

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie

**Možnosti využití monolitických materiálů pro hmotnostní spektrometrii
s desorpční ionizací**

Vypracovala

Studijní obor

Vedoucí diplomové práce

Eva Stískalová

Analytická chemie

Doc. RNDr. Petr Bednář, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením Doc. RNDr. Petra Bednáře, Ph.D. Veškeré literární prameny, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Souhlasím s tím, že práce bude prezenčně zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie, Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci 22. 4. 2011

Za ochotu a odbornou pomoc při vypracování diplomové práce děkuji Doc. RNDr. Petru Bednářovi, Ph.D. a mgr. Renatě Myjavcové. Děkuji také RNDr. Miroslavu Suralovi, Ph.D. za dodání potřebných chemikálií Poděkovat bych chtěla také své rodině za toleranci a psychickou podporu při studiu.

Obsah

1. Souhrn.....	6
2. Summary.....	6
3. Teoretická část	7
3.1. Úvod.....	7
3.2. Monolity	7
3.3. Metody přípravy monolitů	8
3.3.1. Radikálová polymerace (Free radiál polymerization)	8
3.3.2. Kryogely.....	14
3.4. Princip laserové desorpce/ionizace a způsoby provedení	15
3.4.1. MALDI.....	15
3.4.2. SALDI, NALDI, SELDI	17
3.5. Využití monolitů pro hmotnostní spektrometrii s ionizací desorpcí laserem (LDI)..	18
3.5.1. Příprava monolitů na jednotlivých spotech.....	18
3.5.2. Příprava monolitů na celé ploše LDI destičky	19
3.6. Antokyaniny	21
3.6.1. Struktura antokyaninů	22
3.6.2. Významné vlastnosti antokyaninů a možnosti jejich využití	23
3.6.3. Separace, purifikace, identifikace.....	24
4. Experimentální část.....	26
4.1. Použité přístrojové vybavení	26
4.2. Použitý materiál a chemikálie	26
4.3. Silylace	27
4.4. Příprava vzorku.....	27
4.5. Příprava monolitů	28
4.5.1. Postup 1 – příprava vrstvy.....	29
4.5.2. Postup 2 – polymerace monolitu ve vybroušených jamkách na destičce	29
4.5.3. Postup 3 – vytvoření formy, plnění prostřednictvím kapilár	29

4.5.4.	Postup 4- PE fólie s vyřezanými okénky	30
4.5.5.	Postup 5 - plátky	30
4.5.6.	Postup 6 - drť.....	30
4.6.	Výsledky a diskuse	31
4.6.1.	Příprava monolitické vrstvy-hodnocení přípravy	31
4.6.2.	MALDI/MS antokyaninů s využitím monolitů	33
5.	Závěr.....	53
6.	Seznam použitých zkratk	54
7.	Použitá literatura	55

1. Souhrn

Monolity představují zajímavý materiál k různým využitím v analytické chemii, nejvíce se však uplatňuje jako sorbent kapalinové chromatografii. Tato práce je zaměřena na využití monolitických povrchů pro hmotnostní spektrometrii s ionizací/desorpcí laserem (LDI/MS) při analýze antokyaninů. Monolitické povrchy byly připraveny několika způsoby. Měření byla prováděna jak bez přídavku matrice, tak také v její přítomnosti. Byl srovnáván charakter spekter a intenzita sledovaných iontů získaných analýzou z monolitického povrchu s výsledky získanými standardní metodou (vzorek smíchaný s matricí nanesený na nerezovou destičku). Ukázalo se že monolity přispívají ke zvýšení intenzity signálu analytu (standard antokyaninového barviva, malvidin-3-glukosid), pokud jsou připraveny jako souvislá vrstva a vzorek je smíchán s matricí. Nejlepších výsledků bylo dosaženo při použití butylmethakrylát-ethylendimethakrylátového monolitu. V tomto případě totiž došlo nejen ke zvýšení odezvy analytu ale současně byl také potlačen signál matrice. Monolitický povrch byl využit také při analýze reálného vzorku červeného vína. Prvotní výsledky naznačují, že monolity přispívají k potlačení balastních látek a matrice. Pro širší využití monolitů při LDI/MS analýze antokyaninových barviv je však třeba další optimalizace

2. Summary

Monoliths represent an interesting material for various applications in analytical chemistry, among them the most common as sorbent in liquid chromatography. This work is focused on potential use of monolithic surface in laser desorption/ionization/ mass spectrometry (LDI/MS) for analyzing of anthocyanins. Monolithic surface was prepared by several approaches. Measurement were carried out without an addition of matrix and also in presence of matrix. Then, the appearance of spectrum and intensity of ion of interest obtained from monolithic surface was compared with those obtained using standard method (sample mixed with matrix deposited on stainless steel plate). It was shown, that monoliths contribute to higher intensity of analyte (standard of anthocyanin dye, malvidin-3-glucoside) if they are prepared in continuous layer and sample is mixed with matrix. The best results were achieved, when butylmethacrylate-ethylendimethacrylate monolith was used. In this case, not only the highest intensity of analyte, but also significantly decrease of undesirable matrix signal was achieved. The surface of monoliths was used also for analyses real sample of red wine. These pilot results show, that monoliths contribute to decrease of response of balast ions and matrix. This positive influence can be potentially utilized for LDI/MS analysis of plant dyes

after more thorough optimization various parameters (such as thickness of layer, laser energy, etc.

3. Teoretická část

3.1. Úvod

Rychlý rozvoj vědy a techniky klade vysoké nároky na analytickou chemii. Současně také vzrůstá počet prováděných analýz. Proto je třeba neustále vyvíjet nové metody, které by umožnily účinnější, rychlejší a levnější a separaci látek. Mezi nové materiály přispívající k efektivnější separaci patří také monolity.¹

Jako monolity jsou označovány tuhé, porézní polymery tvořené z jednoho kusu hmoty. V posledních 15 letech hrají důležitou roli především ve vysoce účinné kapalinové chromatografii (HPLC), kde slouží jako stacionární fáze. Díky jejich unikátní struktuře pomáhají překonat některá omezení náplňových kolon (např. dochází k menšímu rozmývání separovaných zón) a vykazují lepší separační účinnost zejména pro vysokomolekulární látky. Mezi další výhody moderních monolitických kolon patří jejich relativně jednoduchá a reprodukovatelná příprava a dobrá permeabilita materiálu pro mobilní fázi.² Kromě HPLC lze monolity využít také pro tenkovrstevnou chromatografii.³ kapilární elektrochromatografii (CEC),⁴ mikrofluidní čipy⁵, fotovoltaické moduly⁶ a v dalších oblastech.

Tato práce se zabývá využitím monolitů v oblasti hmotnostní spektrometrie s ionizací/desorpcí laserem za účasti matrice (MALDI/MS). Pro poměrně jednoduché provedení MALDI/MS analýzy a vysokou selektivitu je tato technika široce využívána zejména při analýze makromolekul. Vývoj v této oblasti směřuje ke zlepšení citlivosti a selektivity laserové desorpce/ionizace (LDI). Jako jeden z povrchů, který by mohl výrazně zlepšit analytické parametry laserové desorpce/ionizace je nanosený monolit. Modelovou látkou, která byla zvolena pro experimenty, byl oenin (malvidin-3-glukosid), což je přírodní barvivo patřící do skupiny antokyaninů, které se hojně vyskytuje např. ve víně. Analýza a identifikace přírodních barviv je významná především při hodnocení kvality potravin, které se vyrábějí z barevných částí rostlin.

3.2. Monolity

Monolity jsou charakterizovány jako pevné porézní polymery tvořené z jednoho kusu hmoty. První pokusy o vytvoření takového sorbentu byly prováděny na počátku 50. let. Jednalo se o

materiály na bázi hydrogelu (metakrylátový gel),⁷ ty však v té době nenašly větší uplatnění.^{2, 8} Jako stacionární fáze pro kapalinovou chromatografii jsou monolity používány od 90. let, kdy Tanaka a kol. vytvořili křemennou monolitickou kolonu s kontrolovanou porozitou. Jejich příprava „*insitu*“ je však obtížná kvůli smršťování v důsledku polykondenzace, stárnutí a tepelnému zacházení.⁸

Obecně můžeme monolity rozdělit na dvě skupiny⁹ a to na anorganické (křemenné), které se hodí spíše pro separaci nízkomolekulárních molekul a organické (např. styrenové, metakrylátové, metakrylamidové atd.), jež jsou využívány zejm. pro separaci makromolekul (biomolekul¹⁰ i syntetických polymerů)²

3.3. Metody přípravy monolitů

Existuje několik různých způsobů, pomocí nichž lze připravit monolity (radikálová polymerace, polykondenzace, „živá polymerace“, tvorba kryogelů)⁸. Obecně je reakční směs složena z funkčního monomeru, síťovacího činidla, porogenního činidla a iniciátoru. Význam jednotlivých složek můžeme shrnout takto:^{1,8}

- funkční monomer je základní stavební jednotka a určuje výslednou polaritu monolitu
- síťovací činidlo „spojuje“ polymerní řetězce (vytváří se síť), je to monomer s nejméně dvěma dvojnými vazbami¹¹ (nebo obecněji dvěma skupinami, na kterých může probíhat polymerace)
- porogenní činidlo určuje velikost a distribuci pórů
- iniciátor umožňuje efektivní zahájení polymerace

Výběr a množství jednotlivých komponent pak ovlivňuje výsledné vlastnosti monolitu, zejm. velikost pórů a polaritu.

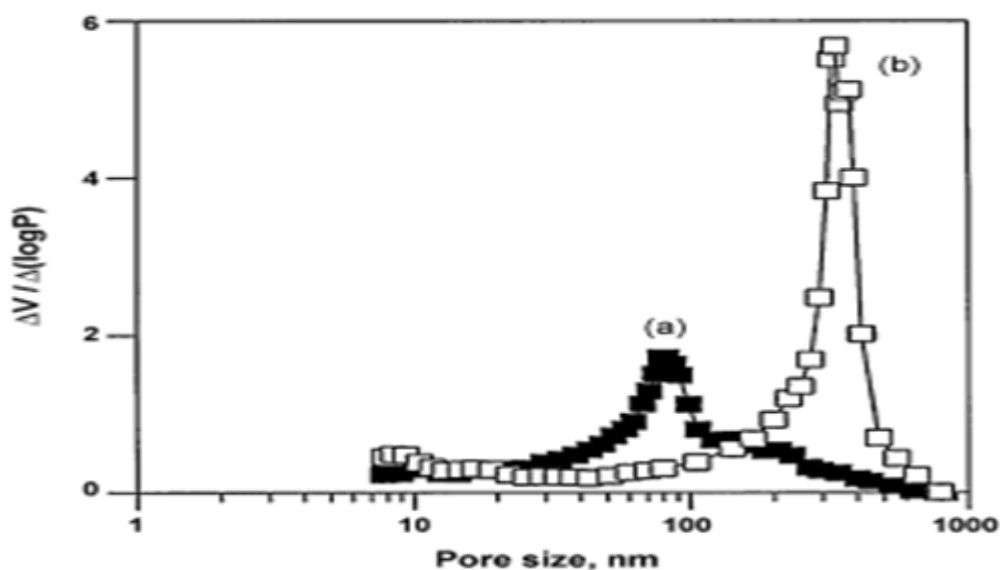
3.3.1. Radikálová polymerace (Free radiál polymerization)

K zahájení (*iniciaci*) polymerace je třeba aktivace nejčastěji dvojně vazby molekuly monomeru. Toho lze dosáhnout mj. prostřednictvím tepla, ozáření, ultrazvuku nebo pomocí iniciátorů. Iniciátory jsou sloučeniny, které se zahřátím nebo osvětlením snadno rozpadají na radikály a ty se pak adují na dvojně vazby nenasyceného monomeru. Jednotlivé kroky reakce růstu (*propagace*) vyžadují relativně malou aktivační energii, a proto malé množství iniciátoru způsobuje vznik velkého množství polymerů. Jako iniciátory se pro výrobu různých polymerů osvědčily zvláště peroxidy (např. peroxodisíran draselný) a alifatické azolátky (např. dibenzoylperoxid). Při přípravě monolitů se pak často využívá např.

azobisisobutyronitril (AIBN). Rychlost iniciace závisí na poločase rozpadu iniciátoru, stabilitě radikálů, teplotě, druhu rozpouštědla. Poslední fází polymerace je ukončení řetězce (*terminace*), kdy dochází převážně ke slučování radikálů rostoucích řetězců po párech na sloučeninu s nasycenými vazbami, tzv. rekombinace. Při radikálové polymeraci je nutno odstranit kyslík, neboť ten působí jako inhibitor.¹²

3.3.1.1. Tepelná iniciace

Tepelně iniciovaná radikálová polymerace je pravděpodobně nejčastěji používanou metodou k přípravě monolitů. Její původ je odvozen z techniky suspenzní polymerace, která se používala při přípravě porézních kuliček. Ačkoli by se dalo očekávat, že vlastnosti výsledných produktů suspenzní polymerace (kuličky) i objemové polymerace („*bulk-like*“) polymerace (monolit) budou téměř shodné, pokusy Švece a kol. s poly(glycidylmethakrylát-co-ethylendimethakrylátem) prokázaly zcela jinou distribuci pórů (tzn. i jinou střední velikost pórů).⁸ K nejvýznamnějším faktorům, které ovlivňují porozitu, patří teplota a čas polymerace, obsah porogenního a síťovacího činidla ve směsi.



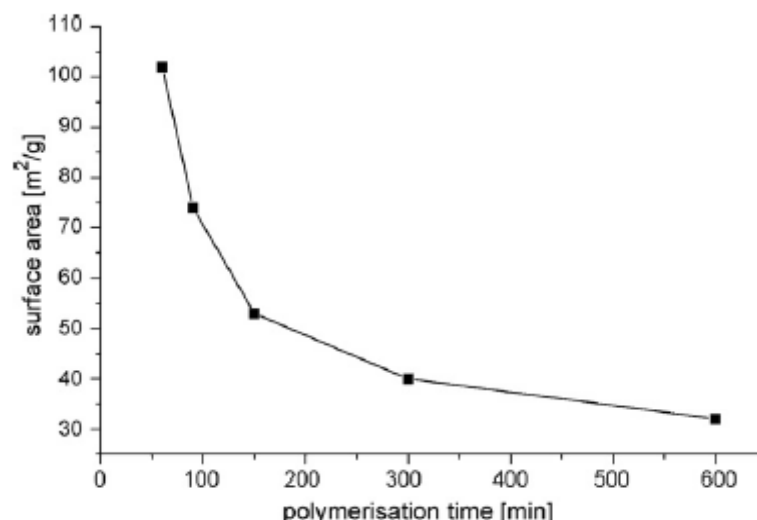
Graf 1: Profil rozdílné distribuce velikostí pórů poly(glycidylmethakrylát-co-ethylendimethakrylátu) připraveného technikou suspenzní polymerace ve formě kuliček křivka (a) a objemové(bulk-like) polymerace křivka (b) při teplotě 70°C stanovené rtuťovou porozimetrií. Reakční směs obsahovala 24% glycidylmethakrylátu, 16% ethylendimethakrylátu, 48% cyklohexanolu, 12% dodekanolu a 1% AIBN. Převzato z⁸, původní publikace¹³

➤ Vliv teploty

Teplota ovlivňuje kinetiku polymeračního procesu a je prostředkem, umožňujícím přípravu makroporézních polymerů s určitou distribucí velikostí pórů. Při polymeraci dochází nejprve k vytvoření nerozpustných gelových zárodečných jader. Na ty se postupně zachycují další monomery z okolního roztoku a způsobují jejich růst. Polymerace pak probíhá jak v těchto zárodečných jádrech tak také ve zbývající kapalně reakční směsi. Pokud je teplota nízká, probíhá i polymerace pomalu a může docházet k přechodu značné části monomerů z roztoku do zárodečných jader. Polymerace uvnitř jader je kineticky upřednostňována, protože je tu vyšší lokální koncentrace monomerů než v okolním roztoku. Zvýšení teploty způsobuje, že polymerace probíhá velmi rychle, a proto se větší podíl polymerních řetězců nezachycuje na již vytvořených a polymerovaných jádrech a vytváří v roztoku samostatné útvary. Tyto útvary jsou malé, a proto je plocha jejich povrchu velká. Zjednodušeně lze říci, že vyšší teplota vede k tvorbě menších pórů. Teplotou lze proto ovlivňovat také specifický povrch, jehož hodnota závisí především na množství tzv. mikropórů (póry s rozměry menší než 2 nm) Označení je zavádějící, předpona mikro- odkazuje na rozměr μm , vhodnější by bylo použít termín nanopóry.⁸

➤ Doba polymerace

Významným faktorem, který má vliv na porézní charakteristiky monolitu je doba polymerace. Závislost můžeme formulovat tak, že s rostoucím časem polymerace klesá plocha specifického povrchu, jak dokládají např. experimenty Greiderera a kol.¹⁴ či Trojera a kol.² Závislost lze dobře demonstrovat následujícím grafem, který ilustruje pokles plochy povrchu z cca $110 \text{ m}^2/\text{g}$ po 1 hodině polymerace na cca $35 \text{ m}^2/\text{g}$ po 10 hodinách polymerace.



Graf 2: Závislost specifické plochy povrchu na čase polymerace (převzato z práce Greiderera a kol.¹⁴)

➤ Funkční monomer

Funkční monomer jakožto základní stavební jednotka monolitu určuje jeho chemickou povahu a tím pádem ovlivňuje i jeho použití⁸ (nese např. hydrofobní skupinu potřebnou pro separace v modu reverzních fází, ionizovatelnou pro iontovou chromatografii nebo kapilární elektrochromatografii CEC).¹

Existuje velké množství monomerů, které mohou být k přípravě monolitů použity. Struktury některých funkčních monomerů jsou ukázány na obrázku: *hydrofilní* akrylamid (1), 2-hydroxymethylmethakrylát (2), *ionizovatelné* 2-akrylamido-2-methyl-1-propansulfonová kyselina (3), akrylová kyselina (4), *reaktivní* glycidylmethakrylát (5), *hydrofobní* butyl methakrylát (6), styren (7)⁸

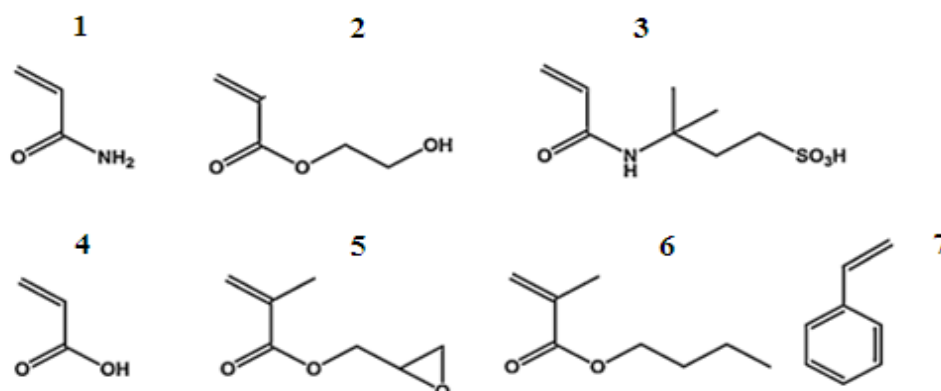


Schéma 1: Příklady funkčních monomerů a jejich struktura: akrylamid (1), 2-hydroxymethylmethakrylát (2), 2-akrylamido-2-methyl-1-propansulfonová kyselina (3), akrylová kyselina (4), glycidylmethakrylát (5), butyl methakrylát (6), styren (7)⁸

➤ Porogenní činidlo

Volba porogenního činidla je další nástroj, kterým lze „nastavit“ porézní vlastnosti výsledného monolitu, aniž by došlo ke změně chemického složení. Jako porogeny se často používají např. směs cyklohexanolu a dodekanolu, nebo směs toluenu a vyšších alkoholů. Santora a kol. prováděli experimenty s různými rozpouštědly (v nichž porogenní činidlo bylo tvořeno jednou složkou) - s tetrahydrofuranem, acetonitrilem, toluenem, chlorbenzenem, hexanem, metanolem, dimethylformamidem a methyl-terc-butyl etherem a připravili sérii monolitických kolon (poly(divinylbenzen, poly(styren-co-divinylbenzen), poly(etylen dimethakrylát) a poly(methylmethakrylát-co-ethylendimethakrylát). Některé z nich měly obrovskou plochu specifického povrchu (kolem 820 m²/g), což značí přítomnost malých pórů a tudíž měly příliš malou permeabilitu pro mobilní fázi. Zhu a kol. experimentovali s jinou sadou jednosložkových porogenních činidel (cyklohexanol, 1-propanol, dodekanol, dimethylsulfoxid a 1,4 butandiol) při přípravě monolitické kolony (poly(glycidylmethakrylát-co-ethylendimethakrylát) a opět nebylo dosaženo žádaných porogenních vlastností. Jako porogenní činidla se pak osvědčily binární směsi rozpouštědel např. 1,4-butandiolu a dimethylsulfoxidu, pomocí nichž byly připraveny kolony s vynikající permeabilitou.⁸

➤ Síťovací činidlo

Posledním faktorem, který má vliv na morfologii a porézní vlastnosti monolitu, je množství síťovacího činidla. Na rozdíl od předchozích faktorů, které ovlivňovaly pouze velikost a distribuci pórů se změna v poměru monomerů s jednou skupinou schopnou polymerace k monomerům s více skupinami (tj. síťovacími schopnostmi) projeví nejen v rozdílné porositě ale také ve změně chemického složení výsledného produktu. K nejčastěji používaným síťovacím činidlům patří ethylenglykoldimethakrylát, divinylbenzen, methylenbisakrylamid či trimethylolpropantrimethakrylát.⁸

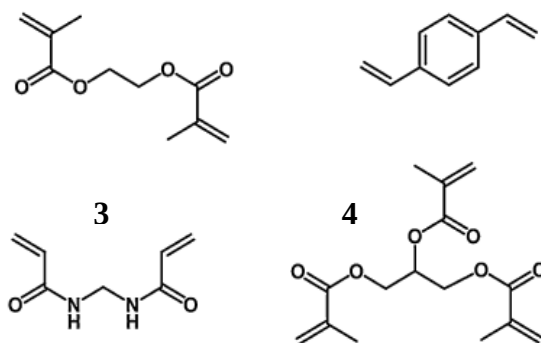


Schéma 2: Příklady některých síťovacích činidel a jejich struktury: ethylenglykoldimethakrylát (1), divinylbenzen (2), methylenbisakrylamid (3) či trimethylolpropantrimethakrylát (4).⁸

3.3.1.2. Fotoiniciace (pomocí UV záření)

Fotoiniciace se k přípravě monolitů používá od roku 1997. Její předností oproti polymeraci za zvýšené teploty je rychlejší průběh reakce (řadově v minutách) i při pokojové teplotě. Využívá se pro aplikace, kde není potřeba, aby monolit zaplnil celý prostor, např. pro mikrofluidní čipy. Zde má být monolit vytvořen pouze na určitých místech, zatímco zbytek plochy má zůstat volný. Provedení fotoiniciace je poměrně jednoduché. Polymerační směs se převede do formy/lisu, překryje „maskou“ a poté je vložena pod UV lampu. Z tohoto vyplývá i omezení, které s sebou metoda přináší, a sice že je potřeba pracovat s UV propustnými materiály a UV propustnou směsí/monomery. Proto se také nepoužívá k přípravě monolitických kolon, jejichž povrch bývá potažen polyimidem. Nezbytnou součástí polymerační směsi je (foto)iniciátor. Stejně jako u tepelné iniciace lze použít např. azobisisobutyronitril, další možností pak jsou aromatické ketony (2-methoxy-2-fenylacetofenon, 2,2-dimethyl-2-fenylacetofenon).⁸

3.3.1.3. Iniciace pomocí γ -záření

Pro přípravu monolitů tato metoda není běžná, především kvůli bezpečnostním opatřením, která jsou vyžadována při práci s γ -zářením. Jeho použití ovšem přináší několik výhod, např. není potřeba přidávat do směsi iniciátor, polymeraci lze provádět při jakékoli teplotě a téměř v jakékoli nádobě (včetně nerezové oceli).

Např. Grasselli a kol. vytvořili monolit pomocí ⁶⁰Co zdroje ze směsi diethylen glykol dimethakrylátu a glycidylmethakrylátu rozpuštěných v různých rozpouštědlech (metanol, etanol, terc-butanol, aceton, ethylacetát) teflonové trubičce s vnitřním průměrem 4mm.

Permeabilita monolitů závisela na množství monomeru ve směsi (ty, které byly připravené ze zředěných roztoků vykazovaly větší porozitu) a na teplotě (při vyšší teplotě polymerace vznikaly monolity s větší permeabilitou).¹⁵

Jako vysokoenergetickou alternativu γ záření lze k iniciaci polymerace použít elektronový paprsek.⁸

3.3.1.4. *Iniciace pomocí chemických činidel*

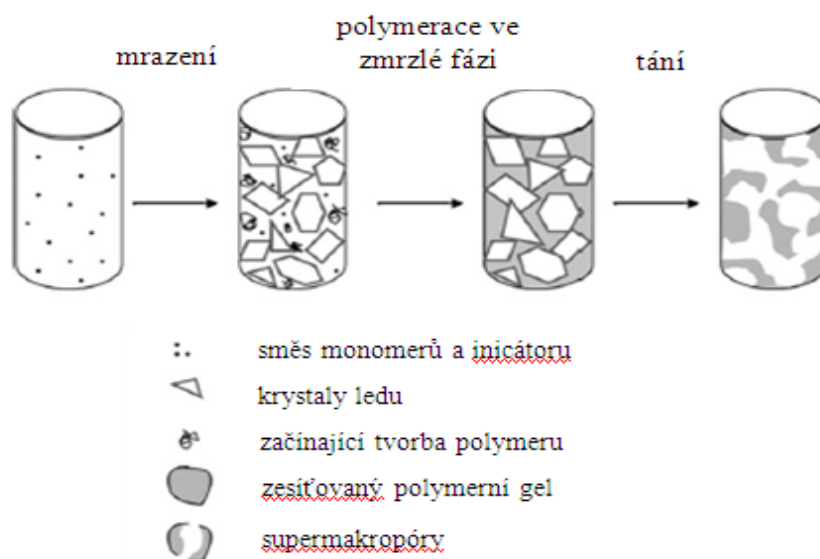
Nejstarším způsobem přípravy monolitů je chemická iniciace za laboratorní teploty. K tomu se dají využít různá činidla jako peroxodisulfát amonný s N,N,N',N'-tetramethylethyldiaminem jako katalyzátorem, který je snadno rozpustný v polárních rozpouštědlech.⁸

3.3.2. **Kryogely**

Kryogely jsou makroporézní materiály, s rozměry pórů 5 – 100 μm ,⁸ které jsou připravovány při velmi nízkých teplotách. Jejich unikátní vlastnosti jako je makroporozita, biokompatibilita, fyzikální a chemická stabilita a snadná příprava nabízí široké možnosti uplatnění na poli mikrobiologického výzkumu (např. při zpracování buněčných a virových suspenzí, při separaci buněk, či při analýze patogenních buněk v krvi nebo moči).¹⁶

Kryogely jsou syntetizovány ve zmrzlém vodném roztoku, v němž krystalky ledu vystupují jako porogenní činidlo. Vytvoření porézní struktury je založeno na oddělení fází během zmrazování, kdy jedna fáze tuhne (tvorba krystalů ledu) a druhá tvoří nemrznoucí kapalnou mikrofázi, která polymeruje. V průběhu chlazení krystalky ledu rostou až do bodu, kdy je vytvořena souvislá zmrzlá „kostra“ (= porogenní struktura). Po ukončení polymerační reakce je systém přenesen do prostředí s pokojovou teplotou, kde krystaly ledu roztají a voda je odstraněna promytím mobilní fází. Na velikost pórů má vliv teplota, při které polymerace probíhá, rychlost chlazení a množství monomeru ve vodném roztoku.

Bylo připraveno velké množství kryogelů z různých monomerů např. 2-hydroxyethylmethakrylát, akrylamid, dimethylakrylamid, N-vinylkaprolaktam, N-isopropylakrylamid. Jako síťovací činidla, která zároveň zpevňují makroporézní strukturu a chrání vytvořený monolit před rozpuštěním ve vodě se používají např. methylenbisakrylamid a poly(ethylen glykol)diakrylát. Polymerace je obvykle iniciována ve vodě rozpustným redox systémem obsahujícím amonium peroxodisulfát a N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin.⁸



Obrázek 1: Schématické znázornění tvorby kryogelů¹⁶

3.4. Princip laserové desorpce/ionizace a způsoby provedení

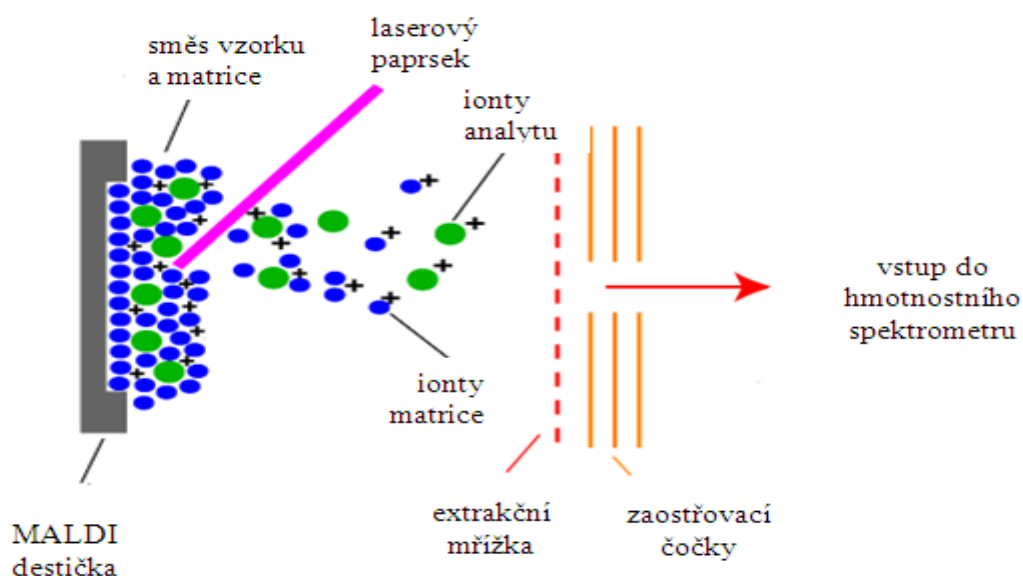
V hmotnostní spektrometrii se využívá řada ionizačních metod, na tomto místě však budou zmíněny pouze ty, které využívají k ionizaci/desorpci energii laseru (LDI). Největší uplatnění z nich v současnosti nachází technika MALDI

3.4.1. MALDI

MALDI (Matrix assisted laser desorption/ionization) patří mezi měkké ionizační techniky, které se vyznačují nízkým stupněm fragmentace během ionizace a tedy vysokým výtěžkem jedenkrát nabitých iontů, což umožňuje stanovení hmotnosti molekuly. K ionizaci/desorpci laserem dochází za účasti matrice.¹⁷ Uplatnění nachází především při analýze proteinů, peptidů, nukleotidů, polysacharidů, glykoproteinů, glykolipidů a syntetických polymerů, čehož se dá využít např. v medicíně při diagnostice onemocnění, v chemickém či farmaceutickém průmyslu. Navzdory rychlému pokroku ve využití MALDI je tato technika známá špatnou reprodukovatelností.¹⁸ Důraz je proto v současné době kladen na detailní porozumění mechanismu ionizace, který dosud není zcela znám. Fotochemický model, jímž bývá mechanismus ionizace vysvětlován, totiž selhává při objasňování některých jevů, které byly při MALDI experimentech pozorovány.¹⁸

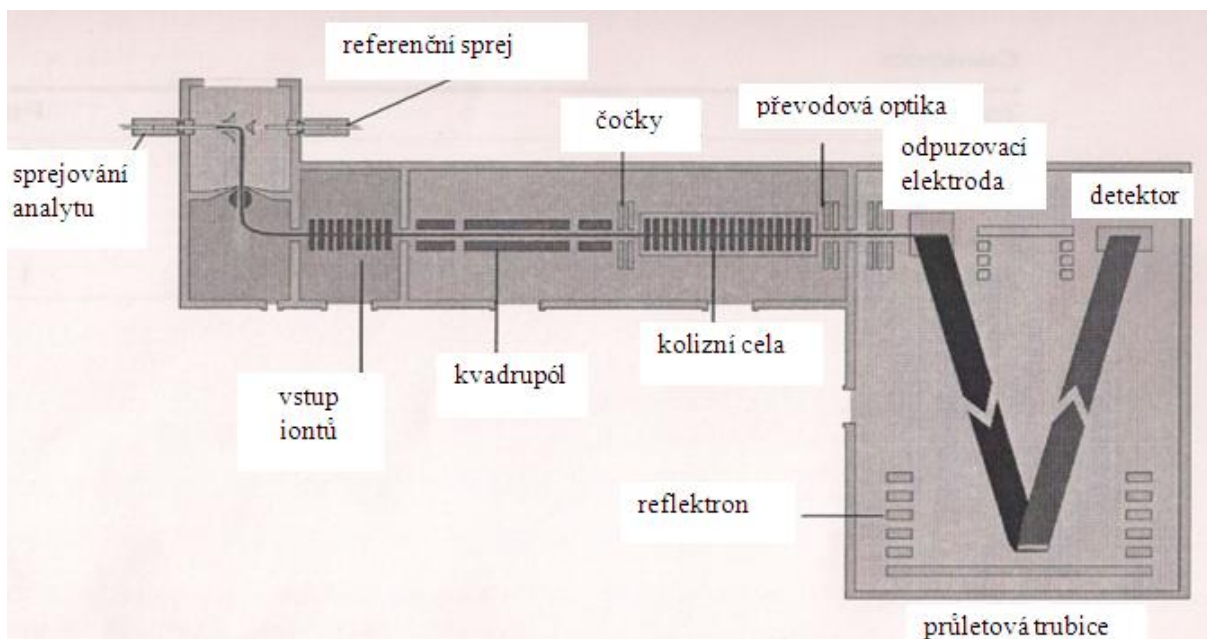
Při této metodě je vzorek smíchán s nadbytkem matrice, jíž bývá vhodná nízkomolekulární látka. Často se jedná o deriváty aromatických kyselin; např. kyselina 2,5-dihydroxybenzoová, 3,5-dimethoxy-4-hydroxyskořicová. Tato směs je poté ozařována

krátkými pulzy laseru, jehož energie je absorbována především molekulami matrice. Tím dochází k jejich excitaci. Částice matrice předávají energii přijatou ozářením laserem molekulám analytu a tím dochází k jeho ionizaci a transferu do plynné fáze. Ionizace analytu[A] je nesčastěji spojena s přenosem protonu[H⁺] z excitovaných molekul matrice a vznikají tzv. pseudomolekulové ionty [A+H⁺].¹⁷



Obrázek 2: Schématické znázornění ionizace metodou MALDI¹⁹

Vzniklé ionty jsou pak zaznamenávány různými typy detektorů, pro MALDI se nejčastěji používá průletový hmotnostní analyzátor TOF-MS (*time of flight – mass spectrometry*). Ten je založen na měření času, za který ion dorazí z iontového zdroje, respektive odpuzovací elektrody v případě tandemového uspořádání analyzátoru, k detektoru. Doba letu je funkcí poměru hmotnosti k náboji (m/z) daného iontu.



Obrázek 3: Schématické znázornění Q-TOF analyzátoru, který byl použit v experimentální části této práce. Jako ionizační zdroj je zde znázorněn elektrosprej.²⁰

MALDI je metoda, která se využívá především pro analýzu makromolekul. Určitým omezením pro analýzu malých molekul jako např. farmaceutik, je možná interference signálu matrice se signálem analytu.

3.4.2. SALDI, NALDI, SELDI

Kvůli omezením, které přináší použití matrice, jsou vyvíjeny nové metody LDI umožňující přímou desorpci/ionizaci z povrchu destičky.²¹ Z nich je pravděpodobně největší pozornost věnována technice SALDI (surface assisted laser desorption/ionization).

Tato technika využívá na povrchu destičky různé substráty, které jsou schopny předat analytu energii laseru, ale na rozdíl od matrice se nedesorbují s analytem po ozáření laserem. Vhodnými substráty jsou např. uhlíkové nanotrubičky, porézní křemen, prášek kovu či oxidů kovu, nanočástice kovů (zlato, stříbro, kobalt) nebo tenké svazky olova. K nejrozšířenějším materiálům používaným pro SALDI patří porézní křemen.²² Desorpci/ionizaci z porézního křemenného povrchu (DIOS) je dosaženo významného zlepšení ionizačního procesu do té míry, že často dokonce není nutné přidávat matrici. Vzorek je nanesen přímo na vyleptaný povrch křemenné destičky. Kombinace velkého povrchu, optické absorpce a tepelné vodivosti vede ke zvýšení tvorby iontů. Intenzitu signálu lze navíc zlepšit navázáním typicky používaných matric, jako 2,5-dihydroxybenzoová

kyselina (DHB) nebo α -kyano-4-hydroxyskořicová kyselina (CHCA) na vnitřní povrch porézních křemenných „kuliček“. Následkem tohoto včlenění pak je získáno spektrum bez interferujících vlivů matrice, což zlepšuje selektivitu pro analýzu nízkomolekulárních látek. Nevýhodou ovšem je, že povrch křemenné destičky (obsahující hydridové skupiny) rychle oxiduje a musí být proto využita co nejdříve po přípravě.²³ Prodloužit jejich životnost lze depozicí nanočástic stříbra do pórů i na povrchu křemenné destičky, jak dokládá práce Y. Hana a kol. Modifikace těchto nanočástic s navázaným 4-ATP pak dále vedlo ke snížení limitů detekce sledovaných látek, k vyšší ionizační účinnosti a menší fragmentaci.²² Jistou variací SALDI jsou tedy techniky využívající nanočástice, které bývají označovány jako NALDI. V současnosti jsou již i komerčně dostupné destičky s připravenou nanostrukturní vrstvou, např. od firmy BrukerDaltonics, Billerica, MA.²¹

3.5. Využití monolitů pro hmotnostní spektrometrii s ionizací desorpčí laserem (LDI)

K potlačení vlivů matrice, která při MALDI často znemožňuje nebo alespoň znesnadňuje analýzu nízkomolekulárních látek, byly jako další možné materiály testovány také monolity. Některé přístupy využívají vrstvy monolitu, pouze k LDI – MS analýze a jsou proto vytvořeny pomocí masky jen na spotech MALDI destičky. Jiné využívají vrstvu monolitu k prvotní TLC separaci s následnou LDI – MS detekcí a jsou tudíž připraveny po celé ploše destičky.

3.5.1. Příprava monolitů na jednotlivých spotech

Jak ukazuje Švec a kol., za účelem nahrazení matrice lze využít porézní polymerní monolity. Ve svých experimentech pracovali se styren-divinylbenzenovým monolitem a několika druhy methakrylátového monolitu, které neobsahovaly žádnou funkční skupinu, jež by byla náchylná na přítomnost kyslíku, vlhkosti či jiných složek vzduchu. Oproti DIOS tedy vykazují velkou odolnost. Vysokou stabilitu dokládají i MS experimenty prováděné se vzorkem nikotinu, který byl analyzován nejprve hned po nanesení na monolit a poté po uplynutí tří týdnů, kdy destička se vzorkem byla vystavena běžnému laboratornímu prostředí. Získaná spektra jsou prakticky identická, což naznačuje možné využití pro archivaci či uskladnění přinejmenším netěkavých látek.²³ Aby reakční směs zpolymerovala pouze na spotech, vytvořili si podle MALDI destičky speciální masku z fólie, kterou přilepili na sklo. Na nerezovou MALDI destičku nanесли malé množství reakční směsi (methakrylátové) a

překryli sklíčkem s vyrobenou maskou. Polymerace probíhala pod UV zářením po dobu 5 min. Styren-divinylbenzenový monolit byl připravován termální iniciací. Proto byla monomerní směs nanášena na destičku a překryta děrovaným polyethylenovým filmem, který vymezoval jak umístění monolitu tak tloušťku vrstvy a sloužil také jako těsnění. Na vrch byla pak umístěna hliníková destička. Polymerace probíhala při 80°C po dobu 24 h. Po ukončení reakce byl monolit v obou případech propláchnut a „vyluhován“ metanolem aby došlo k odstranění nezreagovaných zbytků. Připravené monolity pak byly úspěšně použity při analýze výbušnin (tetryl) i jiných nízkomolekulárních látek (kofein, nortriptylin)²³

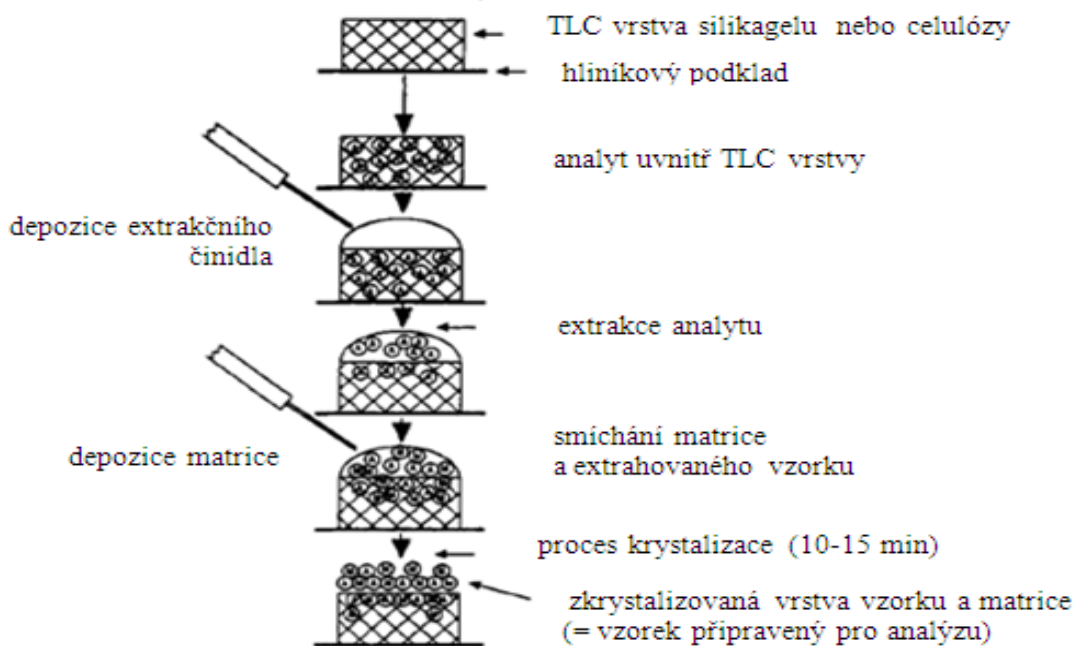
3.5.2. Příprava monolitů na celé ploše LDI destičky

Příprava monolitu na celé ploše LDI destičky umožňuje spojení tenkovrstevné chromatografie (TLC, thin-layer chromatography) a LDI-MS detekce. TLC je jednou z nejstarších chromatografických metod a díky své jednoduchosti a rychlosti separace je stále využívána k různým účelům např. při dopingových zkouškách, testování drog, klinické diagnostice, při analýze reziduí pesticidů a mnoha dalších. Z této analýzy však dostáváme informaci pouze o retenčních datech (retardační faktor R_f) nikoli o struktuře.

Pro určení struktury je pak vyžadována další analýza např. HPLC-MS. Tento mnohdy zdlouhavý krok je možné vynechat, použije-li se k separaci TLC ve formátu MALDI destičky (např. hliníkový podklad pokrytý silikagelem nebo celulozou). Následně je možné provádět MS analýzu jednotlivých zón. Touto technikou již byly analyzovány jak některé nízkomolekulární látky (drogy) tak makromolekuly (peptidy, proteiny, nukleotidy) a dokonce bylo dosaženo nižších detekčních limitů než při konvenční MALDI analýze.²⁴ Je však zapotřebí před přidáním matrice „vyextrahovat“ analyt z vnitřku sorbentu na jeho povrch. Toho lze docílit přidáním vhodného „extrakčního činidla“ jak schematicky ilustruje obrázek.²⁵ Pro některé látky však klasické povrchy používané pro TLC (silikagel, celulóza) nevykazují dostatečnou separační účinnost.

Variantou, kterou lze tento problém řešit, je využití monolitických tenkých vrstev. První monolitickou, křemennou TLC destičku/plate vyvinula firma Merck (Darmstadt, Německo) v roce 2002.²⁴ Salo a kol. využili tuto monolitickou vrstvu (UTLC) pro separaci nízkomolekulárních látek, k jejichž detekci použili techniku MALDI pracující za vakua a MALDI za atmosférického tlaku (AP-MALDI). V obou případech musela být přítomna také matrice (α -CHCA), neboť bez ní bylo dosaženo velice slabé ionizace. Její množství však muselo být také optimalizováno – nízká koncentrace snižuje citlivost, vysoký obsah způsobuje vysoké pozadí, a tudíž klesá selektivita. V hmotnostních spektrech se pak v obou

případech objevily adukty sodíku $[M+Na]^+$ u sloučenin obsahujících hydroxy skupinu. Četnost výskytu aduktů a iontů fragmentů pak byla poněkud vyšší u spekter získaných vakuovou MALDI technikou, což značí energeticky bohatší proces ionizace při použití vakua. Za daných pracovních podmínek je totiž adukt $[M+Na]^+$ stabilnější než molekulový ion $[M+H]^+$. U jednotlivých látek pozorovali ve spektru rozdílnou velikost pozadí, což připisují jejich odlišným fyzikálním a chemickým vlastnostem, jako je protonová afinita, hydrofobicita, či schopnost absorpce energie laseru. Co se týká opakovatelnosti, tak vybraný povrch (ultratenká vrstva křemenného monolitu) vykazovala dobré výsledky při separaci látek (relativní směrodatná odchylka R_f hodnot v rozmezí 1,7 až 3,1%). Při detekci užitím spojení UTLC-AP-MALDI-MS byla zjištěna odchylka 22-25%, to znamená, že tato metoda je vhodná spíše pro semi-kvantitativní analýzu. K přesnému stanovení koncentrace pak lze využít UV denzitometry.²⁶ Tyto tenké vrstvy umožnily zkrátit dobu potřebnou pro separaci a zmenšit spotřebu mobilní fáze. Vysoká separační účinnost však byla dosažena pouze pro malé molekuly. Pro separaci makromolekul jsou vhodné porézní organické monolity.



Obrázek 4: Schématické znázornění extrakce analytu z vnitřních vrstev TLC destičky na její povrch při přípravě vzorku pro MALDI/MS měření od Guseva a kol.²⁵

Bakry a kol. se při svých experimentech²⁴ zaměřili na využití monolitické tenkovrstevné chromatografie pro separaci s následnou detekcí pomocí MALDI při analýze proteinů a peptidů. Na základě svých předešlých zkušeností pracovali s methakrylátovým monolitem (BMA-EDMA), který nanášeli buď na sklíčko, jehož povrch byl upraven silylací, nebo na MALDI destičku. Vrstva monolitu byla získána polymerací reakční směsi

v připravené formě. Ta byla sestavena z modifikovaného sklíčka (nebo MALDI destičky), na které byla připevněna teflonová těsnicí páska (o různé tloušťce, v rozmezí 50-200 μm) a obojí překryto dalším sklíčkem bez upraveného povrchu a stlačeno. Monomerní směs obsahující butylmethakrylát, ethylendimethakrylát, 1-dekanol, cyklohexanol, a 2,2-dimethoxy-2-fenylacetofenon byla od vzdušněna dusíkem a poté stříkačkou plněna do vytvořené formy. Polymerace byla iniciována působením UV záření (254 nm) po dobu 15 min. Poté byla vrstva monolitu propláchnuta proudem metanolu a pak ještě přes noc extrahována v kádince s metanolem aby došlo k odstranění zbylého porogenu. Pro porovnání výsledků připravili autoři také styren-divinylbenzenový monolit dle postupu Premstallera a kol.²⁷ Polymerační směs byla složena ze styrenu, divinylbenzenu, 1-dekanolu, tetrahydrofuranu a AIBN. Polymerace těchto UV absorbujících monomerů vyžadovala termální iniciaci při 70°C po dobu 24 h. Vzniklý monolit však nedosahoval dobré kvality, vyskytovaly se trhliny a nejednotná tloušťka vrstvy a proto většinu experimentů prováděli na methakrylátovém monolitu.

Co se týká separací, methakrylátový monolit se osvědčil jak pro nízkomolekulární látky, tak pro směs peptidů a také pro směs proteinů. Následná MALDI analýza jednotlivých složek přinesla zajímavé informace, např. vzorek methylenové modře poskytl dobré spektrum dokonce i bez použití matrice, tzn. že k ionizaci došlo přímo z povrchu monolitu. Naproti tomu u vzorku peptidů byla přímá ionizace z povrchu velice slabá. K významnému nárůstu ionizační účinnosti přispělo přidání matrice (α -kyano-4-hydroxyskořicové kyseliny),²⁴ což je pravděpodobně způsobeno tím, že matrice zde hraje roli „extrakčního činidla“ jak popisuje Gusev.²⁵ Matrice byla použita i při detekci proteinů.²⁴

3.6. Antokyaniny

Antokyaniny jsou přírodní barviva vyskytující se v ovoci (např. vinné hrozny, borůvky, jahody, rybíz), zelenině (zelí, ředkvičky) a také v květech některých rostlin (tulipány, růže, orchideje), jimž dodávají červenou, modrou, fialovou, růžovou a oranžovou barvu. Označení pochází z řeckého *anthos* - květ a *kyanos*- modrý.²⁸

Přírodní pigmenty jsou předmětem mnoha výzkumů ze dvou hlavních důvodů. Jednak kvůli prospěšnému účinku na zdraví člověka (antioxidační aktivita, protizánětlivé účinky, ochrana před kardiovaskulárním onemocněním, potlačení růstu nádorových buněk,²⁹ která nabízí využití v medicíně, farmaceutickém a kosmetickém průmyslu a jednak v potravinářském průmyslu, kde by mohly nahradit syntetická barviva s toxickým účinkem.

Široký potenciál, který antokyaniny nabízí, však vyžaduje také rozvoj identifikačních technik, což je částečně také předmětem této práce.

3.6.1. Struktura antokyaninů

Základní struktura antokyaninů, tzv. antokyanidin, je tvořena aromatickým kruhem (A) navázaným na heterocyklus obsahující kyslík (C), na který je vazbou uhlík – uhlík připojen třetí aromatický kruh (viz obrázek). V přírodě se vyskytují v glykosylované formě, tzn. obsahují navázaný cukr. Varianta bez cukerné jednotky (aglykon) se nazývá antokyanidin. Je známo více než pět set antokyaninů, jejichž základem je 23 antokyanidinů. V ovoci a zelenině je nejrozšířenějších těchto šest: cyanidin, delphinidin, malvidin, pelargonidin, peonidin, petunidin.²⁸ Strukturní odlišnosti a biologická aktivita jsou dány typem a oxidačním stupněm heterocyklických kruhů, jejich substituenty (např. hydroxylové skupiny), existencí stereoizomerů, dále záleží na druhu a počtu glykosylovaných cukrů a také na acylovaných karboxylových kyselinách, na polymerizaci atd. Nejběžnější cukry vázané na antokyaniny jsou glukóza, galaktóza, manóza, rhamnosa a arabinóza a to obvykle jako 3-glykosidy nebo 3,5-diglykosidy. Jako acylační činidla vystupují často fenolické kyseliny např. kyselina kávová, kumarová, ferulová i řada alifatických kyselin, např. octová, jablečná, malonová, šťavelová, jantarová.³⁰

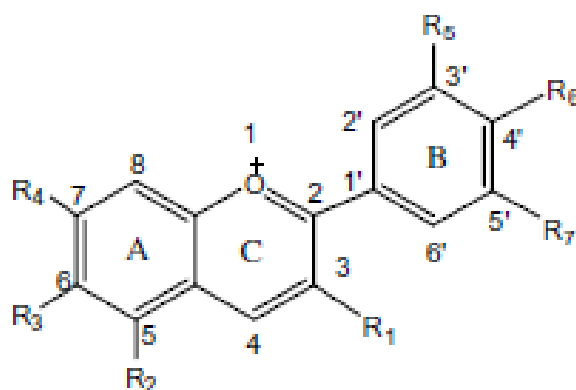


Schéma 3: Obecná struktura antokyaninů

Tabulka 1: Druh a pozice substituentů základních antokyanidinů^{31,28}

	3	5	6	7	3'	4'	5'
carajurin	H	H	OH	OH	H	OCH ₃	OCH ₃
apigeninidin	H	OH	H	OH	H	OH	H
arrabidin	H	H	OH	OH	H	OH	OCH ₃
3'-hydroxyarrabidin	H	H	OH	OH	OH	OH	OCH ₃

	3	5	6	7	3'	4'	5'
apigenin	H	OH	H	OH	H	OH	H
luteolin	H	OH	H	OH	OH	OH	H
tricetinidin	H	OH	H	OH	OH	OH	OH
pelargonidin	OH	OH	H	OH	H	OH	H
aurantinidin	OH	OH	OH	OH	H	OH	H
cyanidin	OH	OH	H	OH	OH	OH	H
5-methylcyanidin	OH	OCH ₃	H	OH	OH	OH	H
peonidin	OH	OH	H	OH	OCH ₃	OH	H
rosinidin	OH	OH	H	OCH ₃	OCH ₃	OH	H
6-hydroxycyanidin	OH	OH	OH	OH	OH	OH	H
6-hydroxydelphinidin	OH	OH	OH	OH	OH	OH	OH
delphinidin	OH	OH	H	OH	OH	OH	OH
petunidin	OH	OH	H	OH	OCH ₃	OH	OH
malvidin	OH	OH	H	OH	OCH ₃	OH	OCH ₃
pulchelinidin	OH	OCH ₃	H	OH	OH	OH	OH
eupinidin	OH	OCH ₃	H	OH	OCH ₃	OH	OH
capensinidin	OH	OCH ₃	H	OH	OCH ₃	OH	OCH ₃
hirustinidin	OH	OH	H	OCH ₃	OCH ₃	OH	OCH ₃
riccinidin A	OH	H	OH	OH	H	OH	H

3.6.2. Významné vlastnosti antokyaninů a možnosti jejich využití

Pro člověka je pravděpodobně nejvýznamnější vlastností antokyaninů (i jiných přírodních barviv), antioxidační účinek. Antioxidanty jsou sloučeniny, které se samy snadno oxidují, tzn. mohou předat volný elektron nebo vodík.²⁸ Důležitou roli hrají při odstraňování volných radikálů³² vznikajících při látkové přeměně. Tímto „zneškodněním“ je pak také nepřímo chráněna DNA před poškozením, které by mohlo vést k mutacím, karcinogennímu bujení apod.³⁰ Antokyaniny jsou tak významnými složkami prevence proti rakovině, nervovým a kardiovaskulárním onemocněním či cukrovce.²⁸ Bylo také prokázáno, že třeba extrakty z borůvek, brusinek a malin snižují proliferaci rakovinných buněk, způsobujících např. rakovinu tlustého střeva nebo prsu.³⁰ Zdraví prospěšná je podle výzkumů S. Renauda³³ také konzumace přiměřeného množství červeného vína, která snižuje riziko vzniku srdečních onemocnění. Prospěšný účinek antokyaninů je podpořen synergickým působením dalších biologicky aktivních látek jako jsou kondenzované taniny (proantokyanidiny) a fenolické kyseliny (např. hydroxybenzoová, hydroxyskořicová), které jsou spolu s antokyaniny přítomné v potravinách rostlinného původu.³⁰

Další významnou vlastností antokyaninů je jejich zbarvení. Barva totiž hraje velice důležitou roli při hodnocení kvality a výběru potravin. V potravinářství se barviva používají

již po staletí, aby byl zachován/obnoven jejich původní vzhled. Velký zájem je v posledních letech o nahrazení syntetických barviv, která mohou představovat určitá zdravotní rizika, přírodními pigmenty, mezi něž patří i antokyaniny.³⁴ Jsou to látky rozpustné ve vodě, které mohou dodávat potravinám oranžovou, růžovou, červenou, fialovou a modrou barvu.²⁸ Výhodou oproti dnes používaným syntetickým barvivům je to, že jsou tělu přirozená a nezatěžují organismus tak, jako barviva syntetická. Vedle toho lze antokyaninový profil v potravině využít pro hodnocení její autenticity. Typické je to při hodnocení odrůdy vína^{35,36}

Avšak izolované antokyaniny jsou poměrně nestabilní a náchylné k degradaci. Stabilita je ovlivněna různými faktory jako pH, teplota, skladování, chemická struktura, koncentrace, světlo, přítomnost kyslíku, enzymů, proteinů, jiných flavonoidů, iontů kovů atd.²⁸ Nízká stabilita a obtížná izolace z přírodních materiálů s nízkou výtěžností extrakce jsou hlavními problémy, které brání průmyslovému využití antokyaninů.

3.6.3. Separace, purifikace, identifikace

Nejčastějším způsobem izolace je extrakce kapalinou (l – l extrakce). Antokyaniny jsou látky polární, tudíž se k extrakci používají polární rozpouštědla, např. směsi voda : etanol / metanol nebo aceton. Současně s nimi se však extrahují i další polární látky (cukry, kyseliny, proteiny). Protože zatím neexistuje extrakční metoda, která by byla naprosto selektivní pro antokyaniny, je obvykle potřeba provést následné přečištění (např. SPE). V potravinářském průmyslu se k extrakci upřednostňuje okyselený etanol. Má sice menší výtěžnost než metanol, ale není toxický.²⁸

Pro charakterizaci antokyaninů byly vyvinuty různé metody. Nejběžnější technikou je vysoce účinná kapalinová chromatografie na obrácených fázích (RP-HPLC) s elektrochemickým, UV nebo fluorescenčním detektorem, nebo ve spojení hmotnostním analyzátozem (HPLC/MS), za využití různých způsobů ionizace – ionizace elektrosprejem (HPLC-ESI/MS), chemické ionizace za atmosférického tlaku (APCI), bombardováním rychle letícími atomy (FAB).³⁷ Separační účinnost lze zlepšit použitím monolitické kolony, kde celý vnitřní prostor vyplňuje porézní materiál. Vyznačují se krátkou dobou analýzy, rychlou ekvilibrací kolony a možností vyššího průtoku při nižším zpětném tlaku.³⁸

Pro identifikaci antokyaninů lze využít také MALDI. Tato metoda umožňuje stanovení molekulové hmotnosti i v komplexních vzorcích bez předchozí izolace a přečištění a ze spektra lze získat i informaci o množství jednotlivých látek. Je to snadná, rychlá a účinná metoda, která je vhodná i pro screening.³⁶ Do značné míry může být považována za techniku

komplementární k technice LC/MS, protože umožňuje analýzu látek, které mohou být na stacionární fázi velmi silně vázány a nebyly by tedy technikou LC/MS zachyceny.

4. Experimentální část

4.1. Použité přístrojové vybavení

K polymeraci byla využita vyhřívaná plotýnka (HCT basic, IKA, Německo), v experimentu byla použita ultrazvuková lázeň (Elma s 40H, Elmasonic, Německo).

MALDI/MS měření byla provedena na hmotnostním spektrometru Waters Micromass MALDI Q-TOF Premier, USA. Tento přístroj je vybaven dusíkovým laserem ($\lambda = 337$ nm, pulzní energie 300 μ J (10 Hz), frekvence puslů 20,0 Hz). Energie laseru byla 250 μ J. Skenování MALDI terčiku bylo prováděno po spirále (od středu ke krajům terčiku). Průtok chladicího plynu byl 10 ml/h, kolizní energie 5,0 eV, průtok kolizního plynu 0,32 ml/min, napětí na MCP 1900 V. Měření byla prováděna skenováním v hmotnostním rozsahu m/z 50-1000.

4.2. Použitý materiál a chemikálie

V experimentu byly použity tyto chemikálie:

styren (ST) ($p \geq 99,5\%$), Sigma Aldrich, USA

divinylbenzen (DVB) (techn. 80% směs izomerů) Sigma Aldrich, USA

hydroxystyren¹, dodal RNDr. Miroslav Soural, katedra organické chemie PřF UP Olomouc

4-vinylbenzoová kyselina (VBA) ($p = 97\%$) Matrix Scientific, Kolumbie

dekanol ($p \geq 95\%$), Sigma Aldrich, USA

cyklohexanol ($p = 99\%$) Sigma Aldrich, USA

N,N-dimethylacetamid ($p = 99\%$), Sigma Aldrich, USA

butylmetakrylát (BMA) ($p = 99\%$), Sigma Aldrich, USA

ethylendiglykolmethakrylát (EDMA) ($p = 98\%$) Sigma Aldrich, USA

tetrahydrofuran (p. a.) Penta, ČR

1,4-butandiol - ($p = 98\%$) Sigma Aldrich, USA

1-propanol (p.a.) Lachema ČR

kyselina 2-akrylamid-2methyl-1-propansulfonová (AMPS) ($p \geq 98\%$) Sigma Aldrich, USA

AIBN - ($p \geq 98\%$) Sigma Aldrich, USA

metanol - (p. a.) Penta, ČR

oenin (malvidin-3-glukosid)- Carl Roth, Francie

¹ Chemikálie byly poskytnuty RNDr. Miroslavem Souralem, Ph.D., z Katedry organické chemie PřF UP v Olomouci

trihydroxyacetofenon (THAP) - (p.a.) Sigma Aldrich, USA

HCl – (35% p.a.) Lachema ČR

NaOH – (p.a.) Lachema ČR

acetonitril – (p = 99,8) MallinckrodtBaker B. V. USA

deionizovaný voda Milipore, USA

lepidlo Fixo gum, Marabu Rubber Cement, Německo

sklíčka ThermoScientific, ESCO, USA

PE fólie

4.3. Silylace

Povrch sklíček, na kterých byl připravován monolit, byl upraven silylací, kvůli lepšímu uchycení polymeru. Sklíčka byla nejprve opláchnuta acetonem, poté promyta a ponořena na půl hodiny do 200 mM NaOH. Následovalo promytí destilovanou vodou a 200 mM roztokem HCl, ve kterém byla opět půl hodiny. Potom byla sklíčka vložena do 15% etanolickeho roztoku (okyseleného kyselinou octovou na pH 5) trimethoxysilylpropylmethakrylátu. Silylace probíhala v optimálním případě přes noc. Nakonec byla sklíčka propláchnuta acetonem a vysušena.

4.4. Příprava vzorku

Standardní roztok oeninu byl připraven o koncentraci 1 mg/ml, rozpuštěn ve vodném roztoku 0,01% HCl. Při měřeních byla potřeba také matrice, kterou v tomto případě představoval THAP. Koncentrace matrice byla 25 mg/ml ve směsi voda:acetonitril (1:1)

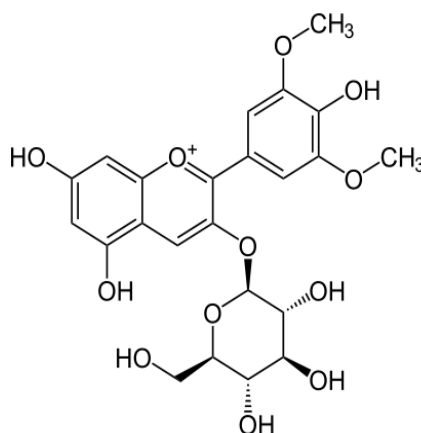


Schéma 4: Chemická struktura oeninu (malvidin 3-O-glukosidu)

4.5. Příprava monolitů

Experimenty byly prováděny se čtyřmi typy monolitů a to s methakrylátovým (BMA-EDMA), styren-divinylbenzenovým (ST-DVB), hydroxystyren-divinylbenzenovým (OH-ST-DVB) a karboxystyren-divinylbenzenovým (COOH-ST-DVB). Složení jednotlivých reakčních směsí je uvedeno v tabulkách 2, 3 a 4. U směsi pro přípravu methakrylátového monolitu jsou obsahy jednotlivých složek udány v hmotnostních procentech (m/m), u směsi pro přípravu ST-DVB a OH-ST-DVB jsou v objemových procentech (v/v) a jejich složení je analogické, reakční směs pro přípravu COOH-ST-DVB se liší, protože 4-vinylbenzoová kyselina se v této soustavě nerozpouští. Úspěšného vytvoření tohoto polymeru bylo dosaženo, na základě práce Huanga a kol. v níž vytvářeli kopolymer poly(styren-divinylbenzen-vinylbenzensulfonové kyseliny),³⁹ kde polymerační směs neobsahovala pouze VBA, ale současně také určitý podíl styrenu. Procenta uvedená v tabulce 4 (5, 10, 20 a 30%) udávají obsah VBA v monomerní směsi složené ze ST, DVB a VBA.

Tabulka 2,3,4: Procentové složení/složení jednotlivých reakčních směsí pro přípravu monolitů

Tabulka 2	m/m%
	BMA-EDMA
BMA	12%
EDMA	8%
butandiol	25%
propanol	54,50%
AMPS	0,50%
AIBN	1%

Tabulka 3	V/V%	
	ST-DVB	OH-ST-DVB
ST	20%	-
OH-ST	-	20%
DVB	20%	20%
dekanol	52%	52%
tetrahydrofuran	8%	8%
AIBN	0,50%	0,50%

Tabulka 4	COOH-ST-DVB			
	5%	10%	20%	30%
ST	0,3235 g	0,2345 g	0,1455 g	0,0565 g
DVB	0,492 g	0,492 g	0,492 g	0,492 g
VBA	0,0445 g	0,0890 g	0,1780	0,2670 g
cyklohexanol	1875 ml	1875 ml	1875 ml	1875 ml
N,N-dimethylacetamid	1,875 ml	1,875 ml	1,875 ml	1,875 ml
Voda	0,1875ml	0,1875ml	0,1875ml	0,1875ml
AIBN (m/m%)	0,5%	0,5%	0,5%	0,5%%

Všechny reakční směsi byly připravovány smícháním uvedených chemikálií kromě iniciátoru. Ten byl přidán pouze k menšímu objemu vzniklého roztoku, který byl určen k okamžité polymeraci. Po přidání iniciátoru byla směs homogenizována v ultrazvuku (10 min) a poté do ní byl 10 min zaváděn dusík kvůli odstranění kyslíku, který by měl negativní vliv na polymeraci. Zbytek roztoku (bez iniciátoru) byl uzavřen, utěsněn a uchován v lednici propozdější použití. Vzniklý roztok má být bezbarvý a čirý, pokud zežloutne, není vhodný pro polymeraci.

Monolit byl na sklíčku či MALDI destičce uchycen/nanášen několika různými způsoby. V následujících odstavcích bude popsán postup přípravy jednotlivých variant:

4.5.1. Postup 1 – příprava vrstvy

Prvním způsobem, který byl k přípravě monolitu v této práci použit, je vytvoření souvislé vrstvy monolitu na nerezové MALDI destičce nebo na sklíčku, jehož povrch byl upraven silylací. Obecně, na destičce/podkladu byl pomocí lepidla Fixo gum vytvořen „rám“, do kterého byla po jeho zaschnutí nanášena reakční směs. Poté byla tato plocha překryta kouskem polyethylenové (PE) fólie, který velikostí i tvarem odpovídal „rámu“ a po okrajích byl spoj mezi PE fólií a destičkou znovu oblepen lepidlem kvůli utěsnění. Po zaschnutí byla destička umístěna na elektrický vaříč, kde při definované teplotě 70°C po dobu 21 hodin probíhala polymerace. Poté byla PE fólie sejmuta a vrstva monolitu promyta metanolem

4.5.2. Postup 2 – polymerace monolitu ve vybroušených jamkách na destičce

Při tomto postupu byly do MALDI destičky vybroušeny jamky, do nichž byla plněna monomerní směs. Překrytí bylo prováděno dvěma způsoby – buď opět pomocí PE fólie, jejíž okraj byl utěsněn pomocí lepidla nebo byla PE folie přilepená k hladké straně druhé MALDI destičky a pomocí vyvrtaných děr v rozích obou destiček a šroubů k sobě vzájemně pevně přitisknuty a utěsněny. Polymerace byla prováděna pomocí termální iniciace při 70°C po dobu 21 h. Po ukončení reakce byl monolit opět propláchnut methanolem.

4.5.3. Postup 3 – vytvoření formy, plnění prostřednictvím kapilár

Další způsob představoval plnění směsi do vytvořené formy. Ta byla složena ze sklíčka se silylovaným povrchem, na které byly umístěny dvě krátké kapiláry (jedna pro

plnění vzniklého prostoru směsí monomerů, druhá pro odvod vytlačovaného vzduchu) a pomocí epoxidového lepidla, které bylo nanášeno po okrajích a rozetřeno přibližně na tloušťku kapiláry přilepeno krycí sklíčko s připevněnou PE fólií na straně styku se směsí. Po zaschnutí lepidla byla tato forma plněna pomocí Hamiltonovy stříkačky a kapiláry monomerní směsí. Polymerace probíhala jako v předchozích případech.

4.5.4. Postup 4- PE fólie s vyřezanými okénky

Poslední varianta, která byla k přípravě monolitické souvislé vrstvy monolitu použita, využívá k ohraničení prostoru, v němž má být monolit vytvořen, PE fólii s vyřezanými pásy („okénka“). Ta byla k MALDI destičce (s vyvrtanými otvory v rozích) připevněna opět pomocí lepidla Fixo gum a poté slisována sešroubováním s další MALDI destičkou. Tento lis měl zaručit jednotnou a definovanou tloušťku vrstvy. Po zaschnutí lepidla byl lis rozšroubován, lepidlo, které se dostalo do prostoru pro monolit, bylo odstraněno metanolem. Po usušení byla monomerní směs dávkována do volných „okének“. Ty byly překryty opět PE fólií, jejíž okraje byly utěsněny pomocí lepidla Fixo gum.

4.5.5. Postup 5 - plátky

Vrstva monolitu byla připravena také ve formě tenkých plátků. Ty byly pořízeny z monolitů, které se vytvořily ve skleněných vialkách při kontrolních pokusech. Po uplynutí 21h polymerace při 70°C byly několikrát propláchnuty metanolem a poté pod metanolem extrahovány přes noc. Následně byly skleněné vialky rozbity a z monolitu pomocí žiletky uříznuty plátky. Vytvořené plátky pak bylo potřeba připevnit na jednotlivé spoty MALDI destičky. K uchycení jsme chtěli využít „přischnutí“ monolitu k povrchu po odpaření metanolu, avšak toto přichycení nebylo příliš pevné a kousky monolitu z destičky odpadávaly. K upevnění jsme proto použili lepidlo Fixo Gum.

4.5.6. Postup 6 - drť

Při poslední variantě, která byla k nanesení monolitu na MALDI destičku využita, byl původní monolit (z vialek) rozdrcen a nanášen na MALDI destičku jako suspenze zrníček polymeru.

V prvním případě (*postup 6a*) byl monolit rozetřen v třecí misce a poté smíchán s roztokem matrice tak aby jeho koncentrace byla 10 mg/ml. Poté byly 2 μ l směsi monolitu a matrice nanášeny na MALDI destičku.

V druhém případě (*postup 6b*) bylo využito rozrušení monolitu pomocí ultrazvuku. Do plastové vialky byl vložen kousek monolitu a přidáno přiměřené množství metanolu. Poté byla nádobka vložena do ultrazvukové lázně asi na 20 min. Vzniklá kašovitá suspenze byla při míchání automatickou pipetou nabírána a dávkována na spoty MALDI destičky. Aby se pipeta neustále neucpávala hustou směsí, byl konec špičky ustřižen, čímž byl vytvořen širší otvor. Tento prášek pak po odpaření metanolu na MALDI destičce držel a při opatrné manipulaci samovolně neodpadával.

4.6. Výsledky a diskuse

Tato práce se zabývá možností využití monolitů pro hmotnostní spektrometrii s ionizací desorpcí laserem pro analýzu nízkomolekulárních látek, konkrétně antokyaninů. Použití porézní monolitické vrstvy při LDI-MS analýze mělo přinést několik výhod.

- Jednak se nabízela možnost fungování/působení monolitu jako sorbentu, obdobně jako např. při SPE to znamená, že na MALDI destičce pokryté vrstvou monolitu by byl zadržen analyt, zatímco ostatní balastní látky by byly promytím odstraněny. Následně by pak bylo možné provést LDI-MS analýzu adsorbovaných látek.
- Monolit by mohl potlačovat signál matrice, který při analýzách nízkomolekulárních látek často ruší signál (interferuje) sledované látky.
- Úvahou také bylo, že velký povrch porézního monolitu umožní větší rozptýlení energie dodané laserem, což by znamenalo jemnější ionizaci. To by vedlo k potlačení vzniku iontů fragmentu ve prospěch iontů rodičovských.
- Zavedení vhodných kyselých „snadno ionizovatelných“ skupin (-OH, COOH) do struktury monolitu by mohlo přispívat k usnadnění transferu protonu na analyt a tím k efektivnější ionizaci. Tím by bylo dosaženo zvýšení odezvy signálu.

4.6.1. Příprava monolitické vrstvy-hodnocení přípravy

Prvním způsobem, kterým byly monolity na destičce připravovány, byl *postup 1*. Touto cestou se podařilo připravit monolitickou vrstvu se všemi polymeračními směsmi, kromě COOH-STDVB. Problémem bylo, že příprava monolitické vrstvy ze všech typů polymerační směsi se nedařila reprodukovatelně, přestože při souběžně prováděném kontrolním pokuse polymerace malého množství stejné směsi ve skleněné vialce k vytvoření monolitu vždy došlo. Vzniklá vrstva monolitu neměla definovanou tloušťku a tloušťka navíc nebyla stejná

po celé ploše. Negativní vliv na homogenitu vrstvy měly také vzduchové bublinky, které vznikly při překrývání polymerační směsi PE fólií či sklíčkem.

Dalším testovaným postupem bylo dávkování monomerní směsi do jamek vybroušených do MALDI destičky (viz *postup 2*). Jamky měly umožnit dávkovat větší objem polymerační směsi. Tento postup však při přípravě monolitu rovněž nevedl k reprodukovatelnému vytvoření monolitického povrchu.

Další způsob, který měl zabránit možnému vytlačení a vytěkání monomerní směsi a zamezit tvorbě vzduchových bublin při pokládání krycí fólie nebo sklíčka, představoval plnění směsi do formy (viz *postup 3*). V tomto případě nedošlo k vytvoření souvislé vrstvy monolitu.

Poslední varianta, která byla k přípravě souvislé monolitické vrstvy použita, využívá k ohraničení prostoru, v němž má být monolit vytvořen, PE fólii s vyřezanými pásy (*postup 4*). Ani tento způsob však nevedl ke zdárnému vytvoření monolitické vrstvy.

Z uvedených postupů se souvislou vrstvou monolitu použitelnou pro LDI experimenty podařilo připravit pouze *postupem 1*. Jak bylo uvedeno, je reprodukovatelnost i tohoto postupu poměrně malá. Důvodů, proč byla příprava monolitické vrstvy problematická, může být několik.

Jedna z možností, která připadala v úvahu, byl nevhodný iniciátor. Po uplynutí polymerační doby totiž často na destičce zůstávala směs v tekutém stavu, jakoby polymerace vůbec neprobíhala. Proto byly prováděny souběžné pokusy se stejnou směsí, jaká byla na destičce, také ve skleněných vialkách. Tyto experimenty však domněnku vyvrátily, neboť ve vialkách se polymer vytvořil vždy. Byl testován i vliv jeho množství ve směsi na polymeraci. Provedené pokusy s 0,5%; 1% a 2% hmotnostním obsahem AIBN ukázaly, že nejvhodnější koncentrace je 0,5% iniciátoru na celkovou hmotnost roztoku.

Dalším faktorem, který mohl mít negativní vliv na vytvoření vrstvy monolitu, je použití lepidla, které mělo vymezit prostor a zároveň sloužit jako těsnění. Nerovný povrch naneseného lepidla mohl způsobovat určité netěsnosti, které mohly vést k uniku těkavých složek, eventuálně mohl svou roli hrát také přímý kontakt lepidla a polymerační směsi. Proto byly zkoušeny také metody bez jeho použití (např. MALDI destička s vybroušenými jamkami). Jak se však ukázalo, tento způsob také nevedl k významnému zlepšení. Alternativní variantou, která však nebyla testována, by mohlo být použití teflonové pásky, jako v práci Bakryho a kol.²⁴

Jedním z možných důvodů, proč bylo obtížné připravit vrstvu monolitu, je použití termálně iniciované polymerace. V pracích jiných autorů (např. Bakry, Švec), které se zabývají vytvářením monolitu v plošném formátu, se uplatňuje především polymerace

iniciovaná UV zářením. Tento způsob je mnohem rychlejší, reakce probíhá 5-15 min.^{23, 24} Pokud polymerace probíhá rychleji, je menší časový prostor, aby docházelo např. k úniku těkavých složek a není potřeba systém hermeticky utěšňovat. Polymerace iniciovaná UV zářením však pro srovnání prováděna nebyla, protože k dispozici nebyl vhodný zdroj UV záření.

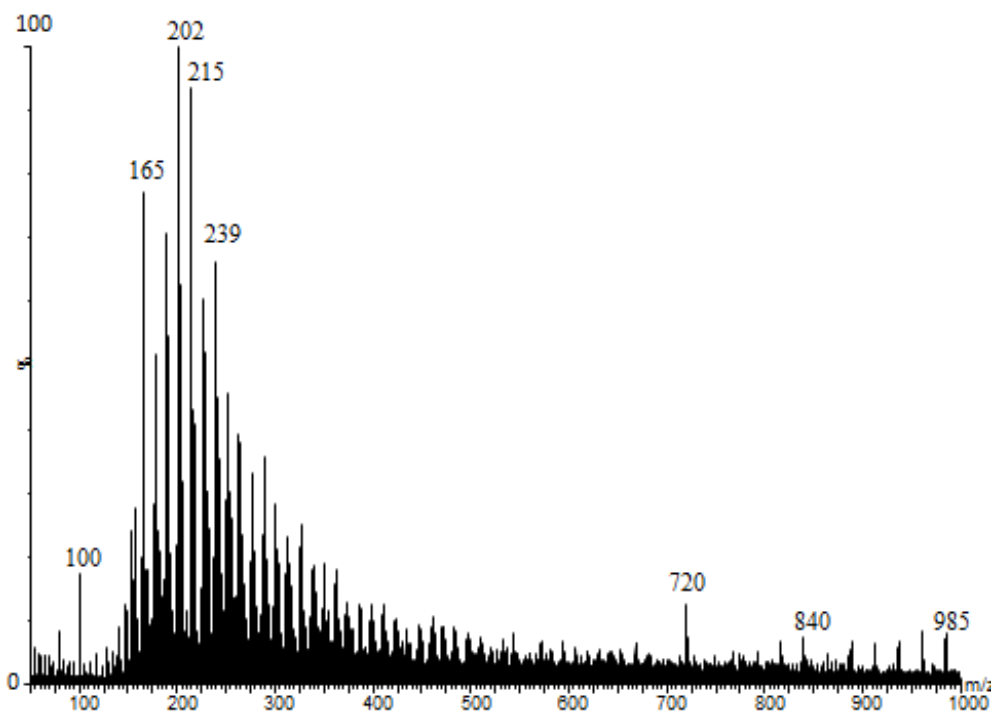
Jelikož se tedy v této práci podařilo vytvořit jen omezený počet monolitických vrstev, byly k analýze využity i jiné přístupy „modifikace“ povrchu nerezové MALDI destičky monolitem. V prvním případě byla vrstva monolitu nahrazena tenkými plátky monolitu (viz *postup 5*) Ty byly pořízeny z monolitů, které se vytvořily ve skleněných vialkách při kontrolních pokusech. Dobře se pracovalo s methakrylátovým monolitem, z něhož bylo celkem snadné odříznout tenké plátky. Naopak poměrně špatné vlastnosti pro řez vykazoval styrenový monolit, který se při krájení lámal, a bylo pracnější z něj odříznout tenký plátek. K upevnění plátek na MALDI destičku bylo použito lepidlo Fixo Gum. V druhém případě byl původní monolit rozdrcen a nanášen na MALDI destičku pomocí pipety jako suspenze zrníček polymeru roztoku matrice nebo v metanolu. V této formě byla nadávkována určitá vrstva porézního polymeru na jednotlivé spoty destičky.

Ze všech uvedených způsobů přípravy monolitů, byly k analýze použity jen monolity získané *postupem 1*, kromě COOH-STDVB který se tímto způsobem nepodařilo připravit a dále *postupy 5 a 6*. Ostatní metody nevedly k vytvoření vrstvy, která by byla použitelná k MALDI/MS experimentům.

4.6.2. MALDI/MS antokyaninů s využitím monolitů

Nejvýznamnější pík při analýzách patřil molekulovému iontu oeninu s hodnotou m/z 493, dále pak pík fragmentu oeninu, který odpovídá ztrátě glukózy, s hodnotu m/z 331. Objevovaly se také sodné a draselné adukty fragmentu (353, resp. 369) i molekulového iontu (515 a 531). Matrice (trihydroxyacetofenon, THAP) poskytovala ve spektru signál při hodnotě m/z 169. Při MALDI-TOF-MS analýzách oeninu byla srovnávána intenzita signálu těchto výše uvedených iontů na různých monolitech.

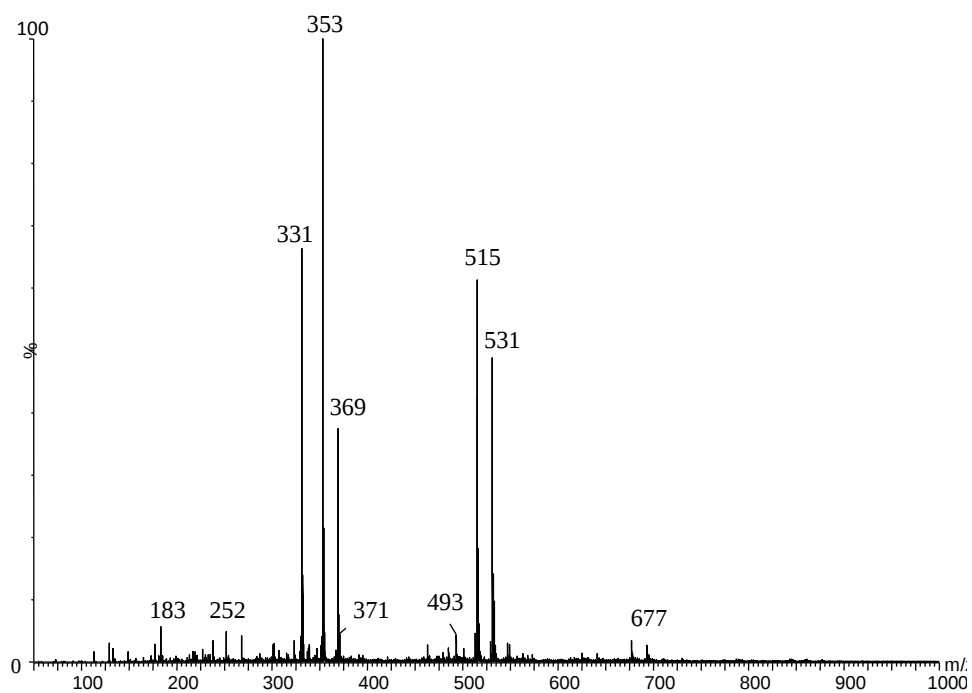
Před zahájením analýzy vzorku byly proměřeny také odezvy (spektra) samotných vrstev monolitů fungující jako slepý vzorek. Tím bylo zjištěno pozadí, případně možné interferující píky. Tyto experimenty ukázaly, že monolity nezpůsobují výrazné pozadí ve spektru a celkový iontový proud (TIC) je malý. Tento fakt potvrzuje např. spektrum OH-ST-DVB (obrázek 5).



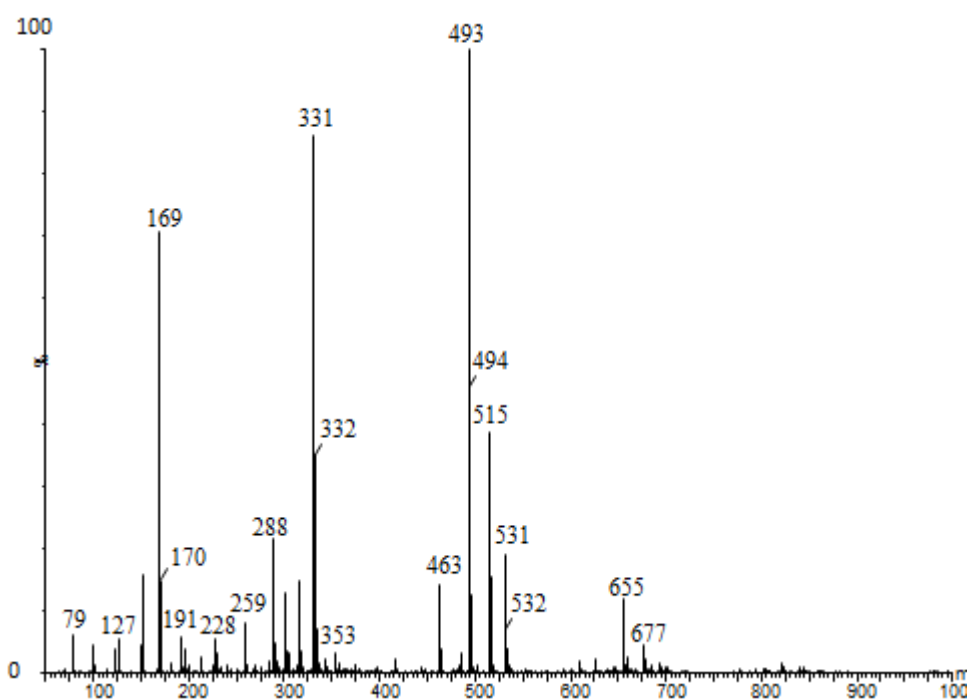
Obrázek 5: MS spektrum hydroxystyren-divinylbenzenového monolitu pro zjištění pozadí, intenzita nejvyššího poměru $m/z = 202$ je $2,55 \cdot 10^2$.

Oenin byl nanášen na monolit stejným způsobem, jaký je používán při běžném dávkování analytu na MALDI terčíky. Při měření byl porovnáván charakter spekter oeninu naneseného bez matrice přímo na terčík nerezové MALDI destičky, dále na terčík s naneseným monolitem a na tyto povrchy (nerezová destička a monolit) byla dávkována také směs oeninu a matrice. Standardní postup vůči, kterému byly spektra porovnávány je oenin smíchaný s matricí nanesený na povrch nerezové MALDI destičky

K měření byl oenin nanášen na jednotlivé monolity připravené ve formě vrstvy, plátků a rozetřeného monolitu. Aby bylo možné posoudit efekt monolitu, byly na destičku zařazeny referenční roztoky samotného oeninu (oenin dávkovaný na kovový povrch MALDI destičky, obrázek 6) a také oenin smíchaný s matricí, analogicky ke standardnímu postupu při identifikaci technikou MALD (viz obrázek 7).



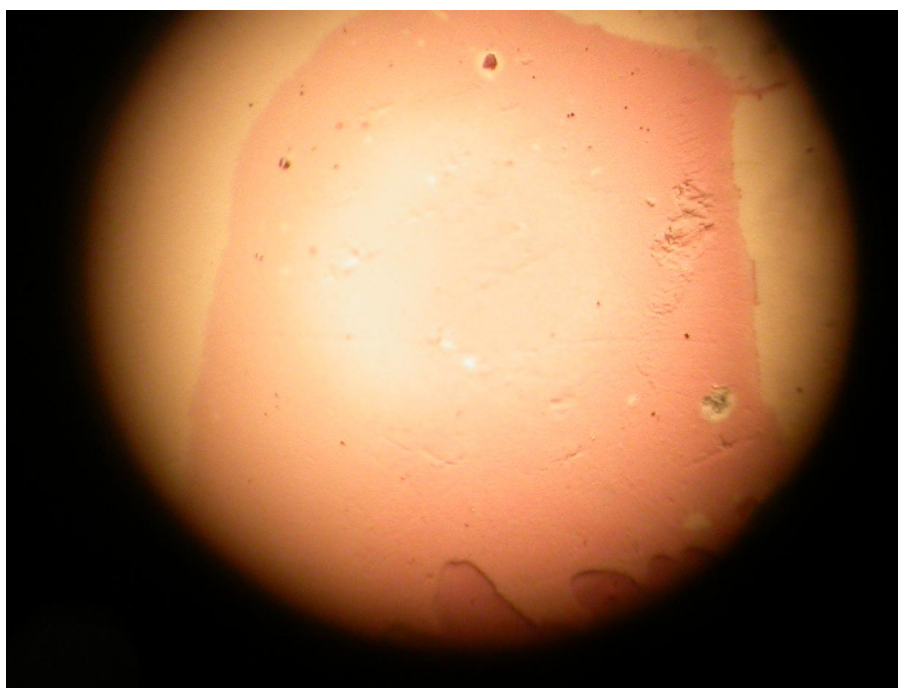
Obrázek 6: MS spektrum oeninu bez přítomnosti matrice na povrchu nerezové LDI destičky, odezva nejvyššího píku $6,14 \cdot 10^4$



Obrázek 7: MS spektrum oeninu v přítomnosti matrice na povrchu nerezové LDI destičky (standardní metoda analýzy), intenzita molekulového iontu ($m/z = 493$) $2,19 \cdot 10^5$.

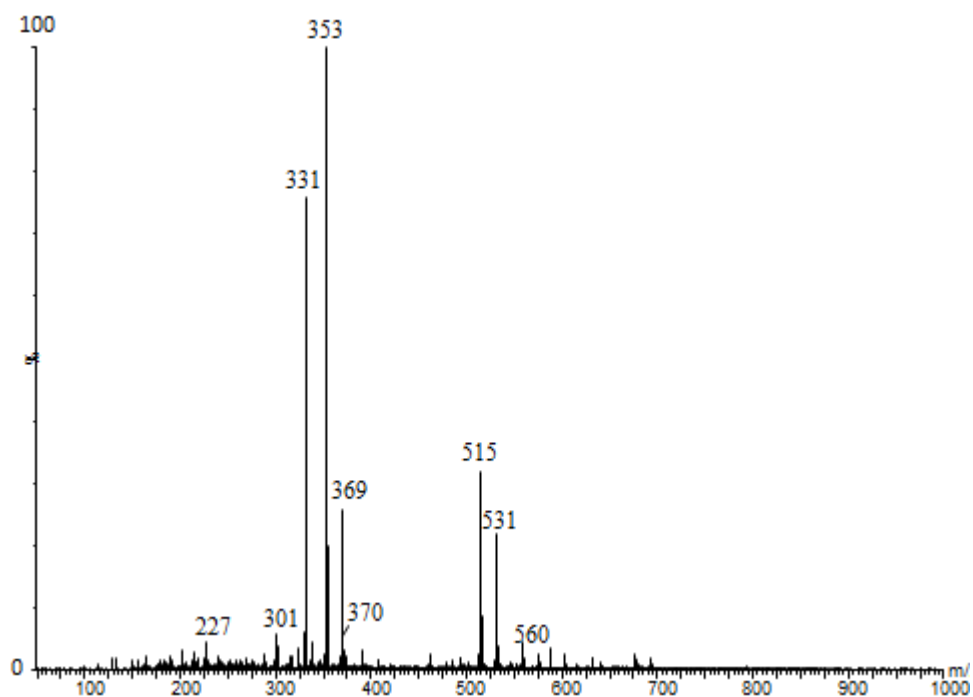
4.6.2.1. *Výsledky měření z vrstvy*

Souvislá vrstva monolitu měla být z hlediska homogenity či opakovatelnosti výsledků nejlepší variantou z uvedených možností. Při dávkování vzorku se zvláště u ST-DVB projevil silný hydrofobní účinek, který zabraňoval jeho přilnutí k monolitické vrstvě. V důsledku této hydrofobicity vznikalo na kapičce roztoku oeninu velké povrchové napětí, které ji zformovalo do tvaru malé kuličky. Tu bylo poměrně pracné umístit na povrch monolitu a ve tvaru kulovité kapičky setrvala, na povrchu monolitu až do odpaření rozpouštědla. Díky tomu pak byl vzorek zkoncentrován na malé ploše, což by logicky mělo vést ke zlepšení odezvy.

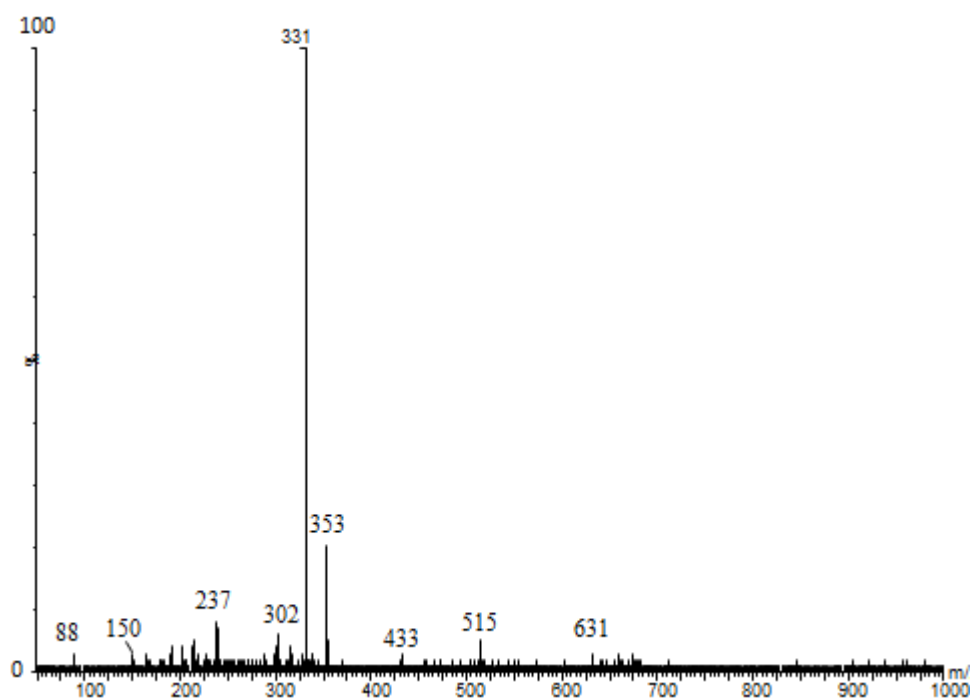


Obrázek 8: Vzorek oeninu nanesený na vrstvu BMA-EDMA monolitu při 40x zvětšení optického mikroskopu.

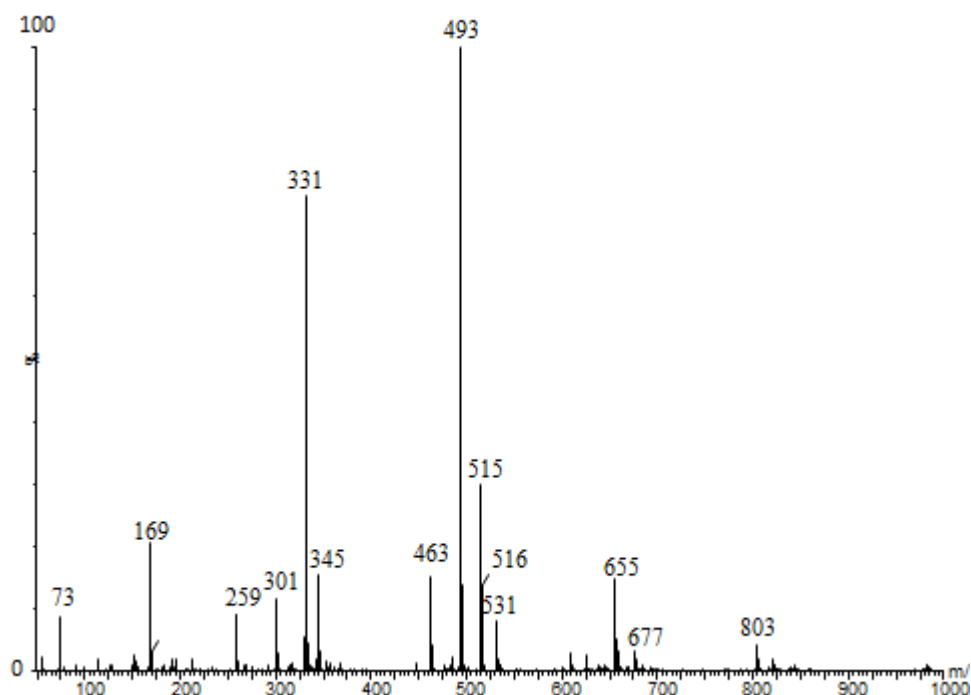
Překvapivě tato domněnka potvrzena nebyla, jak ilustruje spektrum na obrázku 9. Ve srovnání se standardní metodou analýzy (oenin s matricí na povrchu LDI destičky, obrázek 7) došlo k celkovému poklesu odezvy a intenzita signálu sledované látky se prakticky ztrácí v šumu. Výrazný je naopak signál aglykonu a také sodných a draselných aduktů jak fragmentu, tak molekulárního iontu. Tento jev potlačení signálu rodičovského iontu ($m/z = 493$) i snížení celkové odezvy oproti standardní metodě byl pozorován u všech monolitů při kterékoli formě nanesení na destičku (viz spektrum na obrázku 10 s COOH-STDVB monolitem), ačkoli od monolitů s funkčními skupinami ($-OH$ a $-COOH$) byla očekávána lepší ionizační účinnost a díky tomu také lepší odezva. Srovnání intenzit bez použití matrice ze ST-DVB, OH-STDVB a methakrylátového monolitu je uvedeno v grafu 3. Z těchto výsledků tedy vyplývá, že monolity nelze při analýze antokyaninů využít přímo bez přítomnosti matrice.



Obrázek 9: MS spektrum vzorku oeninu analyzovaného z vrstvy styren-divinylbenzenového monolitu bez přítomnosti matrice, odezva nejvyššího píku $8,78 \cdot 10^3$.



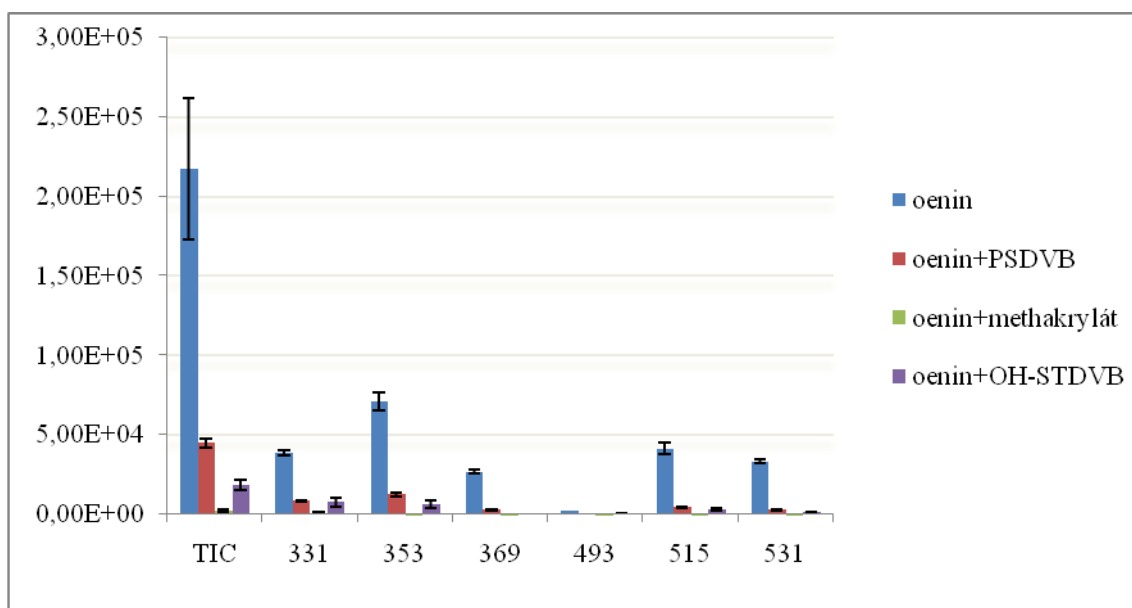
Obrázek 10: MS spektrum vzorku oeninu analyzovaného z karboxystyren-divinylbenzenového (s 10% obsahem VBA) monolitu ve formě plátku přilepeného na LDI destičku bez přítomnosti matrice, odezva nejvyššího píku $9,8 \cdot 10^1$.



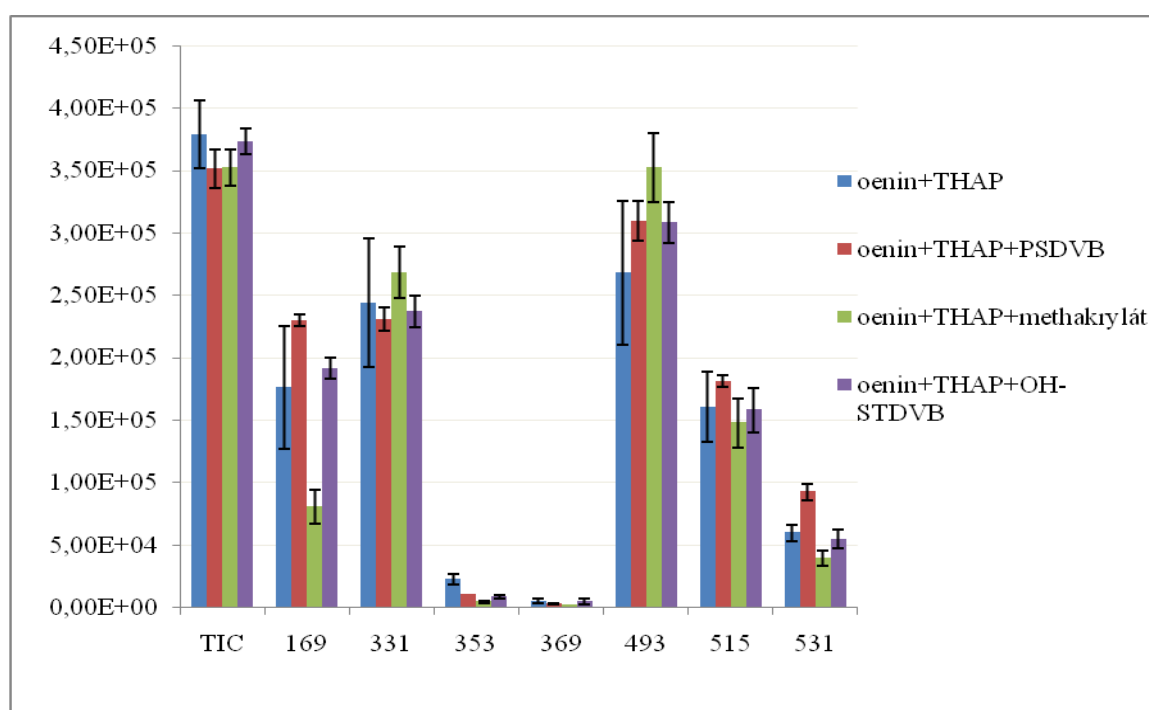
Obrázek 11: MS spektrum vzorku oeninu analyzovaného z vrstvy methakrylátového monolitu za přítomnosti matrice, odezva nejvyššího, molekulového píku oeninu $3,84 \cdot 10^5$.

Proto byla sledována také odezva signálu oeninu za přítomnosti THAP jako matrice na jednotlivých monolitech. Nejlepších výsledků měření bylo dosaženo na methakrylátovém monolitu (obrázek 11), který byl na destičce vytvořen *postupem 1*. V porovnání se standardní MALDI metodou (obrázek 7) totiž došlo ke zvýšení signálu molekulového iontu a také k výraznému snížení signálu matrice jak je vidět ze spekter. Za přítomnosti matrice na monolitu se rovněž snižuje intenzita aduktů a dalších balastních látek takže spektrum je „čistší“. Z grafu 4 je také dobře vidět efekt potlačení signálu matrice. Je však nutno dodat, že měření by bylo vhodné provést ještě na několika opakováně připravených monolitických površích a zjištěný efekt statisticky prověřit. Jak již bylo uvedeno, opakovaná příprava monolitické vrstvy byla poměrně problematická.

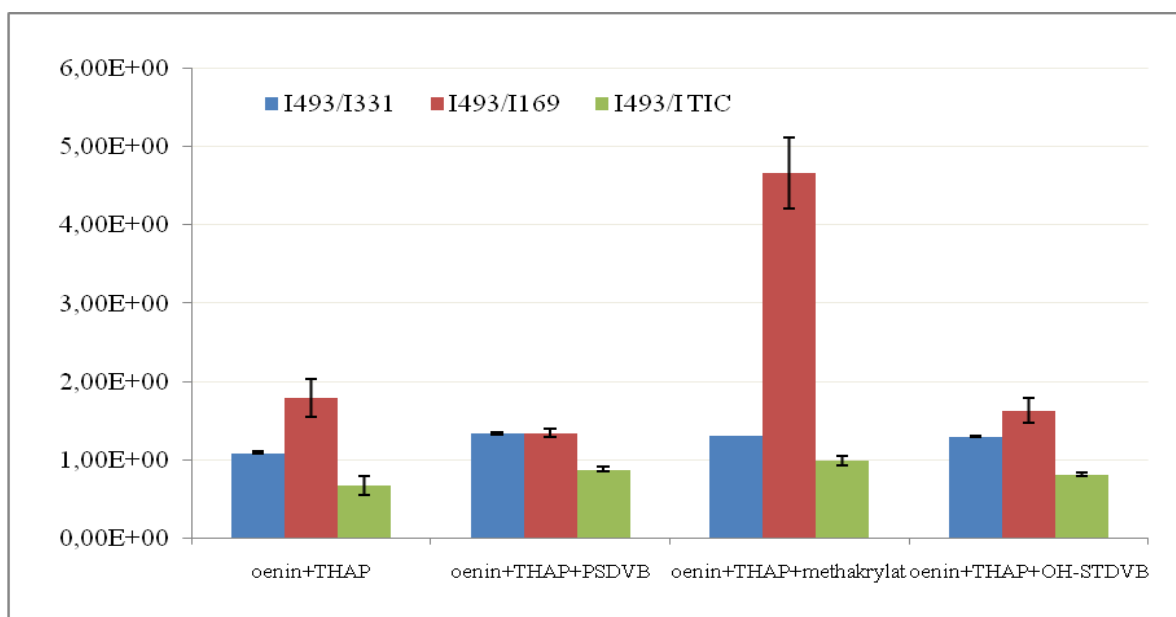
V následujících grafech srovnávajících hodnoty intenzit, resp. poměry intenzit jsou znázorněny průměry, které byly získány ze tří opakovaných měření (ze tří spotů dávkovaných na jedné destičce). Chyby měření (zobrazených jako chybové úsečky v grafech porovnávajících intenzity, resp. poměry intenzit iontů) byly vypočteny jako směrodatná odchylka z těchto tří opakovaných měření.



Graf 3: Srovnání velikosti intenzit sledovaných iontů ze vzorku oeninu a stejného vzorku s matricí analyzovaného z povrchu nerezové LDI destičky, ST-DVB, BMA-EDMA a OH-STS VB bez přidavku matrice



Graf 4: Srovnání velikosti intenzit sledovaných iontů ze vzorku oeninu smíchaného s matricí (THAP) analyzovaného z povrchu nerezové LDI destičky, ze ST-DVB, BMA-EDMA a OH-STS VB



Graf 5: Srovnání poměru intenzit molekulového iontu oeninu ($m/z = 493$) k iontu fragmentu ($m/z = 331$), matrice ($m/z = 169$) a celkovému iontovému proudu (TIC) analyzovaných za přítomnosti matrice z povrchu nerezové LDI destičky, ze styren-diviylbenzenového, methakrylátového a hydroxystyren-divinylbenzenového monolitu.

Z grafu 5 je patrné, že opakovatelnost poměrů intenzit iontů je dobrá (chybové úsečky jsou velmi malé) a rozdíly mezi jednotlivými typy pokusů jsou statisticky významné. Rovněž je zde dobře vidět pokles intenzity signálu matrice v případě použití methakrylátového monolitu, neboť poměr intenzit molekulového iontu oeninu (I_{493}) ku intenzitě matrice (I_{169}) je zde nejvyšší. Dále lze z grafu pozorovat mírný nárůst intenzity rodičovského iontu na úkor jeho fragmentu (I_{331}) při použití kteréhokoli z těchto monolitů. Tento nárůst by mohl být vysvětlen určitým zjemněním procesu ionizace, způsobeným efektivním předáním energie přes monolit.

Byla testována i možnost opakovaného použití takto připravených monolitů. Provedené experimenty prokázaly, že po důkladném promytí metanolem mohou být k analýze znovu použity.

4.6.2.2. *Výsledky měření z povrchu monolitů ve formě plátek*

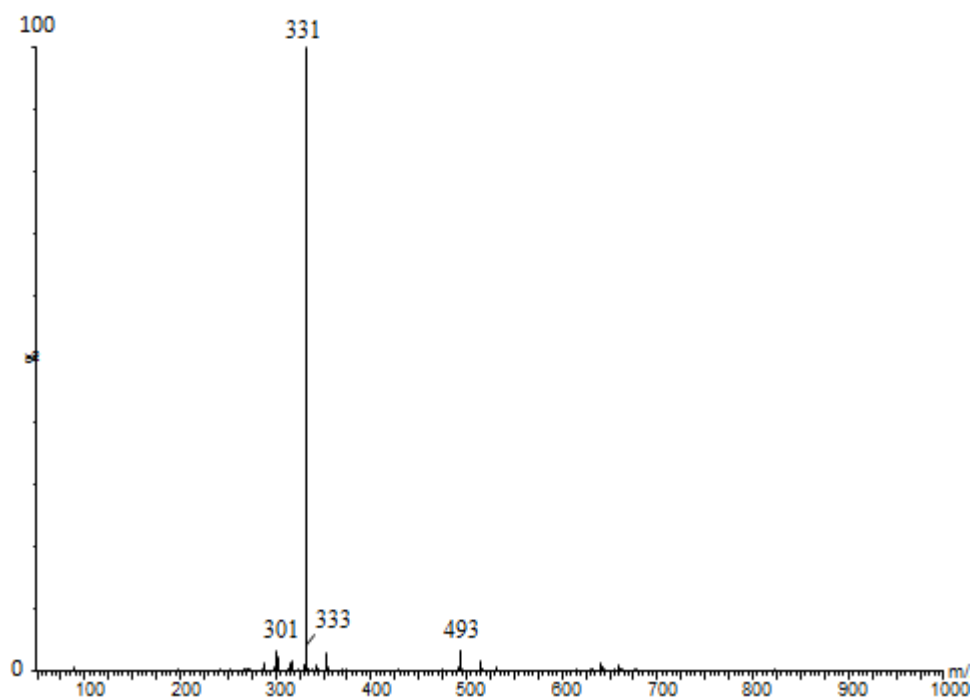
Jak již bylo řečeno k upevnění plátek monolitu na LDI destičku bylo použito lepidlo Fixo Gum. Proto bylo nutné zjistit, zda složení lepidla neovlivňuje pozadí MS spektra. Bylo zjištěno, že v rozsahu měření nedochází k výraznému signálu balastních iontů. Podobně monolit promytý metanolem a připevněný k LDI destičce tímto lepidlem nezvyšoval zásadním způsobem šum, a tudíž výrazně nepřispíval k charakteru MALDI-MS spektra.

Vzorek oeninu byl dávkován na přichycené plátky methakrylátového, styren-divinylbenzenového a karboxystyren-divinylbenzenového (s10% obsahem VBA) monolitu a pro porovnání také na samotné lepilo. Měření probíhala opět jak bez přídavku matrice, tak i s matricí. Pro ilustraci je na obrázku 12 ukázka vzorku naneseného na methakrylátový monolit připraveného k analýze.

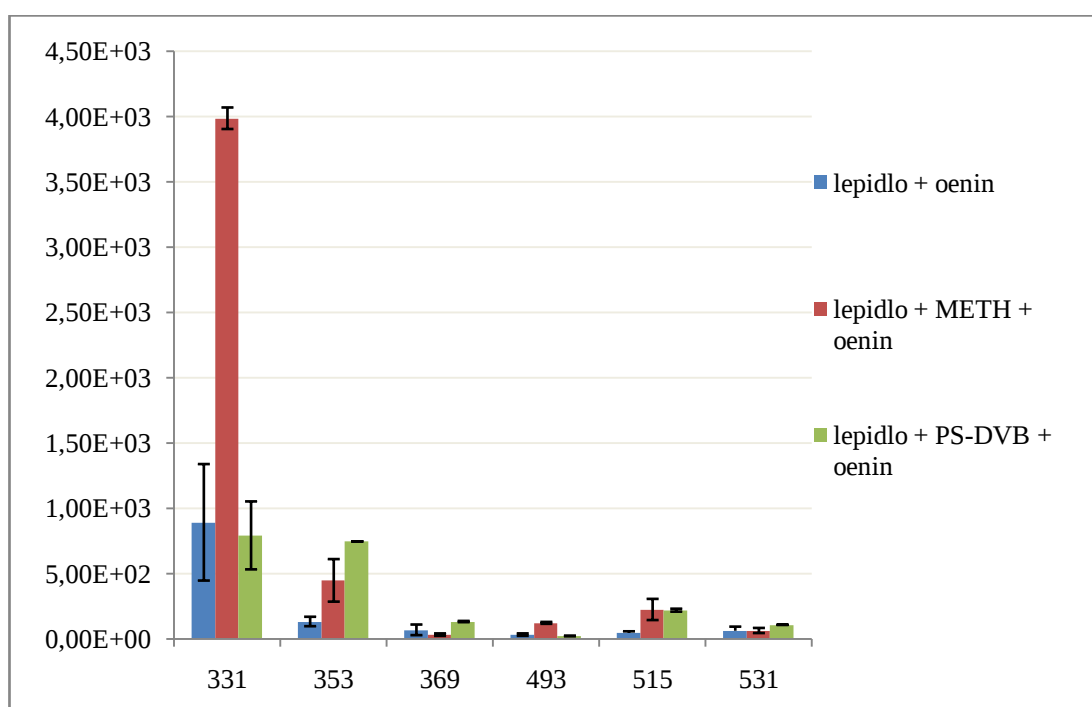


Obrázek 12: Vzorek oeninu nanesený na plátku methakrylátovém monolitu při 40x zvětšení optického mikroskopu.

U naměřených dat byl pozorován podobný trend jako u měření prováděných ze souvislé vrstvy monolitu, a sice že bez použití matrice byla odezva molekulárního iontu minimální, prakticky v úrovni šumu. Výrazný byl v podstatě pouze signál aglykonu, zejm. u BMA-EDMA monolitu jak dokládá např. spektrum 13, jeho intenzita byla však také poměrně nízká, řádově 10^3 . Kromě fragmentu se pak projevují hlavně píky sodných aduktů. Tato tvrzení lze doložit grafem 6 srovnávající intenzity jednotlivých iontů. V tomto grafu nejsou uvedeny hodnoty získané pomocí COOH-STDVB monolitu, neboť ty vykazovaly rozdílná spektra s velmi malou odezvou.



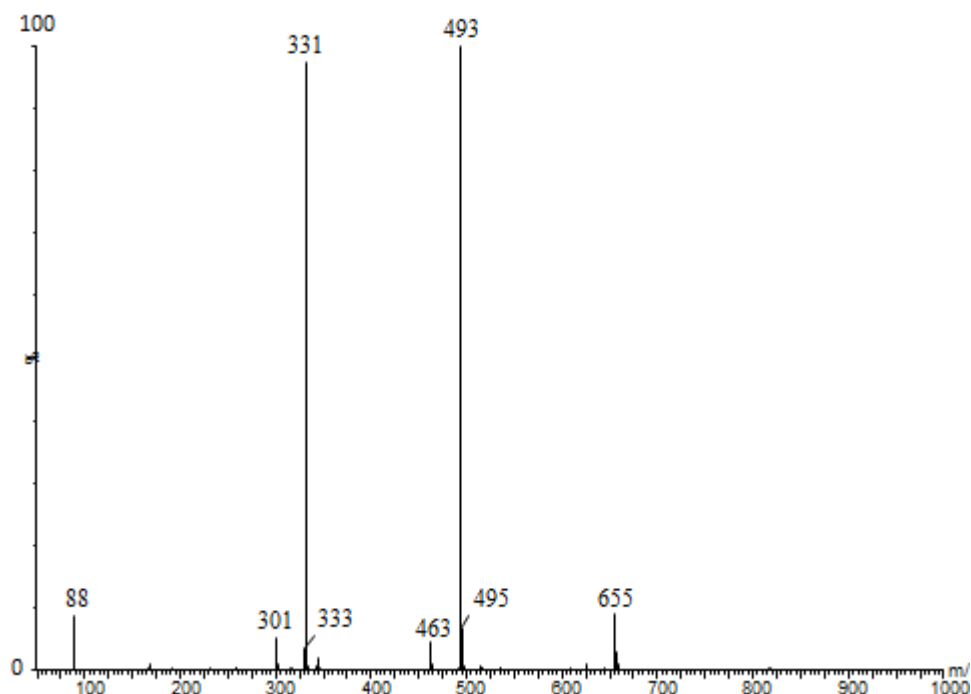
Obrázek 13: MS spektrum vzorku oeninu analyzovaného z plátku methakrylátového monolitu přilepeného na LDI bez přítomnosti matrice, odezva nejvyššího píku ve spektru je $4,07 \cdot 10^3$.



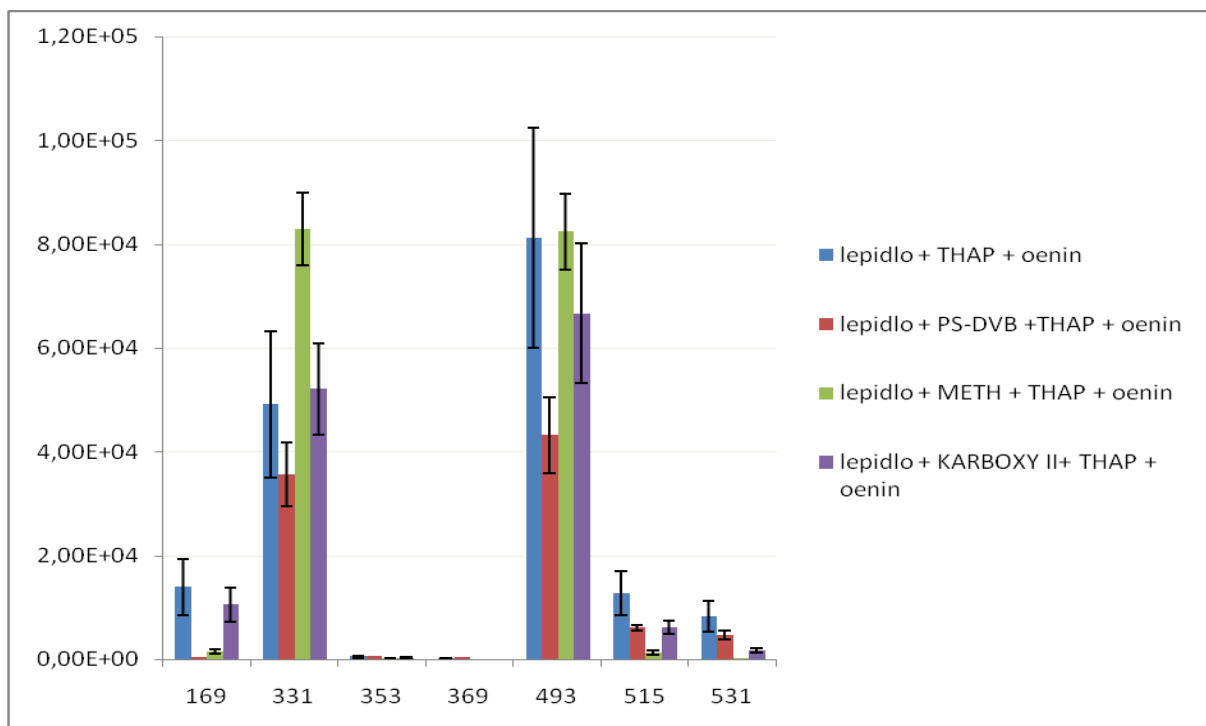
Graf 6: Srovnání velikosti intenzit sledovaných iontů ze vzorku oeninu analyzovaného z povrchů přilepených plátků monolitu bez přidavku matrice. Měřítka. Velikost TIC byla cca od $5 \cdot 10^4$ (oenin+lepidlo) do $1,7 \cdot 10^5$ (lepidlo + PSDVB – oenin).

Za účasti matrice pak opět došlo k nárůstu intenzity rodičovského iontu oeninu, jeho intenzita však byla nižší než tomu bylo v případě napolymerované vrstvy. Ze získaných výsledků lze říci, že použitím BMA-EDMA, COOH-STDVB monolitu nebo lepidla smíchaného s matricí při analýze vzorku oeninu má v rámci experimentální chyby přibližně stejný účinek. Nižší intenzity sledované hmotnosti je pak dosaženo pomocí ST-DVB monolitu (viz graf 7)

Nejlepších výsledků v rámci tomto uspořádání opět dosahuje methakrylátový monolit, který se vyznačuje prakticky nejvyšší intenzitou iontu oeninu (i jeho fragmentu) a současně velice výrazně potlačuje signál matrice i aduktů. Na základě velikosti chybových úseček k celkové velikosti signálu lze také říci, že se vyznačuje také nejlepší opakovatelností. U spekter, která byla získána při těchto experimentech, byla sice naměřena nižší intenzita než v případě použití napolymerované vrstvy (*postup 1*), zato jsou čistší, vyskytuje se v nich méně dalších píků a prakticky není patrný pík matrice (např viz obrázek 14). K tomuto jevu může přispívat i lepidlo, ale vliv jeho složení na charakter spektra (snížení ionizace některých látek) bude ještě vhodné detailně prozkoumat, mimo jiné i z pohledu obecného využití tohoto lepidla pro imobilizaci pevných vzorků na LDI destičce.



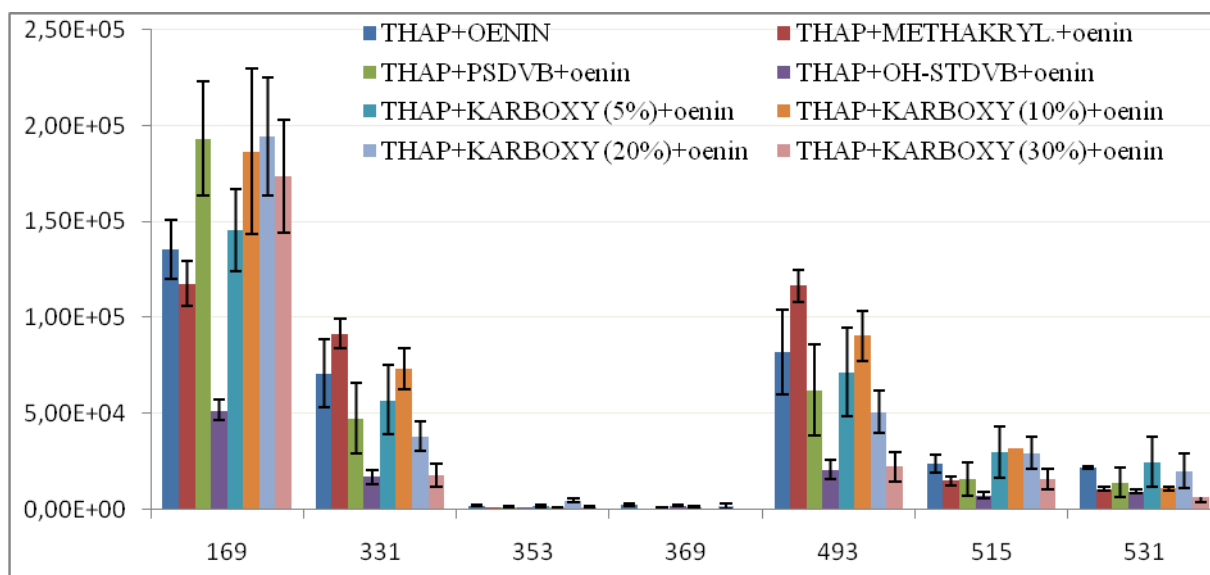
Obrázek 14: MS spektrum vzorku oeninu analyzovaného za přítomnosti matrice z plátku methakrylátového monolitu přilepeného na LDI destičku, odezva nejvyššího píku ve spektru je $7,11 \cdot 10^4$



Graf 7: Srovnání velikosti intenzit sledovaných iontů ze vzorku oeninu analyzovaného z povrchů přilepených plátek monolitu s přidavkem matrice. Velikost TIC se byla v rozmezí cca od 3.10^5 (lepidlo+oenin+COOH-STDVB) do 8.10^5 (lepidlo + THAP+oenin).

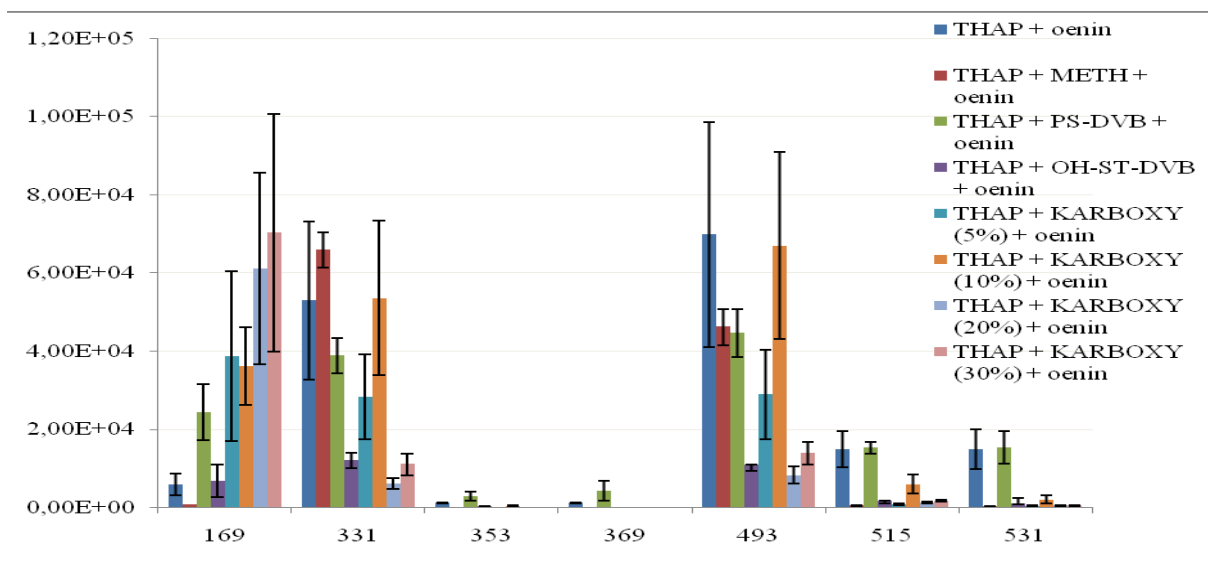
4.6.2.3. Výsledky měření z povrchu rozdrčeného monolitu

K MALDI/MS měření byly ve formě prášku použity všechny druhy připravených monolitů, tzn. BMA-EDMA, ST-DVB, OH-STDVB a COOH-STDVB (s 5, 10, 20 a 30% obsahem VBA). Již bylo uvedeno, že rozdrčení monolitů bylo provedeno dvěma způsoby (viz *postup 6a a 6b*). Pravděpodobně nejvýraznější rozdíl je ten, že v případě série měření s monolitem naneseným *postupem 6a* se výrazně projevoval signál matrice a to i v případě použití standardní metody (oenin smíchaný s THAP na nerezovém povrchu LDI destičky). Analýzou vzorku z monolitů nanesených na destičku spolu s matricí jsou získána spektra, v nichž nejvyšší nebo jeden z nejvyšších signálů patří matrici. To je zcela nežádoucí účinek, neboť využití monolitů při MALDI (LDI) analýze má vést k eliminaci signálu matrice. Intenzita jednotlivých píků s chybovými úsečkami je uvedena v grafu 8, z něhož je rovněž vidět dominantní, ale nežádoucí signál matrice.



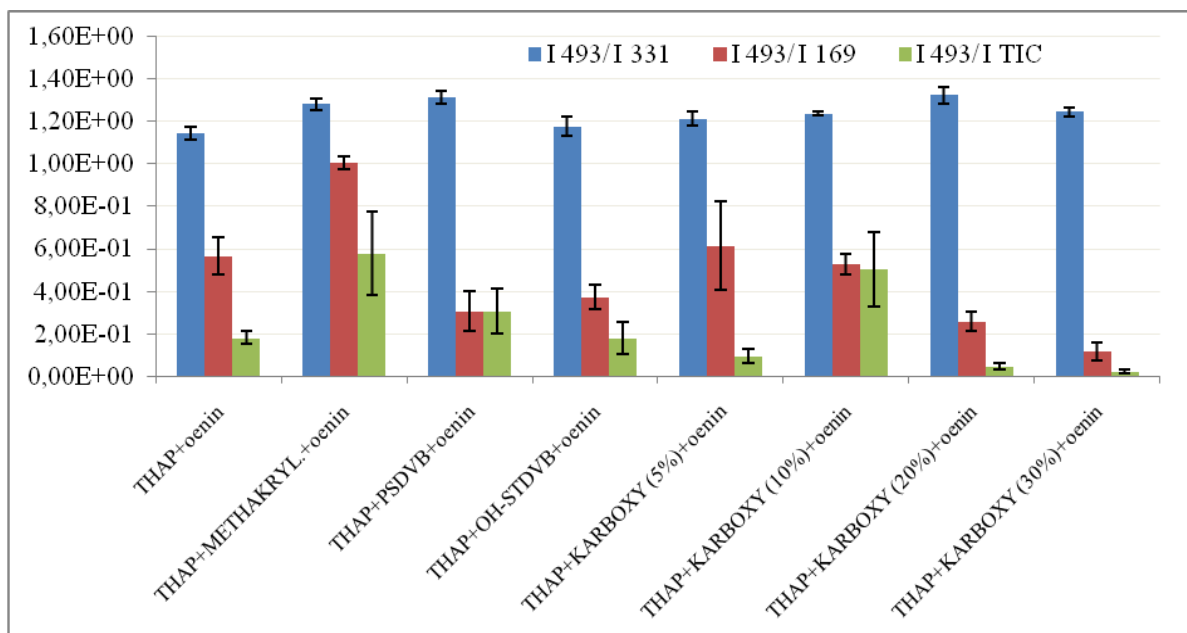
Graf 8: Srovnání velikosti intenzit sledovaných iontů ze vzorku oeninu analyzovaného z povrchů rozdrcených monolitů připravených postupem 6a.

Při použití druhého postupu přípravy a nanášení monolitu na LDI destičku (viz *postup 6b*) se již signál matrice projevoval méně, ve většině případů nepřevyšoval signál analytu, přesto je jeho hodnota vysoká jak je patrné z grafu 9. Použití všech styrenových monolitů poskytuje horší výsledky, než pokud je vzorek oeninu nanášen spolu s matricí pouze na nerezovou LDI destičku. Jinak je tomu v obou případech u methakrylátového monolitu, který odezvu matrice oproti srovnávacímu standardnímu měření snížil.

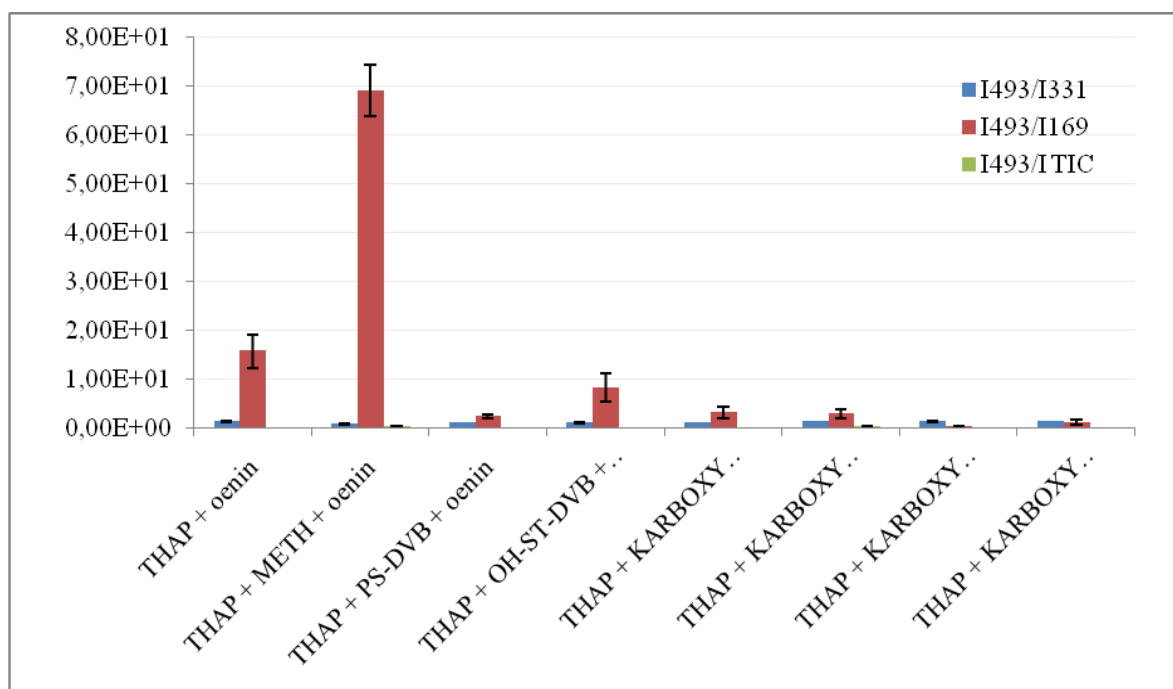


Graf 9: Srovnání velikosti intenzit sledovaných iontů ze vzorku oeninu analyzovaného z povrchů rozdrcených monolitů připravených postupem 6b

V obou těchto předchozích grafech (8, 9) lze také pozorovat, že naměřené hodnoty jsou zatíženy poměrně velkou chybou měření. K té přispívá pravděpodobně také nestejnorodost připraveného materiálu a malý počet opakování analýz. Aby bylo možné srovnat charakter spektra objektivněji, bez ohledu na absolutní velikosti odezvy, byly hodnoceny opět poměry intenzit, které jsou znázorněny v grafech 10, 11. Ty např. potvrzují, že signál matrice snižuje pouze methakrylátový monolit, ostatní (styrenové) monolity žádný kladný efekt ve srovnání se standardní technikou analýzy (vzorek smíchaný s matricí analyzovaný z povrchu nerezové LDI destičky) nepřinášejí, ale dochází ke staticky významnému zlepšení rodičovského iontu oproti jeho fragmentu (poměr 493/331) při použití všech druhů monolitů s výjimkou OH-STDVB, jak je patrné z grafu 10



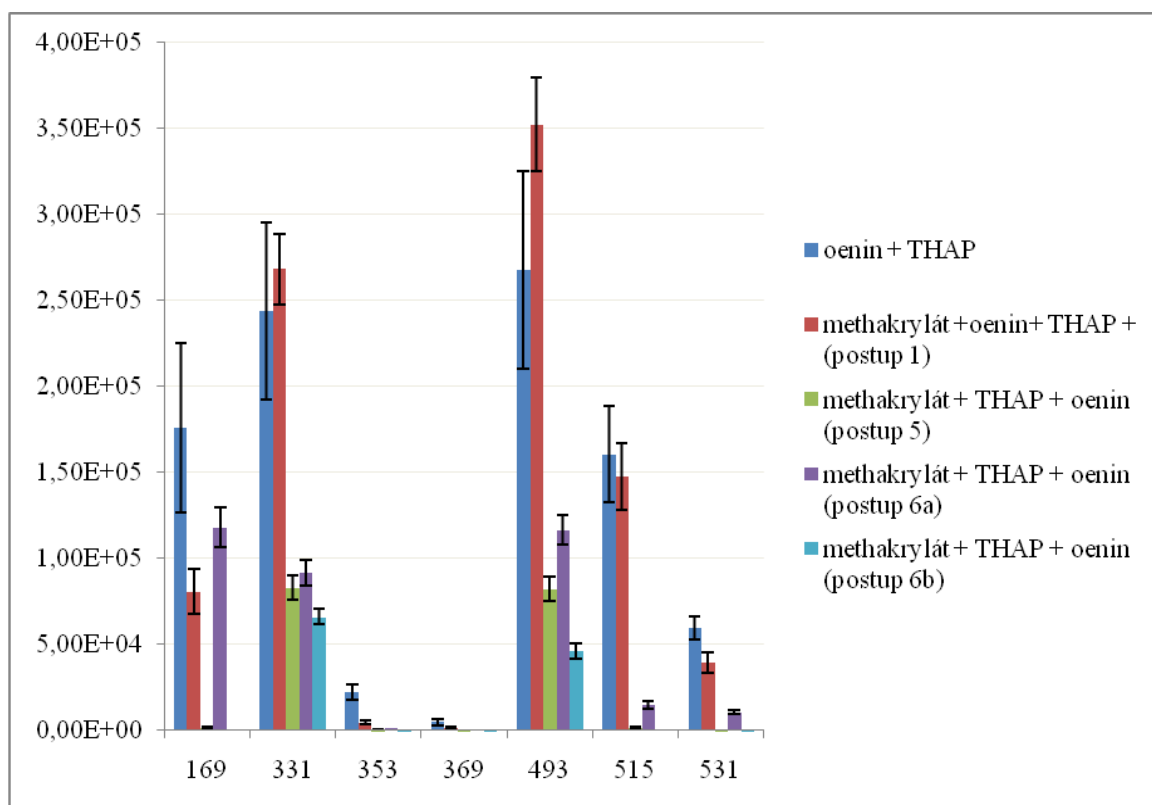
Graf 10: Srovnání poměru intenzit molekulového iontu oeninu ($m/z = 493$) k iontu fragmentu ($m/z = 331$), matrice ($m/z = 169$) a celkovému iontovému proudu (TIC) analyzovaných za přítomnosti matrice z povrchu nerezové LDI destičky, z methakrylátového, styren-diviylbenzenového, hydroxystyren-diviylbenzenového a karboxystyren-diviylbenzenového monolitu připravených dle postupu 6a.



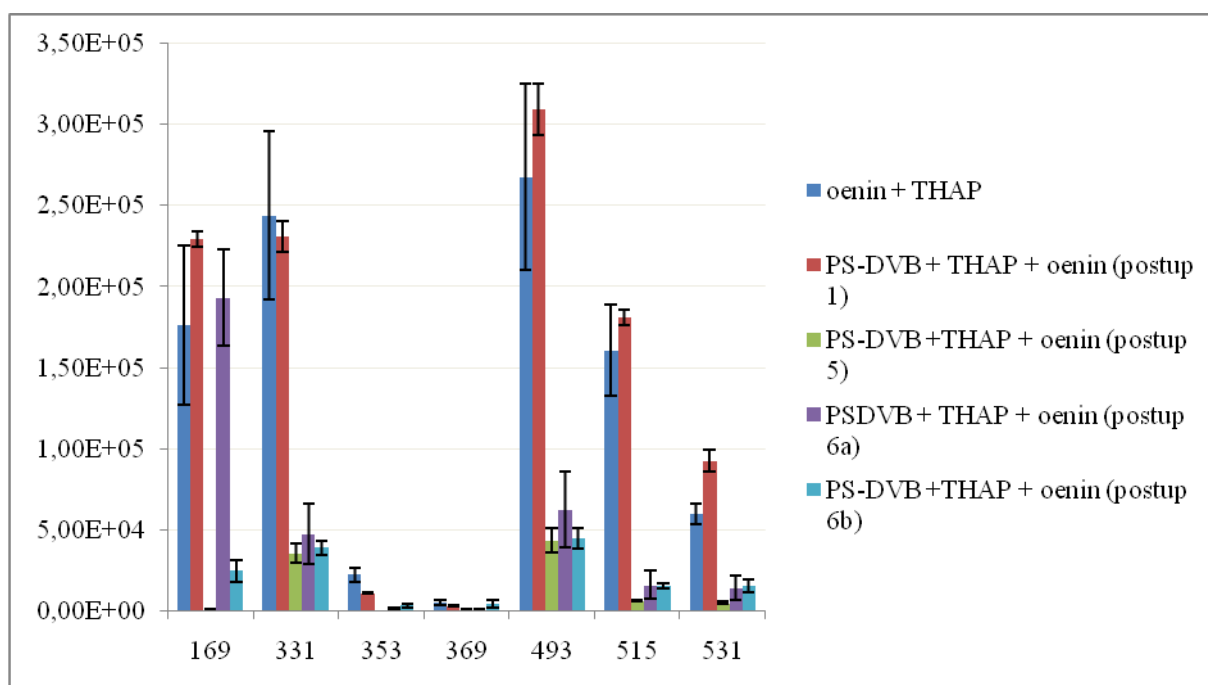
Graf 11: Srovnání poměru intenzit molekulového iontu oeninu ($m/z = 493$) k iontu fragmentu ($m/z = 331$), matrice ($m/z = 169$) a celkovému iontovému proudu (TIC) analyzovaných za přítomnosti matrice z povrchu nerezové LDI destičky, z methakrylátového, styren-diviylbenzenového, hydroxystyren-divinylbenzenového a karboxystyren-divinylbenzenového monolitu připravených dle postupu 6b

4.6.2.4. Srovnání výsledků získaných při použití uvedených forem monolitů

Ke všem zmíněným postupům vytvoření určitého monolitického povrchu byly použity pouze ST-DVB a BMA-EDMA monolit. Proto lze účinnost jednotlivých způsobů hodnotit pouze v souvislosti s těmito dvěma materiály. Grafy 12 a 13 znázorňují intenzity sledovaných iontů oeninu analyzovaných z povrchu styrenového a methakrylátového monolitu, které byly připraveny *postupy 1, 5, 6a, 6b*. Jak je z obou grafů vidět, nejvyšší intenzitu poskytoval molekulový ion ($m/z = 493$) v případě použití monolitu ve formě vrstvy, tedy postupem 1. Ostatní použité metody nevedly ke zlepšení analýzy oproti standardní metodě, kterou představovala běžná MALDI analýza. Přínosem methakrylátového monolitu je navíc potlačení signálu matrice. Tento efekt se však neprojevuje, pokud je monolit nanášen ve formě zrníček (*postup 6a a 6b*).

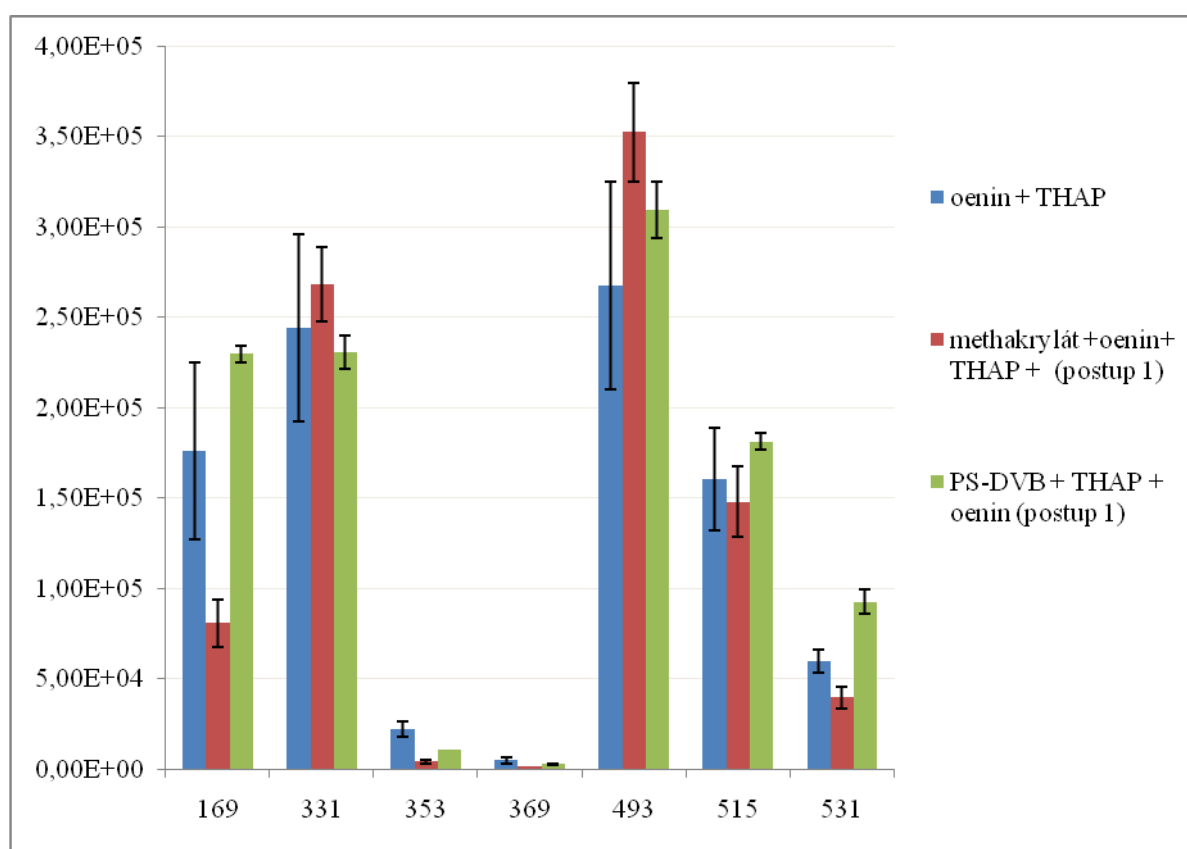


Graf 12: Srovnání intenzit jednotlivých iontů/poměrů m/z vzorku analyzovaného z různých forem methakrylátového monolitu.

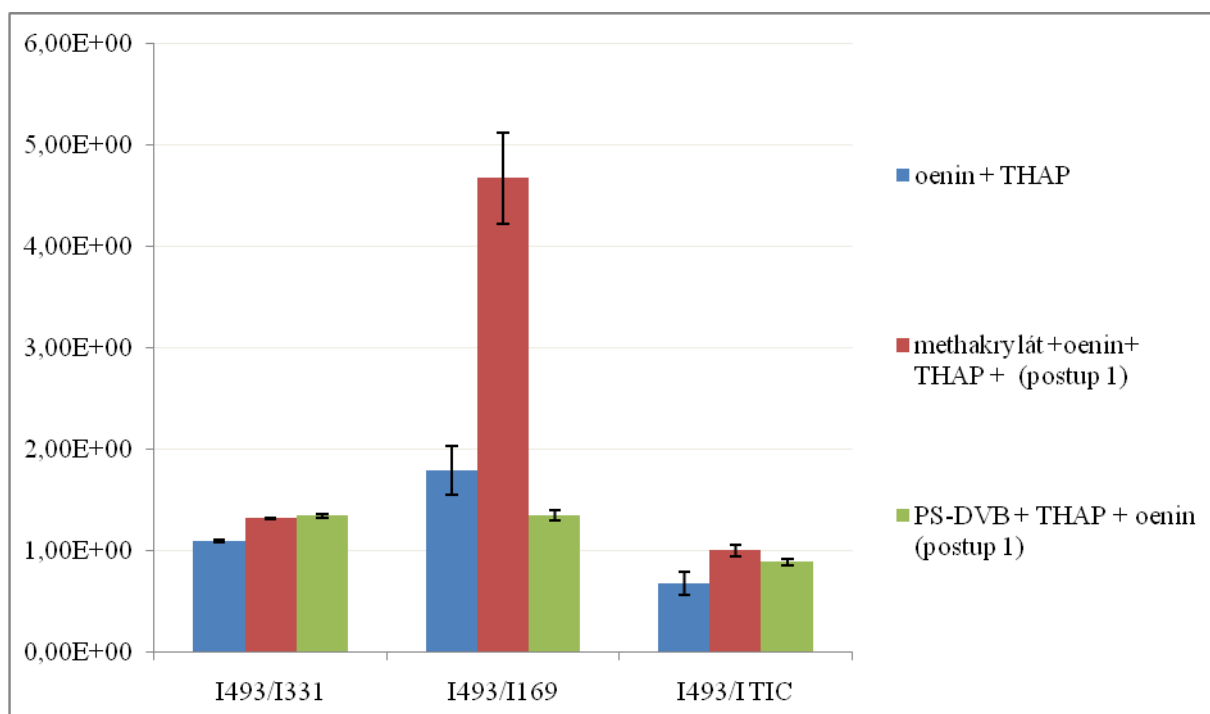


Graf 13: Srovnání intenzit jednotlivých iontů/poměrů m/z vzorku analyzovaného z různých forem styren-divinylbenzenového monolitu

Intenzity iontů získaných postupem, který se při analýze osvědčil nejlépe (použití jednodité vrstvy) jsou kvůli možnosti vzájemného porovnání zobrazeny v grafu 14. Z něj vyplývá, že k analýze vzorku oeninu, potažmo antokyaninů, je nejvhodnější methakrylátový monolit. Styren-divinylbenzenový monolit totiž poskytuje obdobné výsledky jako srovnávací MALDI metoda, nárůst intenzity signálu, který je vidět u molekulového iontu lze prakticky zahrnout do experimentální chyby, kterou znázorňuje chybová úsečka. Rovněž při použití ST-DVB nedochází k potlačení vlivu matrice. Graf 15 pak znovu dokazuje užitečný vliv methakrylátového monolitu, který spočívá v potlačení signálu matrice.



Graf 14: Srovnání nejlepších získaných výsledků dosažených pomocí souvislé vrstvy monolitu se standardní metodou MALDI analýzy (vzorek s matricí analyzovaný z povrchu nerezové LDI destičky)

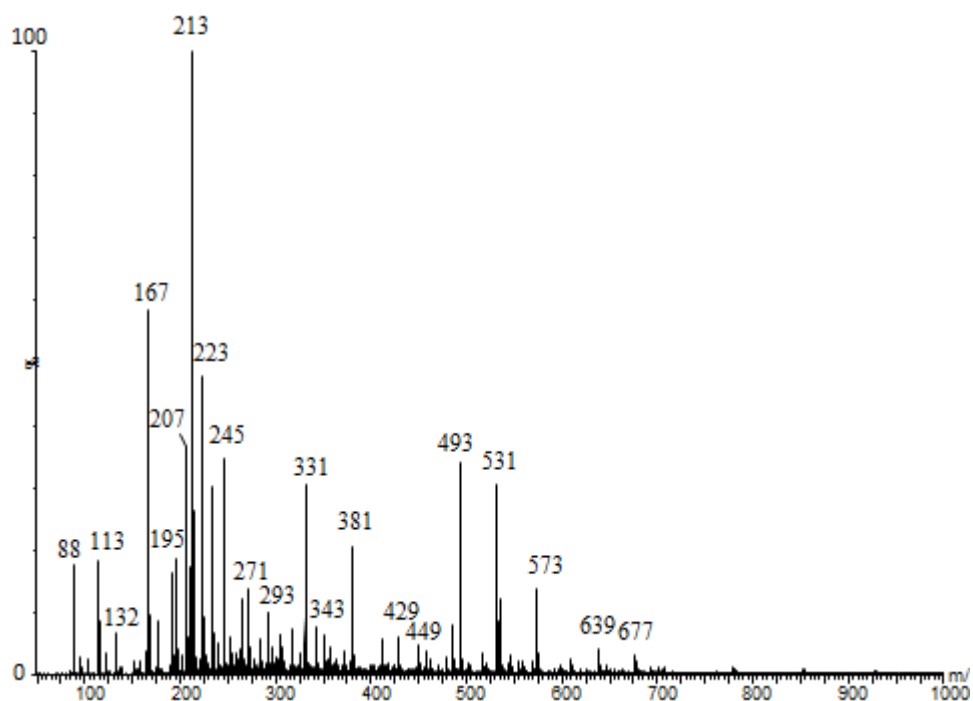


Graf 15: Srovnání poměru intenzit molekulového iontu oeninu ($m/z = 493$) k iontu fragmentu ($m/z = 331$), matrice ($m/z = 169$) a celkovému iontovému proudu (TIC) analyzovaných za přítomnosti matrice z povrchu nerezové LDI destičky, z methakrylátového a styren-diviylbenzenového monolitu.

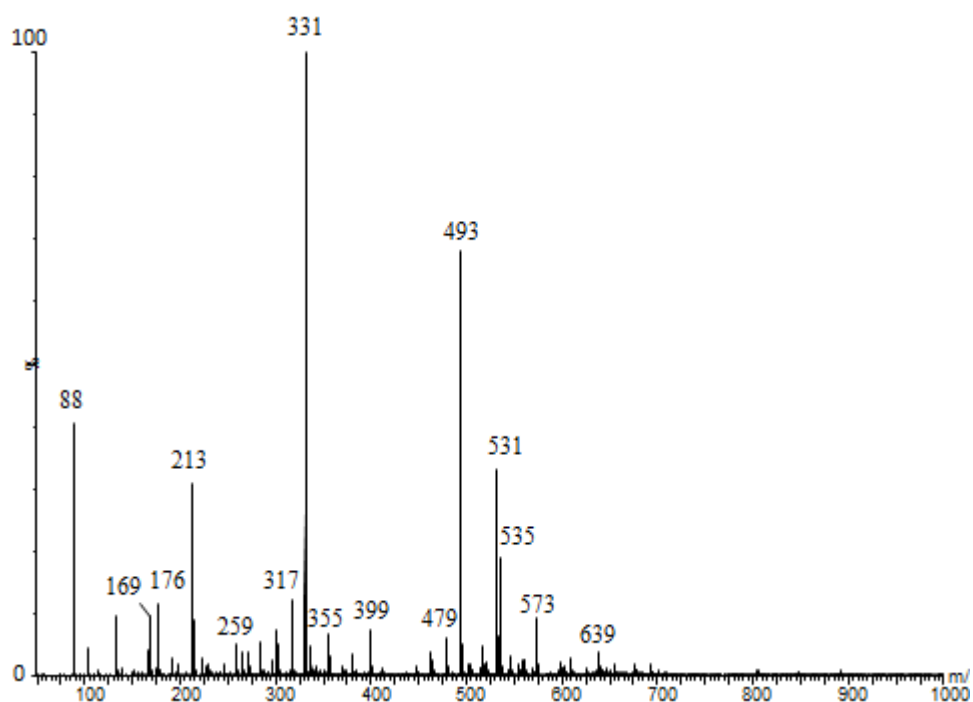
4.6.2.5. *Analýza reálného vzorku vína*

Na BMA-EDMA a ST-DVB monolitech byly prováděny i prvotní experimenty s reálným vzorkem vína. Tento vzorek nebyl upraven žádnou přečišťovací technikou, byl pouze okyselen kyselinou mravenčí a nanesen spolu s matricí na daný podklad. Při použití monolitů byl, v porovnání s analýzou prováděnou z nerezového povrchu, pozorován zajímavý efekt, spočívající ve zjednodušení („pročištění“) získaného spektra s dominantním píkem oeninu a jeho aglykonu, jak je vidět při srovnání spekter na obrázcích 15, 16 a 17. Tyto analýzy byly prováděny z monolitických povrchů plátek (*postup 5*). Spektra, jichž bylo dosaženo při použití plátek, vykazují v rámci prováděných měření dobrou opakovatelnost.

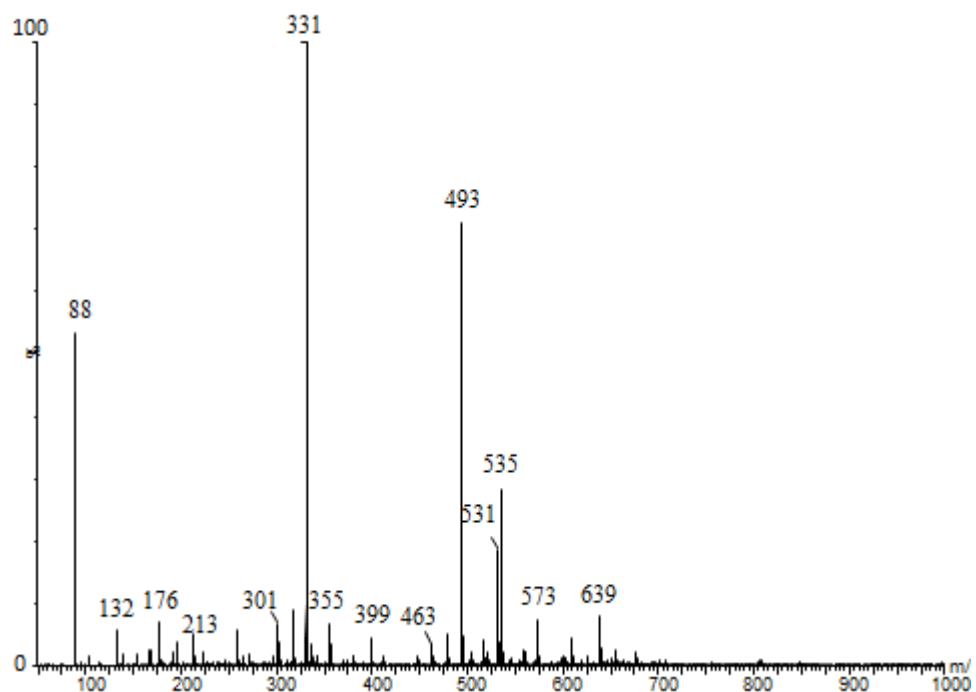
Pro tyto experimenty by bylo vhodné otestovat také monolity připravené ve formě souvislé vrstvy, která se při pokusech se standardem oeninu nejvíce osvědčila. K tomu však kvůli problematické přípravě monolitu v napolymerované vrstvě během experimentů v rámci této práce nedošlo.



Obrázek 15: MS spektrum vzorku červeného vína smíchaného s matricí naneseného na nerezovou LDI destičku. Intenzita nejvyššího píku $1,94 \cdot 10^3$



Obrázek 16: MS spektrum vzorku červeného vína smíchaného s matricí analyzovaného z plátek methakrylátového monolitu přilepeného na LDI destičku, intenzita nejvyššího píku ve spektru je $3,86 \cdot 10^3$



Obrázek 17: MS spektrum vzorku červeného vína smíchaného s matricí analyzovaného z plátků ST-DVB monolitu přilepeného na LDI destičku, intenzita nejvyššího píku ve spektru je $3,20 \cdot 10^3$

5. Závěr

Monolity představují v analytické chemii zajímavý materiál pro různé aplikace, z nichž nejčastější je jejich využití jako separační medium v kapalinové chromatografii a kapilární elektrochromatografii. Uplatňují se také jako sorbenty při TLC s následnou MALDI/MS detekcí separovaných zón.

Tato práce byla zaměřena na možnost využití monolitických povrchů při LDI/MS analýze antokyaninů. Bylo popsáno několik variant přípravy monolitického povrchu, z kterého byl vzorek analyzován. Měření probíhala jak bez přídavku matrice, tak také za přítomnosti matrice. Byl srovnáván charakter spekter a intenzita sledovaných iontů získaných analýzou z připravených monolitických povrchů s výsledky měřených standardní metodou (tj. vzorek analytu smíchaný s matricí nanesený na povrch nerezové LDI destičky). Ukázalo se, že monolity přispívají k vyšší intenzitě signálu analytu, pokud jsou připraveny ve formě souvislé vrstvy a je-li přítomna matrice. Nejlepších výsledků pak bylo dosaženo použitím BMA-EDMA monolitu, na kterém bylo dosaženo nejen nejvyšší intenzity molekulového iontu, ale současně také nejvíce potlačoval nežádoucí signál matrice. Naproti tomu k významnému zvýšení odezvy v důsledku lepší ionizační účinnosti po zavedení kyselých funkčních skupin(-OH a COOH) do struktury ST-DVB monolitu, nedošlo.

Byly provedeny také pokusy využívající monolitický povrch při analýze vína. Tyto prvotní výsledky naznačují, že monolity přispívají ke snížení odezvy balastních látek a matrice. Monolity jsou tak jednou z nadějí pro další vývoj v oblasti LDI technik. Bude však nutné zefektivnit přípravu a optimalizovat další faktory, které mohou ovlivňovat výsledky analýz, jako např. tloušťka vrstvy, velikost energie použitého laseru apod.

6. Seznam použitých zkratek

LDI - ionizace/ desorpce laserem (*laser desorption/ionization*)

MS – hmotnostní spektrometrie (*mass spectrometry*)

MALDI - ionizace/ desorpce laserem (*matrix assisted laser desorption/ionization*)

HPLC- vysoce účinná kapalinová chromatografie (*high performance liquid chromatography*)

SPE – extrakce tuhou fází (*solid- phase extraction*)

ST – styren

DVB – divinylbenzen

OH-STDVB – hydroxystyren-divinylbenzen

VBA – 4-vinylbenzoová kyselina

COOH-STDVB – karboxystyren.divinylbenzen

THF - tetrahydrofuran

BMA – butylmethakrylát

EDMA – ethyldimethakrylát

THAP – trihydroxyacetofenon

AIBN - azobisisobutyronitri

ACN –acetonitril

AMPS - kyselina 2-akrylamid-2methyl-1-propansulfonová

7. Použitá literatura

- ¹ K. Štulík, V. Pacáková, J. Suchánková, P. Coufal, J. Chromatogr. B, 841 (2006) 79–87
- ² L. Trojer, C. P. Bisjak, W. Wieder, G. K. Bonn, J Chromatogr. A, 1216 (2009) 6303–6309
- ³ E. F. Maksimova, E. G. Vlach, T. B. Tennikova, J. Chromatogr. A, (2011), doi:10.1016/j.chroma.2010.12.061
- ⁴ M. Zhang, F. Wei, Y.-F. Zhang, J. Nie, Y.-Q. Feng, J Chromatogr. A, 1102 (2006) 294–301
- ⁵ J. Lee, H. K. Musyimi, S. A. Soper, K. K. Murray, J AmSocMassSpectrom 2008, 19, 964–972
- ⁶ H. Lyu, S. Jeong, J. H. Sim, S. Woo, K. P. Kim, J. K. Shin, CurApplPhys (2010), doi:10.1016/j.cap.2010.11.084
- ⁷ M. R. Buchmeiser, Polymer 48 (2007) 2187e2198
- ⁸ F. Švec, J. Chromatogr. A (2009), doi:10.1016/j.chroma.2009.09.073
- ⁹ H. Oberacher, A. Premstaller, Ch. Huber, J. Chromatogr. A, 1030 (2004) 201–208
- ¹⁰ W. Walcher, H. Toll, A. Ingedoh, Ch. G. Huber, J. Chromatogr. A 1053 (2004) 107–117
- ¹¹ F. Švec, Chem. Listy, 98 (2004) 232–238
- ¹² B. Volmert: Základy makromolekulární chemie, přeložili ing. J. Kopeček, CSc, ing. K. Šolc, ing. J. Vacík, Academia Praha 1970, 1. vydání
- ¹³ F. Švec, J.M.J. Frechet, Chem. Mater. 7 (1995) 707.
- ¹⁴ A. Greiderer, L. Trojer, Ch. W. Huck, G. K. Bonn, J. Chromatogr. A, 1216 (2009) 7747–7754
- ¹⁵ M. Grasselli, E. Smolka, P. Hargittai, A. Sáfrány, Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B 185 (2001) 254–261
- ¹⁶ F. M. Plieva, I. N. Savina, S. Deraz, J. Andersson, I. Y. Galaev, B. Mattiasson, J. Chromatogr. B, 807 (2004) 129–137
- ¹⁷ <http://chemi.muni.cz/~preisler/courses/Lab%20Cv%20MALDI.pdf>, staženo 7.3. 2011
- ¹⁸ W. Ch. Chang, L. Ch. L. Huang, Y. S. Wang, W. P. Peng, H. Ch. Chang, N. Y. Hsi, W. B. Yang, Ch. H. Chen, Anal. Chim. Acta 582 (2007) 1–9
- ¹⁹ <http://www.chm.bris.ac.uk/ms/theory/maldi-ionisation.html>, staženo 7.3. 2011
- ²⁰ Manuál ke hmotnostnímu spektrometru Micromass MALDI Q-TOF Premier, USA
- ²¹ R. H. Daniels, S. Dikler, E. Li, C. Stacey, The Association for Laboratory Automation doi:10.1016/j.jala.2008.07.005
- ²² H. Yan, N. Xu, W. Y. Huang, H. M. Han, S. J. Xiao, Int. J. Mass Spectrom. 281 (2009) 1–7
- ²³ D. S. Peterson, Q. Luo, E. F. Hilder, F. Švec, J. M. J. Fréchet, Rapid Commun. Mass Spectrom. 2004; 18: 1504–1512
- ²⁴ R. Bakry, G. K. Bonn, D. Mair, F. Švec, Anal. Chem., Vol. 79, No. 2, January 15, 2007
- ²⁵ A. I. Gusev, A. Proctor, Y. I. Rabinovich, D. M. Hercules, Anal. Chem. Vol. 67, No. 11, June 1, 1995 1805
- ²⁶ P. K. Salo, H. Salomies, K. Harju, R. Ketola, T. Kotiaho, J. Yli-Kauhaluoma, R. Kostianen, J AmSocMassSpectrom 2005, 16, 906–915
- ²⁷ A. Premstaller, H. Oberacher, G. Huber, Anal. Chem. 2000, 72, 4386–4393
- ²⁸ A. Castaneda-Ovando, Ma de Lourdes Pacheco-Hernández, E. Pérez-Hernández, J. A. Rodrigues, C. A. Galán-Vidal, Food Chem 113 (2009) 859–871
- ²⁹ J.-M. Kong, L.-S. Chia, N.-K. Goh, T.-F. Chia, R. Brouillard, Phytochemistry 64 (2003) 923–933
- ³⁰ N. P. Seeram, Nutritional Oncology (Second Edition), 2006, Pages 615–628
- ³¹ M. Rein, Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins, Disertační práce, Univerzita Helsinky, 2005
- ³² D.-X. Hou, M. Fujii, N. Terahara, M. Yoshimoto, J. Biomed Biotechnol • 2004:5 (2004) 321–325
- ³³ S. Renaud, M. de Lorgeril, The Lancet, Volume 339, Issue 8808, 20 June 1992, Pages 1523–1526
- ³⁴ M. M. Giusti, R. E. Wrolstadt, Biochemical Engineering Journal 14 (2003) 217–225
- ³⁵ J. Careno, L. Almela, J. A. Fernández-López, Lebensm.-Wiss. u.-Technol., 30, 259–265 (1997)
- ³⁶ V. Ivanova, A. Dorney, M. Stefova, T. Stafilov, B. Vojnoski, F. Kilár, L. Márk, Food Anal. Methods (2011) 4:108–115
- ³⁷ Q. Tian, M. M. Giusti, G. D. Stoner, S. J. Schwartz, J. Chromatogr. A, 1091 (2005) 72–82
- ³⁸ J. Valls, S. Millán, M. P. Martí, E. Boras, L. Arola, J. Chromatogr. A, 1216 (2009) 7143–7172
- ³⁹ H.-Y. Huang, Y.-Ch. Liu, Y.-J. Cheng, J. Chromatogr. A, 1190 (2008) 263–270