chirální separaci.⁹

4.1.3.1 Dansylační postup

Dle článku²³ byly zvolené optimální podmínky a postup dansylace.

Dansylační postup pro standardy byl následující. Byly připraveny vodné roztoky aminokyselin (Ala, Asn, Asp, Ser, Gly) o koncentraci 1 mg/ml, dále pufr, 2 M KHCO₃ – KOH o pH 9,8. Roztok dansylchloridu byl připraven rozpuštěním 200 mg dansylchloridu v 10 ml acetonitrilu. Do čisté ependorf zkumavky bylo převedeno 50 µl roztoku aminokyseliny, přidáno 30 µl KHCO₃ – KOH a 30 µl Dns-Cl v acetonitrilu. Směs byla důkladně protřepána a ponechána reagovat 30 min ve vodní lázni při 80° C za nepřístupu světla. V případě derivatizace glycinu byla doba reakce prodloužena na 60 min.

Derivatizace vzorku i slepého vzorku, probíhala obdobně, jen množství přidávaného roztoku dansylchloridu bylo sníženo na 6 µl. Doba reakce byla 30 min.

Po uplynutí 30 minut byly ependorf zkumavky s dansylderiváty vyjmuty z lázně a reakce byla zastavena přidáním 20 µl kyseliny octové. Roztoky o původním žlutém zbarvení (žluté zbarvení získaly roztoky po přidání roztoku Dns-Cl v acetonitrilu) se během reakce ve vodní lázni odbarvily. Před vlastní analýzou na HPLC koloně byly roztoky 5 minut centrifugovány.

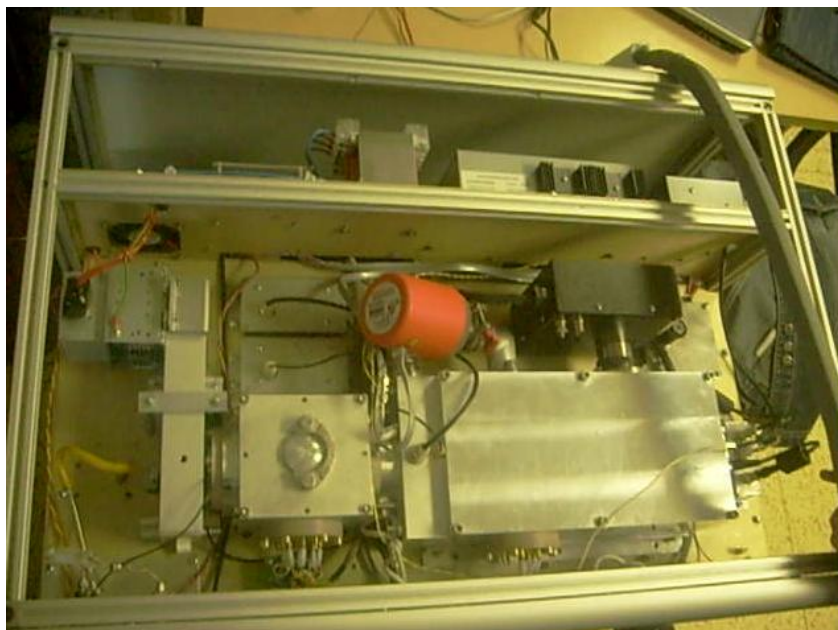
4.1.4 Kyvety s fóliemi

Fólie byly z ostřílených kyvet opatrně vysunuty a z každé fólie bylo nastříháno pomocí chirurgických nůžek a pinzety několik malých kousků. Ústřížky byly odebrány z části fólie, která ležela přibližně uprostřed kyvety, tedy v místě, kde docházelo ke vzniku plazmatu a lze zde tedy předpokládat nejvyšší koncentraci případných produktů. Veškerá manipulace s fóliemi probíhala s nejvyšší snahou nekontaminovat jejich povrch, proto jsme pracovali výhradně v teflonových rukavicích a veškeré používané náčiní a nádobí bylo předem vypečeno v peci. Ústřížky ozářených fólií i referenční kousky fólií byly ihned převezeny na ÚOCHB, kde byly povrchy analyzovány pomocí metody MALDI-TOF.

4.2 Analýza plynné složky metodou SIFT-MS

Před otevřením ozářených kyvet byla plynná složka analyzována metodou proudové trubice s vybranými ionty SIFT (selected-ion flow tube) na přístroji Profile 3 SIFT-MS (Instrument science, UK). Kyvety byly k přístroji připojeny přes jeden ze svých kohoutů pomocí kovové spojky cajon.

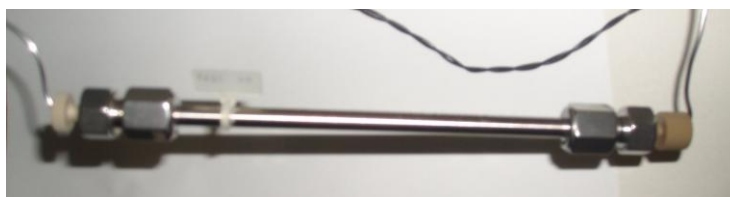
Proudová trubice přístroje je dlouhá 5 cm a má průměr 1 mm. Analyt je do trubice vstříkován vyhřívanou kapilárou.



Obr.21: Přístroj SIFT-MS (pohled shora).

4.3 Analýza kapalné složky metodou HPLC-UV/Vis

Derivatizovaný kapalný vzorek byl analyzován pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie na katedře fyzikální a makromolekulární chemie PřF UK. Použitá kolona (agilent zorbox SB-C8) o délce 150 mm, průměru 4,6 mm a s velikostí zrn 5 μm je vidět na obr 22 .



Obr.22: Kolona agilent zorbox SB-C8

Jako mobilní fáze byla zvolena směs methanolu a 1% TEAA (triethylamin s kyselinou octovou, pH 3,5) v poměru 35 MeOH/ 65 TEAA. Stacionární fází byl silikagel s chemicky vázanou nepolární fází, oktalovými řetězci.

Měření probíhalo při tlaku 60 Ba a průtokové rychlosti 0,7 ml/min. Detekce pomocí UV detektoru (Deltachrom UVD200) probíhala při vlnové délce 286 nm. Dávkované množství analytu bylo 20 μl . Nejdříve byly proměřeny jendotlivé standardy AK, poté jejich směs a nakonec slepý (neozářený) vzorek a vzorek samotný.



Obr.23: Celkové uspořádání čerpadla, kolony, detektoru a počítače.

4.4 Analýza povrchů pomocí metody MALDI-TOF

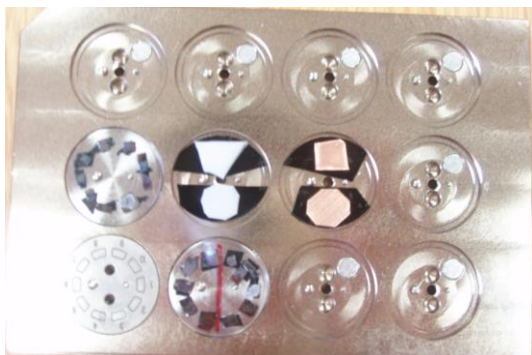
Ústřižky měděné a teflonové fólie byly analyzovány na ÚOCHB metodou MALDI-TOF na přístroji Bruker DALTOWOS.



Obr.24: Přístroj MALDI-TOF

Kousky mědi a teflonu byly pomocí uhlíkové pásky nalepeny na kovovou destičku s terčíky, viz obr. 25. Destička byla zasunuta do přístroje a povrchy ostříleny dusíkovým laserem. Poté byla destička z přístroje vyjmuta, na povrchy nanesen 1 μ l matrice (dehydroxybenzoová kyselina v 50% acetonitrilu) a po zaschnutí opět ostřílena laserem.

Dehydroxybenzoová kyselina v 50% acetonitrilu byla zvolena jako matrice pro svoji univerzálnost. Nevýhodou této matrice však je, že tvoří velké krystaly, což způsobuje posun hmoty v hmotnostním spektru.



Obr.25: Kovová destička s nalepenými fóliemi: vlevo uprostřed teflon, vpravo uprostřed měď. Horní ústřižek-vzorek, spodní-referenze.

5 VÝSLEDKY A DISKUSE

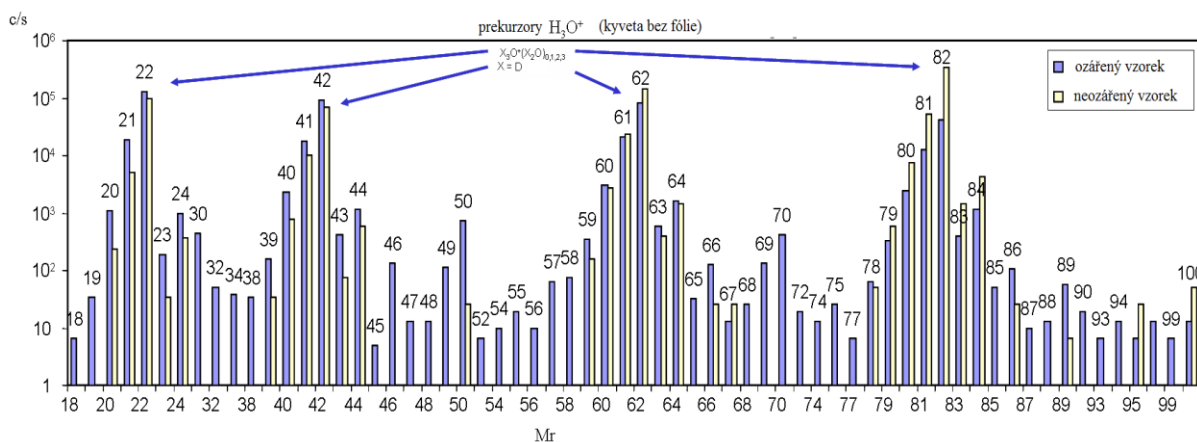
5.1 Výsledky analýzy plynné složky

Pomocí metody SIFT-MS byly ve vzorcích stanoveny látky zobrazené v tabulkách 6-8 .

- o kyveta bez fólie:

Název	Vzorec	Molekulová hmotnost	Detekční iont	Hmotnost Iontového produktu	Množství (ppm)	
					Neozářený vzorek	Ozářený vzorek
oxid dusnatý	NO	30	O ₂ ⁺	30	0,101	172,130
oxid uhličitý	CO ₂	44	H ₃ O ⁺	63	1,137	1,724
oxid dusičitý	NO ₂	46	O ₂ ⁺	46	0,076	1,004

Tab.6: Látky stanovené metodou SIFT-MS v kyvetě bez fólie.

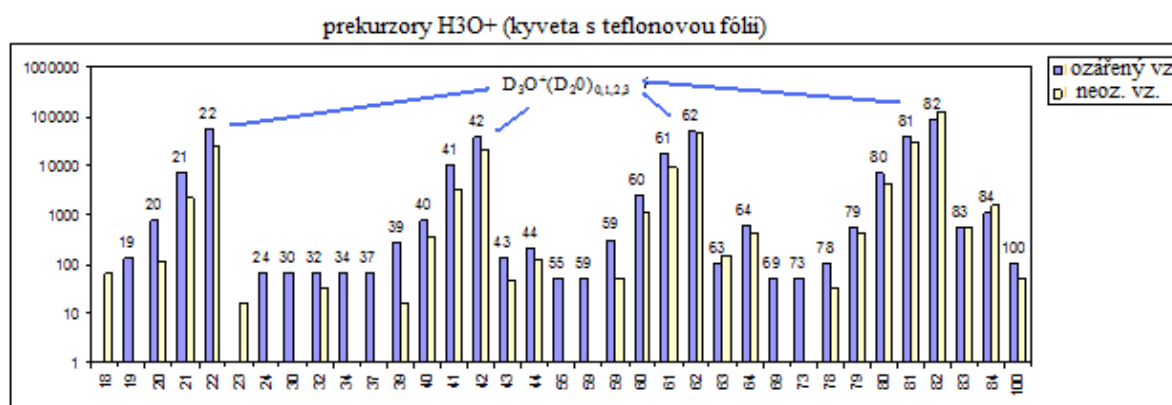


Obr.26: Porovnání ozářeného a neozářeného vzorku z kyvety bez fólie po stanovení metodou SIFT-MS (prekurzory H₃O⁺)

- o kyveta s teflonovou fólií:

Název	Vzorec	Molekulová hmotnost	Detekční iont	Hmotnost Iontového produktu	Množství (ppm)	
					Neozářený vzorek	Ozářený vzorek
oxid dusnatý	NO	30	O ₂ ⁺	30	0	66,71

Tab.7: Látky stanovené metodou SIFT-MS v kyvetě s teflonovou fólií.

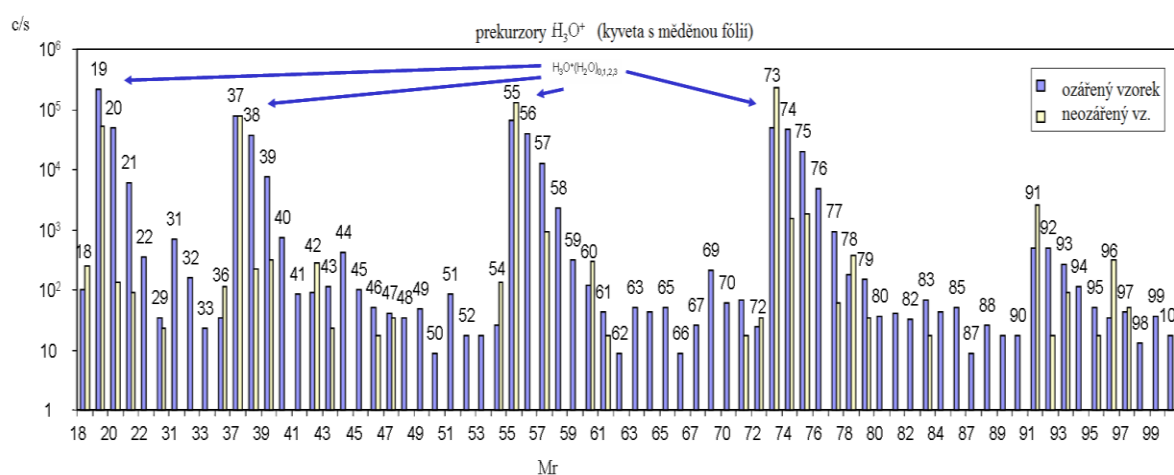


Obr.27: Porovnání ozářeného a neozářeného vzorku z kyvety s teflonovou fólií po stanovení metodou SIFT-MS (prekurzory H₃O⁺)

- o kyveta s měděnou fólií:

Název	Vzorec	Molekulová hmotnost	Detekční iont	Hmotnost Iontového produktu	Množství (ppm)	
					Neozářený vzorek	Ozářený vzorek
formaldehyd	CH ₂ O	30	H ₃ O ⁺	31	0	2,023
oxid dusnatý	NO	30	O ₂ ⁺	30	0,068	78,84
Kyanovodík	HCN	27	O ₂ ⁺	28	0	0,675
oxid uhličitý	CO ₂	44	H ₃ O ⁺	63	0	0,015
oxid dusičitý	NO ₂	46	O ₂ ⁺	46	0	0,050

Tab.8: Látky stanovené metodou SIFT-MS v kyvetě s měděnou fólií.



Obr.28: Porovnání ozářeného a neozářeného vzorku z kyvety s měděnou fólií po stanovení metodou SIFT-MS (prekurzory H_3O^+)

V plynných vzorcích bylo analyzováno několik látek. Z nichž pouze NO byl přítomný ve všech kyvetách.

Při porovnání obsahu kyvet s povrchy je vidět, že v kyvetě s mědí vzniká více, anorganických plynů. V kyvetě s teflonem byl analyzován pouze NO. Složení plynné složky v kyvetě bez fólie a v kyvetě s mědí jsou podobné v obsahu anorganických plynů (NO , NO_2 , CO_2), kyveta s mědí však obsahuje navíc formaldehyd a kyanovodík.

Pokud porovnáme kvantitativní zastoupení látek, nejnižší množství oxidu dusnatého obsahuje kyveta s teflonovou fólií a nejvyšší, více než dvaapůlkrát vyšší než v systému s teflonem, obsahuje kyveta bez fólie. Obsah oxidu dusnatého v kyvetě s mědí je přibližně o 15% vyšší než u kyvety s teflonem. NO je ve všech třech systémech dominantním vznikajícím plynem. Oxid uhličitý je nejméně zastoupen v kyvetě s mědí a jeho množství je ve srovnání s kyvetou bez fólie téměř čtyřicetkrát nižší. Vzniklé množství oxidu dusičitého je v kyvetě s mědí dvacetkrát nižší než v kyvetě bez fólie.

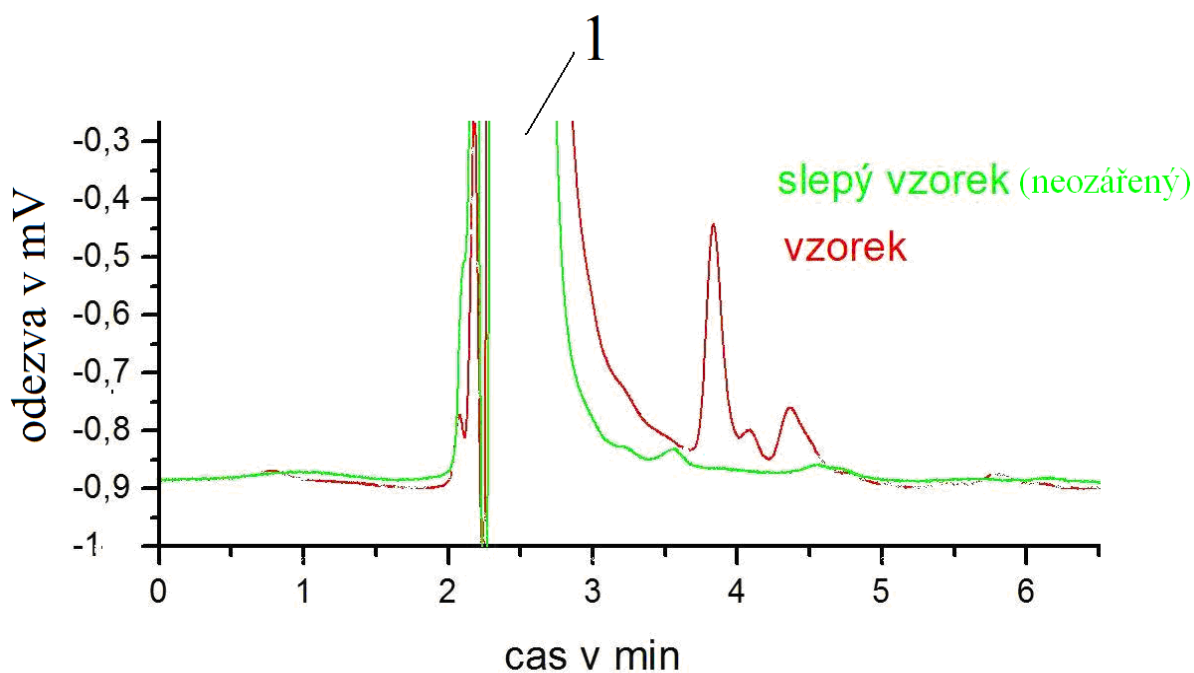
Tyto rozdíly ukazují, že různý povrch (sklo, měď, teflon) má vliv na složení plynné směsi v ozářené kyvetě.

5.2 Výsledky analýzy kapalného vzorku

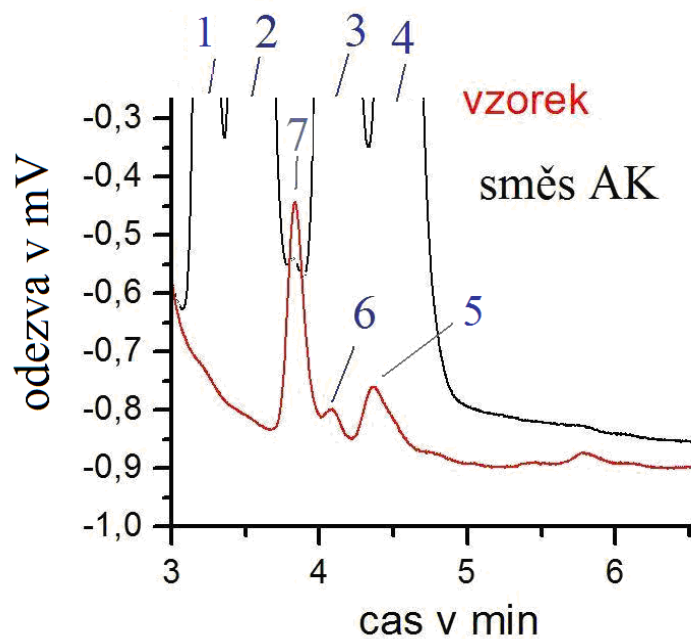
- analýza aminokyselin ve vodném vzorku

Pro snadnější identifikaci aminokyselin byly nejdříve proměřeny vybrané standardy. Standardní aminokyseliny (Ala, Asn, Asp, Ser, Gly) byly vybrány z důvodu, že naše dříve provedené experimenty (viz. práce ⁹) potvrdily jejich přítomnost ve vzorcích.

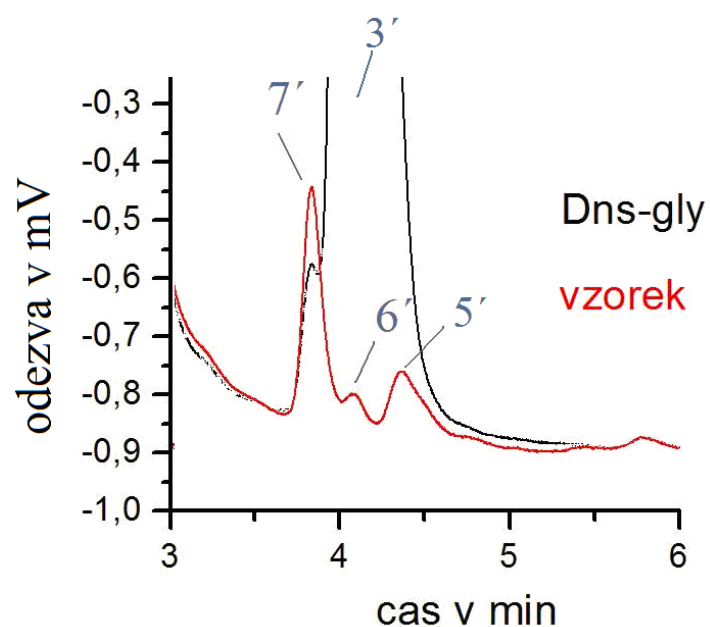
Analýza vlastního vzorku nepotvrdila přítomnost detegovatelného množství alaninu, asparaginu, k. asparágové ani serinu. Na chromatogramu jsou však patrné tři píky; *obr. 29*. Jeden z nich odpovídá svým retenčním časem dansylglycinu (4,08 min); *obr.30*, pík č. 6. Další dva píky neodpovídají retenčními časy žádné z vybraných dansylaminokyselin, ale ukazují na přítomnost dalších látek schopných vázat dansyl.



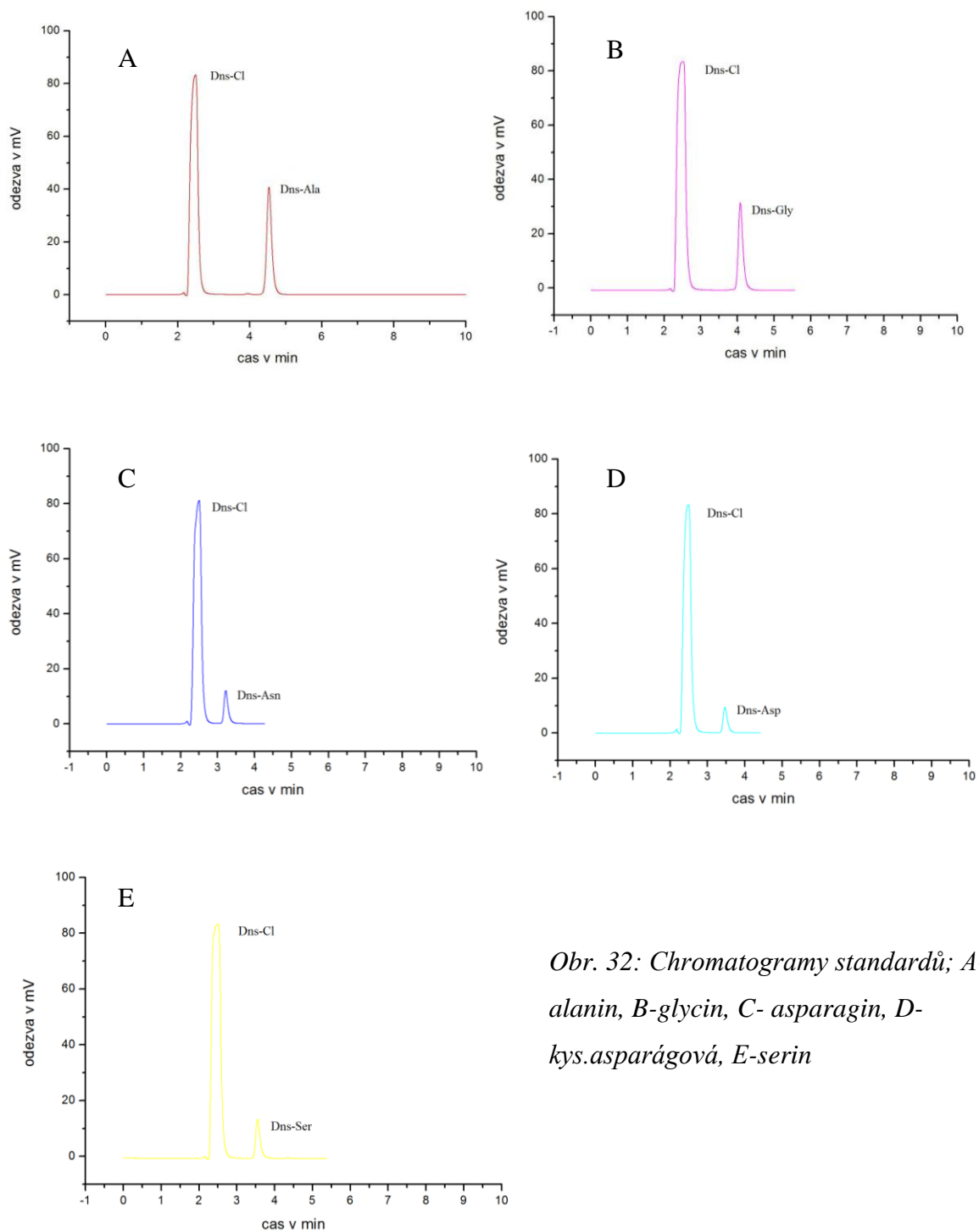
Obr29.: Porovnání chromatogramu vzorku se slepým vzorkem (z neozářené směsi). Na chromatogramu vzorku jsou patrné 3 píky. 1-pík nezreagovaného Dns-Cl.



Obr.30: Porovnání chromatogramu vzorku a směsi AK; 1 – Dns-asn, 2 – Dns-asp + Dns-ser, 3 – Dns-gly, 4 – Dns-ala, 6 – pik odpovídající retenčním časem dansylglycinu, 5,7 - ?



Obr.31: Porovnání chromatogramu vzorku a glycinu., 3' – Dns-gly, 6' – pik odpovídající retenčním časem dansylglycinu, 5',7' - ?



Obr. 32: Chromatogramy standardů; A- alanin, B-glycin, C- asparagin, D- kys.asparágová, E-serin

Z obr. 32 je zřejmé, že signály dansylglycinu a dansylalaninu jsou přibližně čtyřnásobně větší než signály ostatních dansylaminokyselin. Pravděpodobně je to způsobeno tím, že pro každou aminokyselinu je jiná optimální doba dansylace. U alaninu, serinu, asparaginu a k. asparágové byla doba reakce s dansylchloridem 30 minut a je

zřejmé, že pro alanin byla tato doba optimálnější než pro ostatní aminokyseliny. Glycin byl ponechán reagovat 60 minut a vzniklé množství dansylderivátu je přibližně srovnatelné s alaninem.

Množství glycinu v reálném vzorku bylo stanoveno z odezvy detektoru pro standardní aminokyselinu glycin. Jeho koncentrace se pohybuje řádově 10^{-5} mol/ml.

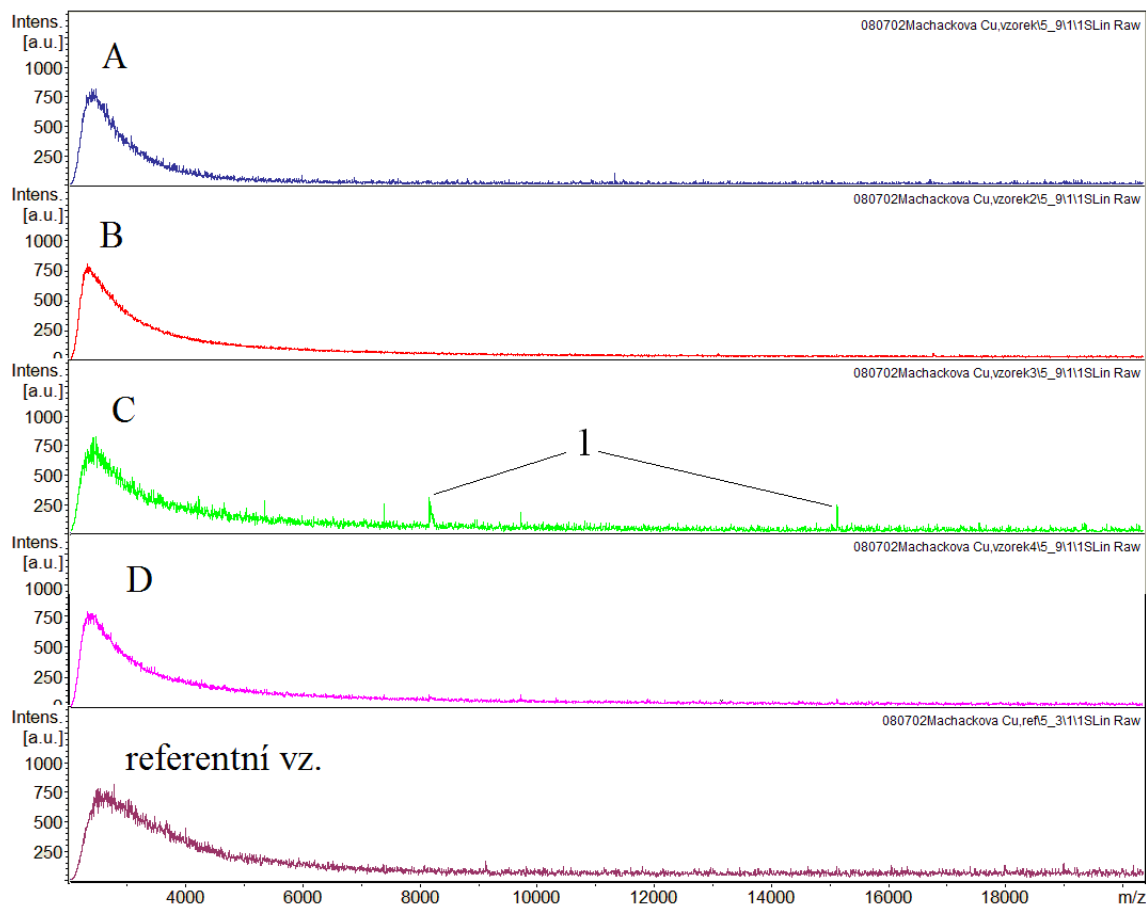
- analýza látek ve vzorku s hexanem

Analýzou roztoku hexanu na hmotnostním spektrometru na principu iontové pasti nebyly detegovány žádné látky. Znamená to tedy, že v ozářené směsi nevznikají žádné chemické látky rozpustné v tomto rozpouštědle.

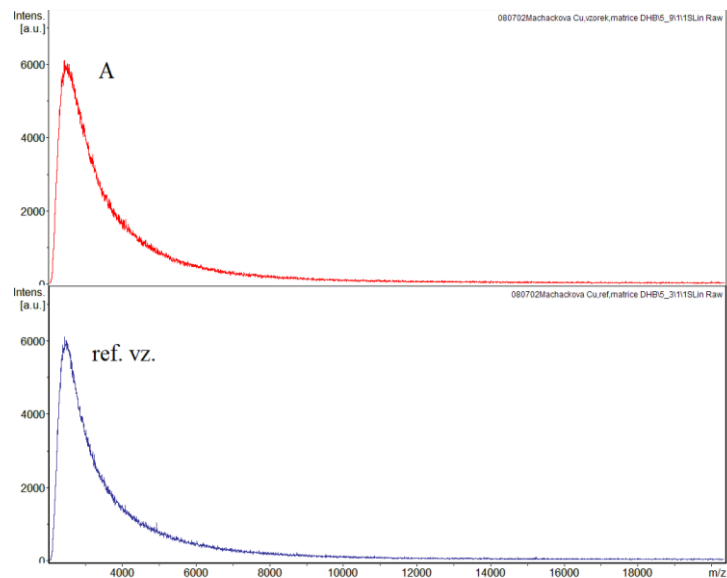
5.3 Výsledky analýzy povrchů

Analýza povrchů pomocí metody MALDI-TOF neprokázala přítomnost detegovatelného množství organických látek na povrchu mědi a teflonu. Názorně je to vidět z následujících obrázků, které porovnávají hmotnostní spektra ze vzorku a z referenčního vzorku. Jako reference byl použit stejný povrch, který však nebyl přítomen v ozařované kyvetě. Spektrum získané bez použití matrice i spektrum získané s nanesenou matricí, se shoduje se spektry referenčního vzorku. Analýza byla provedena postupně pro hmotnostní rozsah 900–3500 Da, 0–3500 Da, 0–20000 Da.

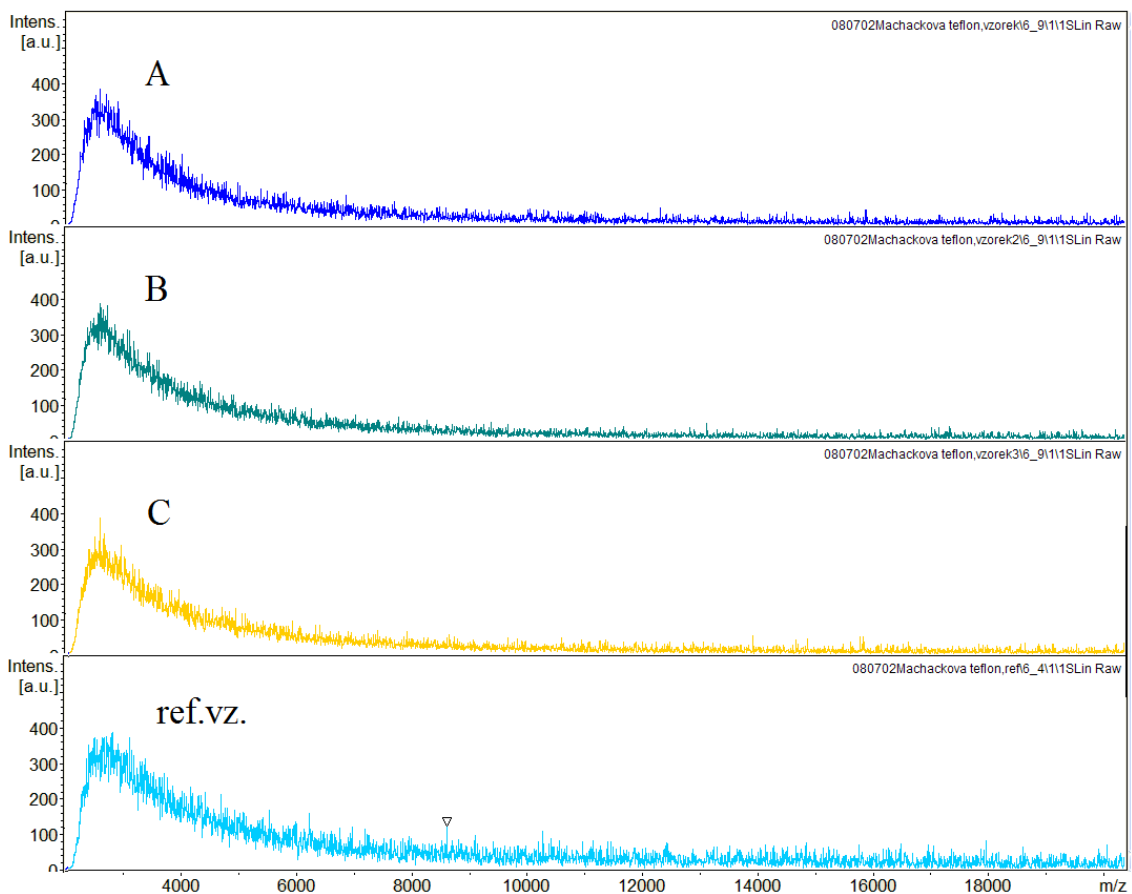
Na obrázku 33 C jsou patrné píky (1), ty však pravděpodobně vznikly kontaminací části povrchu, neboť se nevyskytují v jiných spektrech (A, B, D).



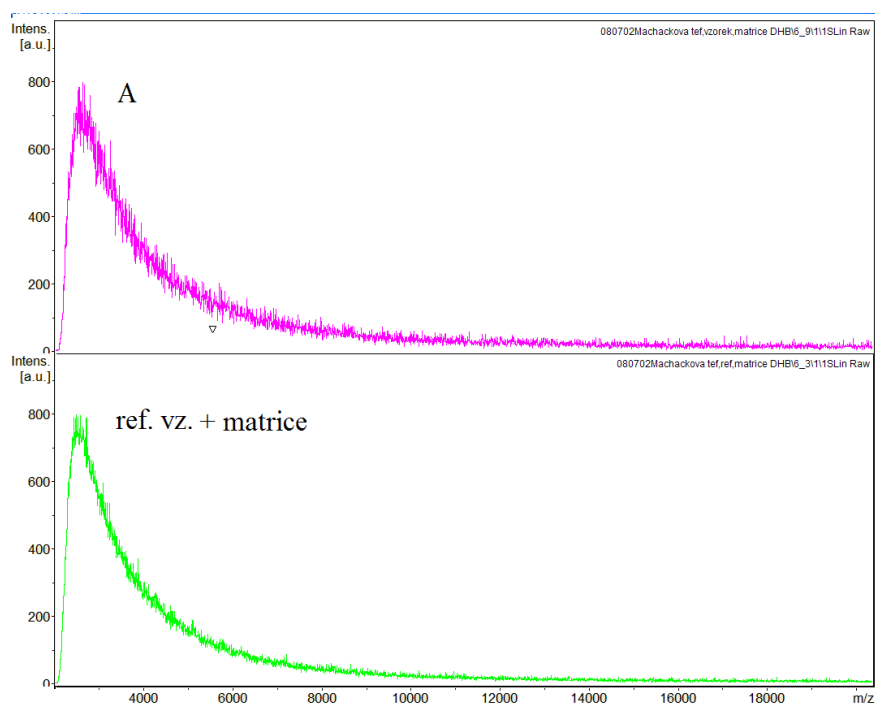
Obr.33: Porovnání hmotnostních spekter Cu povrchu bez matrice s referentním povrchem Cu; A,B,C,D, ref.vz. – povrch vystavený 20 pulsům. 1-píky vzniklé pravděpodobně kontaminací vzorku.



Obr.34: Porovnání hmot. spektra Cu povrchu s matricí s ref. povrchem Cu s mat.(20 pulsů)

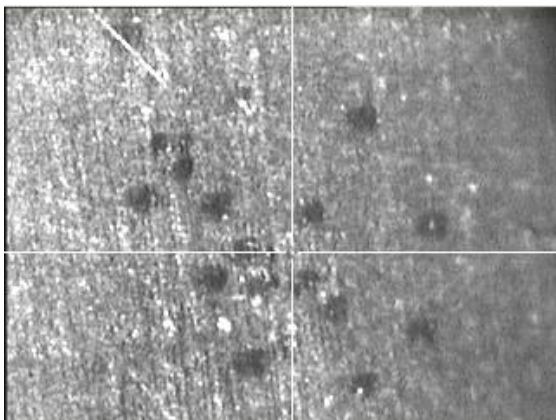


Obr.35: Porovnání hmotnostních spekter teflonového povrchu bez matrice s referentním povrchem teflonu; A,B,C, ref.vz. – povrch vystavený 20 pulsům.

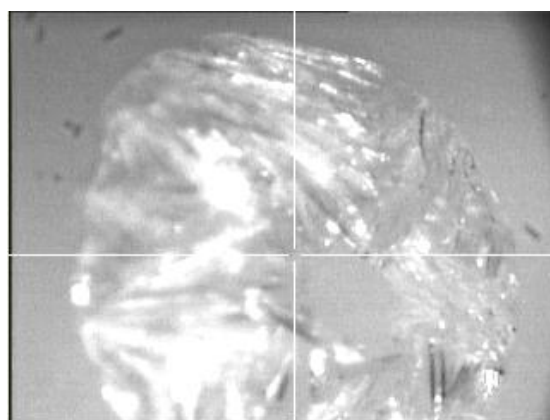


Obr.36: Porovnání hmot. spektra tef. povrchu s matricí s ref. povrchem tef. s mat.(20 pulsů)

A



B



Obr.37: Snímky povrchů zachycené kamerou umístěnou uvnitř hmotnostního spektrometru. A- měděný povrch se zřetelnými body po ostřílení laserem; B-teflonový povrch s krystaly matrice.

6 ZÁVĚR

Cílem této práce bylo zjistit, zda je možné v několikanásobně menším objemu plynů syntetizovat vyšší koncentrace jednoduchých organických látek, hlavně aminokyselin, ve směsi CO-N₂-D₂O. A dále nás zajímalo, zda-li má interakce s různým povrchem vliv na množství a tvorbu produktů v ozařované směsi.

V kyvetách o objemu 820 cm³ byly připraveny tři typy systémů. Kyveta bez fólie naplněná směsí CO-N₂-D₂O, která byla vystavena 20 pulsům o průměrné energii 113 J, kyveta s teflonovou fólií naplněná směsí CO-N₂-D₂O, která byla vystavena 8 pulsům o průměrné energii 107 J a kyveta s měděnou fólií naplněná směsí CO-N₂-H₂O, která byla vystavena 12 pulsům o průměrné hodnotě energie 99 J. Stěžejním nástrojem této práce byl vysoce energetický laserový systém PALS, využívající ke generaci záření atomů jódu a pracující na základní vlnové délce 1315 nm. K těmto experimentům byly dříve používány malé lasery s vysokou opakovací frekvencí, poskytující pulzy o nízkých energiích nebo elektrické výboje. Pomocí několika vysoce energetických laserových pulzů lze deponovat v plynné směsi stejné množství energie jako s tisíci pulzy s nízkou energií. Tím je možné předejít nežádoucímu vlivu následujících laserových pulzů na již vzniklé produkty, což je v případě nízko energetických laserových pulzů nevyhnutelné.

Do této doby byla na UFCHJH k výzkumu složení atmosfér používána kyveta o několikanásobně větším objemu, než je kyveta použitá v této práci. Výsledky analýz ukázaly, že ve velkoobjemové kyvetě vznikají působením velkých laserových jisker jednoduché organické látky, hlavně aminokyseliny, jejichž koncentrace jsou však velice nízké (ve směsi CO-N₂-H₂O řádově 10⁻⁶ mol/ml). Nové malé kyvety byly sestaveny cíleně tak, aby vznikající jiskra zaplnila pokud možno celý prostor kyvety. Tím by také byla možná interakce s povrchem. V takovýchto podmínkách se předpokládá účinnější syntéza organických látek.

Po ozáření kyvet bylo složení plynné složky analyzováno pomocí metody SIFT-MS, kapalný vzorek z kyvety bez fólie byl analyzován pomocí HPLC-UV/Vis a povrchy měděné a teflonové fólie metodou MALDI-TOF.

Shrnutí dosažených výsledků:

- Chemické změny složení plynné směsi byly zkoumány hmotnostní spektrometrií v proudové trubici s vybranými ionty (SIFT-MS). Výsledky jsou shrnuty v tabulkách 9 a 10.

	NO	NO ₂	CO ₂	HCN	CH ₂ O
kyveta bez fólie	X	X	X		
kyveta s teflonovou fólií	X				
kyveta s měděnou fólií	X	X	X	X	X

Tab.9: Kvalitativní porovnání plynných složek vzniklých po ozáření v kyvetách. X značí obsah látky v systému.

	NO	NO ₂	CO ₂	HCN	CH ₂ O
kyveta bez fólie	100%	100%	100%	0%	0%
kyveta s teflonovou fólií	38%	0%	0%	0%	0%
kyveta s měděnou fólií	46%	5%	2,5%	100%	100%

Tab.10: Kvantitativní porovnání vzniklých látek mezi systémy. Hodnota 100% byla vždy zvolena v systému s nejvyšším zastoupením konkrétní látky. **Tabulka znázorňuje procentuální srovnání obsahu jedné látky ve všech systémech, nikoliv procentuální zastoupení všech látek v jednom systému.**

Z tabulek 8 a 9 je vidět rozdílné zastoupení látek, kvalitativní i kvantitativní, v kyvetách s povrchy a v kyvetě bez povrchu.

- Pro stanovení aminokyselin byla vypracována metoda pomocí HPLC-UV/Vis. Bylo vybráno 5 standardních aminokyselin - alanin, glycin, asparagin, kyselina asparagová a serin. Ve směsi CO-N₂-D₂O, vystavené 20 laserovým pulsům o průměrné energii 113 J, byla analyzována aminokyselina glycin a další dvě látky, jejichž retenční časy neodpovídaly žádné z vybraných aminokyselin. Jedná se však

o látky schopné vázat dansylchlorid, musí tedy obsahovat ve své molekule alespoň jednu amino skupinu. Můžou to být také látky obsahující hydroxylové skupiny, neboť při vysokém nadbytku dansylchloridu reaguje dansyl i s touto skupinou (viz. schéma 19 v kapitole 3.6.1.1). Koncentrace glycinu ve vzorku byla řádově 10^{-5} mol/ml. Ve srovnání s výsledky dosaženými ve velkoobjemové kyvetě (Ala – 1×10^{-6} mol/ml), se zde podařilo syntetizovat o řád větší koncentraci aminokyseliny.

- Analýza povrchů metodou MALDI-TOF měla objasnit, zda se na zvolených površích vytvoří polymerní řetězce aminokyselin, pospojované různými typy vazeb, mezi kterými by mohla být i vazba peptidová. Výsledky však nepotvrdily detegovatelné množství žádných látek na povrchu mědi a teflonu.

Uvedené výsledky ukazují, že nově zvolené podmínky pro syntézu organických molekul ze směsi anorganických plynů CO-N₂-D₂O vedly k syntéze aminokyseliny glycinu, která v předchozích experimentech (uvedených v práci ⁹) nebyla nalezena v detegovatelném množství. Naopak alanin, který byl v předchozích experimentech ⁹ detegován, se v tomto experimentu ve vzorku v detegovatelném množství nevyskytoval. Při srovnání koncentrace syntetizovaného alaninu (1×10^{-6} mol/ml) z práce ⁹ a koncentrace syntetizovaného glycinu (1×10^{-5} mol/ml) z této práce, je vidět, že se v podmínkách malé kyvety vzniklo desetkrát více glycinu, než alaninu v kyvetě velkoobjemové. Tyto rozdíly jsou pravděpodobně způsobeny použitím kyvet o odlišném objemu. Jiskra deponovaná v malé kyvetě dosahuje až ke stěnám kyvety, není tedy prostorově a časově možné, aby následně došlo k oddělení rázové vlny. Ve velkoobjemové kyvetě tato situace nenastává. Jelikož má rázová vlna určitý podíl na chemických změnách v systému, může být její absence důvodem uvedených rozdílů.

Dále se prokázalo, že různý povrch (sklo, měď, teflon) ovlivňuje složení plynné směsi v ozářené kyvetě. Přímá vazba produktů s povrchem však nebyla potvrzena.

7 LITERATURA

- ¹ Calvin, M.: *Chemical Evolution*, Oxford University Press (1969).
- ² Bada, J.L.; Lazcano, A.: *Prebiotic Soup-Revisiting the Miller Experiment*, *Science* 300 (2003)
- ³ Miyakawa, S.; Yamanashi, H.; Kobayashi, K.; Cleaves, H.J.; Miller, S.L.: *Prebiotic synthesis from CO atmospheres: Implications for the origins of life*, dostupné z www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.192568299
- ⁴ Kasting, J.F.: *Bolide Impacts and the Oxidation-State of Carbon in the Earth's Early Atmosphere*, *Orig. Life Evol. Biosph.* 20, 199 (1990).
- ⁵ Miller, S.L.; Orgel, L.E.: *The Origins of Life on the Earth*, Englewood Cliffs, NJ: Prentice Hall (1974).
- ⁶ Kobayashi, K.; Saito, T.: *Energetics for Chemical Evolution on the Primitive Earth*, In: *The Role of Radiation in the Origin and Evolution of Life*, v knize *The Role of Radiation in the Origin and Evolution of Life* Kyoto University Press, Japan (2000).
- ⁷ Kobayashi, K.; Ponnamperna, C.: *Trace Elements on Chemical Evolution I,II*, *Origins of life* 16, 41 (1985).
- ⁸ Babánková, D; Civiš, S; Juha, L: *Chemické projevy laserových jisker*, *Chemické Listy*, 99, 109 (2005)
- ⁹ Babanková, D: *Využití velkých laserových jisker pro laboratorní simulaci chemických účinků dějů o vysoké hustotě energie v planetárních atmosférách*, Disertační práce, PřF UK, Praha 2005
- ¹⁰ internetové stránky věnované Prague Asterix Laser System dostupné z <http://www.pals.cas.cz>
- ¹¹ Ferus, M: *FT-IR spektrometrie plynných polutantů*, Bakalářská práce, PřF UK, Praha 2006
- ¹² Kamas, M. : *Vznik organických molekul iniciovaný procesy o vysoké hustotě energie v methanových atmosférách*, Bakalářská práce, PřF UK, Praha 2007
- ¹³ internetové stránky věnované informacím o vědě a výzkumu dostupné z www.veda.cz
- ¹⁴ internetové stránky ústavu biochemie a mikrobiologie VŠCHT Praha dostupné z <http://biomikro.vscht.cz/maldiman/cz/theory/>

- 15 Španěl, P.; Smith, D.: *A general method for the calculation of absolute trace gas concentrations in air and breath from selected flow tube mass spectrometry data.* International Journal of Mass Spectrometry, 249-250, 230- 239 (2006)
- 16 Kramulová, B. : *Analýza složení bioplynu produkovaného čistírnami odpadních vod a skládkami komunálního odpadu,* Bakalářská práce, PřF UK, Praha 2008
- 17 Smith, D; Španěl, P.: *Selected on tube mass spectrometry (SIFT- MS) for online trace gas analysis.* Mass spectrometry reviews, 24, 661- 700 (2005)
- 18 VESMÍR 78, srpen 1999 dostupný z <http://www.cts.cuni.cz/vesmir>
- 19 Štulík K. akol.: *Analytické separační metody,* Skriptum PřF UK, Karolinum, Praha 2005
- 20 internetové stránky věnované vysokoúčinné kapalinové chromatografii dostupné z <http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html>
- 21 Pacáková, V., Štulík, K.: *Vysokoúčinná kapalinová chromatografie,* Skriptum PřF UK, Státní pedagogické nakladatelství Praha 1986
- 22 internetové stránky věnované vysokoúčinné kapalinové chromatografii dostupné z www.hplc.cz
- 23 Kang, X.;Xiao, J.;Huang, X.;Gu, Z.: *Optimalzation of dansyl derivatization and chromatographic conditions in the determination of neuroactive amino acids of biological samples.*Clinica Chimica Acta 366, 352-356 (2006)