

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko–technologická

Hmotnostně spektrometrické zobrazování malých molekul

Martin Dušek

Bakalářská práce
2012

University of Pardubice
Faculty of chemical technology

Mass Spectrometry Imaging of Small Molecules

Martin Dušek

Bachelor work
2012

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Martin Dušek**
Osobní číslo: **C09336**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Klinická biologie a chemie**
Název tématu: **Hmotnostně-spektrometrické zobrazování malých molekul**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

- 1/ Vypracujte literární rešerši zaměřenou na hmotnostně-spektrometrické metody využívané při zobrazování malých molekul s důrazem na aplikace v medicíně a farmacii.
- 2/ Pokuste se zhodnotit současnou situaci v této problematice.

Rozsah grafických prací: dle potřeby
Rozsah pracovní zprávy: ca 30 stran
Forma zpracování bakalářské práce: tištěná
Seznam odborné literatury:

- " A. Svatoš, Trends Biotechnol., 28 (2010) 425-434.
- " E.R.A. van Hove, D.F. Smith, R.M.A. Heeren, J. Chromatogr. A, 1217 (2010) 3946-3954.
- " R.M.A. Heeren, D.F. Smith, J. Stauber, B. Kukrer-Kaletas, L. MacAleese, J. Am. Soc. Mass Spectrom., 20 (2009) 1006-1014.
- " J. Pól, M. Strohalm, V. Havlíček, M. Volný, Histochem. Cell Biol., 134 (2010) 423-443.
- " R. Arakawa and H. Kawasaki, Anal. Sci., 26 (2010) 1229-1240.
- " K.P. Law, J.R. Larkin, Anal. Bioanal. Chem., 399 (2011) 2597-2622.
- " M.P. Greving, G.J. Patti, G. Siuzdak, Anal. Chem., 83 (2011) 2-7.
- " další odborné články týkající se dané problematiky dostupné na WOS databázi

Vedoucí bakalářské práce: Ing. Robert Jirásko, Ph.D.
Katedra analytické chemie
Konzultant bakalářské práce: prof. Ing. Michal Holčapek, Ph.D.
Katedra analytické chemie
Datum zadání bakalářské práce: 3. října 2011
Termín odevzdání bakalářské práce: 22. června 2012


prof. Ing. Petr Lošťák, DrSc.
děkan

L.S.


doc. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 23. února 2011

Prohlášení autora

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 19. 6. 2012

Martin Dušek

Poděkování

Tímto bych rád poděkoval panu Ing. Robertu Jiráskovi, Ph.D. za odborné vedení práce, cenné rady a připomínky při vypracování mé bakalářské práce.

Anotace

Bakalářská práce se zabývá hmotnostně spektrometrickými metodami se zaměřením na hmotnostně spektrometrické zobrazování MSI malých molekul. V práci jsou obsaženy informace, týkající se základních ionizačních technik a hmotnostních analyzátorů, používaných při hmotnostní spektrometrii. Čtvrtá kapitola této práce pojednává o MSI v analýze malých molekul a zahrnuje popis instrumentace přístupy při přípravě vzorku a příklady aplikací.

Annotation

Bachelor work is focused on mass spectrometric methods, with regard to mass spectrometry imaging MSI of small molecules. This work contains information about basic ionization techniques and mass analyzers used in mass spectrometry. The fourth chapter of this work deals with MSI techniques, specialized in analysis of small molecules and includes instrumentation description, sample preparation approaches and application examples.

Obsah

1. Úvod	9
2. Základní principy ve hmotnostní spektrometrii	10
2.1. Ionizační techniky	10
2.1.1. Elektronová ionizace	10
2.1.2. Chemická ionizace	10
2.1.2.1. Chemická ionizace za vzniku záporných iontů	11
2.1.3. Ionizace za atmosférického tlaku	11
2.1.3.1 Ionizace elektrosprejem ESI	11
2.1.3.2 Chemická ionizace za atmosférického tlaku APCI	13
2.1.3.3. Fotoionizace za atmosférického tlaku APPI	15
2.1.3.4. Ionizace laserem za účasti matrice MALDI	16
2.1.3.4.1. Sloučeniny sloužící jako matrice	16
2.1.3.5. Desorpční ionizace elektrosprejem DESI	17
2.1.3.6. Další ambientní techniky	18
2.2. Hmotnostní analyzátory	19
2.2.1. Magnetické analyzátory	19
2.2.1.1. Magnetický analyzátor s jednoduchou fokusací iontů	19
2.2.1.1. Magnetický analyzátor s dvojí fokusací iontů	20
2.2.2. Kvadrupólový analyzátor Q	21
2.2.2.1. Trojitý kvadrupólový analyzátor QqQ	21
2.2.3. Iontová past IT	22
2.2.3.1. Vznik prostorového náboje v IT	22
2.2.3.2. Lineární iontová past	22
2.2.4. Analyzátor doby letu TOF	23
2.2.4.1. Možnosti zvýšení rozlišení u TOF analyzátorů	23
2.2.5. Orbitrap	24
2.2.6. Iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací	25
3. Charakteristika a rozdělení lipidů	26
4. Hmotnostně spektrometrické zobrazování malých molekul	27
4.1. Metoda mikrosondování	28
4.2. Metoda mikroskopická	29

4.3. Rozlišení při MSI	30
4.4. MSI ionizační techniky	31
4.4.1. SIMS zobrazování	31
4.4.1.1. Povrchová úprava vzorku pro Met – SIMS a ME – SIMS	32
4.4.2 MALDI – MS zobrazování	32
4.4.2.1. Příprava vzorku pro MALDI – MS zobrazování	33
4.4.2.2. Metody nanášení matrice pro MALDI – MS zobrazování	35
4.4.2.3. MALDI zobrazování lipidů	36
4.4.2.4. MALDI zobrazování metabolitů, léčiv a dalších molekul	39
4.4.2.5. Další LDI ionizační techniky	40
4.4.3. DESI – MSI	41
4.5. Zpracování dat	42
5. Závěr	43
6. Seznam použité literatury	45
7. Seznam obrázků	48
8. Přehled zkratk	49

1. Úvod

Malé molekuly jsou definovány jako organické sloučeniny s nízkou molekulovou hmotností (obvykle do 2 000 Da). Vysoce efektivním kombinováním hmotnostní spektrometrie a separačních technik, jako např. kapalinová chromatografie nebo elektroforéza, bylo již identifikováno velké množství biomarkerů, přítomných v nejrůznějších tělesných tekutinách, které souvisejí s určitým patologickým stavem vyšetřované tkáně. LC – MS technologie mohou být do jisté míry využity i k prostorovému mapování a identifikaci sloučenin [1].

K vizualizaci molekul na povrchu vzorku však slouží zejména technika nazývaná hmotnostně spektrometrické zobrazování. Základním předpokladem pro hmotnostně spektrometrické zobrazování je desorpce analyzovaných molekul z povrchu vzorku a jejich ionizace [2]. Za posledních 15 let vedl značný vývoj této techniky k jejímu využití ve výzkumu biologických vzorků. Multi-modální MS zobrazovací metody učinily z hmotnostně spektrometrického zobrazování MSI účinný nástroj pro prostorovou distribuci a identifikaci prvků, léků, metabolitů, lipidů, peptidů a proteinů v tkáních [1]. Hmotnostní spektrometrie se stala rutinní metodou analýzy biomolekul, jejichž přítomnost souvisí s různými onemocněními.

2. Základní principy ve hmotnostní spektrometrii

2.1. Ionizační techniky

2.1.1. Elektronová ionizace EI (electron ionization)

Jedná se o „nejtvrďší“ ionizační techniku. Molekuly během této ionizace absorbují velký přebytek energie, což se projeví fragmentací molekulárního iontu. Technika EI, která je používána již od roku 1913, patří mezi nejstarší používané ionizační metody. Podmínkou pro změření EI spekter je dostatečná těkavost analytu, poněvadž k ionizaci dochází v plynné fázi za vakua (tlak = $10^{-3} - 10^{-5}$ Pa) při teplotě 150 - 400 °C. Tuto ionizační techniku tudíž nelze použít pro ionizaci termolabilních a netěkavých sloučenin. Zdrojem elektronů pro EI je žhavená katoda (W nebo Re vlákno). Tyto emitované elektrony jsou po průchodu iontovým zdrojem zachyceny na anodě. Dojde-li k přiblížení emitovaného elektronu k valenčním elektronům molekuly, může nastat ovlivnění jejich magnetických polí, což může vést k uvolnění valenčního elektronu a ke vzniku radikálkationtu $M^{\cdot+}$.

Takto vzniklé ionty jsou odpuzovací elektrodou vypuzeny z iontového zdroje, fokusovány, a poté dalšími elektrodami urychleny do hmotnostního analyzátoru. Zavedením brzdícího plynu, jako je např. Argon, můžeme získat i záporně nabitě ionty molekul. Vzájemnými srážkami s brzdícím plynem se sníží rychlost ionizujících elektronů, čímž se zvýší pravděpodobnost elektronového záchytu molekul. Je nutné emitovat elektrony s nižší energií [3].

2.1.2. Chemická ionizace CI (chemical ionization)

Konstrukce tohoto iontového zdroje i princip ionizace molekul je naprosto totožný s technikou EI. Jediným rozdílem je přítomnost tzv. reakčního plynu o tlaku 50 – 100 Pa v iontovém zdroji. Nejprve dochází k ionizaci molekul reakčního plynu, který poté ion-molekulárními reakcemi ionizuje molekuly analytu. V iontovém zdroji dochází k řadě konkurenčních reakcí. Podle použitého reakčního plynu dochází obvykle během těchto reakcí ke vzniku $[M+H]^+$ nebo $[M-H]^-$ a dalších aduktů. Nejběžněji používanými reakčními plyny jsou methan (dochází ke vzniku $[CH_5]^+$, $[C_2H_5]^+$ a $[C_3H_5]^+$ iontů), isobutan (Vzniká ion $[t-C_4H_9]^+$) a amoniak (dává vznik iontům $[NH_4]^+$, $[(NH_3)_2H]^+$, $[(NH_3)_3H]^+$). Ke vzniku iontů při CI dochází několika různými

mechanismy, mezi něž patří např. protonace, které jsou nejčastější, ale i abstrakce hybridu, výměny náboje nebo kondenzace dvou molekul [3].

2.1.2.1. Chemická ionizace za vzniku záporných iontů

Pro tvorbu záporných iontů technikou chemické ionizace se nejčastěji používají tyto reakční plyny: methan, isobutan (dává vznik $[H]^-$ aniontu), amoniak (tvoří ionty $[NH_2]^-$ a $[H]^-$), CCl_4 nebo jiné halogenderiváty (poskytují ion $[X]^-$) a N_2O (vznikají ionty $[O]^-$ a $[NO]^-$). Mezi nejběžnější reakce vedoucí ke vzniku záporných iontů patří např. deprotonace, adice halogenidů nebo záchyt elektronu.

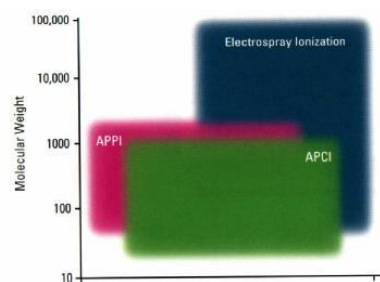
2.1.3. Ionizace za atmosférického tlaku API (Atmospheric pressure ionization)

Mezi ionizace pracující za atmosférického tlaku patří tři základní techniky ESI, APCI a APPI.

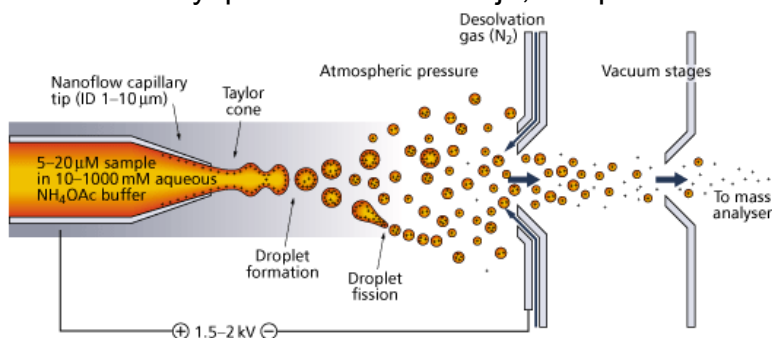
2.1.3.1. Ionizace elektrosprejem ESI (Electrospray ionization)

Analyt, rozpuštěný ve vhodném eluentu, je nejprve přiváděn kovovou kapilárou, na kterou je vloženo napětí o velikosti 3 – 5 kV. Vznikající kapičky vzorku jsou rozprášeny na výstupu z kapiláry pomocí zmlžujícího plynu. Tyto kapičky nesou na svém povrchu velké množství nábojů. Odpařováním rozpouštědla dochází v kapičkách ke zvyšování hustoty povrchového náboje, až při dosažení kritické hodnoty dojde k tzv.

Coulombické explozi. Při Coulombické explozi probíhá rozpad kapiček roztoku na ještě menší kapičky s rozdělením původních nábojů [4]. Opakování tohoto procesu vede k uvolnění kvazimolekulárních iontů.



Obr. č. 1: Využití API ionizačních technik v závislosti na polaritě a molekulové hmotnosti analytu



Obr. č. 2: Mechanismus elektrosprejové ionizace

Ionizace elektrosprejem vede ke vzniku vícenásobně nabitých iontů $[M+zH]^{z+}$ a $[M-zH]^{z-}$. Pro jeden analyt se tím pádem objevuje série píků, jenž odpovídají iontům

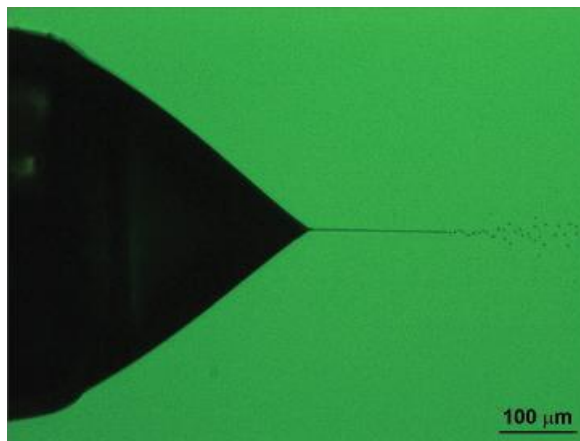
téže látky o stejné molekulové hmotnosti M_r , ale rozdílným počtem nábojů z . Tato ionizační technika se používá pro analýzu středně polárních až iontových sloučenin, biopolymerů, nekovalentních komplexů, organokovů i syntetických polymerů spíše polární charakteristiky.

Základní procesy elektrospreje

A. Zmlžení roztoku vzorku na malé elektricky nabitě kapičky

Tvorba nabitých kapiček závisí především na složení a průtoku eluentu, koncentraci aditiv, průměru i geometrickém uspořádání kapiláry, vlastnostech zmlžujícího plynu (typ, průtok, teplota) a na vlastnostech samotného analytu (koncentrace, struktura). Taktéž lze použít i několik různých způsobů zmlžování. Můžeme sprejovat čistý analyt, nebo můžeme použít elektrosprej s přídavným tokem kapaliny, a také elektrosprej s pneumatickou podporou zmlžení.

Ze tří možných sprejovacích režimů je pro ESI použitelný pouze tzv. **tryskající kužel** (cone-jet), jenž oproti zbývajícím dvěma režimům (explodující a pulzující Taylorův kužel) poskytuje výrazně vyšší signál a řadu dalších výhod. Režim sprejování závisí na průtoku, obsahu rozpouštědla a napětí, které je přivedeno na kovovou kapiláru.



Obr. č.3: Schéma tryskajícího kužele

B. Uvolnění iontů z kapiček

K uvolnění iontů dochází jejich vypařením z kapiček.

C. Transport iontů z atmosférické oblasti zdroje do vakua

Ionty mohou procházet z atmosférické oblasti do vakua otvorem v rovném disku, otvorem v horní části kuželu, ve spodní části kuželu, ale také kovovou či skleněnou kapilárou. Při vstupu do vakua dochází k velkému ochlazení iontů a ke tvorbě klastrů. Pro potlačení tvorby klastrových iontů se využívají preventivní

opatření jako např. zavedení protiproudu dusíku jako sušícího plynu nebo vyhřátí iontového zdroje na teplotu 250 °C.

Nanoelektrosprej

Analyt protéká nanoelektrosprejem v jednotkách až stovkách nanolitrů za minutu. Na rozdíl od klasického elektrospreje se nepoužívá zmlžující plyn. Obvykle se sprejuje přímo proti vstupní kapiláře do analyzátoru ve vzdálenosti 1 – 2 mm. Používají se speciální kovové špičky kapiláry, vytažené do velmi úzkého konce o průměru 5 – 10 µm. Použitím nanospreje lze dosáhnout extrémní koncentrační citlivosti analýzy, poněvadž lze stanovit i pouhé stovky molekul (s přesností na attomoly až zeptomolly). Vzhledem k menšímu průměru primárně vzniklých nabitých kapiček potřebujeme menší počet cyklů Coulombických explozí a to je důvodem, proč odpařováním rozpouštědla dochází k menšímu zkoncentrování solí v jednotlivých kapičkách, z čehož vyplývá vyšší tolerance vůči solím [3].

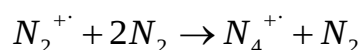
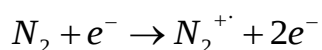
2.1.3.2. Chemická ionizace za atmosférického tlaku APCI (atmospheric pressure chemical ionization)

APCI funguje na podobném principu jako klasická CI pouze s tím rozdílem, že ionizace probíhá za atmosférického tlaku a za průtoku HPLC eluentu (0,1 – 1 ml/min). Na výbojovou elektrodu je vloženo napětí o velikosti 3 – 4 kV, čímž vzniká koronový výboj, kterým se nejdříve ionizují molekuly mobilní fáze a následně se ion-molekulární reakcemi ionizují i molekuly analytu. Vzniklé ionty jsou elektrodami usměrněny do analyzátoru. Také používáme dusík jako sušící plyn, sloužící k rozbití nekovalentních klastrů.

Jelikož je před ionizací potřeba převést molekuly analytu do plynné fáze, není tato metoda vhodná pro analýzu iontových a vysokomolekulárních sloučenin. Tato ionizační metoda se využívá při analýze málo až středně polárních sloučenin do M_r asi 1000 až 1500 Da [3].

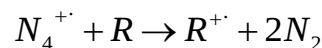
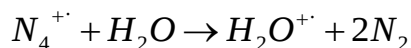
Mechanismy tvorby kladných iontů

A. Primární ionty vznikající ze zmlžujícího plynu



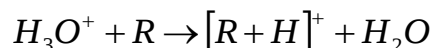
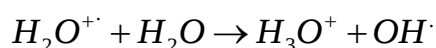
B. Reakční ionty, vznikající z mobilní fáze a aditiv

Reakční ionty vznikají v mobilní fázi několika mechanismy: -výměnnou náboje

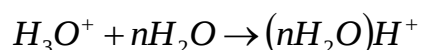


-přenosem

protonu

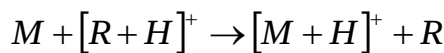


-vznikem aduktů

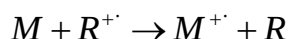


C. Hlavní mechanismy ionizace analytu

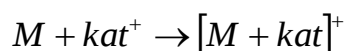
Ionizace molekul analytu ve vzorku probíhá: -Přenosem protonu – Molekula M musí mít větší protonovou afinitu než molekula rozpouštědla R



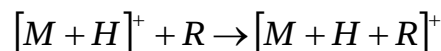
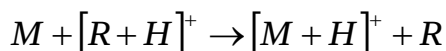
-Přenosem náboje – Ionizační energie molekuly M musí být nižší než ionizační energie molekuly R.



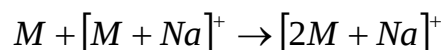
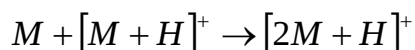
-Tvorbou aduktů



-Adicí rozpouštědla

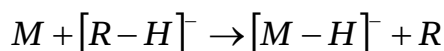


-Tvorbou polymerních klastrů

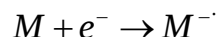


Základní mechanismy tvorby záporných iontů

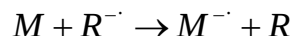
A. Deprotonace analytu



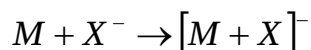
B. Záchyt elektronu



C. Výměna náboje



D. Tvorba aduktů



2.1.3.3. Fotoionizace za atmosférického tlaku APPI (Atmospheric pressure photon ionization)

Použitím této ionizační techniky dochází k ionizaci molekul analytu působením UV záření. Jako zdroj UV záření se používá kryptonová výbojka, z níž se uvolňují fotony o energii 10 eV. Jelikož je tato energie větší než ionizační energie nepochárných organických molekul, ale menší než ionizační energie složek mobilní fáze, dochází k selektivní ionizaci analytu a nikoliv mobilní fáze. Na rozdíl od ESI a APCI běžně vznikají ionty s lichým počtem elektronů.

Během analýzy je výhodné kvůli zvýšení citlivosti použít tzv. dopant, nebo-li sloučeninu, která reaguje ion-molekulárními reakcemi pouze s analytem (nikoliv mobilní fází). Jako dopant se většinou používá toluen nebo benzen. Tuto techniku lze na rozdíl od APCI použít i pro velmi nepochární sloučeniny. Mechanismy vzniku iontů v APPI závisí na řadě faktorů, týkajících se analytu, mobilní fáze i dopantu. Mezi nejčastější faktory patří velikost ionizační energie EI, protonová a elektronová afinita molekul [5].

Mechanismus vzniku iontů

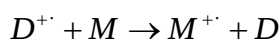
Bez přítomnosti dopantu.

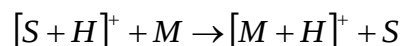
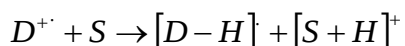


Je-li přítomen dopant.



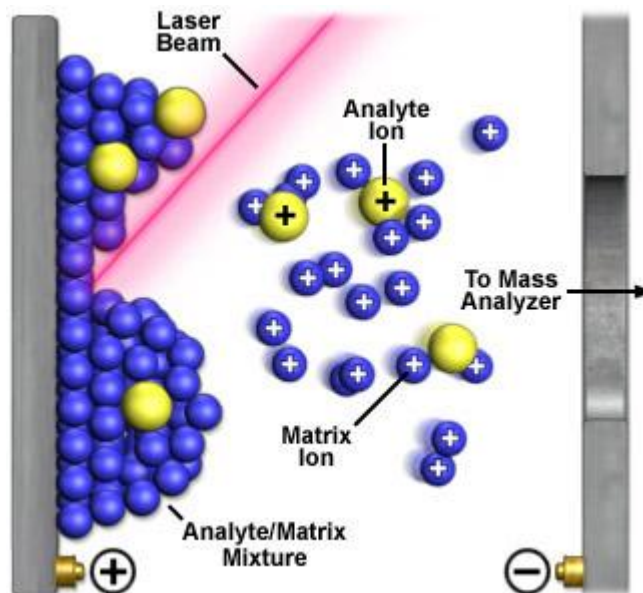
Mezi dva nejčastější mechanismy přenosu náboje z dopantu na molekulu analytu patří výměna náboje molekulami a přenos protonu.





2.1.3.4. Ionizace laserem za účasti matrice MALDI (Matrix assisted laser desorption ionization)

MALDI je společně s ESI nejvhodnější ionizační technikou pro analýzu biologických i syntetických polymerů. Vzorek se nechá rozpustit a smísit s vhodnou matricí. Po odpaření rozpouštědla je látka kokrytalizována v pevné matrici. Vzorek ozáříme krátkým laserovým pulsem, jenž je absorbován matricí. Poté je absorbovaná energie přenesena z matrice na molekuly vzorku, což vede k jejich ionizaci, desorpci a ion-molekulárním interakcím. Jedná se o pulzní ionizační metodu, proto se nejčastěji používá ve spojení s hmotnostním analyzátozem TOF (Time of flight).



Obr. č.4: Princip MALDI ionizace

Nejrozšířenější je použití dusíkových UV laserů, které vysílají 4 ns pulz záření o vlnové délce 337 nm a Nd:YAG laserů (355 nm). Mezi nejčastěji zaznamenané ionty patří $[M+H]^+$, $[M+2H]^{2+}$, $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$ a $[M-H]^-$ [3].

2.1.3.4.1. Sloučeniny sloužící jako matrice

Matrice slouží jako rozpouštědlo analytu, takže jeho molekuly jsou dostatečně vzájemně separovány a jejich intermolekulární působení je redukováno na minimum. Sloučenina, sloužící jako matrice musí být schopna výrazné absorpce v dané oblasti elektromagnetického spektra, ale nesmí být příliš těkavá. Matrice musí se sloučeninami analytu tvořit co nejjemnější směsné krystaly.

Při použití UV laseru se jako matrice nejčastěji používají aromatické karboxylové kyseliny jako je např. kyselina dyhydroxybenzoová, chlorsalicylová, skořicová atd., které absorbují UV záření při vlnové délce laseru. Při ionizaci IČ záření lze použít jakoukoliv sloučeninu, která toto záření výrazně absorbuje. U sloučenin, sloužících jako matrice, je velice důležitá přítomnost $-OH$ skupin v jejich

molekule [2]. Tyto –OH skupiny zajišťují ionizaci analytu a jsou-li v molekule matrice nahrazeny za CH₃CO skupiny, ztrácí daná matrice svou funkci.

V některých případech, jako například při analýze polyaromatických sloučenin, však samotné molekuly analytu plní funkci matrice, poněvadž samy velmi intenzivně absorbují záření laseru při dané vlnové délce. Při analýze takovýchto sloučenin tudíž není potřeba přidávat matrici. Ionizační technika, kdy analyzovaná sloučenina plní zároveň funkci matrice se označuje zkratkou LDI (Laser desorption ionization) [3].

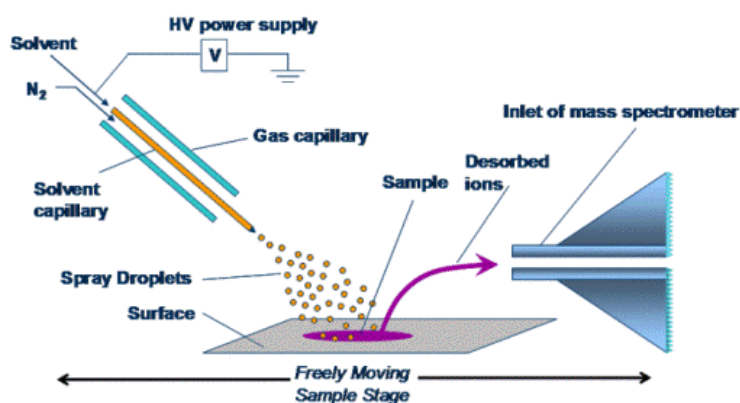
2.1.3.5. Desorpční ionizace elektrosprejem DESI (Desorption electrospray ionization)

Při této ionizační metodě je kapilárou v elektrospreji přiváděno, zmlžováno a ionizováno pouze rozpouštědlo. Vzorek je nutno umístit pod vhodným úhlem ke sprejovací kapiláře a vstupu do hmotnostního spektrometru.

Ionizujeme-li technikou DESI, není potřeba provádět žádnou úpravu

vzorku. Můžeme naprosto běžně analyzovat např. kus rostlinného pletiva (list a jiné části rostliny) nebo živočišné tkáně (prst člověka, výřezy nádorové tkáně).

Princip ionizace a desorpce povrchu molekul pomocí DESI není zcela objasněn. Na základě počítačových simulací se ale předpokládá, že analyzovaný povrch je postupně zavlažen sprejovací kapalinou, přičemž analyzované molekuly jsou extrahovány z povrchu vzorku do kapaliny, desorbovány a ionizovány. Ionty i nabité mikrokapičky jsou poté z povrchu odprašovány, a nakonec transportovány do hmotnostního analyzátoru. Tato ionizační technika se používá například při analýze výbušnin, drog, sledování biologických markerů nebo k prostorovému zobrazení vybraných iontů (MS imaging viz. níže) [3,7,8,9].



Obr. č.5: Princip DESI ionizace

2.1.3.6. Další ambientní ionizační techniky

DAPCI (Desorption atmospheric pressure chemical ionization)

Tato technika se velice podobá klasickému APCI ionizačnímu zdroji. Hlavním rozdílem je, že nedochází ke zmlžování analytu, nýbrž čistého rozpouštědla. Jako zmlžovací rozpouštědlo se nejčastěji používá methanol a jako zmlžující plyn využíváme např. dusík nebo helium. Z par zmlžovacího rozpouštědla jsou pomocí koronárního výboje v blízkosti elektrody produkovány primární ionty z několika málo molekul tohoto rozpouštědla. Tyto ionizované páry jsou směřovány na povrch vzorku k sekundární desorpci a ionizaci molekul analytu. K ionizaci molekul vzorku tudíž dochází reakcí s primárními ionty rozpouštědla, vytvořenými působením elektrického výboje.

V záznamu kladných iontů se často objevují ionty $[M+H]^+$, přičemž nepolární molekuly s ionizační energií nižší než je excitační energie dusíku nebo hélia jsou spíše ionizovány v podobě radikál kationtů. Zaznamenáváme-li záporně nabitě ionty, pak dochází nejčastěji ke tvorbě deprotonované molekuly nebo aduktů s přítomnými anionty [4,8,10].

DAPPI (Desorption atmospheric pressure photon ionization)

Tato technika využívá k desorpci a ionizaci molekul z povrchu vzorku ohraničeného proudem aerosolu rozpouštědla, jenž bylo vytvořeno ve vyhřívaném mikročipovém zmlžovači, a fotonů z kryptonové výbojky. K ionizaci dochází pravděpodobně kombinací tepelného a chemického procesu, poněvadž intenzita signálu roste s teplotou aerosolu. Jako sprejovací rozpouštědla využíváme toluen, aceton atd. Úlohu zmlžovacího plynu nám opět zastupuje dusík. Molekuly rozpouštědla jsou při použití této techniky ionizovány vyzářenými fotony za tvorby primárního iontů. Následně dochází k reakcím primárních iontů s molekulami analytu za vzniku sekundárních iontů. DAPPI je vhodná k analýze středně polárních i nepolárních molekul. Mezi nejčastěji pozorované ionty patří M^+ a $[M+H]^+$ [4,8].

Přímá analýza v reálném čase DART (Direct analysis in real time)

Podobně jako u DESI lze při použití této ionizační techniky analyzovat plynné, kapalné a pevné vzorky bez jakékoliv úpravy. Princip této ionizační techniky spočívá v procesu, kdy jsou molekuly reakčního plynu (He nebo N_2) excitovány

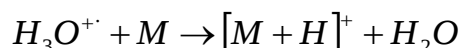
výbojem za vzniku metastabilních iontů a částic, přičemž ionty jsou zachyceny na elektrodě. S analytem tím pádem reagují pouze excitované částice reakčního plynu He^* [3,8,9].

Mechanismus ionizace metodou DART

Ionizace analyzované molekuly probíhá mechanismem tzv. **Penningovy ionizace**.



Kromě Penningovy ionizace dochází ještě k dalším ion-molekulárním interakcím za vzniku obvyklých iontů se sudým počtem elektronů.



2.2. Hmotnostní analyzátory

Hmotnostní analyzátory slouží k rozdělení iontů podle jejich poměru m/z , přičemž kvalita rozdělení iontů je vyjádřena jejich rozlišovací schopností.

2.2.1. Magnetické analyzátory

2.2.1.1. Magnetický analyzátor s jednoduchou fokusací iontů

Pokud prochází nabitá částice magnetickým polem, dochází k zakřivení trajektorie jejího pohybu. Ionty, urychlené záporným potenciálem V , s nižší hodnotou m/z , zakřivují trajektorii pohybu více než ionty s vyšší hodnotou m/z , poněvadž na těžší ionty působí větší odstředivá síla. Při vstupu do magnetického pole vykazují

ionty určitou hodnotu kinetické energie E_k : $E_k = zV = \frac{1}{2}mv^2$

V magnetickém poli působí na ion také dostředivá síla $F_{\text{dost.}} = B \cdot z \cdot v$, která musí být v rovnováze s $F_{\text{odst.}} = m \cdot v^2 / r$: $Bzv = \frac{mv^2}{r} \rightarrow Bz = \frac{mv}{r}$

$$v = \sqrt{\frac{2zV}{m}} \rightarrow Bz = \frac{m \sqrt{\frac{2zV}{m}}}{r} \rightarrow m/z = \frac{B^2 r^2}{2V}$$

V – urychlující potenciál, z – hodnota náboje dané částice, m – hmotnost částice, v – rychlost pohybu urychleného iontu, B – magnetická indukce, r – poloměr zakřivení trajektorie

Úpravou tohoto vztahu jsme získali základní rovnici pro magnetický analyzátor $m/z = B^2 r^2 / 2V$. Poloměr dráhy iontů tedy závisí na magnetické indukci B , urychlovacím potenciálu V a poměru m/z . Měníme-li postupně magnetickou indukci B (magnetické skenování) nebo urychlovací potenciál V (potenciálové skenování), při konstantním poloměru r charakteristickým pro určitý přístroj, projdou ionty výstupní štěrbinou na detektor postupně a zaznamenají se intenzity pro jednotlivé m/z .

2.2.1.2. Magnetický analyzátor s dvojitou fokusací iontů

V tomto hmotnostním analyzátoru dochází kromě magnetické ještě navíc k elektrostatické fokusaci iontů, čímž dojde k výraznému zvýšení rozlišovací schopnosti. Jestliže ionty s různou kinetickou energií E_k a odlišnou m/z vstoupí do elektrického pole, dojde k zakřivení jejich dráhy v závislosti na velikosti E_k , nikoliv však m/z . Ionty, které vznikají v iontovém zdroji mají určitou distribuci energií, což přispívá k šířce jejich píků při detekci. Z toho vyplývá, že pro dosažení vyššího rozlišení musíme jednotlivé ionty energeticky sjednotit, k čemuž nám slouží hmotnostní analyzátor.

Fyzikální popis elektrostatické fokusace iontů

V elektrostatickém analyzátoru pro ionty platí, že dostředivá elektrická síla

$$F_{\text{dost.}} = z \cdot E \text{ je v rovnováze s odstředivou silou } F_{\text{odst.}} = m \cdot v^2 / r \rightarrow zE = \frac{mv^2}{r}$$

z – hodnota náboje daného iontu, E – Intenzita elektrického pole, m – hmotnost částice, v – rychlost pohybující se částice, r – poloměr zakřivení trajektorie

Po výstupu z iontového zdroje a urychlení potenciálem V vykazují ionty

$$\text{určitou hodnotu kinetické energie } E_k: E_k = zV = \frac{1}{2}mv^2 \rightarrow v^2 = \frac{2zV}{m}$$

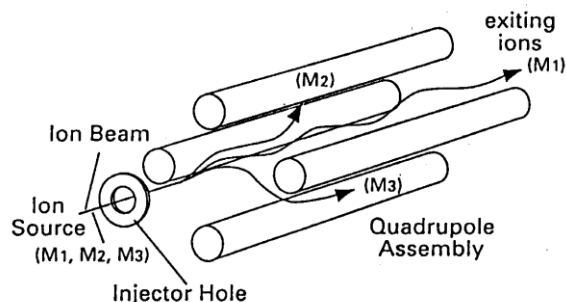
$$zE = \frac{mv^2}{r} \rightarrow zE = \frac{2zV}{r} \rightarrow r = \frac{2V}{E}$$

Z rovnice, vyjadřující vztah pro zakřivení trajektorie pohybu iontu v elektrostatickém poli, vyplývá, že fokusace iontů v elektrostatickém poli nezávisí na

poměru m/z , nýbrž pouze na jejich kinetické energii. Spojením magnetické a elektrostatické fokusace iontů lze dosáhnout zvýšení rozlišovací schopnosti o 30-100 tisíc jednotek.

2.2.2. Kvadrupólový analyzátor Q (quadrupole)

Kvadrupólový analyzátor se skládá ze čtyř stejných kovových tyčí kruhového průřezu o délce 20-30 cm. Na dvě protilehlé tyče je vloženo kladné stejnosměrné napětí a na zbývajících dvě



Obr. č.6: Mechanismus separace iontů v kvadrupólu

záporné stejnosměrné napětí, přičemž na všechny je superponováno

vysokofrekvenční střídavé napětí. Pro páry tyčí tedy platí vztah: - $F_+ = +(U - V \cos \omega t)$

$$- F_- = -(U - V \cos \omega t)$$

F_+, F_- - potenciál dvojice tyčí, ω - angulární frekvence, U - stejnosměrné napětí, V - amplituda střídavého napětí.

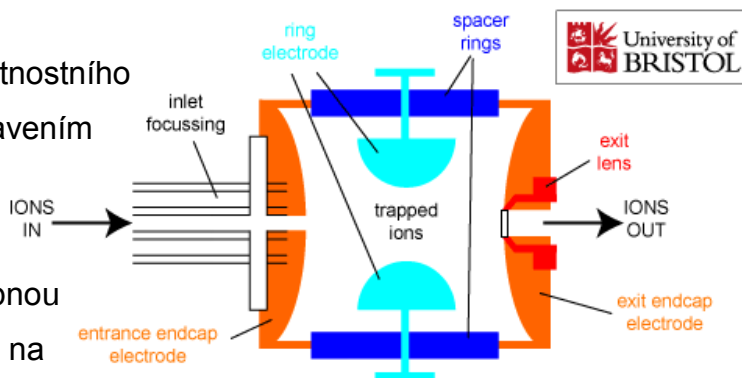
Ion začne potom, co je přiveden do středu osy kvadrupólu oscilovat. V určitém časovém okamžiku jsou pro daný poměr U/V oscilace stabilní pouze ionty se specifickou hodnotou m/z , které projdou kvadrupólem a dostanou se k detektoru. Všechny ostatní ionty zůstávají zachyceny na tyčích kvadrupólu, přičemž postupnou změnou hodnot stejnosměrného napětí U i amplitudy střídavého napětí V jsou postupně na detektor připuštěny všechny ionty. Kvadrupól je velice jednoduchý a poměrně levný hmotnostní analyzátor, jenž se velmi rychle rozšířil u tzv. stolních hmotnostních spektrometrů pro spojení se separačními technikami [3,4].

2.2.2.1. Trojitý kvadrupólový analyzátor QqQ (Triple quadrupole)

Jedná se o tři kvadrupóly řazené za sebou, přičemž prostřední z nich q_2 slouží jako kolizní cela. Zavedeme-li do kvadrupólu q_2 kolizní plyn, způsobíme kolizní aktivaci vybraných iontů kvadrupólovým analyzátozem Q_1 s kolizním plynem a jejich následnou fragmentaci.

2.2.3. Iontová past IT (Ion trap)

Ionty jsou do tohoto hmotnostního analyzátoru přiváděny pulzně. Nastavením vhodného poměru mezi kruhovou a zbylé dvě elektrody jsou poté zachyceny, a následně postupnou změnou těchto napětí vypuzovány na detektor podle jejich m/z . Akumulační časy pro záchyt iontů se pohybují v rozmezí 0,01 – 200 ms, doba excitace a kolize okolo 20 – 60 ms.



Obr. č. 7: Schéma sférické iontové pasti

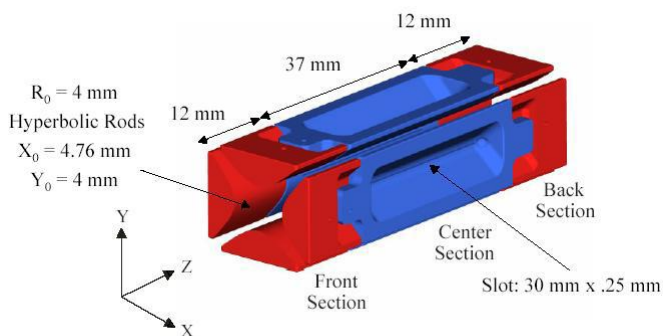
V podstatě se jedná o trojrozměrný kvadrupól. Iontová past se skládá ze tří elektrod, z nichž je jedna kruhová a zbylé dvě jsou vyklenuté do prostoru kruhu, v němž se shromažďuje oblak iontů. Je používán tzv. tlumící plyn, nejčastěji Helium o nízkém tlaku ($5 \cdot 10^{-3}$ Pa), jenž třením brzdí pohyb iontů a napomáhá jejich semknutí do oblaku. Tlumící plyn tlumí oscilace v ose z , což vede k výraznému zlepšení rozlišovací schopnosti i k zlepšení záchytu iontů.

2.2.3.1. Vznik prostorového náboje u IT

Množství iontů dávkovaných do iontové pasti musí být pečlivě regulováno, poněvadž dojde-li k přeplnění pasti, může v jejím okolí vzniknout tzv. prostorový náboj, jenž vede k horšímu rozlišení a nižší citlivosti. Prostorový náboj totiž způsobí ovlivnění harmonického pohybu iontů, načež rezonance iontů každé hodnoty m/z bude probíhat přes širší rozsah frekvencí, což rozšíří pík.

2.2.3.2. Lineární iontová past

Ve své podstatě se jedná o kvadrupól s přídatnými elektrodami na obou koncích. Na tyče kvadrupólu je vloženo střídavé napětí, zatímco na jeho koncích je umístěno stejnosměrné napětí. Tyto iontové pasti mají vyšší rozlišení a citlivost nežli sférické iontové pasti.



Obr. č. 8: Lineární iontová past

2.2.4. Analyzátor doby letu TOF (Time of flight)

Jedná se o typický pulzní hmotnostní analyzátor. Ionty jsou nejprve na vstupu do analyzátorové trubice velmi krátkým pulzem urychleny, načež se přesně měří doba, během níž se ionty dostanou k detektoru. Ionty s menší hodnotou m/z o stejné kinetické energii se v oblasti bez přítomnosti působení pole pohybují rychleji, takže se k detektoru dostávají v kratším časovém intervalu. Podle toho za jakou dobu „doletí“ ionty k detektoru lze určit hodnotu m/z . Skenování je velice rychlé a hmotnostní rozsah m/z není teoreticky omezen.

Při ionizaci získají ionty přibližně stejnou kinetickou energii E_k a jsou urychleny

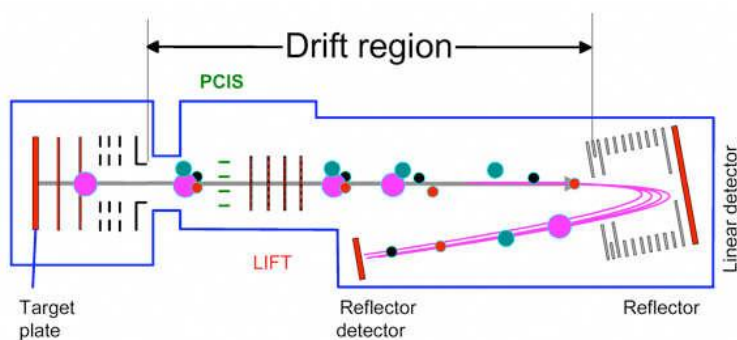
$$\text{potenciálem } V: E_k = \frac{1}{2}mv^2 = zV \quad t = \frac{l}{v} \quad \frac{1}{2}m\frac{l^2}{t^2} = zV \quad m/z = 2V\frac{t^2}{l^2}$$

2.2.4.1. Možnosti zvýšení rozlišení u TOF analyzátoru

Rozlišení lineárního TOF analyzátoru není příliš vysoké (1000 – 3000), proto používáme následující techniky, díky nimž můžeme dosáhnout mnohem vyšší rozlišovací schopnosti (15 000 – 25 000).

Analyzátor doby letu s reflektorem rTOF

Iontové zrcadlo, nebo-li reflekttron má schopnost do určité míry pohlcovat a následně odrážet ionty. Ionty s větší kinetickou energií pronikají, ještě před svým odrazem, hlouběji do odrazového elektrického pole reflekttronu než ionty s nižší kinetickou energií. Tento proces způsobí opoždění iontů s vyšší kinetickou energií oproti iontům s nižší kinetickou energií, čímž dojde k vyrovnání jejich celkových drah. Hloubka průniku iontu do elektrického pole reflekttronu je úměrná pouze jejich hodnotě kinetické energie, nikoliv velikosti m/z [3,4].



Obr. č.9: Schéma analyzátoru doby letu s reflektorem

Opožděná extrakce iontů (Delayed extraction)

Při použití této metody jsou ionty ze zdroje extrahovány s malým zpožděním, což vede díky vzájemným srážkám ke sjednocení E_k .

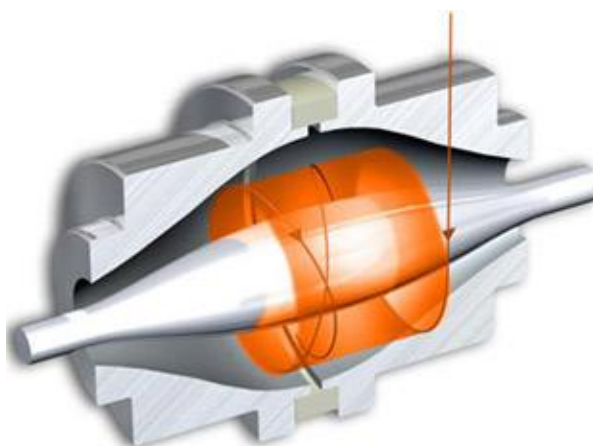
Hybridní analyzátor QqTOF

Jedná se o zařízení, jenž je složeno ze dvou kvadrupólů, spojených s TOF analyzátelem. Hybridní analyzátor nám dává možnost vysokého rozlišení i přesného určení hmoty díky TOF analyzátoru. Druhý kvadrupól q slouží jako kolizní cela.

2.2.6. Orbitrap

Jedná se nejnovější typ hmotnostního analyzátoru, byl popsán ruským fyzikem Makarovem v roce 2005. Frekvence iontů jsou určeny pomocí Fourierovy transformace. Použitím tohoto hmotnostního analyzátoru lze dosáhnout vysoké správnosti určení hmoty (méně než 1 ppm) a vysokého rozlišení (více než 240 000 jednotek).

Tento hmotnostní analyzátor využívá nehomogenní elektrostatické pole, které vzniká mezi speciálně tvarovanými elektrodami (vnitřní vřetenovitá a vnější soudkovitá). V tomto analyzátoru vstupují ionty do elektrostatického pole kolmo na elektrody, což způsobí, že se tyto ionty začnou pohybovat po složitých



Obr. č.10: Schéma tří základních pohybů iontů v orbitrapu

spirálovitých trajektoriích. Tento složitý pohyb lze rozložit na tři základní pohyby. Prvním pohybem, které ionty vykonávají je kruhovitý pohyb kolem centrální elektrody. Druhým pohybem je pohyb iontu vpřed a vzad podél centrální elektrody. Posledním typem pohybu jsou odchylky od kruhového pohybu, způsobené harmonickými oscilacemi iontu v elektrostatickém poli. Frekvence těchto harmonických oscilací totiž

závisí na poměru m/z analyzované sloučeniny $\omega = \sqrt{\frac{k}{m/z}}$ [4,11].

2.2.7. Iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací FT-ICR

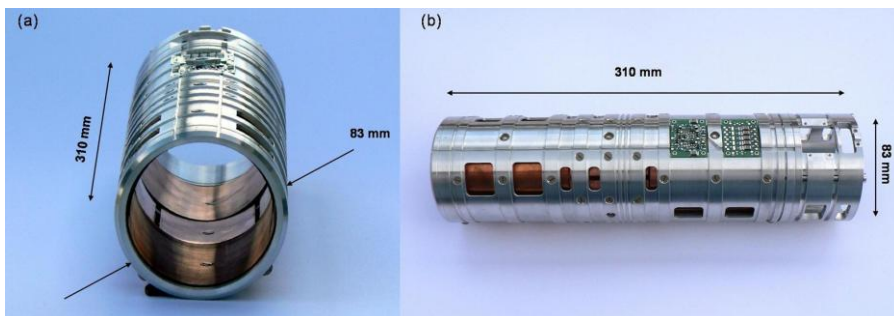
Uvnitř tohoto hmotnostního analyzátoru je potřeba udržovat extrémní podmínky prostředí, kdy se teplota blíží absolutní nule a vakuum odpovídá hodnotám tlaku $10^{-11} - 10^{-10}$ mbar. Cela tohoto hmotnostního analyzátoru je umístěna právě ve vnitřních prostorách homogenního stacionárního magnetického pole supravodivého magnetu, jenž je chlazený kapalným dusíkem nebo heliem. Pokud se iont dostane do velice silného magnetického pole (asi 7 Tesla), začne se působením tohoto pole pohybovat po

cykloidální
trajektorii
s cyklotronovou

frekvencí: $\omega_c = \frac{Bz}{m}$.

Rychlý sken (cca 1
 μ s) přes velký

rozsah frekvencí způsobí simultánní excitaci všech iontů v cyklotronu vysokofrekvenční energií. K disociaci molekul můžeme využít excitaci infračerveným paprskem nebo záchytem elektronu. Jednotlivé analyty lze určit na základě toho, že každá hodnota m/z má charakteristickou cyklotronovou frekvenci. Fourierovou transformací poté z hodnot těchto cyklotronových frekvencí získáme hmotnostní spektrum. Velkou výhodou FT – ICR je obrovské rozlišení ($10^5 - 10^6$ rozlišovacích jednotek), vysoká přesnost až na úrovni sub ppm a vysoká citlivost. Nevýhodou FT – ICR je vysoká cena a potřeba velice výrazného vakuu [4].



Obr. č.11: FT – ICR analyzátor

3. Charakteristika a rozdělení lipidů

Lipidy jsou přírodní látky živočišného i rostlinného původu, které se vyskytují v kapalném i pevném skupenství. Přestože jsou jednotlivé lipidy funkčně i chemicky velice odlišné sloučeniny, jejich společnou charakteristickou vlastností je hydrofobní charakter. Lipidy jsou energeticky velmi bohaté, proto v organismu často slouží jako zdroj a zásoba energie. Různé druhy lipidů však mají i další odlišné funkce. Jsou součástí plazmatických membrán buněk, mají ochranné a termoizolační funkce, ale slouží také k rozpouštění některých biologicky významných látek. Cholesterol, jeden z nejznámějších lipidů steroidní povahy, je převážně součástí plazmatické membrány buněk, zatímco triacylglyceroly, vyskytující se ve formě tukových kapének, plní spíše funkci zásobní [2].

Lipidy lze podle jejich struktury zařadit do několika skupin. Nejzákladnější jsou tzv. jednoduché lipidy. Do této skupiny patří tuky a oleje, které se skládají z esterů glycerolu a vyšších mastných kyselin (např. kyseliny olejové, linolové a palmitové). Dále do této skupiny lipidů patří také tzv. vosky, což jsou estery vyšších alifatických kyselin (nejčastěji laurové, myristové a palmitové) s primárními nebo sekundárními alifatickými alkoholy.

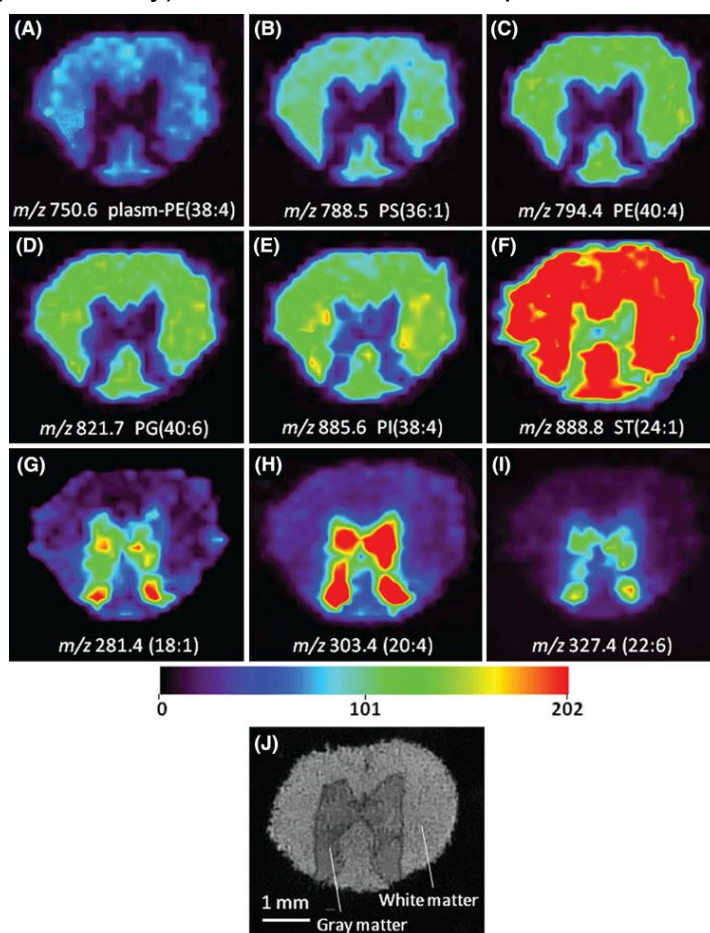
Mezi složené lipidy patří např. fosfolipidy, které jsou základní stavební jednotkou plazmatických membrán. Fosfolipidy jsou tvořeny polární „hlavičkou“, která se skládá z esteru kyseliny fosforečné a cholinu, ale i nepolárními konci, jenž tvoří estery glycerolu nebo sfingosinu s vyššími mastnými kyselinami. Fosfolipidy, jenž mají ve své molekule navázán cholin se nazývají fosfatidylcholin. Lipidy, obsahující dlouhý řetězec s bazickou skupinou a jejichž základem je ceramid (sloučenina obsahující alkohol sfingosin), se nazývají sfingolipidy. Sfingolipidy lze podle další sloučeniny navázané na ceramid rozdělit na sfingomyeliny (obsahují fosforylcholin) a sfingoglykolipidy (obsahují molekuly sacharidů). Podle sacharidu navázaného na sfingoglykolipid můžeme dále rozlišovat tyto látky na cerebrosidy, jenž navíc obsahují molekulu glukózy či galaktózy, nebo sulfamidy (cerebrosidy obsahující zbytek kyseliny sírové). Tyto lipidy se také mohou vyskytovat ve fosforylované podobě nebo s navázanou molekulou aminokyseliny (fosfatidilinositoly, fosfatidilseriny) [2,12].

4. Hmotnostně spektrometrické zobrazování malých molekul

Hmotnostně spektrometrické zobrazování MSI (Mass spectrometry imaging) je vizualizační technika, sloužící k zobrazení molekul na povrchu biologického materiálu. Původně bylo hmotnostně spektrometrické zobrazování používáno při analýze anorganických povrchů, ale i v materiálovém výzkumu. Teprve během posledních patnácti let umožnil technologický vývoj použití MSI ve zdravotnickém výzkumu k analýze povrchů tkání a dalších biologických materiálů [2].

Základní podmínkou pro vizualizaci prostřednictvím MSI je desorpce analyzovaných iontů z povrchu vzorku. Teoreticky lze touto technikou zobrazovat jakékoliv sloučeniny, které je možné z povrchu vzorku desorbovat a převést do plynné fáze. MSI technologie využívá převážně ionizační techniky DESI, MALDI a SIMS (Secondary ion mass spectrometry). Pro hmotnostně spektrometrické

zobrazování malých molekul lze obecně použít jakýkoliv typ hmotnostního analyzátoru, nejčastěji se však používají analyzátory na principu doby letu. MSI kombinuje molekulovou analýzu povrchu vzorku s prostorovým vyobrazením takovým způsobem, že každý pixel ve hmotnostně spektrometrickém zobrazování představuje patřičné hmotnostní spektrum obsahující ionty přítomných sloučenin. Takto získaný obraz je vícerozměrový, avšak vhodné softwarové vybavení nám umožní zobrazit 2D distribuci každé hodnoty m/z hmotnostního spektra v příslušném vzorku. Takto je



Obr.č.12: Zobrazení distribuce jednotlivých lipidů a mastných kyselin při analýze krysí míchy prostřednictvím MALDI-MSI. [2]

možné získat molekulové zobrazení jednotlivých látek a stejně tak jejich rozložení na povrchu vzorku. Zobrazení, znázorňující distribuci jednotlivých iontů ve studovaném řezu, je znázorněno černobílou nebo barevnou stupnicí, kde intenzita barvy vyjadřuje kvantitativní zastoupení daného iontu na povrchu analyzované oblasti [2,13,14].

První ionizační technikou, jenž byla používána při zobrazování molekul prostřednictvím MSI, byla v šedesátých letech minulého století metoda SIMS [1]. Roku 1997 byla při histochemickém vyšetření nádorových proteinů poprvé použita pro MSI zobrazování MALDI technologie [1]. Nejnovější ionizační technikou, jenž také našla své uplatnění při MSI zobrazování, je metoda DESI, která byla vyvinuta teprve v roce 2004 [2].

Hmotnostně spektrometrické zobrazování molekul MSI lze provádět dvěma odlišnými metodami, které se od sebe liší převážně způsobem získávání prostorových informací. První metodou je mikrosondování (microprobe mode nebo také scanning probe) a druhou metodou je tzv. metoda mikroskopická (microscope mode).

4.1. Metoda mikrosondování (Microprobe „Scanning probe“ mode)

Většina hmotnostních spektrometrů operuje v tomto módu, protože je technicky jednodušší. Při této metodě se ionizačním paprskem označují určité velmi malé oblasti na povrchu vzorku, načež jsou molekuly od sebe separovány dle jejich m/z a zaznamenány na detektoru. Hmotnostní spektrum je uloženo a terčík se vzorkem, nebo samotný zdroj laserového paprsku, je posunut tak, aby mohla být ionizačním impulsem označena další lokalizovaná oblast, což vede opět k uvolnění iontů, přítomných v dané oblasti řezu, jejichž hmotnostní spektrum je opět uloženo. A tento proces se neustále opakuje, dokud nejsou změřeny všechny oblasti povrchu vzorku, který potřebujeme zanalyzovat (ROI – Region of interest). Hmotnostně spektrometrické vyobrazení je poté prostřednictvím speciálního softwaru zrekonstruováno ze všech změřených spekter, kdy každé z těchto spekter představuje jednotlivý pixel tohoto zobrazení.

Výhodou této metody je, že je snadno aplikovatelná, dále je kompatibilní se všemi typy hmotnostních analyzátorů a použitelná pro všechny desorpční ionizační techniky. Nevýhodou je, že jakákoliv prostorová informace z vnitřní části lokalizované oblasti ionizace je ztracena. 2D rozlišení je tím pádem omezováno šířkou primárního

ionizačního paprsku (laserového paprsku). U komerčně dodávaných zařízení lze nastavit šířku ionizačního paprsku okolo 10 μm . Při provádění experimentů s těmito zařízeními se však z časových důvodů většinou pracuje se šířkou mezi 50 – 250 μm . Speciální konfokální typy objektivů dokáží snížit šířku paprsku dokonce až do velikosti 1 μm , ovšem u těchto technologií se stále spekuluje o tom, zda-li je použití ionizačního paprsku o tak malém průměru vůbec vhodné pro intaktní analýzu tkáně. Počáteční experimenty poukazovali na to, že použitím těchto úzkých paprsků je možné pořizovat zobrazení malých molekul s poměrně vysokým rozlišením [2,13].

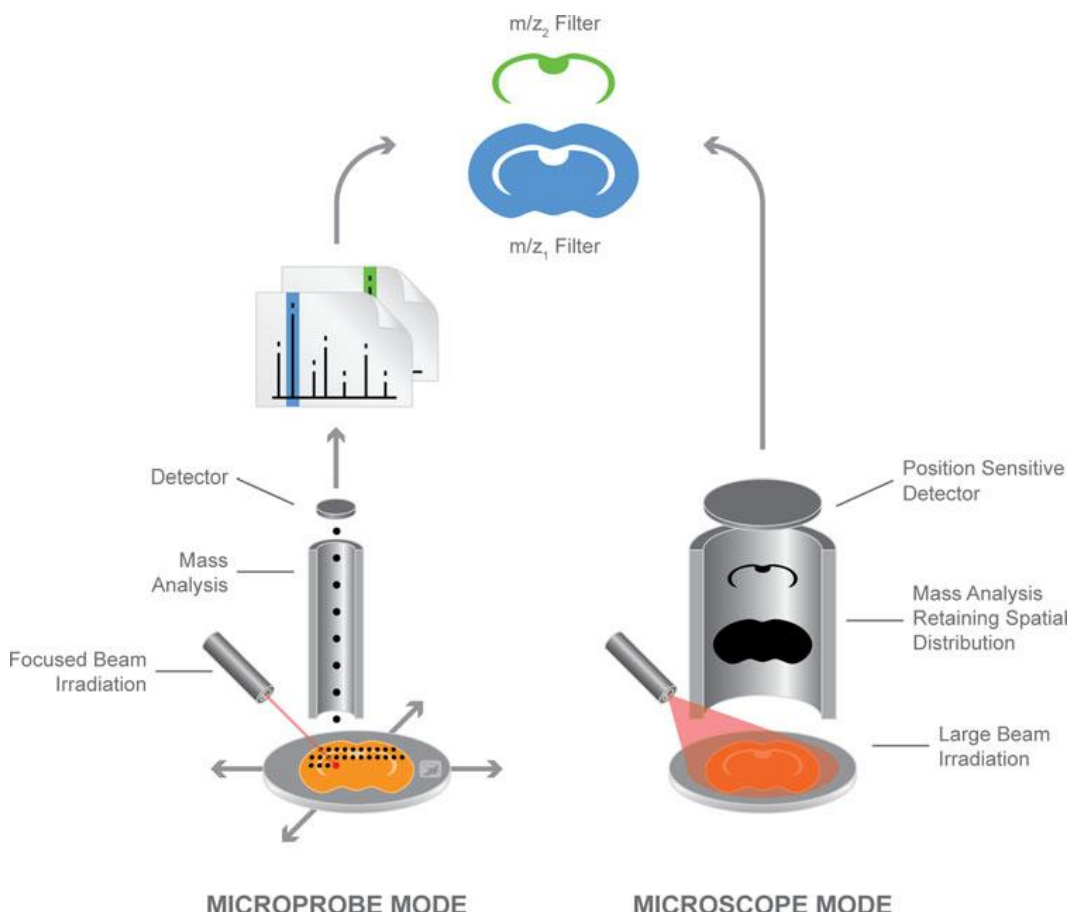
Alternativním způsobem, jak zvýšit prostorové rozlišení při konvenčním použití MALDI–TOF zařízení je tzv. metoda oversampling, která byla uveřejněna Sweedlerovou výzkumnou skupinou [15]. Při této metodě je laserový paprsek posouván o menší vzdálenost, než je jeho samotný průměr. Poté, co byl vzorek poprvé označen ionizačním paprskem, získáváme vlastně s každou další ionizací nové informace z mnohem menší oblasti. Výsledkem tohoto jevu je, že získáváme mnohem vyšší prostorové rozlišení. Nevýhodami této metody je pouze omezené využití při MS/MS tandemové hmotnostní spektrometrii a úplná spotřeba vzorku.

4.2. Metoda mikroskopická (Microscope mode)

Detektory, využívané při mikroskopické metodě, musí být schopné zaznamenat nejen informaci o intenzitě a hodnotě m/z analyzovaného iontu, ale také prostorovou informaci, jenž zobrazuje umístění v osách x , y iontu, narážejícího na tento detektor. Hmotnostně spektrometrické vyobrazení vyšetřovaného řezu se při použití mikroskopické metody projevuje jako sada obrázků, přičemž každý z těchto obrázků nám udává, v jakém množství a v kterých oblastech studovaného řezu je analyzovaný ion o specifické hodnotě m/z přítomen. Výhodou této metody je podstatně vyšší prostorové rozlišení, které není omezeno fokusací primárního ionizačního paprsku. Nevýhodou této metody je potřeba velmi drahé speciální iontové optiky a detektoru, jenž je dostatečně citlivý k tomu, aby byl schopen zpracovávat i prostorovou informaci, týkající se analyzovaných iontů [1,2,13,15].

Tato metoda je dále použitelná pouze v kombinaci s TOF nebo magnetickým sektorovým analyzátozem [2]. Při mikroskopické metodě navíc nelze použít ambientní desorpční ionizační techniky (např. DESI), poněvadž u těchto technik musí ionty

nejprve projít tzv. přítokem atmosférického tlaku (API – Atmospheric pressure inlet), kde dojde k jejich smíchání a tím i ke ztrátě prostorové informace [2].



Obr.č. 13: Schéma metody mikrosondování a mikroskopické

4.3. Rozlišení při MSI

Pod tímto pojmem si v MSI můžeme představit tři různé typy rozlišení. Za prvé můžeme mluvit o schopnosti rozlišit dva píky o podobné hodnotě m/z ve hmotnostním spektru. Toto rozlišení je ovlivněno rozlišovací schopností hmotnostního analyzátoru a jeho hodnota je při použití MSI zobrazování nesmírně důležitá. Druhým typem rozlišení je tzv. 2D povrchové rozlišení, které odpovídá velikosti analyzovaného pixelu na povrchu vzorku. SIMS je jediná MSI ionizační technika, při níž lze dosáhnout velikosti pixelu menší než 1 μm . Obzvláště vysokého 2D rozlišení může být dosaženo při použití mikroskopického módu. Používáme-li MALDI ionizační techniku, je 2D rozlišení ovlivněno zaostřením laserového paprsku, přičemž velikost pixelu se obvykle pohybuje mezi 1 – 100 μm [2,6].

Posledním a nejméně používaným typem rozlišení je rozlišení, týkající se zobrazení ve třetím rozměru. Jelikož MSI nelze za normálních podmínek provádět ve 3D (Výjimkou jsou některé studie, týkající se dynamické SIMS technologie.), je proces získávání 3D vyobrazení založen na přestavbě několika po sobě následujících „plátků“ vzorku, které byly oříznuty a jednotlivě vyobrazeny ve 2D zobrazení. 3D zobrazení je tedy závislé na tloušťce tohoto plátku.

4.4. MSI Ionizační techniky

4.4.1. SIMS–MSI (Secondary ion mass spectrometry)

Tato technologie má velmi dlouhou historii a dodnes se používá v mnoha vědeckých i technologických disciplínách. Při této metodě dochází k nárazu svazku primárních iontů o energii 1 – 30 keV s povrchem analyzovaného vzorku, což vede k ionizaci povrchových molekul a následné tvorbě tzv. sekundárních iontů., pronikajících do hmotnostního analyzátoru.

SIMS technologie se dle intenzity primárních iontů dělí do dvou kategorií. První z nich je tzv. statická SIMS, při níž se používá primárních iontů s nižší intenzitou ($< 10^{13}$ iontů/cm²). Tato technika je nedestruktivní a způsobuje minimální poškození vzorku. Naopak při dynamické SIMS technologii se využívá velmi intenzivních paprsků primárních iontů ($>10^{13}$ iontů/cm²), které mohou vést k povrchovému rozprašování i poškození vzorku, ale také umožňují profilování vzorku do hloubky od několika nanometrů až po několik set mikrometrů. Obě techniky, jak statická tak i dynamická SIMS, mohou být využity při MSI zobrazování, avšak statická SIMS poskytuje kvalitnější prostorové rozlišení [1,2,13,16].

Ionizační technologie SIMS je v analýze aplikována již od druhé poloviny minulého století a sloužila převážně k analýze povrchů anorganických materiálů [2]. S použitím klasické SIMS lze tedy ve hmotnostním spektru zaznamenat veličiny m/z analyzovaných molekul pouze do hodnoty 1000, což není zrovna pro analýzu biologických vzorků úplně vhodné. Z tohoto důvodu bylo od roku 1997 pracováno na nových alternativách SIMS, s jejímž použitím by bylo možné analyzovat i molekuly o m/z vyšším než 1000. Mezi technologiemi, umožňujícími analýzu molekul s vyššími hodnotami m/z , mohou být zmíněny např. ME–SIMS (Matrix enhanced secondary ionization mass spectrometry) a Met–SIMS (Metal assisted secondary ionization mass spectrometry)[1].

Výhodou ME–SIMS je, že opotřebovává povrch analyzovaného materiálu méně než laserově desorpční ionizační techniky (např. MALDI). To je také důvodem toho, proč lze tutéž tkáň po použití ME–SIMS znovu zobrazit prostřednictvím MALDI ionizační techniky. Následující znovu zobrazování stejného vzorku tkáně prostřednictvím ME–SIMS a MALDI je základem tzv. multi–modálního hmotnostně spektrometrického zobrazovacího protokolu (multi–modal mass spectrometry imaging protocol), který byl vyvinut roku 2010 v AMOLF institutu. Tato metoda je relativně drahá a časově náročná, ale umožňuje nám získávat opravdu obrovské množství informací ohledně složení molekul na analyzovaném povrchu [1].

Například prostřednictvím ME–SIMS vyobrazení s elektrosprejováním 2,5-dyhydroxybenzoovou kyselinou je možné při analýze neuroblastomů zobrazit přesné složení sfingomyelinu a fosfatidilcholinu na buněčné úrovni [2]. Dalším příkladem využití této technologie je například vizualizace mitotického vřeténka z lidských glioblastických nádorových buněk prostřednictvím SIMS–MSI [2]. SIMS technologie je také velmi dobře využitelná při analýze anorganických iontů, např. při vyšetřování změn koncentrace Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^{+} a Na^{+} iontů v průběhu ischemie tkání [2].

4.4.1.1. Povrchová úprava vzorku pro Met–SIMS a ME–SIMS imaging

Při Met–SIMS analýze je na povrch vzorku nanесena velmi tenká vrstva kovu (např. zlata) o šířce 1 – 5 nm. Tato kovová vrstva může být na povrch vzorku snadno a opakovaně aplikována prostřednictvím tzv. plazmových nastřikovačů (plasma sputter coaters). ME–SIMS technika využívá při ionizaci organickou MALDI matrici, která se nanáší na povrch vzorku. Použitím ME–SIMS technologie lze analyzovat i sloučeniny, jejichž poměr m/z dosahuje hodnot kolem 2000 jednotek. Nanášení matrice je při této metodě velice důležitým přípravným úkonem, poněvadž velikost krystalu matrice má velký vliv na prostorové rozlišení [1]. Nanášení matrice na povrch vzorku lze při ME–SIMS provádět stejnými způsoby jako u MALDI techniky viz. níže.

4.4.2. MALDI–MSI (Matrix assisted laser desorption ionization)

První měkké ionizační techniky za použití laseru LDI byly uvedeny v 80. letech minulého století [2]. Analyzovaná sloučenina je při použití MALDI technologie smíchána s maticí (obvykle aromatickou kyselinou), jenž absorbuje energii primárního UV laseru a ionizuje molekuly analytu. Jelikož se jedná o pulzní ionizační

metodu, používáme při MALDI–MSI většinou TOF analyzátory, ať už v základním TOF provedení nebo v tandemovém uspořádání např. TOF/TOF nebo QqTOF. Lze však použít i Orbitrap nebo FT–ICR hmotnostní analyzátor, poněvadž tyto analyzátory vykazují velmi dobré hmotnostní rozlišení a umožňují měření s vysokou správností hodnot m/z [6,15].

MALDI–MSI se většinou využívá ke studiu úzkých tkáňových řezů s průřezem menším než 15 μm . Postranní (laterální) rozlišení při tomto zobrazování se pohybuje okolo 25 – 100 μm a závisí na šířce použitého laserového paprsku. Jednou z variant této technologie je AP–MALDI (Atmospheric pressure matrix assisted laser desorption ionization). AP–MALDI je jemnější ionizační metodou než klasická MALDI a ionizované molekuly při této metodě méně podléhají fragmentaci. Oproti vakuovému MALDI vykazuje hoší citlivost[2,6].

4.4.2.1. Příprava vzorků pro MALDI zobrazování

Příprava vzorku je pro MALDI–MSI klíčovou operací, přičemž všechny kroky tohoto děje musí být provedeny velmi pečlivě, aby nedošlo k porušení tkáňové integrity. Postup přípravy vzorku pro MALDI–MSI zahrnuje několik po sobě následujících operací, mezi něž patří získání i skladování tkáně, provádění řezů, převedení vzorku na MALDI destičku a nanesení vhodné matrice.

Vzorek obvykle získáváme vyříznutím zkoumané tkáně nebo biopticky. Po vyjmutí je vzorek tkáně okamžitě zabalen do hliníkové fólie a prudce ochlazen ponořením do kapalného dusíku po dobu 30 – 60 sekund. Během tohoto procesu je zapotřebí co nejvíce minimalizovat přímý kontakt tkáně s kapalným dusíkem, abychom zabránili případnému poškození tkáně, či rozložení nebo rozpuštění některých analytů.

Po zmražení v kapalném dusíku jsou tkáně uskladněny v mrazícím boxu při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Uvádí se, že po jednom roce skladování vzorků v mrazícím boxu začíná docházet k prvnímu rozkladu proteinů a peptidů. Vzorky, které byly uskladněny v roztoku formaldehydu (formalín) mohou být také použity pro analýzu proteinů, avšak nikoliv pro analýzu lipidů, poněvadž po formalínové fixaci je tkáň inkubována při zvýšených koncentracích alkoholů a xylenu ve směsi [1,2,6,13,15].

MSI umožňuje pouze analýzu plochých vzorků. Tkáně jsou proto nařezány kryomikrotomem na 10 – 20 μm plátky, s jehož použitím lze buňky „krájet otevřeně“ a

tím pádem zobrazovat jejich intracelulární složení. Dalším parametrem, který má vliv nejen na přesné krájení plátků tkáně, ale i na získávání nepoškozených plátků je teplota kryomikrotomu. Základním pravidlem je, že tučné tkáně vyžadují nižší teploty nežli tkáně s vyšším obsahem vody, každá tkáň je však jedinečná a potřebuje trochu jiný přístup [2].

Přenos tkáně na MALDI destičku může být proveden několika různými způsoby. Obvyklým způsobem se využívá přilnutí plátků tkáně k vodivému mikroskopickému sklíčku, pokrytému vrstvou oxidu India a cínu (ITO Indium – tin oxide), jenž zajišťují jeho vodivost. Jiný způsob využívá skleněných kuliček, zapuštěných v parafilmu k napnutí rozprostřeného plátku tkáně, což vede ke zvýšení prostorového rozlišení při MSI i k intenzivnější extrakci analytu z povrchu vzorku [1].

Před samotnou aplikací matrice musí být někdy vzorky vystaveny dalším úpravám, jako je např. promývání nebo enzymatický rozklad. Při analýze proteinů je nutné zbavit se lipidů použitím výrazně nepolárních rozpouštědel, poněvadž přítomnost lipidů snižuje potlačováním tvorby jiných iontů intenzitu proteinových signálů. Organické soli vymýváme ze vzorku polárními rozpouštědly. Lipidy a další malé molekuly jsou analyzovány přímo z tkáně bez nutnosti jakékoliv další úpravy [15].

Jako matrice při MALDI – MSI se využívají organické kyseliny rozpuštěné ve vhodných organických rozpouštědlech, vodě případně jejich směsi, přičemž je roztok matrice rovnoměrně nanesen na povrch vzorku. Způsobů, jakými lze nanášet matrici na povrch vzorku, bylo vyvinuto opravdu mnoho (viz níže). Směs matrice musí být schopná nejen oddělit molekuly analytu od povrchu tkáně, ale musí s analytem i úspěšně kokrystalizovat, aniž by došlo k narušení prostorového uspořádání molekul. Tato směs nesmí reagovat s analyty a měla by vykazovat pouze nízké sublimační schopnosti [1,2].

Matrice je obvykle nanášena v cyklech s opakovaným zvlhčováním a vysoušením, přičemž je velmi důležité, aby nedošlo k převlhčení vzorku. Vrstva matrice musí být nanesena takovým způsobem, aby byla na povrchu vzorku co nejvíce homogenní. Jinak by totiž na povrchu vzorku mohlo docházet k lokálním odchylkám v ionizaci a desorpci. Různé vlivy prostředí, jako např. vlhkost nebo přítomnost kyslíku, mohou během nanášení matrice také vést ke snížení interakce mezi analytem a matricí [2].

V MALDI–MSI se používá několik různých maticí. Mezi nejpoužívanější patří kyselina α -kyano-4-hydroxyskořicová (CHCA), 2,6-dihydroxyacetofenon (DHA) a kyselina 2,5-dihydroxybenzoová (DHB). Výběr matrice závisí na vlastnostech analytu. CHCA se většinou používá pro analýzu vysokomolekulárních sloučenin jako jsou například proteiny, zatímco DHB pro analýzu nízkomolekulárních sloučenin, např. lipidů. Velikost matricových krystalů velmi výrazně ovlivňuje prostorové uspořádání molekul a je důležité optimalizovat tento parametr během nanášení matrice [2,15].

4.4.2.2. Metody nanášení matrice pro MALDI imaging

Metoda sušené kapky (Dried – droplet method)

Roztok matrice je na povrch vzorku aplikován manuálně použitím pipety. Tato metoda je rychlá a jednoduchá, skvěle se hodí k profilování vzorku, ale není moc vhodná za účelem zobrazování. Rozptylem kapiček totiž může docházet k nerovnoměrnému rozptýlení matricových krystalů.

Vzdušné zmlžování (Pneumatic nebulization)

Při této metodě je roztok matrice rozprašen na povrchu vzorku ručním tenkovrstvým chromatografickým rozstřikovačem nebo airbrushem. Jemný sprej umožňuje vytvořit homogenní vrstvu matricových krystalů na povrchu krystalů.

Chemickým tiskem (Chemical inkjet printer)

Malé kapičky matrice jsou aplikovány na povrch vzorku současně s piezoelektrickými kapičkami tiskařského zařízení. Touto metodou lze nanášet na jednu analyzovanou oblast během jednoho vyšetřovacího cyklu velmi malé objemy roztoku (až 100 pl). Při této metodě se využívají propracovaná zařízení firmy Shimadzu, Labcyte a Aerni. Nanášení roztoku matrice touto metodou je velmi precizní a kapičky se udržují celistvé. Kvůli velikosti kapiček je vhodnější pro nižší prostorové rozlišení MSI.

Automatizovaný vibrační sprejový nanášec (Automated vibrational spray coater)

Toto komerčně dodávané zařízení je určeno pouze pro MALDI imaging. Vytváří na povrchu vzorku homogenní matricovou vrstvu, obsahující velmi malé krystaly a operuje v uzavřeném systému. Velikost kapiček, jenž ovlivňuje povrchovou difúzi i délku interakce mezi analyty a matricí, lze při této metodě nastavit takovým způsobem, abychom dosáhli maximální kokrystalizace.

Sublimací matrice (Matrix sublimation)

Matrice je umístěna v pevném skupenství na spodní část kondenzátoru a vzorek je spojen ke kondenzátoru s dvoustrannou tepelně vodivou páskou, která vede směrem k matrici. Sublimace probíhá pod nízkým tlakem a vysokou teplotou (obvykle 125 °C), přičemž tyto podmínky umožňují kondenzaci matrice na chladném povrchu vzorku. Tato metoda se vyznačuje čistotou aplikované matrice na povrch vzorku, malou velikostí krystalů a jejich rovnoměrným rozložením.

Suché nanášení (Dry – coating)

Jemně nadrcená pevná matrice je filtrována přímo na povrch tkáně skrz 20 µm síto. Tato metoda je vhodná pro rychlou i opakovatelnou aplikaci matrice při analýze lipidů. Mechanismus suchého nanášení se podobá sublimační metodě, difúze molekul na povrchu vzorku je taktéž vzhledem k absenci rozpouštědla omezená.

4.4.2.3. MALDI zobrazování lipidů

Současné MALDI–MSI experimenty jsou zaměřeny převážně na studium funkce lipidů v biochemických procesech. Příprava vzorků pro zobrazování lipidů je jednodušší než příprava vzorků pro zobrazování proteinů, protože se vzhledem k jejich vysokému zastoupení v biologických tkáních většinou obejde bez promývání vzorku a jiných zakoncentrovávacích procesů.

Lipidy mohou být měřeny v režimu snímání kladně i záporně nabitých iontů. Zatímco pro fosfatidylcholíny (PCs), sfingomyeliny (SMs) a steroidní sloučeniny měříme spíše kladně nabitě ionty, pro fosfatidylinositoly, fosfatidylseriny a sulfatidy využíváme převážně negativní mód ionizace. Fosfatidylethanolamíny (PEs) mohou

být zaznamenány v obou módech. U fosfolipidů je tvorba intenzivních záporně nabitých iontů zapříčiněna z velké části fosfodiesterovým podílem na struktuře molekuly, který může v plynné fázi existovat jako velice stabilní anion, obzvláště u kyselých fosfolipidů jako jsou například PI, PG a PS. Ostatní lipidy, jako např. sfingomyelin (fosfodiester), sulfatidy (estery kyseliny sírové) a bakteriální lipidy odvozené od lipidu A (estery fosfátů) produkují poměrně intenzivní molekulární anionty $[M-H]^-$. U některých polyfosfátových esterů je možné zaznamenat dvakrát nabitý ion $[M-2H]^{2-}$ [12].

Hmotnostní spektra lipidů jsou poměrně komplikovaná, přičemž obvykle zobrazují protonované molekuly doprovázené sodnými a draselnými adukty (případně deprotonované molekuly při použití opačné polarizace). Některé typy fosfolipidů, jako např. fosfatidylethanolamíny (PE), fosfatidilseriny (PS) nebo fosfatidilinositoly (PI), vykazují naopak úplnou absenci komplexů $[M+H]^+$ i alkalických aduktů.

Za účelem snížení počtu píků ve hmotnostním spektru, náležitým jednoduše stejnému druhu lipidové sloučeniny, ale i ke zvýšení citlivosti a redukci píkového přesahu, se do roztoku matrice přidává octan draselný nebo chlorid lithný. Identifikace lipidů ve hmotnostně spektrometrickém zobrazování obvykle vyžaduje vysoké hmotnostní rozlišení i správnost určení hodnoty m/z na základě čehož lze určit elementární složení analyzované sloučeniny. Množství potenciálních elementárních složení je velice významně redukováno zvyšující se správností určení hodnot m/z . Z tohoto důvodu mohou vysoce výkonné hmotnostní spektrometry s vyšším rozlišením velmi účinně oddělit potencionálně interferující molekuly, což vede k výrazně přesnější identifikaci analyzovaného lipidu [2,12].

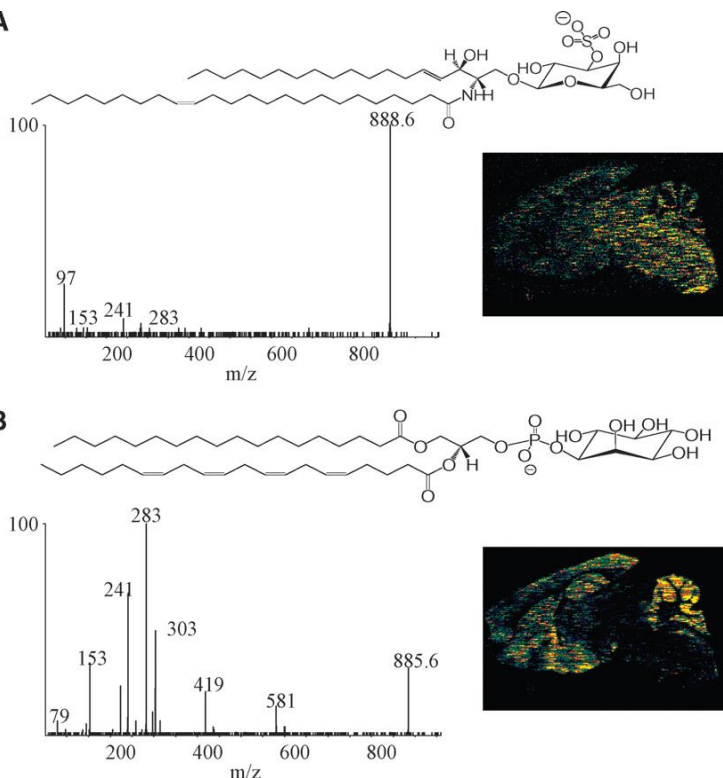
Sumární vzorec je poté dohledán v lipidové databázi (např. Lipidmaps). Tato databáze obsahuje seznam všech lipidových izomerů se stejným sumárním vzorcem. Obvykle patří jednotlivé izomery do stejné třídy lipidů a liší se od sebe různými kombinacemi mastných kyselin nebo různými pozicemi dvojných vazeb na nenasycených uhlíkových řetězcích. Potřebujeme-li získat více informací týkajících se struktury analyzovaného lipidu, je nutné provést fragmentaci iontu tandemovou hmotnostní spektrometrií.

Při první fragmentaci odhalíme přítomnost iontů molekul, z kterých se skládali hlavní komponenty lipidové molekuly (hlavní skupina – např. fosfocholin a

řetězce vyšších mastných kyselin). Jestliže je intenzita fragmentových iontů dostatečná, může být provedena další fragmentace. Tímto způsobem lze např. odhalit pozici dvojné vazby. Využití CID při identifikaci lipidů může být znázorněno při detekci dvou odlišných lipidů (v podobě záporně nabitých iontů), přítomných v myším mozečku (*cerebellum*).

Ve hmotnostním spektru vidíme ion o poměru m/z 888,6, který poskytuje výrazně odlišný signál v bílé a

šedé hmotě mozečku (viz. obr. č.14). Při CID tohoto iontu byl zaznamenán produkt iontové kolize o poměru m/z 97, což odpovídá sulfonové skupině HSO_3^- , jenž je charakteristická pro sfingolipidy ze skupiny sulfatidů. Tyto sloučeniny byly identifikovány na základě přesného hmotnostně spektrometrického měření a výrazné podobnosti pozorované na CID hmotnostním spektru k již publikovaným $[\text{M}-\text{H}]^-$ iontům 18:0/24:1 sulfatidům. Dalším



Obr. č. 14: MALDI – MSI zobrazení negativních iontů a CID spektra ze sagitální oblasti myšího mozečku: A) CID spektrum iontu o m/z 888,6 $[\text{d18:0/24:1-ST-H}]^-$, B) CID spektrum iontu o m/z 885,6 $[\text{18:0a/20:4-PI-H}]^-$ [12]

významným negativním iontem, který byl zaznamenán při CID hmotnostně spektrometrické analýze myšího mozečku je ion o poměru m/z 885,6. Tento ion produkoval při kolizní aktivaci fragmentové ionty o poměru m/z 303, 283 a 241, což jsou ionty, jejichž prostřednictvím lze při CID identifikovat sloučeninu fosfoinositolů 18:0a/20:4 – PI [12].

Zajímavým objevem této analýzy je, že co se týče prostorového rozmístění těchto sloučenin, tak fosfoinositoly vykazují mnohem vyšší intenzitu v šedé kůře myšího mozečku, kdežto v případě sfingolipidů se sulfonovými skupinami je tomu přesně naopak. Další možností pro získání více informací je mikrodisekce vzorku

tkáně z analyzované oblasti, její rozpuštění a provedení standardní analýzy LC – MS. Výsledky LC–MS analýzy jsou poté porovnány s výsledky MSI.

Využití MALDI–MSI k přesnému kvantitativnímu stanovení lipidů je zatím poněkud problematické, poněvadž intenzita signálu záleží nejen na koncentraci lipidů a jejich aduktů, ale i na vyšetřované oblasti analyzované tkáně a na různé tendenci tvorby iontů, která závisí na tom, jakou použijeme matici.

V důsledku vysokého počtu vodíkových atomů, které tvoří acylové řetězce esterifikovaných mastných kyselin, je u lipidů pozorován relativně vysoký hmotnostní úbytek. Často zaznamenávaným fosfolipidem při analýze tkání bývá sloučenina 16:0/18:1-PC, tvořící komplex $[M+H]^+$ o hodnotě m/z 760,5860, jejíž elementární složení lze vyjádřit vzorcem $C_{42}H_{83}NO_8P$. Jelikož tato sloučenina obsahuje 83 atomů vodíků, přičemž každý tento atom přispívá k celkové molekulové hmotnosti 1,007825 Da, pak těchto 83 atomů vodíků přispívá k celkové molekulové hmotnosti 83,6494 Da. Relativně vysoká intenzita iontu m/z 761,5895 (izotopu M+1) dosahující přes 47% je zapříčiněna přítomností 42 atomů uhlíku (izotop ^{13}C) [12].

4.4.2.4. MALDI zobrazování metabolitů, léčiv a dalších malých molekul

Metabolomika se zabývá kvalitativními i kvantitativními změnami nízkomolekulárních sloučenin v organismu, které mají vliv na fyziologické procesy organismu. Původ jednotlivých metabolitů v organismu může být endogenní (jejich syntéza probíhá v organismu) nebo exogenní (léčiva, potrava). Analyzování hladin koncentrací a prostorového zastoupení obou těchto skupin v tkáních je důležitou součástí všech farmakologických a toxikologických studií [2,15].

Hlavním problémem MALDI analýzy nízkomolekulárních sloučenin je, že může dojít k interferenci s MALDI maticí. V některých případech může být analyzovaná sloučenina od sloučenin matrice izolována použitím tandemové MS nebo hmotnostních analyzátorů s vysokým rozlišením. Další možností je použití LDI ionizačních technik, při nichž se na povrch vzorku nenanášá matrice.

MALDI–MSI techniky byly a jsou stále aplikovány v nejrůznějších farmakologických studiích, např. při analýze olanzapinu a jeho metabolitů i protinádorového léčiva vinblastinu v celém krysím těle [2]. Jiné výzkumy využívající tuto technologii byly zaměřeny na analýzu antipsychotického léku klopazinu,

protinádorového léku SCH 226374 a chlorisondiaminu v jednotlivých tkáňových řezech krysího mozku nebo inhibitorů HIV proteázy na kultuře Mono Mac 6 buněk [2].

4.4.2.5. Další LDI ionizační techniky

Kromě MALDI se používá také mnoho nejrůznějších LDI technik, např. SALDI (Surface assisted laser desorption ionization), NALDI (Nano assisted laser desorption ionization), ELDI (Electrospray assisted laser desorption ionization) nebo DIOS (Desorption ionization on porous silicon). Mechanismus ELDI vychází z kombinace mechanismů dvou ionizačních technik MALDI a ESI. Nejprve je analyt desorbován prostřednictvím laserového paprsku (IR, ale většinou UV záření) z povrchu vzorku. Tímto procesem vznikají plynné ionty analytu, které se dále spojují s nabitými kapičkami rozpouštědla uvolňovanými z ESI spreje, což vede k ion-molekulárním interakcím mezi částečně ionizovanými molekulami analytu a nabitými molekulami přítomných v rozpouštědle. Tuto ionizační technologii lze při analýze některých biologických vzorků použít i bez jakýchkoliv předchozích úprav (např. mléko, krev, sliny, bakteriální kolonie ad.) [4,17].

U SALDI, NALDI i DIOS je laserové záření absorbováno nanostrukturovanými povrchy LDI destičky. Přidání aditivních sloučenin se specifickými funkčními skupinami může dále vést k selektivní detekci analyzovaných sloučenin z komplexních směsí. Přidáním nanostrukturovaných anorganických materiálů s hydrofobní organickou vrstvou, umístěnou na povrchu vzorku, lze například dosáhnout selektivní detekce lipidů. DIOS technika využívá k absorpci energie laserového paprsku porézní křemíkový substrát. Následně jsou molekuly analytu na povrchu vzorku ionizovány, aniž by docházelo k výraznějším fragmentacím. Jelikož při této metodě nepoužíváme žádnou matici, dosahujeme při analýze nízkomolekulárních sloučenin prostřednictvím DIOS nízkého chemického šumu a vysoké citlivosti [17,18].

NIMS (nanostructure–initiator mass spectrometry) byla vyvinuta z DIOS technologie, přičemž na rozdíl od DIOS využívá kapalný iniciátor pro usnadnění procesu desorpce analyzované sloučeniny z povrchu vzorku, což vede k vyšší ionizační efektivitě. NIMS iniciátory se od MALDI matric liší převážně tím, že neabsorbují energii UV záření, většinou neionizují a nekokrystalizují s molekulami analytu. Během NIMS desorpce absorbuje vrstva porézního křemíku energii UV

záření laserového paprsku, což vede k výraznému zahřátí povrchu vzorku, odpaření přilnutého iniciátoru a k samotné desorpční ionizaci. Výsledky NIMS analýzy jsou srovnatelné s výsledky MALDI – MS, ovšem během NIMS analýzy není potřeba provádět časově velice náročné úkony související s přípravou a nanášením matrice, přičemž i samotná hmotnostní spektra jsou méně komplikovaná. Během NIMS ionizace nedochází k fragmentaci iontů. NIMS povrchy na bázi křemíku ještě nejsou komerčně dostupné, ale jsou relativně snadné na přípravu. Vynikajících výsledků při přímé analýze metabolitů i biotekutin prostřednictvím NIMS lze dosáhnout tzv. Z-touch metodou, při které je vzorek opakovaně nanášen a odstraňován z křemíkového povrchu [19].

4.4.3. DESI – MSI

DESI je nejnovější ionizační technologií, která byla poprvé uvedena v roce 2004. Jedná se o technologii, která vyvolala obrovský zájem o ambientní DI–MS techniky, jenž umožňují přímou analýzu povrchu vzorků v laboratoři, či přirozeném prostředí bez předchozích úprav. Při použití této ionizační techniky je sprejovaná kapalina (např.: směs vody a methanolu v poměru 1:1) aplikována na analyzovaný povrch vzorku pod určitým úhlem (většinou 50°) a z určité vzdálenosti (obvykle 5 mm). Geometrické parametry a vlastní parametry elektrospreje mají velký vliv na průběh desorpce i tvorbu iontů [1,2,7].

Principem této technologie je jev, při kterém interakcí iontů vzniklých sprejováním s povrchem dochází k desorpci analyzovaných iontů, které jsou následně vedeny do hmotnostního analyzátoru.

DESI může být použita k analýze pevných a kapalných vzorků se zaměřením jak na analýzu malých molekul, tak i vysokomolekulárních sloučenin. Mezi nejvíce využívané hmotnostní analyzátory pro DESI experimenty patří vzhledem ke své robustnosti iontová past. Velmi účinná je i kombinace DESI ionizace s FT–ICR hmotnostním analyzátozem. DESI hmotnostní spektra se v mnohém podobají ESI spektrům. Stejně tak jako v ESI spektrech, mohou být v DESI spektrech obsaženy několikanásobně nabitě ionty [14].

DESI–MSI zobrazování bylo již využito např. při analýze příčných řezů krysí míchy, krysího mozku, nádorových tkání atd. Zajímavá aplikace DESI byla uveřejněna Kerteszem a van Berkelem, kteří prostřednictvím této technologie

dokázali velice rychle vizualizovat lokalizaci propranololu v histologických řezech celého myšího organismu [2]. Nevýhodou DESI je nízké 2D rozlišení, odpovídající zhruba 100 – 250 μm .

4.5. Zpracování dat

Zpracování dat je společně s předchozími úkony nedílnou součástí MSI zobrazování. S ohledem na použité rozlišení, jak prostorové tak i hmotnostní, vyprodukuje každý MSI experiment několik gigabytů dat. Veškeré procesy týkající se zpracování experimentálních dat jako např. obrazová rekonstrukce, statistická analýza nebo archivace vyžadují velice výkonné počítače s vysokou paměťovou kapacitou [2,13].

Zatímco vlastní datové formáty, vyvinuté výrobci, jsou paměťově funkční, jejich těsný instrumentálně softwarový vztah představuje velký problém ve výměně a sdílení dat. Pro překonání tohoto omezení byl společností COMPUTIS vyvinut specifický MSI formát imzML. Výsledky všech MSI analýz jsou ukládány v imzML formátu, který se skládá ze dvou oddělených souborů. Jedním z nejpoužívanějších softwarů pro zpracovávání MSI dat je program Biomap.

5. Závěr

Současné výzkumy, zabývající se instrumentací i samotnými přípravami vzorků pro MALDI–MSI a SIMS–MSI, vedou k výraznému zdokonalení citlivosti, prostorového rozlišení a identifikačních schopností. Díky prostorovému zobrazování můžeme mnohem lépe porozumět vzniku nádoru v jednotlivých tkáních a fyziologii jednotlivých orgánů. MALDI–MSI se ukázala jako velice účinná technika, užitečná obzvláště při odhalování široké škály lipidů přítomných uvnitř tkání.

Využití MS při zobrazování malých molekul patří mezi nejvíce rozvíjející se techniky instrumentální analýzy. Pomocí MSI bude v blízké budoucnosti možné sledovat růst a tvorbu biofilmů, což umožní vyvíjet efektivnější léčiva proti bakteriálním infekcím. Díky intenzivnímu vývoji dnes nachází DESI–MSI uplatnění například v daktyloskopii. V posledních letech dochází k velice usilovnému rozvoji rutinních metod přípravy vzorků pro MSI ve farmaceutickém a zdravotnickém studiu.

V současnosti je největším problémem MSI vytvořit model, s jehož prostřednictvím by bylo možné získat přesné kvalitativní a hlavně kvantitativní informace o analyzované sloučenině. Příčinou tohoto problému je odlišný signál téhož analytu při použití různých matric, jiného zařízení nebo použitím odlišné metody přípravy vzorku. Předpokládá se, že lepší mechanické porozumění odlišnosti odpovědi téhož analytu a vnitřního standartu v biologických vzorcích by mohlo tento problém odstranit, a tím výrazně přispět k získávání přesných kvantitativních informací. Lepší porozumění MALDI mechanismu by mohlo být využito také k syntéze kvalitnějších matric. Prostřednictvím těchto studií mohou být objeveny takové matrice, které by specificky kokrystalizovaly pouze s určitou skupinou molekul.

Ke studiu biotekutin a tkání jsou dnes také často využívány LDI a nanostrukturované ionizační techniky, které v posledních letech také zaznamenaly velký pokrok. Tyto techniky jsou výhodné díky tomu, že není potřeba matrice, způsobují minimální fragmentaci analytů a jsou vysoce citlivé. Na kvalitě hmotnostně spektrometrického zobrazování se velmi významně podílí velikost rozlišení hmotnostního analyzátoru. Proto i díky vývoji a zdokonalování hmotnostních analyzátorů o velmi vysokém rozlišení, jako je Orbitrap nebo FT–ICR (více než 100 000 Da) je možné pořizovat i mnohem kvalitnější MSI zobrazení.

Využitím MSI zobrazování společně s dalšími standardními klinickými zobrazovacími zařízeními (jako např. MRI, PET a CT) by bylo možné získávat chemicky specifickou a přesnou prostorovou informaci.

6. Seznam použité literatury

1. E. R. Amstalden van Hove, D. F. Smith, R. M. A. Heeren; A concise review of mass spectrometry imaging; *Journal of chromatography A* (2010); 1217; 3946–3954.
2. J. Pól, M. Strohalm, V. Havlíček, M. Volný; Molecular mass spectrometry imaging in biomedical and life science research; *Histochem cell biol* (2010); 134; 423–443.
3. <http://holcapek.upce.cz/vyuka-ms-org-anal.php>
4. J. Kozic; Diplomová práce: Identifikace metabolitů antihelmintik s využitím UHPLC/MS/MS (2011).
5. M. Haapala, J. Pól, V. Saarela, V. Arvola, T. Kotiaho, R. A. Ketola, S. Franssila, T. J. Kauppila, R. Kostianen; Desorption atmospheric pressure photoionization (2007); *Anal. Chem.*; 79; 7867–7872.
6. J. A. van Kampen, P. C. Burgers, R. de Groot, R. A. Gruters, T. M. Luiders; Biomedical application of Maldi mass spectrometry for small molecule analysis; *Mass spectrometry reviews* (2011); 30; 101–120.
7. V. Ranc, V. Havlíček, P. Bednář, K. Lemr; Desorpční elektrosprej; Moderní metoda analýzy organických povrchů; *Chemické listy* (2007); 101; 524–529.
8. A. Venter, M. Nefliu, R. G. Cooks; Ambient desorption ionization mass spectrometry (2008)
9. D. J. Weston; Ambient ionization mass spectrometry: current understanding of mechanistic theory; analytical performance and applications areas (2010); *Analyst*; 135; 661 – 668.

10. R. M. Alberici, R. C. Simas, G. B. Sanvido, W. Romao, P. M. Lalli, M. Bennasi, I. B. S. Cunha, M. N. Eberlin; Ambient mass spectrometry: bringing MS into the real world (2010); *Anal. Bioanal. Chem.*; 398; 265 – 294.
11. Q. Hu, R. J. Noll, H. Li, A. Makarov, M. Hardman, R. G. Cooks; The Orbitrap: a new mass spectrometer (2005); *J. Mass spectrom.*; 40; 430 – 443.
12. R. C. Murphy, J. A. Hankin, R. M. Barkley; Imaging of lipid species by MALDI mass spectrometry (2009); *Journal of lipid research*; 50; S317–S322.
13. A. Svatoš; Mass spectrometry imaging of small molecules; *Trends in biotechnology*; 28; 425–434.
14. V. Vidová, M. Volný, K. Lemr, V. Havlíček; Surface analysis by imaging mass spectrometry; *Collect. Czech. Chem. Commun.* (2009); 74; 1101- 1116.
15. R. M. A. Heeren, D. F. Smith, J. Stauber, B. K. Kaletas, L. MacAleese; Imaging mass spectrometry: Hype or hope ?; *J. Am. Soc. Mass Spectrom* (2009); 20; 1016–1014.
16. A. Rompp, S. Guenther, Y. Schober, O. Schulz, Z. Takats, W. Kummer, B. Spengler; Histology by mass spectrometry: Label free tissue characterization obtained from high accuracy bioanalytical imaging; *Angewandte chemie international edition* (2010); 49; 3834–3838.
17. V. Vidová, P. Novák, M. Strohalm, J. Pól, V. Havlíček, M. Volný; Laser desorption – ionization of lipid transfers: Tissue mass spectrometry imaging without Maldi matrix; *Analytical chemistry* (2010); 82; 4994–4997.
18. Q. Liu, Z. Guo, L. He; Mass spectrometry imaging of small molecules using desorption/ionization on silicon; *Analytical chemistry* (2007); 79; 3535-3541.

19. M. P. Greving, G. J. Pattl, G. Sluzdak; Nanostructure initiator mass spectrometry metabolite analysis and imaging; *Analytical chemistry* (2011); 83; 2–7.
20. G. J. Van berkel, V. Kertesz, K. A. Koeplinger, M. Vavrek, A. N. T. Kong; Liquid microjunction surface sampling probe electrospray mass spectrometry for detection of drugs and metabolites in thin tissue section (2008); *J. Mass Spectrom.*; 43, 500 – 508.
21. Y. H. Rezenom, H. Dong, K. K. Murray; Infrared laser – assisted desorption electrospray ionization mass spectrometry(2008); *Analyst*; 133; 226 – 232.

Seznam obrázků

Obr.č.1: Využití API ionizačních technik v závislosti na polaritě a molekulové hmotnosti analytu

Obr.č.2: Mechanismus elektrosprejové ionizace

Obr.č.3: Schéma tryskajícího kužele

Obr.č.4: Princip MALDI ionizace

Obr.č.5: DESI ionizace

Obr.č.6: Mechanismus separace iontů v kvadrupólu

Obr.č.7: Schéma sférické iontové pasti

Obr.č.8: Lineární iontová past

Obr.č.9: Schéma analyzátoru doby letu s reflektorem

Obr.č.10: Schéma tří základních pohybů iontů v orbitrapu

Obr.č.11: FT – ICR analyzátor

Obr.č.12: Zobrazení intenzity jednotlivých lipidů a mastných kyselin při analýze krysí míchy prostřednictvím MSI

Obr.č.13: Schéma metody mikrosondování a mikroskopické

Obr.č.14: MALDI – MSI zobrazení negativních iontů a CID spektra ze sagitální oblasti myšního mozečku

Přehled zkratk

MSI – Hmotnostně spektrometrické zobrazování

TOF – Analyzátor doby letu

CID – Kolizní aktivace

MS – Hmotnostní spektrometrie

EI – Elektronová ionizace

CI – chemická ionizace

API – Ionizace za atmosférického tlaku

ESI – ionizace elektrosprejem

MALDI – Desorpční ionizace laserovým paprskem za účasti matrice

SIMS – Ionizace prostřednictvím primárních iontů

DESI – Desorpční ionizace elektrosprejem

LDI – Desorpční ionizace laserem.

FT – ICR – Cyklotronový rezonátor s Fourierovou transformací

IT – Iontová past

Q - kvadrupól

