

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie



LAESI/LAESCI nová ambientní ionizační technika pro hmotnostní spektrometrii

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:

Bc. Jakub Grepl

Studijní obor:

Analytická chemie

Vedoucí práce:

RNDr. Tomáš Pluháček, Ph.D.

Konzultant práce:

Mgr. Filip Gregar

2025 Olomouc

Prohlášení:

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

Souhlasím s tím, aby má práce byla zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci a v informačním systému Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci .....

Podpis

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora: Bc. Jakub Grepl

Název práce: LAESI/LAESCI nová ambientní ionizační technika pro hmotnostní spektrometrii

Typ práce: diplomová

Pracoviště: Katedra analytické chemie

Vedoucí práce: RNDr. Tomáš Pluháček, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Filip Gregar

Rok odevzdání práce: 2025

Anotace:

Tato diplomová práce se zabývá optimalizací a využitím nové ambientní ionizační techniky r-DUV-LAESCI-MS/MSI pro analýzu organických látek. Předmětem teoretické části je seznámení čtenáře s ambientní hmotnostní spektrometrií, představení r-DUV-LAESCI-MS/MSI a detailní popis využívané instrumentace. Teoretickou část uzavírá rešerše dosavadních článků zabývajících se využitím LAESI-MS/MSI a LAAPPI-MS/MSI v analýze organických molekul. V druhé polovině diplomové práce navazuje experimentální část, která se zaměřuje na optimalizaci r-DUV-LAESCI-MS/MSI, a to konkrétně průtoku a typů sprejovacích kapalin („sheath liquid“) využívaných v duálním iontovém zdroji ESCI, testování vlivu typu povrchů na intenzitu signálu polárních i nepolárních analytů s různou molekulovou hmotností a v neposlední řadě i optimalizaci vysokorychlostního hmotnostního zobrazování. Závěrem této diplomové práce je detailní vyhodnocení naměřených dat v podobě četných grafů a tabulek, prezentování získaných 2D obrázků z hmotnostního zobrazování a také rozsáhlá diskuse nad danou problematikou, získanými výsledky a také potenciálem této techniky do budoucna.

Klíčová slova: ambientní hmotnostní spektrometrie; r-DUV-LAESCI-MS; analýza povrchů; hmotnostní zobrazování; analýza organických molekul; laserová ablace

Počet stran: 78

Počet příloh: 1

Jazyk: Český

Bibliographical identification:

Author's first name and surname: Bc. Jakub Grepl

Title: LAESI/LAESCI new ambient ionization technique for mass spectrometry

Type of thesis: master

Department: Department of Analytical Chemistry

Supervisor: RNDr. Tomáš Pluháček, Ph.D.

Consultant: Mgr. Filip Gregar

The year of submission: 2025

Annotation:

This master's thesis is about the optimization and use of a new ambient ionization technique r-DUV-LAESCI-MS/MSI for the analysis of organic compounds. The theoretical part describes ambient mass spectrometry, introduces r-DUV-LAESCI-MS and provides a detailed description of its instrumentation. The theoretical part concludes with a review of existing articles dealing with the use of LAESI-MS/MSI and LAAPPI-MS/MSI in the analysis of organic compounds. The second half of the thesis is followed by the experimental part, which focuses on the optimization of r-DUV-LAESCI-MS/MSI, specifically the flow rate and types of sheath liquids used in the dual ion source ESCI, testing the effect of different surface materials on the signal intensity of polar and non-polar analytes with different molecular weights and also optimization of high-speed imaging. The conclusion of this thesis presents a detailed evaluation of the measured data in the form of numerous graphs and tables, as well as the presentation of obtained 2D images from mass spectrometry imaging. It also includes an extensive discussion of the subject, the obtained results, and the potential of this technique for future applications.

Key words: ambient mass spectrometry; r-DUV-LAESCI-MS; surface analysis; imaging; analysis of organic compounds; laser ablation

Number of pages: 78

Number of appendices: 1

Language: Czech

#### Poděkování:

Rád bych poděkoval vedoucímu mé diplomové práce RNDr. Tomáši Pluháčkovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, připomínky a čas, který mi při vypracování mé diplomové práce věnoval. Také bych rád poděkoval svému konzultantovi Mgr. Filipu Gregarovi a RNDr. Barboře Papouškové, Ph.D. za jejich drahocenný čas, pevné nervy a spolupráci. V neposlední řadě bych rád poděkoval své rodině za neustálou podporu a přísun motivace k tomu, co dělám a co mě v životě baví.

Dále bych rád poděkoval Katedře analytické chemie a Přírodovědecké fakultě Univerzity Palackého v Olomouci za poskytnutí přístrojů a chemikálií pro vypracování mé diplomové práce. Předložená diplomová práce vznikla za finanční podpory Interní grantové agentury Univerzity Palackého v Olomouci IGA\_PrF\_2024\_026 a IGA\_PrF\_2025\_027.

## Obsah

Úvod.....	8
1. Ambientní hmotnostní spektrometrie .....	9
1.1. r-DUV-LAESCI-MS.....	14
2. Laserová ablace.....	15
2.1. Typy laserů pro laserovou ablaci .....	16
2.2. Ablací komora a transport aerosolu do detekčního systému .....	17
2.3. Optimalizace měřících parametrů laserové ablace .....	18
3. Instrumentace pro molekulovou hmotnostní spektrometrii .....	18
3.1. Iontové zdroje .....	19
3.1.1. Elektrosprejová ionizace.....	19
3.1.2. Chemická ionizace za atmosférického tlaku.....	21
3.2. Hmotnostní analyzátory .....	22
3.2.1. Kvadrupól .....	23
3.2.2. Analyzátor doby letu.....	24
3.2.3. Hybridní hmotnostní analyzátory (Q-TOF).....	25
3.3. Detektor .....	26
3.3.1. Elektronový násobič .....	26
4. Využití ambientních technik založených na laserové ablaci/ desorpci v analýze organických molekul.....	28
5. Experimentální část.....	35
5.1. Optimalizace průtoku a typu sprejovací kapaliny.....	36
5.2. Testování vlivu povrchů na intenzitu signálu analytů .....	37
5.2.1. Příprava povrchů pro sprejování.....	37
5.2.2. Příprava zásobních roztoků standardů .....	39
5.2.3. Optimalizace metody nanášení homogenní vrstvy analytů .....	40
5.2.4. Analýza nasprejovaných povrchů a zpracování naměřených dat .....	41
5.2.5. Hmotnostní zobrazování otisku prstu pro porovnání povrchů.....	41
5.2.6. Nastavení měřících parametrů r-DUV-LAESCI-MS .....	42
5.3. Optimalizace parametrů LA a MS pro účely hmotnostně spektrometrického zobrazování s vysokou rychlostí posuvu vzorku .....	43
6. Výsledky a diskuse .....	45
6.1. Vyhodnocení optimalizace průtoku a typu „sheath liquid“ .....	45
6.1.1. Závěr a diskuse optimalizace průtoku a typu „sheath liquid“ .....	48

6.2.	Vyhodnocení charakterizace povrchů - XRF a MS/MS analýza.....	50
6.2.1.	Závěr a diskuse charakterizace povrchů - XRF a MS/MS analýza .....	52
6.3.	Vyhodnocení testování vlivu povrchů na intenzitu signálu analytů.....	53
6.3.1.	Závěr a diskuse testování vlivu povrchů na intenzitu signálu analytů .....	59
6.4.	Vyhodnocení a diskuse hmotnostního zobrazování otisku prstu pro porovnání povrchů .....	61
6.5.	Vyhodnocení a diskuse optimalizace hmotnostně spektrometrického zobrazování s vysokou rychlostí .....	63
7.	Závěrečná diskuse a shrnutí.....	69
	Seznam použitých zkratk .....	72
	Seznam použité literatury .....	75
	Příloha 1 .....	1

## Úvod

Ambientní hmotnostní spektrometrie je moderním analytickým přístupem pro studium organických látek umožňující analýzu širokého spektra látek v přirozeném prostředí (nativní podmínky). Hojně studovanou podskupinou ambientních technik, s velkým potenciálem do budoucna, jsou techniky založené na principu laserové ablace/desorpce a následné ionizace měkkými ionizačními technikami např. elektrosprejovou ionizací (elektrosprej, ESI), chemickou ionizací za atmosférického tlaku (APCI) či fotoionizací za atmosférického tlaku (APPI). Toto moderní spojení technik umožňuje přímou analýzu pevných i kapalných vzorků bez jejich předúpravy a se zachováním jejich přirozené struktury/prostředí. Příkladem této ambientní techniky je i nové spojení r-DUV-LAESCI-MS/MSI, které vyniká speciálně konstruovaným rozhraním spojující laserovou ablaci (LA) a duální iontový zdroj ESCI (odpovídá komerčnímu označení zdroje na bázi ESI a APCI). Jako první na světě umožňuje provádět analýzu v obou módech v rámci jediné analýzy a tím pokrýt široký rozsah polarit i molekulových hmotností analyzovaných látek. Toto spojení efektivně využívá nanosekundového UV laseru (193 nm) s frekvencí 300 Hz, který zajišťuje kompletní ablaci/desorpci širokého spektra analyzovaných vzorků s libovolnou velikostí spotu od jednotek  $\mu\text{m}$  (3–160  $\mu\text{m}$ ). Tato výhodná vlastnost umožňuje potenciální vysokorychlostní a vysokorozlišující hmotnostní zobrazování s mikronovým rozlišením. Tyto jedinečné vlastnosti a přednosti této techniky otevírají dveře mnoha novým aplikacím a uplatněním v různých oborech, například v medicíně, kriminalistice i životním prostředí [1].

Předmětem experimentální části této diplomové práce byla optimalizace r-DUV-LAESCI-MS/MSI. Konkrétně testování různých sprejovacích kapalin tzv. „sheath liquid“ a testování jejich různého průtoku do iontového zdroje. Dále byl sledován vliv materiálu různých povrchů na intenzitu signálů vybraných analytů s širokým rozsahem polarit a molekulových hmotností. Závěrem tato práce pojednává o optimalizaci a ladění parametrů laserové ablace a hmotnostního spektrometru pro vysokorychlostní hmotnostní zobrazování.

## 1. Ambientní hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je analytická metoda, využívaná k analýze anorganických i organických látek v pevném, kapalném i plynném skupenství. Je vhodná pro kvalitativní, semikvantitativní i kvantitativní analýzu. Jedná se o metodu s výbornou citlivostí, nízkými mezemi detekce (LOD), rychlostí analýzy a rozmanitostí aplikací. Princip tvoří tři základní kroky: tvorba kladných či záporných iontů v iontovém zdroji, separace iontů v hmotnostním analyzátoru podle poměru hmotnosti ku náboji ( $m/z$ ) a jejich následná detekce pomocí vhodného detektoru. Výstupem analýzy je hmotnostní spektrum, což je graf závislosti absolutní či relativní intenzity signálu na poměru  $m/z$ . Během ionizace analytů mohou vznikat i vícenásobně nabitě ionty (např. v ESI), u kterých se hodnota  $m/z$  liší podle velikosti náboje, tedy pro jedno chemické individuuum můžeme detekovat i více analytických signálů s rozličnou hodnotou  $m/z$  [2–4].

Od počátku 21. století jsme svědky nové éry hmotnostní spektrometrie spojené se zavedením dnes velice hojně studovaných ambientních ionizačních technik. Ambientní ionizační techniky přináší možnost přímé analýzy kapalných a pevných vzorků s jejich minimální či žádnou předúpravou. Tento přístup zajišťuje kromě úspory času, také minimální manipulaci se vzorkem minimalizující pravděpodobnost ztráty těkavých složek a narušení přirozené struktury vzorku, respektive prostorové distribuce analytu. Díky těmto vlastnostem je ambientní hmotnostní spektrometrie vhodná pro *in situ* analýzy a nachází své uplatnění v řadě odvětví např. v životním prostředí [5], biologii [6], medicíně [7], farmacii [8] i forenzních vědách [9]. Poprvé byly ambientní ionizační techniky popsány v roce 2004 zavedením desorpční elektrosprejové ionizace (DESI) a hned vzápětí implementací přímé analýzy v reálném čase (DART). Od té doby bylo vyvinuto více než 100 různých přístupů a jejich počet se dodnes neustále zvyšuje. Souhrn ambientních ionizačních techniky je vypsán v tabulkách 1 a 2 [1, 10].

Významnou skupinou jsou ambientní ionizační techniky založené na laserové ablaci/desorpci. Právě využití laserů v ambientní hmotnostní spektrometrii je velice žádoucí, jelikož lasery mohou být opticky fokusovány na povrch vzorku a v důsledku toho umožňují účinnou desorpci vzorku z předem definované oblasti v řádu jednotek až stovek  $\mu\text{m}$ . Laserová ablace/desorpce primárně uvolňuje neutrální částice, které je potřeba ionizovat v sekundárním iontovém zdroji. Běžně se využívají měkké ionizační techniky pracující za atmosférického tlaku, např. elektrosprejová ionizace (ESI), DART, chemická ionizace za

atmosférického tlaku (APCI) nebo také fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI). V tomto spojení se využívají různé typy laserů s emisí záření v rozmezí od vzdálené UV až po vzdálenou IČ oblast elektromagnetického záření. IČ laser byl součástí již prvního konceptu laserové ablace s ionizací elektrosprejem (LAESI) představeného prof. Vertesem v roce 2007. Nevýhodou IČ laseru byla vždy omezená možnost zaostřit laserový svazek na jednotky či desítky  $\mu\text{m}$  a také potřebný obsah vody/vlhkosti v analyzovaných vzorcích. Oproti tomu UV laser, který je součástí i r-DUV-LAESCI-MS, tato omezení eliminoval a nabízí tak účinnou desorpci širokého spektra molekul s velkým rozsahem polarit i molekulových hmotností z různých povrchů lišících se optickými, fyzikálně chemickými vlastnostmi. Překvapivě interakce UV záření nevede ke značné destrukci organické matrice (fragmentaci) a díky možné fokusaci laseru na jednotky  $\mu\text{m}$  je vhodný pro hmotnostní zobrazování s výborným prostorovým rozlišením. Lasery mohou být zabudované v iontovém zdroji (např. LAESI) nebo oddělené od iontového zdroje např. součástí komerčních laserových ablací, které lze vhodně spojit s vhodnou detekční technikou. Právě spojení komerční laserové ablace s hmotnostním spektrometrem vybaveným sekundárním iontovým zdrojem (např. ESI, APCI či APPI) a hybridním hmotnostním analyzátozem (Q-TOF) se prokázalo jako velice silný nástroj pro kvalitativní analýzu či hmotnostní zobrazování prostorové distribuce látek [1, 10].

Tabulka 1 Souhrn zavedených ambientních ionizačních technik před rokem 2016 (převzato a upraveno z cit. [10])

Anglický název techniky	Zkratka	Mechanismus desorpce	Mechanismus ionizace	Prostorové rozlišení
air-flow assisted desorption electrospray ionization	AFADESI	kapalná extrakce	elektrosprej	100–200 $\mu\text{m}$
coated blade spray	CBS	kapalná extrakce	elektrosprej	N/A
desorption atmospheric pressure chemical ionization	DAPCI	desorpce plazmatem	koronový výboj	200 $\mu\text{m}$
direct analysis in real time	DART	desorpce plazmatem	koronový výboj	N/A
dielectric barrier discharge ionization	DBDI	desorpce plazmatem	dielektrický bariérový výboj	< 200 $\mu\text{m}$
desorption electrospray ionization	DESI	kapalná extrakce	elektrosprej	30–200 $\mu\text{m}$
easy ambient sonic-spray ionization	EASI	kapalná extrakce	sonický sprej	30–200 $\mu\text{m}$
extractive electrospray ionization	EESI	kapalná extrakce	elektrosprej	N/A
electrospray-assisted laser desorption/ionization	ELDI	laserová ablace	elektrosprej	100–200 $\mu\text{m}$
flowing atmospheric pressure afterglow	FAPA	desorpce plazmatem	koronový výboj	N/A
field-induced droplet ionization	FIDI	vibrační	indukované pole	N/A
internal extractive electrospray ionization	iEESI	kapalná extrakce	elektrosprej	N/A
laser ablation electrospray ionization	LAESI	laserová ablace	elektrosprej	70 $\mu\text{m}$
liquid extraction surface analysis	LESA	kapalná extrakce	elektrosprej	1 mm
liquid microjunction surface sampling probe	LMJSSP	kapalná extrakce	elektrosprej	600 $\mu\text{m}$
liquid surface-atmospheric pressure glow discharge	LS-APGD	laserová ablace	doutnavý výboj	N/A
low temperature plasma	LTP	desorpce plazmatem	dielektrický bariérový výboj	150 $\mu\text{m}$

(Pozn.: „N/A“ – údaj nebyl dostupný)

(Pokračování tabulky 1)

matrix assisted ionization	MAI	sublimace	vstupní ionizace	N/A
matrix assisted laser desorption electrospray ionization	MALDESI	laserová ablace	elektrosprej	50–200 μm
microwave plasma torch	MPT	desorpce plazmatem	mikrovlnná plazma	N/A
nano desorption electrospray ionization	nano-DESI	kapalná extrakce	elektrosprej	12–150 μm
probe electrospray ionization	PESI	kapalná extrakce	elektrosprej	~700 nm
picosecond infrared laser desorption	PIRL	laserová ablace	vibrační excitace matrice	1–5 mm
paper cone spray ionization	PCSI	kapalná extrakce	elektrosprej	N/A
pressure probe electrospray ionization	PPESI	přímá analýza	elektrosprej	2–5 μm
paper spray ionization	PSI	kapalná extrakce	elektrosprej	N/A
rapid evaporative ionization mass spectrometry	REIMS	tepelná desorpce	chemické/tepelné odpařování	-
solvent assisted inlet ionization	SAII	kapalná extrakce	vstupní ionizace	N/A
surface acoustic wave nebulization	SAWN	akustická desorpce	-	N/A
secondary electrospray ionization	SESI	kapalná extrakce	elektrosprej	N/A
single probe	-	kapalná extrakce	elektrosprej	10 μm
touch spray	-	kapalná extrakce	elektrosprej	~6 mm

(Pozn.: „N/A“ – údaj nebyl dostupný)

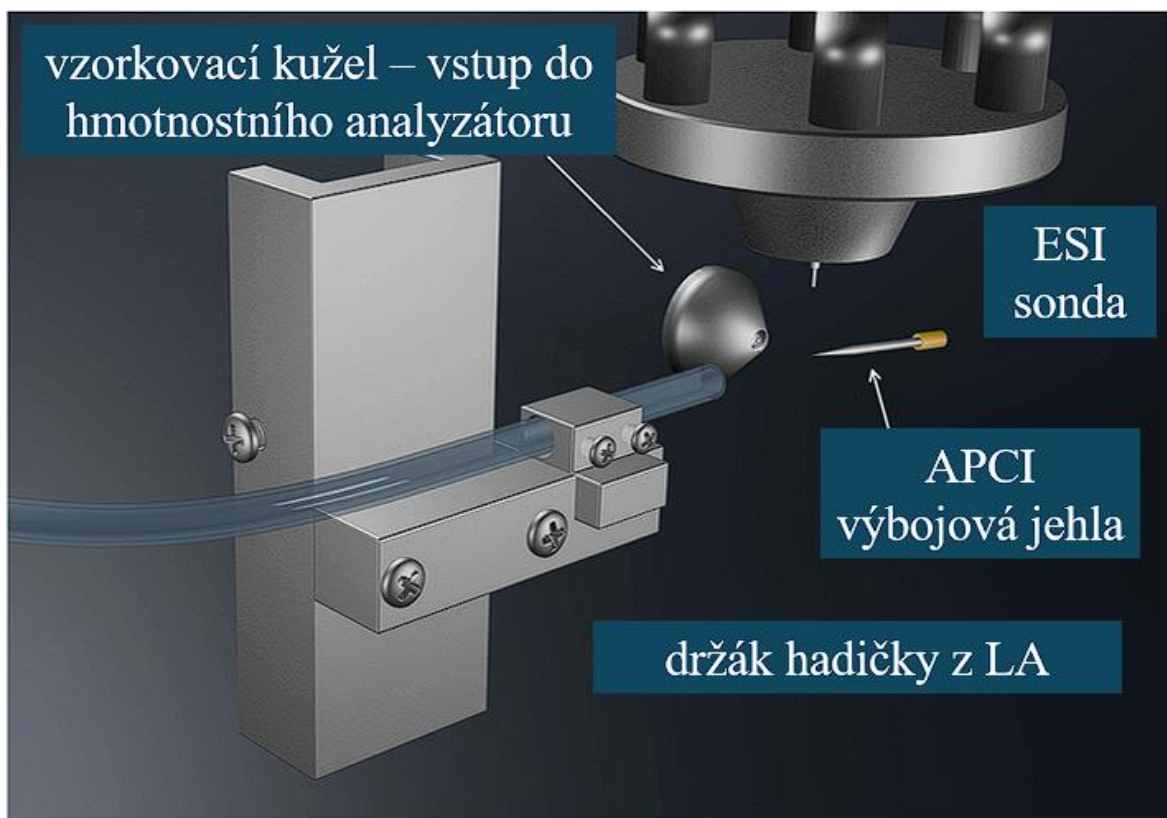
Tabulka 2 Souhrn zavedených ambientních ionizačních technik, leden 2016 – září 2018 (převzato a upraveno z cit. [10])

Anglický název techniky	Zkratka	Mechanismus desorpce	Mechanismus ionizace	Prostorové rozlišení
droplet assisted inlet ionization	DAII	atomizace	vstupní ionizace	N/A
extractive atmospheric pressure photoionization	EAPPI	ultrazvuková extrakce	fotoionizace	N/A
laser ablation-aerosol mass spectrometry-chemical ionization mass spectrometry	LA-AMS-CMS	laserová ablace	elektronová ionizace a/ nebo chemická ionizace	25–50 $\mu\text{m}$
laser ablation dielectric barrier discharge	LA DBD	laserová ablace	dielektrický bariérový výboj	40 $\mu\text{m}$
laser desorption corona beam ionization	LD-CBI	laserová ablace	koronový výboj	~1 mm
laser desorption/ionization droplet delivery	LDIDD	laserová ablace	fotoionizace a elektrosprej	2–3 $\mu\text{m}$
laser diode thermal desorption atmospheric pressure ionization	LDTD-APPI	laserový, termální	fotoionizace	N/A
laser-induced acoustic desorption atmospheric pressure photoionization	LIAD-APPI	laserem indukovaná napětí na molekulárních krystalech	fotoionizace	N/A
MasSpec Pen	MasSpec Pen	kapalná extrakce	odpařování/ionizace rozpouštědla	0,5–5 mm
nanotip ambient ionization mass spectrometry	NAIMS	desorpce plazmatem	koronový výboj	5 $\mu\text{m}$
robotic surface analysis	RoSA	kapalná extrakce	elektrosprej	1 mm
SpiderMass	SpiderMass	laserová ablace	vibrační excitace matrice	<1 mm
sponge spray ionization	SSI	kapalná extrakce	elektrosprej	N/A
triboelectric nanogenerator	TENG	kapalná extrakce	elektrosprej	N/A
T-probe	T-probe	kapalná extrakce	elektrosprej	5–8 $\mu\text{m}$
vibrating sharp edge spray ionization	VSSI	vibrační	odpařování/ionizace rozpouštědla	N/A

(Pozn.: „N/A“ – údaj nebyl dostupný)

## 1.1. r-DUV-LAESCI-MS

r-DUV-LAESCI-MS je novou ambientní technikou využívající spojení laserové ablace/desorpce vzorku s následnou ionizací analytu v duálním iontovém zdroji ESCI, kombinujícím elektrosprejovou ionizaci (ESI) a chemickou ionizaci za atmosférického tlaku (APCI). Tento speciálně konstruovaný duální iontový zdroj ESCI (viz Obrázek 1), vyniká schopností současné analýzy v obou ionizačních módech ESI i APCI, čímž nabízí možnost analýzy molekul v širokém rozsahu polarit a molekulových hmotností. Dále tato technika umožňuje přímou analýzu pevných i kapalných vzorků s omezenou fragmentací pod 13 % při hustotě zářivé energie  $12,1 \text{ J/cm}^2$  [1]. K účinné desorpci částic z povrchu vzorku je zde využíván excimerový nanosekundový UV laser s vlnovou délkou 193 nm. Uvolněný jemný aerosol v plynné fázi je účinně transportován pomocí nosného plynu (He) Tygon® hadičkou (4 mm × 1,2 m) do duálního iontového zdroje ESCI, kde dochází k ionizaci s možností nastavení kladného či záporného napětí na kapiláru (ESI) či výbojovou jehlu (APCI). Ionizaci molekul zde napomáhá sprejovací kapalina tzv. „sheath liquid“, která je sprejována skrze kapiláru ESI do oblasti iontového zdroje. V ESI módu je na tuto kapiláru nastaveno vysoké napětí, které na principu klasického elektrospreje ionizuje „sheath liquid“, jejíž ionty poté interagují s analytem v plynné fázi. V APCI módu je ionizace uskutečněna pomocí koronového výboje v oblasti výbojové jehly. Dále jsou vzniklé kladně či záporně nabitě ionty separovány v hybridním hmotnostním analyzátoru (Q-TOF) a detekovány elektronovým násobičem [1].



Obrázek 1 r-DUV-LA-ESI iontový zdroj, schématické zobrazení LA-ESI rozhraní umožňující vnášení ablatovaného/desorbovaného materiálu do duálního iontového zdroje ESI (převzato a upraveno z cit. [1]) (Pozn.: „LA“ – laserová ablace)

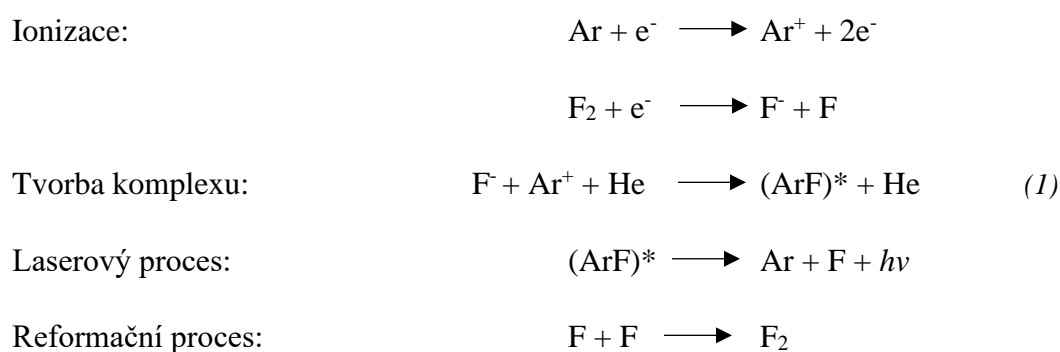
## 2. Laserová ablace

Laserová ablace je analytická technika, která se využívá primárně pro dávkování pevných vzorků pro následnou analýzu. Jedná se o techniku především pro atomovou spektrometrii (např. LA-ICP-MS, LA-ICP-OES a LIBS), v rámci které je hojně aplikovaná např. v geologii [11]. V posledních letech se však její pole aplikací rozšířilo i pro organickou analýzu, např. LAAPPI-MS [12] či r-DUV-LA-ESI-MS [1]. Principiálně laserová ablace využívá krátké vysokoenergetické laserové pulzy, které jsou zaostřeny na povrch vzorku. Postupně dochází k desorpci materiálu ze svrchní vrstvy vzorku a tvoří se laserem indukovaný aerosol v plynné fázi. Uvolněný aerosol je transportován pomocí inertního plynu (např. He) do detekčního systému (např. MS). Výhodou laserové ablace je možnost přímé analýzy bez předúpravy vzorku, která snižuje riziko kontaminace a minimalizuje ztráty těkavých analytů. Neopomenutelnou vlastností laserové ablace je schopnost prostorového zobrazování s mikronovým rozlišením [13–15].

## 2.1. Typy laserů pro laserovou ablací

Existuje hned několik typů laserů podle použitého zdroje, nicméně nejpoužívanější jsou Nd:YAG lasery a excimerové lasery. Nd:YAG lasery obsahují izotropní krystal Yttrium Aluminium Granátu ( $Y_3Al_5O_{12}$ ) dopovaným ionty neodymu ( $Nd^{3+}$ ) a jsou buzeny nejčastěji xenonovou výbojkou nebo laserovou diodou. Základní vlnovou délkou je 1064,1 nm v infračervené oblasti, avšak s nižší účinností můžou emitovat i záření x-tých harmonických frekvencí např. 532 nm pro druhou harmonickou frekvenci [16]. Charakteristický je pro ně Gaussovský profil intenzity, jehož předností je snadné zaostření na malou plochu a zanechává ablační kráter do kuželovitého tvaru. Tyto lasery našly své využití např. ve spojení laserové ablace s ionizací elektrosprejem (LAESI) [13, 14].

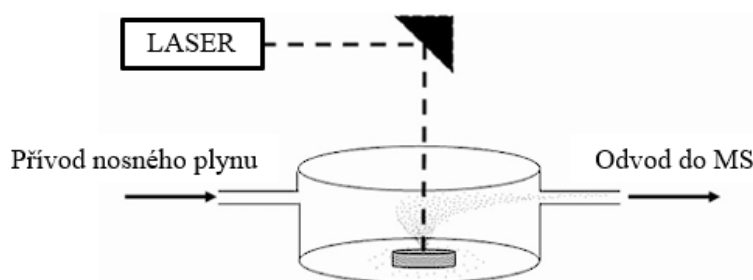
Druhý typ laserů tvoří tzv. excimerové (plynové) lasery. Excimerové lasery využívají směs reaktivních plynů ( $Cl_2$ ,  $F_2$ ) s inertními plyny (Ar, Kr nebo Xe), které dohromady tvoří tzv. excimery. Excimery jsou molekuly, které existují pouze v excitovaném stavu. Vznikají pomocí vysokonapěťové výbojky a v laserovém procesu následně emitují UV záření. Vlnová délka je daná pro danou směs plynů, např. excimery: XeCl, KrF, ArF nebo  $F_2$  mají vlnové délky 308, 248, 193 nebo 213 nm, v daném pořadí [13, 14]. Princip vzniku excimeru ArF laseru je popsán v následujícím schématu (1)[13]:



Pro excimerové lasery je charakteristický plochý profil intenzit, který je vhodnější pro analýzy s většími požadavky na přesnost, hloubkové a prostorové rozlišení. Zároveň zanechává rovnostěnný ablační kráter [13, 14]. Excimerové lasery mají velký potenciál se uplatnit například v medicíně, díky jejich přesnému a diskrétnímu odběru materiálu z konkrétní studované oblasti [17]. Drobnou nevýhodou je dražší údržba, jelikož vysoce čisté plyny jsou drahé a musí se pravidelně doplňovat [13, 14].

## 2.2. Abláční komora a transport aerosolu do detekčního systému

Standardní jednotka pro laserovou ablací obsahuje: zdroj laserového záření, optickou soustavu pro zaostření paprsku a polohovací ablační komoru, kam se umísťuje vzorek. Laserový paprsek je zaostřený pomocí čoček na povrch vzorku a vzorek lze pozorovat pomocí CCD kamery. Abláční komora je řízena počítačovým softwarem, který kontroluje posuv vzorku v osách x-y-z, umožňuje jeho posuv v řádech mikrometrů a slouží pro nastavení ablačních tvarů. Schéma standardní ablační komory je popsáno na obrázku 2 [13–15].



Laserovou ablací lze spojit s vhodným detekčním systémem (např. MS) a je důležité, aby spojení bylo co nejkratší a dostatečně účinné. Účinnost transportu aerosolu má vliv na rozmývání zón analytu, meze detekce (LOD) i výsledné prostorové rozlišení. Vlastnosti ovlivňující transportní proces i přenos signálu jsou: objem a geometrie ablační komory, typ a průtok nosného plynu a vlastnosti spojení pro transport aerosolu do detekčního systému. Standardní rozměry ablačních komor jsou v rozmezí 0,25-60 cm<sup>3</sup>. S velikostí ablační komory se zvyšuje i doba transportu uvolněného aerosolu, což vede k větší časové disperzi signálu. Menší ablační komory zajišťují ostřejší zóny signálu, ale hrozí u nich větší riziko usazování částic na stěnách komory a vzniku tzv. paměťových efektů. Paměťové efekty vedou k částečné ztrátě aerosolu a následné kontaminaci. Abychom dosáhli, co nejlepších výsledků transportní linie a doba výplachu by měly být co nejkratší a časová disperze co nejmenší. Důležitý je i typ nosného plynu, který má vliv na intenzitu signálu a šumu. Často používanými plyny jsou: argon (vhodný pro indukčně vázané plazma - ICP), helium (vyšší ablační a transportní rychlost) či dusík [13–15].

### 2.3. Optimalizace měřících parametrů laserové ablace

Důležité parametry laserové ablace jsou vlnová délka, hustota zářivého toku, frekvence pulzů, doba pulzu, laserový profil a velikost spotu. Vlnová délka má vliv na energii fotonů, absorpci materiálem, ovlivňuje termální (vypařování, tavení a frakcionace) i netermální procesy a také jev zvaný „plasma shielding“. „Plasma shielding“ je jev, kdy se tvoří mikroplazma na povrchu vzorku při ablačním procesu, které může následně absorbovat či odrazet dopadající fotony z laseru. K tomuto jevu dochází častěji při použití vyšší vlnové délky a vyšší pulzní frekvence laseru. Doba pulzu má také velký vliv na analýzu. U laserů s pulzní dobou v řádech nanosekund dominují při ablačním procesu termální efekty. To se projevuje hlavně na materiálech s nízkou teplotou tání (např. kovy). Při interakci dochází k tavení a část taveniny se odpařuje a mixuje, a to vede ke zhoršení prostorového a hloubkového rozlišení. Pro lasery s výrazně kratší dobou pulzu (např. v řádu femtosekund či pikosekund) jsou tyto efekty výrazně redukovány, protože depozice energie je tak rychlá, že se výrazně zkrátí doba působení termálních procesů. Finálně velikost spotu má vliv na laterální rozlišení a na množství a složení ablatovaného materiálu. Větší velikost spotu znamená nižší přenos materiálu ze spodu kráteru a horší rozlišení. Při nižší velikosti spotu lze dosáhnout lepšího rozlišení, ale omezujícím faktorem je citlivost a možnosti nastavení přístroje. Běžná velikost spotu je mezi 10 až 400  $\mu\text{m}$  [13, 14].

### 3. Instrumentace pro molekulovou hmotnostní spektrometrii

Základní součásti hmotnostního spektrometru tvoří zavádění vzorků, iontový zdroj, iontová optika, hmotnostní analyzátor a detektor. Vhodný přístup zavádění vzorku do iontového zdroje se volí na základě skupenství a dalších vlastností analyzovaných vzorků. Příkladem zavádění vzorku může být již popsáná laserová ablace pro pevné vzorky či spojení se separačními technikami (např. LC-MS či CE-MS) pro speciální analýzu kapalných vzorků. V případě analýzy organických molekul jsou nejčastěji využívány měkké ionizační techniky, jako například ESI, APCI, APPI, MALDI a ambientní ionizační techniky. Dále je neopominutelný i kvalitní vakuový systém, který je nezbytný pro hmotnostní analyzátor a detektor, v některých případech i iontový zdroj (např. EI). Jednotlivé součásti hmotnostního spektrometru jsou dále podrobně popsány v následujících kapitolách [2–4, 18, 19].

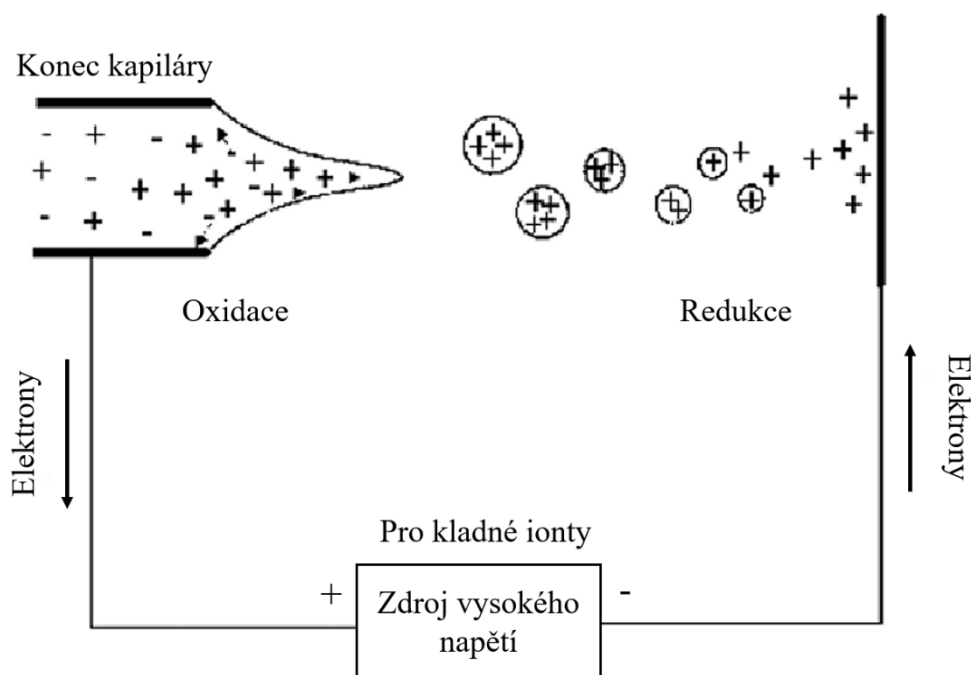
### 3.1. Iontové zdroje

V iontovém zdroji dochází k ionizaci analytů i složek matrice, resp. k tvorbě iontů. Proces ionizace zahrnuje ion-molekulové reakce v plynné fázi, například přenos protonů, vznik aduktů, přenos náboje a záchyt elektronů. Důležitým parametrem ionizace je velikost dodané energie pro ionizaci, se kterou souvisí šetrnost ionizačního zdroje a případná fragmentace. Podle dodané energie se ionizační techniky dělí na měkké a tvrdé. Tvrdé ionizační techniky pracují za vysokého vakua a s mnohonásobně vyšší energií, než je ionizační energie molekul analytu, a tudíž se pojí s výraznou fragmentací (např. EI v GC-MS). Oproti tomu měkké ionizační techniky předávají molekule menší množství energie a v důsledku toho je ve spektrech zachována informace o molekulové hmotnosti analytu. Mezi měkké ionizační techniky patří například ionizace elektrosprejem (ESI), chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI) a také ambientní ionizační techniky (např. DESI). U měkkých ionizačních technik je možné pracovat v kladném či záporném módu a podle zvoleného módu dochází k tvorbě kladných či záporných iontů. V kladném módu se primárně tvoří protonované molekuly  $[M+H]^+$  či adukty např. s alkalickými kovy ( $[M+Na]^+$ ,  $[M+K]^+$ ) či amonnými ionty ( $[M+NH_4]^+$ ). V záporném módu se primárně tvoří deprotonované molekuly  $[M-H]^-$ . Tvorbu aduktů ovlivňuje řada faktorů např. použitá ionizační technika, použitá rozpouštědla či přidaná aditiva. Kromě těchto primárních iontů/aduktů dochází také k tvorbě fragmentů v závislosti na struktuře a stabilitě molekul daného analytu. Mnoho organických látek je termicky nestabilních, také málo těkavých a je potřeba jejich přímá extrakce z kapalně či pevné fáze do fáze plynné. Tato přímá extrakce zahrnuje iontové zdroje pracující s kapalnou či pevnou fází (např. ESI či MALDI) [2, 20].

#### 3.1.1. Elektrosprejová ionizace

Poprvé byl elektrosprej ve spojení s MS publikován v 80. letech 20. století a zasloužila se o to výzkumná skupina Johna Fenna ve Spojených státech Amerických. Dokázali ionizovat malé polární molekuly, peptidy, oligonukleotidy, ale i proteiny. Za tento objev a uplatnění elektrospreje při studiu biomakromolekul byl v roce 2002 J. Fenn oceněn Nobelovou cenou. Předností elektrospreje je, kromě zmíněné schopnosti ionizace biomakromolekul, především analýza polárních látek, nízké meze detekce (LOD) a možnost jeho spojení s vysoko-účinnou kapalinovou chromatografií (HPLC-MS) [2, 21].

Elektrosprej vzniká pomocí vysokého napětí vloženého mezi kapilárou a proti-elektrodou na vstupu do vakuované části hmotnostního spektrometru. Vlivem silného elektrického pole o intenzitě v řádu  $10^5$  až  $10^6$  V/m dochází k polarizaci rozpouštědla a ionty se stejným nábojem se nahromadí ve špičce nabitě kapiláry. Při vhodném nastavení průtoku (desítky  $\mu\text{l}/\text{min}$  až jednotky  $\text{ml}/\text{min}$ ) a při dostatečné intenzitě elektrického pole, dochází k překonání povrchového napětí kapek a vytvoří se tzv. Taylorův kužel. Kontinuálně se tvoří vysoce nabitě kapky, které postupně desolvatují a vlivem odpuzování iontů se stejným nábojem, dochází k jejich rozpadu na menší a menší kapky, až se ve výsledku uvolní volné ionty v plynné fázi. Proces desolvatace je zároveň podpořen vyhříváním nabitě kapiláry či horkým inertním plynem a disperze elektrospreje je usměrněna koaxiálně proudícím plynem. Schéma zobrazující elektrochemický proces elektrospreje je popsán na obrázku 3. U větších molekul, jako jsou proteiny, dochází k uvolnění iontů odpařením molekul rozpouštědla. U proteinů typicky dochází k tvorbě vícenásobně nabitých iontů. Průměrně platí, že nabitý protein po ionizaci elektrosprejem obsahuje přibližně jeden náboj na 1000 Da. Elektrosprej lze aplikovat i na molekuly, které nemají ionizovatelnou skupinu. Ty se ionizují tvorbou sodných, draselných, amonných, chloridových, acetatových či jiných aduktů [2, 20, 21].

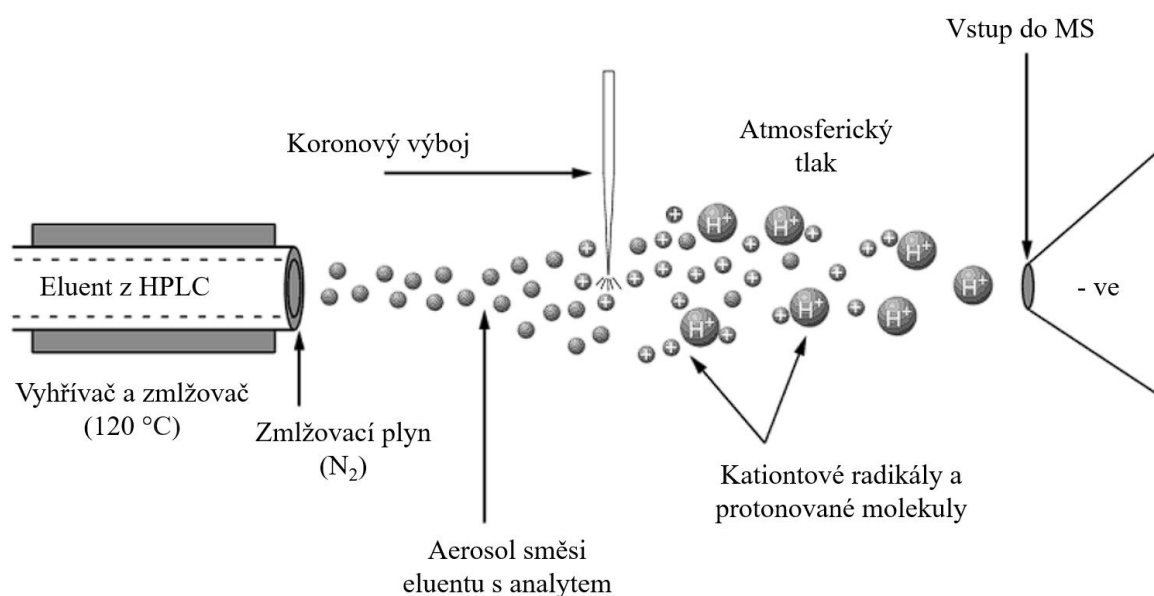


Obrázek 3 Schéma elektrochemického procesu v elektrospreji (převzato a upraveno z cit. [2])

### 3.1.2. Chemická ionizace za atmosférického tlaku

Jedná se o měkkou ionizační techniku, která je komplementární k elektrospreji. Je vhodná pro ionizaci nepolárních a nízkomolekulárních látek do molekulové hmotnosti 1500 Da. Tato ionizační technika vznikla v 70. letech 20. století a stala se velice populární především ve spojení s HPLC (HPLC-APCI-MS) [2, 20, 22].

Zředěný roztok vzorku, resp. eluent z HPLC, se rozprašuje do proudu horkého dusíku (200 °C). Po zplynění dochází k ionizaci jemného aerosolu pomocí koronového výboje v oblasti výbojové jehly. V koronovém výboji, při atmosférickém tlaku, vznikají primárně  $N_2^{+•}$  a  $O_2^{+•}$  radikály. Ty reagují s molekulami rozpouštědel, které jsou v nadbytku oproti analytu. Vznikají sekundární reakční ionty, které následně interagují s analytem a ionizují ho [2, 20, 22]. Podrobné schéma zobrazující proces ionizace v APCI je popsán na obrázku 4.



Obrázek 4 Princip ionizace v APCI (převzato a upraveno z cit. [20])

V kladném módu dochází při ionizaci nejčastěji k přenosu protonu nebo addukce iontů reakčního plynu. V záporném módu dochází k tvorbě iontů pomocí protonové abstrakce nebo také k tvorbě aduktů. Vzniklé ionty se následně zavádí do hmotnostního analyzátoru s vysokým vakuem [2, 22].

### 3.2. Hmotnostní analyzátoary

Vzniklé ionty v iontovém zdroji se dále separují v hmotnostním analyzátoary podle poměru hmotnosti ku náboji ( $m/z$ ). Hmotnostní analyzátoary pracují za vysokého vakua a k separaci iontů využívají statické nebo dynamické elektrické či magnetické pole, buď samostatně nebo kombinovaně [2, 23]. Souhrn hmotnostních analyzátoary a jejich principů separace je shrnut v tabulce 3:

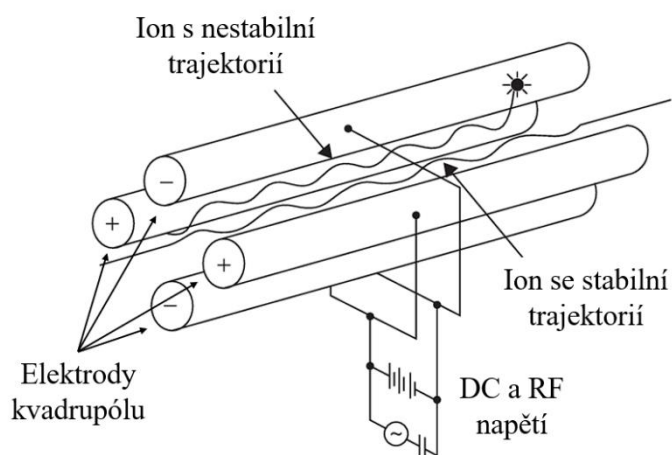
Tabulka 3 Souhrn hmotnostních analyzátoary (převzato a upraveno z cit. [2])

Typ analyzátoary	Symbol	Princip separace
Elektrický sektor	E / ESA	Kinetická energie
Magnetický sektor	B	Magnetický moment
Kvadrupól	Q	$m/z$ (stabilita trajektorie)
Iontová past	IT	$m/z$ (rezonanční frekvence)
Analyzátoary doby letu	TOF	Rychlost (doba letu)
Orbitrap s Fourierovou transformací	FT-OT	$m/z$ (rezonanční frekvence)
Iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací	FT-ICR	$m/z$ (rezonanční frekvence)

Obecně lze hmotnostní analyzátoary rozdělit do dvou skupin podle jejich principu separace iontů. Prvním typem jsou skenující analyzátoary, které transmitují vybrané ionty o daném poměru nebo daném rozmezí  $m/z$  za jednotku času, jako je například kvadrupól. Druhým typem jsou hmotnostní analyzátoary, jimiž prochází všechny ionty zároveň, jako například analyzátoary doby letu (TOF) či orbitrap (OT). Všechny hmotnostní analyzátoary se neustále modifikují a zlepšují se jejich měřicí parametry. Například analyzátoary doby letu je dnes běžně vybaven opožděnou extrakcí iontů či reflektorem pro vyrovnání rozdílů v počátečních kinetických energiích iontů a zlepšení jeho rozlišovací schopnosti. Dalším dnešním trendem je spojení více hmotnostních analyzátoary dohromady. Běžnou takovou kombinací je použití trojitěho kvadrupólu v tandemové hmotnostní spektrometrii či zapojení tzv. hybridních hmotnostních analyzátoary, tedy spojení různých hmotnostních analyzátoary (např. Q-TOF). Důležitými parametry u hmotnostních analyzátoary jsou hmotnostní rozsah, účinnost transmise iontů, přesnost určení hmotnosti a také jejich rozlišovací schopnost [2, 23].

### 3.2.1. Kvadrupól

Kvadrupól byl poprvé objeven Paulem a Steinwedelem v roce 1953 [24]. Řadí se mezi sekvenční a dynamické hmotnostní analyzátoři s nízkou rozlišovací schopností. Vyniká svou jednoduchostí, nízkými náklady, všestranností a rychlostí skenování. Jeho prvotní uplatnění bylo především v analýze anorganických látek (např. prvková analýza). Dnes se hojně využívá v hmotnostních spektrometrech s jednoduchým kvadrupólem, především pro jednoduché aplikace a rutinní analýzy např. ve farmacii, ale také v tandemové hmotnostní spektrometrii či v hmotnostních spektrometrech s hybridním hmotnostním analyzátořem (např. Q-TOF), které se obecně využívají především v analýze organických látek. Skládá se ze dvou párů paralelně uspořádaných hyperbolických tyčí/elektrod, které jsou uspořádány v kruhovém tvaru. Na elektrody se vkládají dvě složky napětí vysokofrekvenční a stejnosměrné a protější elektrody mají nastavenou stejnou polaritu. Nastavením vhodného poměru vysokofrekvenčního (radiofrekvenčního) a stejnosměrného napětí lze separovat ionty s konkrétním poměrem  $m/z$ , které mají v kvadrupólu stabilní trajektorii a projdou až do detektoru. Ostatní ionty, s nestabilní trajektorií, se vybijí na tyčích kvadrupólu a jsou odčerpány vakuovými pumpami. Kvadrupólem lze sledovat konkrétní ionty s vybranou hodnotou  $m/z$  či sledovat celou škálu iontů ve vybraném rozsahu hmotností, resp. poměrů  $m/z$ . Schéma kvadrupólu je popsáno na obrázku 5 [23–27].



Obrázek 5 Kvadrupólový analyzátoř (převzato a upraveno z cit. [27])

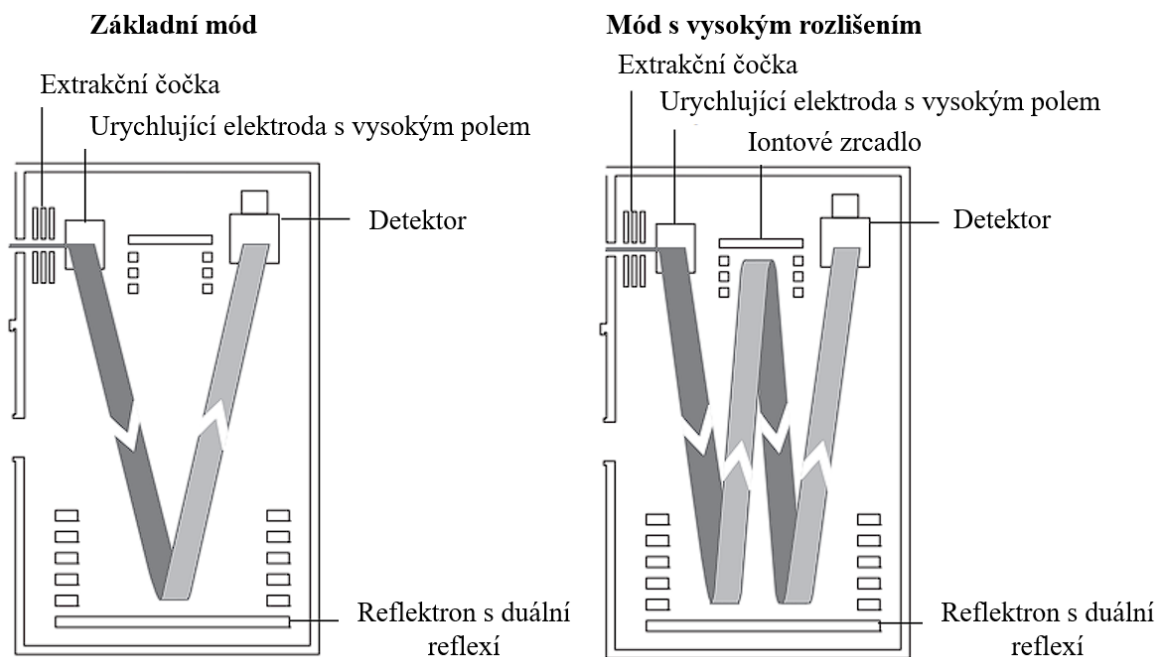
(Pozn.: „DC“ – stejnosměrné; „RF“ – radiofrekvenční)

### 3.2.2. Analyzátor doby letu

Tento hmotnostní analyzátor byl poprvé objeven v roce 1946. Skládá se z pulzního iontového zdroje, letové trubice bez pole a běžně bývá spojen s vhodným detektorem (TOF-MS). Analyzátor doby letu funguje na principu urychlení všech iontů na začátku letové trubice v jeden okamžik, ionty se od sebe separují na základě odlišných hodnot  $m/z$  a finálně jsou detekovány v detektoru. Závislost kinetické energie ( $E_k$ ) na hmotnosti ( $m$ ) a rychlosti ( $v$ ) je popsána rovnicí (2).

$$E_k = \frac{1}{2}mv^2 \quad (2)$$

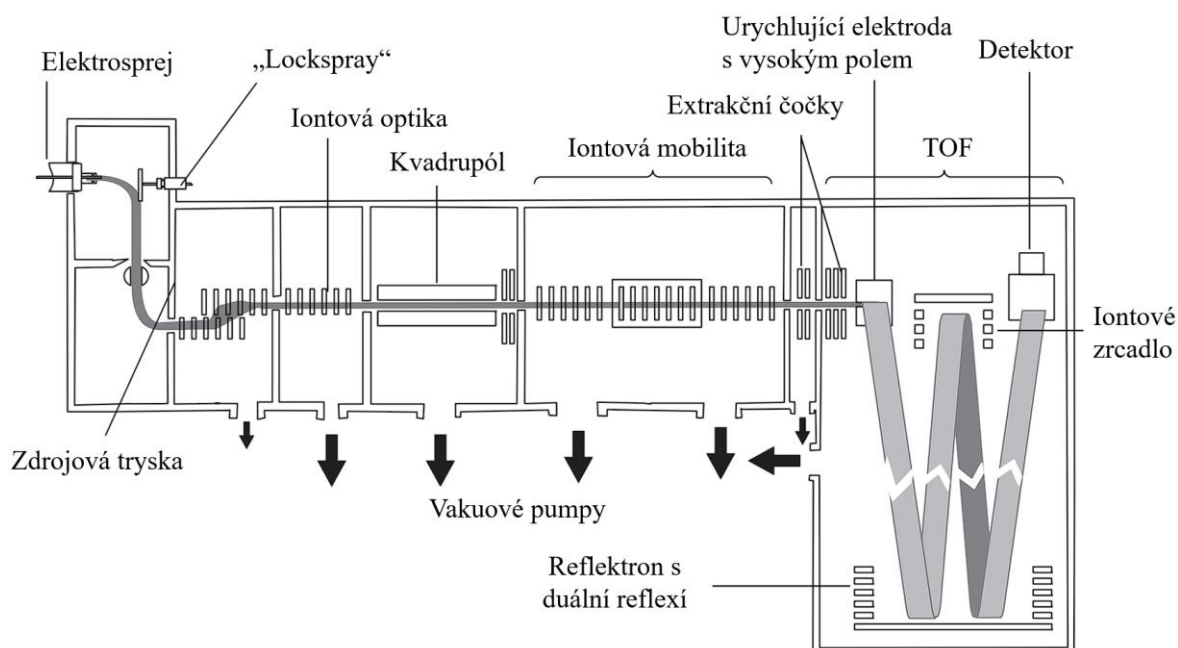
Platí, že čím mají ionty nižší hodnotu  $m/z$ , tím mají po urychlení vyšší rychlost a dorazí na detektor za kratší čas a pro ionty s vyšší hodnotou  $m/z$  to platí zase obráceně. Měří se čas, za který ionty urazí konstantní vzdálenost letovou trubicí bez pole až do detektoru. Naměřené časy lze následně převést na hmotnostní spektrum. Platí, že čím je delší letová trubice a čím jsou menší energetické rozdíly mezi ionty před urychlením, tím je lepší výsledné rozlišení. Takovéto lineární uspořádání má však nevýhodu v nízké rozlišovací schopnosti, proto se zavedl tzv. reflektron. Reflektron je iontové zrcadlo, které kompenzuje energetické rozdíly mezi ionty se stejným poměrem  $m/z$ . Skládá se z elektrod vytvářejících elektrické pole o daném napětí. Ionty penetrují skrze pole až do doby, kdy se sníží jejich kinetická energie na nulu a následně jsou odraženy do detektoru. Ty ionty, které mají vyšší kinetickou energii proniknou hlouběji mezi elektrody a tím se opozdí oproti iontům s nižší kinetickou energií. Tím se vyrovnají energetické rozdíly mezi ionty se stejným poměrem  $m/z$ . V důsledku toho se zaostří jednotlivé zóny a výrazně se zlepší rozlišovací schopnost analyzátoru. Alternativním přístupem je zavedení opožděné extrakce iontů, kdy se ionty urychlují s určitým zpožděním, aby se vyrovnaly rozdíly v jejich počátečních kinetických energiích. Výhodou analyzátoru doby letu je neomezený hmotnostní rozsah umožňující analyzovat vysokomolekulární látky s molekulovou hmotností až stovky tisíc Da [28]. Další výhodou je rychlý přenos signálu vhodný pro rychlé analýzy, které se využívají například v rámci GC-MS, UHPLC-MS nebo také r-DUV-LAESCI-MS. Některé hmotnostní spektrometry (např. Synapt) umožňují analýzy v různých módech. Příkladem může být analýza v základním módu s jednou reflexí či analýza v módu s vysokým rozlišením s duální reflexí. Jednotlivé módy se používají pro různé aplikace, podle požadavků na citlivost a rozlišení dané analýzy. Schéma obou módů analyzátoru doby letu s ortogonálním uspořádáním je zobrazeno na obrázku 6 [20, 22, 24, 29].



Obrázek 6 Hmotnostní spektrometr: Analyzátor doby letu v základním a duálním módu s detektorem (převzato a upraveno z cit. [29])

### 3.2.3. Hybridní hmotnostní analyzátoři (Q-TOF)

Hybridní hmotnostní analyzátoři jsou tvořeny kombinací/spojením více hmotnostních analyzátorů v rámci jednoho hmotnostního spektrometru. Cílem hmotnostních spektrometrů s hybridními hmotnostními analyzátoři je dosažení vyšší rozlišovací schopnosti, zlepšení mezí detekce (LOD) a také poměru signálu k šumu. Principem je v první fázi separace vybraných iontů o daném poměru  $m/z$ , ty se buď dále fragmentují (v tandemové hmotnostní spektrometrii) nebo se jen separují produktové ionty v druhém hmotnostním analyzátoru. První analyzátor se často volí s nižší rozlišovací schopností (například kvadrupól) pro separaci prekurzorových iontů a druhý se volí s vyšší rozlišovací schopností pro přesné určení hmotnosti (například TOF nebo OT). Příkladem hybridního hmotnostního analyzátoru je kombinace kvadrupólu a analyzátoru doby letu (Q-TOF). Jedná se o hybridní hmotnostní analyzátor vhodný pro velice rychlé analýzy organických látek s širokým hmotnostním rozsahem a přesným určením hmoty [20, 22]. Schéma Q-TOF je popsáno na obrázku 7.



Obrázek 7 Schéma hmotnostního spektrometru s hybridním hmotnostním analyzátozem Q-TOF (převzato a upraveno z cit. [29])

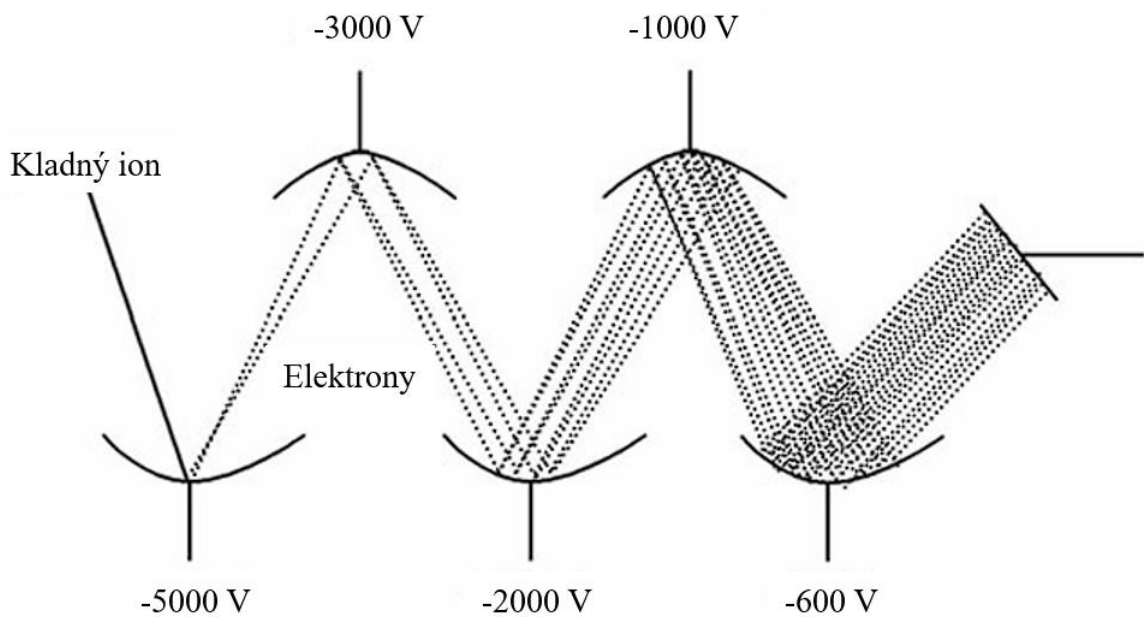
### 3.3. Detektor

Nezbytnou součástí hmotnostního spektrometru je detektor. Detektor pracuje za vysokého vakua a jeho funkcí je detekce a kvantifikace iontů z hmotnostního analyzátoru. Mezi základní detektory patří například elektronový násobič či Faradayův pohár [2, 23, 24].

#### 3.3.1. Elektronový násobič

Elektronový násobič se řadí mezi nejpoužívanější detektory v hmotnostní spektrometrii a byl poprvé uveden v roce 2006. Vyniká svou účinností, citlivostí a schopností detekovat ionty, elektrony i fotony. Existují dva základní typy elektronových násobičů, a to s diskrétní dynodou nebo s kontinuální dynodou, které pracují za vysokého vakua ( $\leq 5 \cdot 10^{-5}$  torrů). Elektronový násobič s diskrétní dynodou se skládá ze série 12 až 20 dynod. Na dynodách je nastaveno kaskádovitě se měnící napětí pomocí řady rezistorů až k poslední dynodě, která je uzemněna (viz Obrázek 8). Principem je dopad iontů na konverzní dynodu, která je nabitá na vysoký potenciál (3-30 kV) a má opačnou polaritu, než mají detekované ionty. Po dopadu primárních iontů na konverzní dynodu se uvolní

sekundární částice, konkrétně ionty, neutrální částice a sekundární elektrony. Sekundární elektrony jsou přitahovány k další dynodě s vyšším potenciálem, kde je znásoben jejich počet. Tento proces se několikrát opakuje až do doby, kdy se dostanou na poslední uzemněnou dynodu, resp. anodu, na které je zaznamenán elektrický proud. Nevýhodou elektronových násobičů je jejich životnost, která je v okolí jednoho až dvou let, protože dochází ke kontaminaci ionty, například i z nedostatečného vakua. Existují i další typy elektronových násobičů, například mikrokanálový nebo mikrosférický [2, 24, 27].



Obrázek 8 Elektronový násobič s diskrétní dynodou (převzato a upraveno z cit. [2])

#### **4. Využití ambientních technik založených na laserové ablaci/desorpci v analýze organických molekul**

Tato kapitola se věnuje přehledu dosud publikovaných vědeckých studií zaměřených na využití LAESI-MS/MSI a LAAPPI-MS/MSI pro kvalitativní a kvantitativní analýzu organických látek. Zvláštní pozornost je věnována jejich aplikaci na reálných vzorcích např. bankovky, lidské a zvířecí tkáně apod. Jednotlivé články jsou shrnuty do krátkých odstavců, které stručně popisují jejich obsah, cíle a hlavní poznatky. Na konci této kapitoly následují tabulky shrnující měřicí parametry pro jednotlivé ambientní techniky (viz Tabulka 4-6).

V časopise „Rapid Communications in Mass Spectrometry“ se autoři článku (Shiea et al., 2005) zabývali analýzou proteinů pomocí ELDI/MS. Pro desorpci látek z kovových povrchů využili dusíkový pulzní laser. Podařilo se jim získat hmotnostní spektra intaktních proteinů bez přídavku matrice. Na analytech cytochrom C a droze metakvalon demonstrovali aplikovatelnost ELDI/MS pro proteiny a syntetické organické molekuly [30].

Autoři v článku (Sampson et al., 2006) experimentálně spojili hybridní ionizační zdroj, maticí asistovanou laserovou desorpci a ionizaci elektrosprejem (MALDESI) s hmotnostní spektrometrií s iontovou cyklotronovou rezonancí (FT-ICR-MS). Analyzovali peptidy (bradykinin, angiotensin I, glukagon a ubiquitin) a proteiny v rozmezí 1-8,6 kDa a obdrželi hmotnostní spektra s vysokým rozlišením a průměrnými náboji odpovídající analýze s využitím nano-elektrospreje. Také potvrdili, že použití elektrosprejové ionizace silně ovlivňuje rozložení nábojů v molekulách peptidů a proteinů. Autoři zároveň upozorňují, že tyto analýzy jsou provedeny s přidáním matrice v podobě organických kyselin (kyselina 2,5-dihydroxybenzoová a kyselina sinapová). Dále objasňují mechanismus tvorby nábojů a také dále rozvíjí analýzu proteinů a komplexních směsí pomocí FT-ICR-MS. Závěrem autoři konstatují, že je velmi důležité pochopit mechanismus MALDESI a neustále pracují na zlepšení jejich měřicích parametrů jako např. citlivost, účinnost transmise iontů apod [31].

V tomto článku (Cheng et al., 2008) se autoři zabývali průběžným monitorováním chemických reakcí (např. epoxidací chalkonu v ethanolu, chelatací Cu a Ni iontů s EDTA či enzymatickou reakcí trypsinu s cytochromem C) v organických a vodných roztocích po smíchání s práškovým uhlíkem. Toto monitorování prováděli pomocí elektrosprejové ionizace (ELDI) při ambientních podmínkách. Autoři využili černý uhlíkový prášek, aby

podpořili laserovou desorpci z povrchu vzorků. Dále se jim podařilo demonstrovat, že ELDI dokáže charakterizovat anorganické i organické molekuly přímo z kapalných roztoků, a tudíž nepřetržitě monitorovat biochemické i další chemické reakce. Také naznačili, že by bylo možné zjistit řadu kinetických informací o meziproduktech a produktech dané chemické reakce, pokud by měli vhodné vnitřní standardy a doba existence daných meziproduktů by byla dostatečně velká [32].

Autoři článku (Schäfer et al., 2011) využili laserovou desorpci s MS detekcí (LDI-MS) pro analýzu prasečí tkáně. Konkrétně LDI-MS testovali a optimalizovali pro analýzu fosfolipidů v kladném i záporném módu. Dále v této studii provedli detailní studii a analýzu intaktní prasečí tkáně. Testovali různé nastavení hustoty zářivé energie laseru, různé vlnové délky laseru, pulzní laser a laser s kontinuální vlnou. Dále skombinovali chirurgický CO<sub>2</sub> laser s hmotnostním spektrometrem pro kvalitativní a identifikační analýzy. K tomu vyvinuli vhodnou metodu na rychlou identifikaci naměřených spekter a tento funkční systém demonstrovali na maligním nádoru v trávicím traktu [33].

Autoři článku (Kao et al., 2013) v časopise *Journal of Mass Spectrometry* se zabývali studiem chemického složení bankovek s cílem odlišit pravé bankovky od padělků, a to konkrétně bankovky amerického dolaru a dolaru z Nového Taiwanu. Povrch bankovek analyzovali pomocí pulzního UV laseru se sekundární elektrosprejovou ionizací. Dokázali, že padělky jsou rozpoznatelné podle jejich povrchového chemického složení. Detekovali řadu látek např. různé polymery (polyethylenglykol a polypropylenglykol), změkčovadla a složky inkoustu. Dosažené výsledky byly srovnatelné s analýzou pomocí klasického MS s elektrosprejovou ionizací, které předcházela kapalinová extrakce. Podstatným rozdílem v těchto dvou analýzách bylo, že při ambientním, šetrném přístupu pomocí ELDI/MS zůstala bankovka nepoškozená [34].

V časopise *Analytical & Bioanalytical Chemistry* se autoři článku (Cho et al., 2013) zabývali studii integrity proteinů (např. cytochrom C, myoglobin) v různých roztocích. Využili k tomu velmi rychlé analýzy pomocí hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí (ELDI/MS). Testovali proteiny v roztocích obsahující např. pufrы, organické soli, anorganické soli, silné kyseliny a báze, aby simulovali roztoky proteinů získané řadou různých předúprav např. extrakcí, filtrací apod. Při analýze nanесли kapku vzorku na kovový plát a přímo ho analyzovali pomocí pulzního laseru [35].

Autoři článku (Lawal et al., 2019) použili UV laser o vlnové délce 193 nm v kombinaci laserové ablace s MS detekcí s elektrosprejovou ionizací pro studování biologických vzorků, konkrétně fosfolipidů, peptidů a proteinů (až 66 kDa). Tento typ laseru umožnil hlubší analýzu tkáně, resp. detekci lipidů v tkáni bez předúpravy. Autoři dospěli k závěru, že UV laserová ablace umožňuje provádět analýzu nativního složení lipidů s mikronovým prostorovým rozlišením bez potřeby použití matrice [36].

V článku (Lawal et al., 2021) autoři provedli proteomickou analýzu tkáně pomocí ArF excimerového laseru ve vzdálené UV oblasti (193 nm). Pomocí laseru desorbovali (vzorkovali) konkrétní části tkání, ze kterých byly extrahovány proteiny pro LC-MS/MS analýzu. Schopnost získání intaktních proteinů byla dále ověřena pomocí maticí asistované laserové desorpce/ionizace (MALDI) pro proteinový standard (BSA), který byl intaktně detekován bez fragmentace. Podařilo se jim transferovat intaktní protein s 90 % účinností při nastavené hustotě zářivé energie 3 kJ/m<sup>2</sup>. Dále se jim podařilo identifikovat 85 a 2400 proteinů z různých oblastí tkáně. Při použití UV laseru v porovnání s IČ laserem byly tyto výsledky, co se týče identifikace proteinů a účinnosti transferu, přibližně 4x lepší [37].

Autoři článku (Yan et al., 2021) se zabývali přímou analýzou pomocí hmotnostní spektrometrie s využitím UV laserové desorpce a ionizace nízkoteplotním plazmatu. Konkrétně se zaměřili na analýzu myších varlat bez jejich předúpravy. Srovnávali metody nezávislé na matrici s MALDI experimenty. Dokázali, že technika AP-LDI-MS je vhodná technika pro analýzu tkání bez použití matrice. Detekovali řadu lipidů (např. fosfolipidy a ceramidy) v kladném módu s mezemi detekce srovnatelnými s technikou MALDI [38].

V této studii článku (Xiang et al., 2023) autoři vyvinuli unikátní platformu pro proteomickou analýzu spojením UV laserové ablace s nanoPOTS (z angl. Nanodroplet processing in one pot for trace samples). Tuto techniku použili pro analýzu slinivky břišní. Demonstrovali, že tato nová platforma je schopná detekovat 1312, 1533 a 1966 proteinů z ablatovaného spotu s průměrem 7, 13 a 19 μm. Po optimalizaci se autorům také podařilo dosáhnout skvělého prostorového rozlišení (2 μm) v rámci hmotnostně spektrometrického zobrazování proteinů. Závěrem autoři konstatují, že DUV-LA-nanoPOTS umožňuje rozsáhlou analýzu proteinů pro klinický a translační výzkum [39].

V časopise Analytical Chemistry popsali Qi et al. novou techniku laserové desorpce a následnou fotoionizaci s dopantem (t-AP-LDI/PI) pro hmotnostně spektrometrické zobrazování. Zobrazovanými analyty byly lipidy (např. fosfolipidy

a ceramidy), mastné kyseliny, neurotransmitery a aminokyseliny přímo v tenkých řezech myších mozků. Díky následné ionizaci s dopantem (toluenem) dosáhli 1-3 řádové zvýšení signálu. Po podrobné optimalizaci dokázali dosáhnout 4  $\mu\text{m}$  prostorového rozlišení pro účely zobrazování metabolitů v hipokampu. Dále pomocí této techniky studovali i nádorové buňky a zjistili určitou metabolickou heterogenitu, v blízkém okolí nádorových buněk, spojenou s abnormální proliferací a šířením nádorových buněk [12].

Autoři článku (Papoušková et al., 2025) publikovaném v časopise *Analytical Chemistry* se zabývali vývojem nové ambientní techniky s duálním iontovým zdrojem: kombinace elektrospreje a chemické ionizace za atmosférického tlaku ve spojení s UV (193 nm) nanosekundovým laserem s MS detekcí (r-DUV-LAESCI-MS). Podařilo se jim detekovat polární látky (např. kofein, PEG (600)) a nepolární látky (např. skvalen, antracen) během jedné analýzy a tím potvrdit schopnost této techniky analyzovat molekuly ve velkém rozsahu polarit a molekulových hmotností. V článku popisují, že se jedná o plně automatizovanou metodu, která zvládne přímou analýzu s velmi nízkými mezemi detekce na úrovni desetin  $\mu\text{mol/l}$  (detekce desítek až stovek attomolů na jeden ablatovaný pixel). Dále demonstrovali potenciál techniky pro vysokorozlišující hmotnostně spektrometrické zobrazování konstituentů otisků prstu s nastavitelnou velikostí ablačního spotu jen 25  $\mu\text{m}$  (nejmenší spot pro analýzu je 3  $\mu\text{m}$ ). r-DUV-LAESCI-MS byla dále aplikována na analýzu lidského mazu, kde byla detekována řada analytů (např. vyšší mastné kyseliny, cholesterol, skvalen, diacylglyceroly i triacylglyceroly) a také hmotnostní zobrazování otisků prstů se zobrazením prostorové distribuce nanesených psychoaktivních látek (nafyron, kathinon, methedron a flefedron). Toto hmotnostní zobrazování umožnilo propojení informací z hlediska chemického složení a biometrických informací. Díky těmto unikátním vlastnostem má tato nová ambientní ionizační technika velký potenciál do budoucna, a to nejen pro analýzu lidských tkání, ale i pro studování lipidového profilu [1].

Tabulka 4 Přehled analyzovaných vzorků, měřících parametrů a instrumentace výše popsaných studií (2005-2011)

	Shiea et al., 2005	Sampson et al., 2006	Cheng et al., 2008	Schäfer et al., 2011			
Analyty, vzorky	proteiny (cytochrom C), metakvalon	peptidy (bradykinin, angiotensin I) a proteiny (1-8,6 kDa)	cheláty s Cu a Ni, cytochrom C	prasečí orgány, lidský karcinom tlustého střeva			
Technika	ELDI-MS	MALDESI, FT-ICR-MS	ELDI-MS	LDI-MS			
Hmotnostní analyzátor	Q-TOF	FT-ICR-MS	Q-TOF či IT	lineární iontová past s orbitrap			
Ionizační technika	ESI	ESI	ESI	LDI			
Typ laseru	dusíkový	dusíkový	dusíkový	CO <sub>2</sub>	Nd:YAG	OPO	dusíkový
Vlnová délka	337 nm	337 nm	337 nm	10,6 μm	355 nm	2,94 μm	337 nm
Energie laseru	20 μJ	120 μJ	~ 150 μJ	10-30 mJ	8 mJ	15-20 mJ	60 μJ
Frekvence	10 Hz	15 Hz	10 Hz	3 Hz	20 Hz	20 Hz	60 Hz
Doba pulzu	4 ns	4 ns	4 ns	90 μs	4 ns	6 ns	3 ns
Velikost spotu	100 x 150 μm	n.u.	~100 x 150 μm	n.u.			
Doba skenu	200 laserových pulzů	2 s	2 s	n.u.			
Napětí na kapiláře	0 V	1,85 kV	0 V	-			
„Sheath liquid“	MeOH + H <sub>2</sub> O 1:1 (v/v)	ACN + H <sub>2</sub> O 1:1 (v/v) s 0,1% kyselinou mravenčí	MeOH + H <sub>2</sub> O 8:2 (v/v)	-			
Průtok „SL“	150 μl/min	400 nl/min	2 μl/min	-			
Reference	[30]	[31]	[32]	[33]			

(Pozn.: “n.u.” – nebylo uvedeno; “-” – neobsahuje parametr, „SL“ – „sheath liquid“)

Tabulka 5 Přehled analyzovaných vzorků, měřících parametrů a instrumentace výše popsaných studií (2013-2021)

	Kao et al., 2013	Cho et al., 2014	Lawal et al., 2019	Lawal et al., 2021
Analyty, vzorky	bankovky	Cytochrom C, myoglobin, močovina, Guanidine.HCl, glycerol	lidský angiotensin II, bradykinin, insulin, cytochrom C atd.	proteiny (albumin), krysí mozek
Technika	ELDI-MS	ELDI-MS	ELDI-MS	laserová desorpce, LC-MS/MS
Hmotnostní analyzátor	Q-TOF	IT	Q-TOF	TOF
Ionizační technika	ESI	ESI	ESI	MALDI
Typ laseru	Nd:YAG	Nd:YAG	excimerový (ArF)	excimerový (ArF)
Vlnová délka	266 nm	266 nm	193 nm	193 nm
Energie laseru	250 $\mu$ J	250 $\mu$ J	1,0 mJ	2-50 $\mu$ J
Frekvence	5 Hz	10 Hz	5 Hz	20 Hz
Doba pulzu	5 ns	5 ns	8 ns	13 ns
Velikost spotu	20–30 $\mu$ m	5.10 <sup>-3</sup> cm <sup>2</sup>	200 $\mu$ m	2 $\mu$ m
Doba skenu	2 s	2 s	n.u.	0,6 s
Napětí na kapiláře	4 kV	4 kV	5,5 kV	-
„Sheath liquid“	100 % MeOH (v/v)	směs MeOH a H <sub>2</sub> O 1:1 (v/v) s 0,1% kyselinou octovou	směs MeOH + H <sub>2</sub> O 1:1 (v/v) s 0,1 % trifluorooctovou kyselinou	-
Průtok „SL“	2,5 $\mu$ l/min	150 $\mu$ l/h	1 $\mu$ l/min	-
Reference	[34]	[35]	[36]	[37]

(Pozn.: „n.u.“ – nebylo uvedeno; “-“ neobsahuje parametr, „SL“ – „sheath liquid“)

Tabulka 6 Přehled analyzovaných vzorků, měřících parametrů a instrumentace výše popsáných studií (2021-2025)

	Yan et al., 2021	Xiang et al., 2023	Qi et al., 2024	Papoušková et al., 2025
Analyty, vzorky	kryší varlata	slinivka břišní, peptidy, proteiny	myší mozek, metabolity	otisky prstů, kofein, antracen, cholesterol, vosky, psychoaktivní látky (kathinon, fefedron, apod)
Technika	AP-LDI-MS	DUV-LA-nanoPOTS	t-AP-LDI-PI	r-DUV-LAESCI-MS
Hmotnostní analyzátor	orbitrap	Orbitrap Fusion Lumos	TOF	Q-TOF
Ionizační technika	AP-MALDI-MSI	ESI	APPI	duální iontový zdroj ESCI
Typ laseru	Nd:YAG	excimerový	Nd:YLF	excimerový (ArF)
Vlnová délka	355 nm	193 nm	349 nm	193 nm
Energie laseru	20 $\mu$ J	2 mJ	n.u.	8 mJ (1,21 J/cm <sup>2</sup> )
Frekvence	1 kHz	n.u.	1000, 5000 Hz	20 Hz
Doba pulzu	n.u.	n.u.	7 ns	n.u.
Velikost spotu	50 $\mu$ m	2 $\mu$ m	$\leq$ 10 $\mu$ m	150 $\mu$ m
Doba skenu	0,287 s	2 s	0,08 s	0,485 s
Napětí na kapiláře	-	2,4 kV	-	3,8 kV
Sheath liquid	-	ACN + 0,1% kyselina mravenčí	MeOH + toluen + kyselina mravenčí 70:30:0,2 (v/v)	MeOH + H <sub>2</sub> O 1:1 (v/v)
Průtok „SL“	-	100 nl/min	3 $\mu$ l/min	5 $\mu$ l/min
Reference	[38]	[39]	[12]	[1]

(Pozn.: "n.u." – nebylo uvedeno; "-" – neobsahuje parametr, „SL“ – „sheath liquid“)

## 5. Experimentální část

### Seznam rozpouštědel

- aceton ( $\geq 99,8$ ; HPLC kvalita) - dodavatel Fluka (Německo)
- isopropanol (IPA) ( $\geq 99,9$ ; HPLC gradient kvalita), acetonitril (ACN) ( $\geq 99,9$ ; HPLC kvalita), methanol (MeOH) ( $\geq 99,9$ ; LC-MS gradient kvalita) a kyselina mravenčí (FA) ( $\geq 99\%$ ; ACS činidlo) - dodavatel VWR (Německo)
- n-heptan ( $\geq 99$ ; p.a.) - dodavatel Penta (Česká republika)
- Milli-Q ultračistá voda (měrný odpor 18,2 M $\Omega$ .cm)

### Seznam analyzovaných látek/vzorků

- antracen (*s*), kofein (*s*) - dodavatel Sigma-Aldrich (Německo)
- katinon (*s*), methedron (*s*) a flefedron (*s*) - dodavatel Lipomed (Švýcarsko)
- naftalen (*s*), stearyl stearát (*s*), cholesterol (*s*)
- kyselina palmitová (*s*) - dodavatel Lachema (Česká republika)
- PEG (600) (*l*), PEG (4000) (*s*) a skvalen (*s*) - dodavatel Fluka (Německo)
- vzorek olivového oleje (*l*) značky Franz Josef (Česká republika)
- myoglobin (*s*), albumin (*s*), angiotensin (*s*)

(Pozn.: (*l*) – kapalná látka, (*s*) – pevná látka; Všechny chemikálie byly minimálně na úrovni analytické kvality, pokud nebylo uvedeno jinak.)

### Přístroje a vybavení

- Analyte G2 remote UV laserový ablační systém (Photon Machines, USA) s nanosekundovým excimerovým laserem (ArF, 193 nm)
- Synapt G2-S, hybrid Q-TOF hmotnostní spektrometr (Waters, UK) se speciálně vyrobeným duálním iontovým zdrojem ESCI
- SunCollect MALDI - spotter, sprejer (Sunchrom, Německo)
- SGE stříkačka (Trajan Scientific and Medical, Austrálie)
- Milli-Q čistící systém pro vodu (Millipore, Francie)
- ruční energiově-disperzní rentgenový fluorescenční spektrometr VANTA (Olympus, USA)

## 5.1. Optimalizace průtoku a typu sprejovací kapaliny

Byla provedena řada experimentů pro optimalizaci průtoku a testování různých sprejovacích kapalin („sheath liquid“) pro vybrané analyty. Jako „sheath liquid“ byly použity směsi uvedené v tabulce 7, které byly testovány při průtocích 5, 20, 50 a 100  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Testovanými analyty byly antracen (nepolární látka) a kofein (polární látka). Dále byly testovány vysokomolekulární látky: peptidy (myoglobin, albumin, angiotensin) a polymer (polyethylenglykol - PEG (4000)).

Tabulka 7 Seznam použitých „sheath liquid“

Číslo směsi	Sprejovací kapalina
1	Acetonitril (ACN) + H <sub>2</sub> O 1:1 (v/v)
2	Methanol (MeOH) + H <sub>2</sub> O 1:1 (v/v)
3	Isopropanol (IPA) + H <sub>2</sub> O 1:1 (v/v)
4	ACN + MeOH + IPA + H <sub>2</sub> O 1:1:1:1 (v/v)
5	Acetonitril (ACN) + H <sub>2</sub> O 1:1 (v/v) + FA 0,1 %
6	Methanol (MeOH) + H <sub>2</sub> O 1:1 (v/v) + FA 0,1 %
7	Isopropanol (IPA) + H <sub>2</sub> O 1:1 (v/v) + FA 0,1 %
8	ACN + MeOH + IPA + H <sub>2</sub> O 1:1:1:1 (v/v) + FA 0,1 %

Jednotlivé analyty byly rozpuštěny ve vhodných rozpouštědlech: antracen v n-heptanu, kofein ve směsi ACN + H<sub>2</sub>O 1:9 (v/v), myoglobin, albumin a angiotensin ve vodě a PEG (4000) byl naředěný v IPA na výslednou koncentraci 1 mg/ml. Následně byly připraveny spoty o objemu 0,5  $\mu\text{l}$  na mikroskopické sklíčko pomocí Hamiltonovy stříkačky (Agilent, USA). Zaschlé spoty o velikosti v průměru přibližně 5 mm byly ihned podrobeny r-DUV-LAESCI-MS analýze. V laserové ablaci byly nastaveny linie přibližně uprostřed zaschlých kapek, tak aby linie zahrnovala celou kapku. Tímto způsobem byly proměřeny všechny analyty s testovanými „sheath liquid“ při definovaných průtocích. Naměřená data byla následně vyhodnocena přímo v softwaru MassLynx V4.1 (SCN851) (Waters Corporation, UK), kde po odečtení pozadí byla zaznamenána absolutní intenzita měřené látky při daném optimálním nastavení r-DUV-LAESCI-MS [1].

## 5.2. Testování vlivu povrchů na intenzitu signálu analytů

### 5.2.1. Příprava povrchů pro sprejování

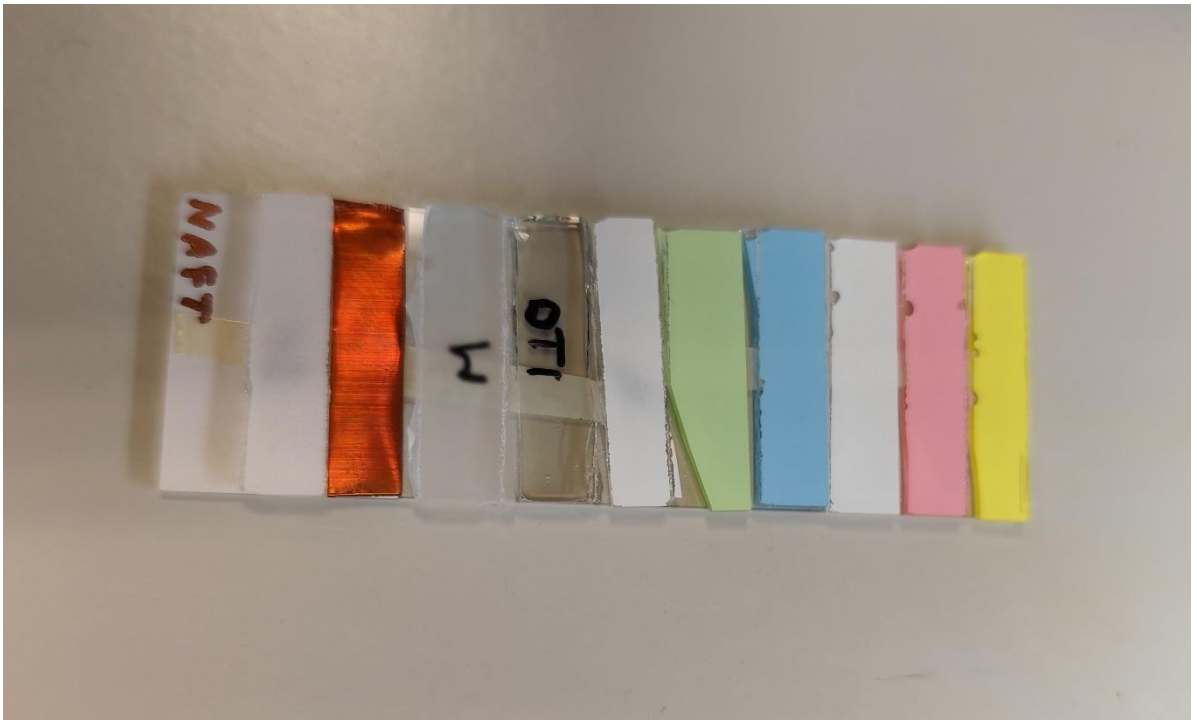
Testováno bylo 8 povrchů mikroskopických sklíček, u kterých byla vybrána matná/barevná část (potah). Dále ITO sklíčko s tenkým vodivým povlakem s příměsí oxidů cínu a india a také kovový povrch, resp. tenký měděný plát. Složení povrchů bylo blíže charakterizováno pomocí rentgenové fluorescence (XRF) a také pomocí MS/MS analýzy (viz kapitola 6.2). Shrnutí povrchů je uvedeno v tabulce 8.

Tabulka 8 Seznam testovaných povrchů

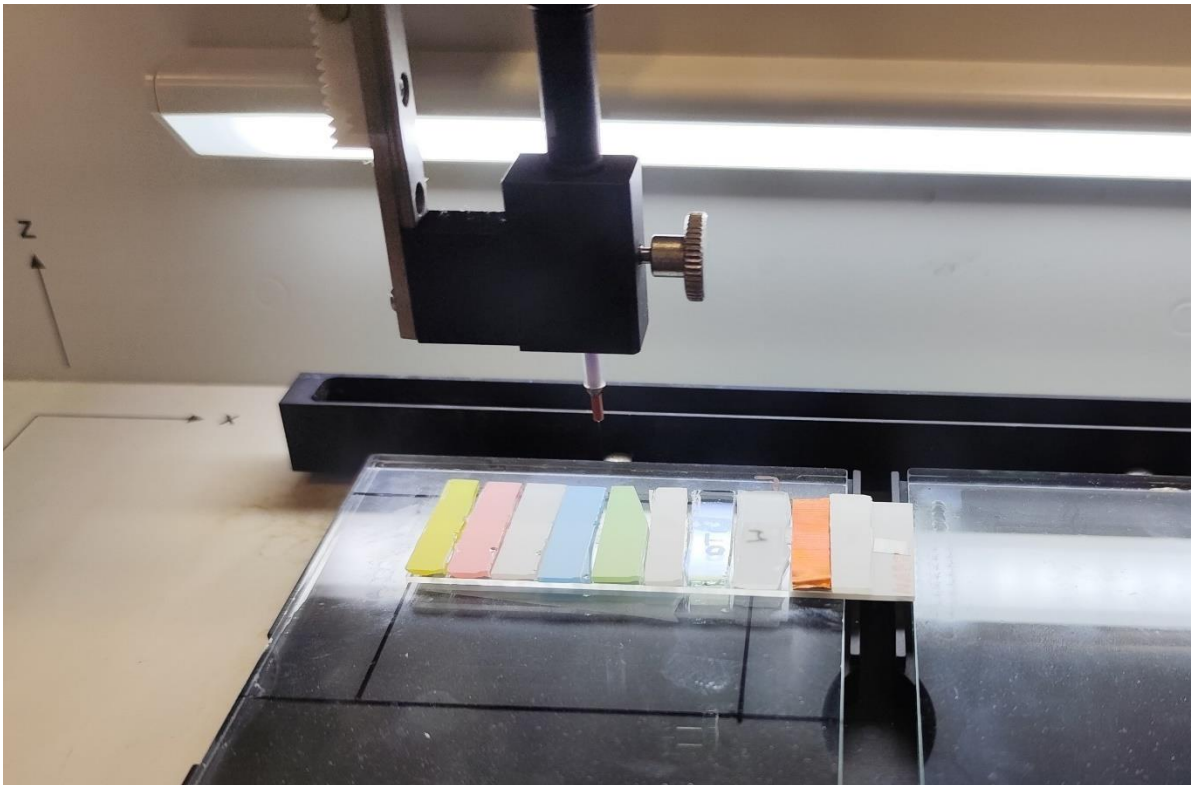
Označení povrchu	Typ povrchu	Výrobce
Ž	Mikroskopické sklíčko se žlutým potahem	Epredia
R	Mikroskopické sklíčko s růžovým potahem	Epredia
B	Mikroskopické sklíčko s bílým potahem	Epredia
M	Mikroskopické sklíčko s modrým potahem	Epredia
Z	Mikroskopické sklíčko se zeleným potahem	Epredia
P	Mikroskopické sklíčko s bílým potahem	Prosolia, Inc.
ITO	Mikroskopické sklíčko potažené vodivou vrstvou oxidů In a Sn	Ossila
Ref	Mikroskopické sklíčko s naleptaným povrchem pomocí HF	Verkon (Marienfeld)
Cu	Měděný plát	Správa budov UPOL
SF	Mikroskopické sklíčko s bílým potahem	Thermo scientific (SuperFrost)

Jednotlivá mikroskopická sklíčka byla nařezána pomocí diamantového popisovače na sklo a tenký měděný plát byl ustřižnut kancelářskými nůžkami, na malé obdélníky o velikosti přibližně  $0,5 \times 2,5$  cm. Jednotlivé povrchy byly upevněny pomocí oboustranné lepicí pásky na podložní mikroskopické sklíčko (viz obrázek 9). Takto připravené povrchy byly očištěny methanolem a po zaschnutí ihned nasprejovány vybranou látkou v připraveném roztoku (viz obrázek 10).

Obrázek 9 Připravené povrchy pro nanesení homogenní vrstvy analytu



Obrázek 10 Sprejování připravených povrchů



## 5.2.2. Příprava zásobních roztoků standardů

V případě pevných i kapalných látek/vzorků byly separátně připraveny zásobní roztoky o koncentraci 1 mg/ml ve vhodných rozpouštědlech (Tab. 9). Tyto zásobní roztoky byly dále standardně 20x zředěny na koncentraci 50 µg/ml. Výjimkou byl PEG (600) a skvalen, které bylo potřeba nasprejovat v 10x větší koncentraci (500 µg/ml). Seznam látek/vzorků, vhodných rozpouštědel a ředících faktorů je uveden v tabulce 9. Připravené roztoky látek/vzorků byly separátně nasprejovány na vždy nově připravené povrchy.

Tabulka 9 Seznam sprejovaných látek/vzorků

Látka	Skupina látek	Rozpouštědlo	Ředící faktor	Výsledná koncentrace [µg/ml]
antracen	nepolární	n-heptan	20	50
naftalen	nepolární	n-heptan	20	50
kofein	polární	ACN + H <sub>2</sub> O 1:9 (v/v)	20	50
PEG (600)	polární polymery	IPA	2	500
kathinon	polární psychoaktivní látky (drogy)	IPA	20	50
methedron		IPA	20	50
flefedron		MeOH	20	50
kyselina palmitová	vyšší mastné kyseliny	MeOH	20	50
skvalen	nepolární, v lidském mazu	IPA	2	500
cholesterol		IPA	20	50
stearyl stearát	vosk	aceton	20	50
olivový olej	potravinářský olej	IPA	20	-

### 5.2.3. Optimalizace metody nanášení homogenní vrstvy analytů

Pro nanesení homogenní vrstvy analytu bylo využito jeho postupné sprejování pomocí SunCollect MALDI – spotter, sprejer (Sunchrom, Německo) vybaveného SGE stříkačkou (Trajan scientific and medical, Austrálie). Optimalizace metody nanášení probíhala především v rámci sprejování kofeinu ve směsi ACN + H<sub>2</sub>O 1:9 (v/v). Testovány byly různé průtoky v rozmezí 20–50 µl/min a také počet sprejovaných vrstev v rozmezí 30–60. Dále se testovaly parametry umístění a vzdálenosti spreje od sprejované plochy a vzdálenost jednotlivých sprejovaných linií od sebe. Homogenita a kvalita nanesené vrstvy (studium distribuce a velikostí zaschlých mikrokapek) byla následně vyhodnocena pod mikroskopem, a především podle těchto vlastností a také doby sprejování byly vybrány vhodné parametry. Profil sprejování byl odlišný pro různá rozpouštědla, proto bylo následně nutné tyto parametry optimalizovat zvlášť i pro další rozpouštědla. Tyto další optimalizace byly provedeny na základě vizuálního porovnání s předešlým profilem sprejování roztoku kofeinu, sledování homogenity nanesené vrstvy přímo v laserové ablacii pomocí CCD kamery a také testovacích analýz pomocí r-DUV-LAESCI-MS, kde byla posuzována variabilita naměřeného signálu analytu v rámci jedné ablační linie. Tabulka 10 shrnuje parametry sprejování pro jednotlivá rozpouštědla/vzorek.

Tabulka 10 Shrnutí parametrů SunCollect MALDI pro jednotlivá rozpouštědla

Rozpouštědla a vzorek	Průtok [µl/min]	Počet sprejovaných vrstev	Nastavení v ose Z [mm]	Z offset [mm]	Vzdálenost sprejovaných linií [mm]	Rychlost v ose X a Y
ACN+H <sub>2</sub> O 1:9 (v/v)	30	60	25	5	1,2	Vysoká (1 a 1)
MeOH	50	60	50	5	1,2	Vysoká (1 a 1)
IPA	30-50	60	45	5	1,0 nebo 1,2	Vysoká (1 a 1)
n-heptan	50	60	50	5	1,2	Vysoká (1 a 1)
Aceton	75	60	50	5	1,2	Vysoká (1 a 1)
Olivový olej v IPA	20	50	30	5	1,2	Vysoká (1 a 1)

#### **5.2.4. Analýza nasprejovaných povrchů a zpracování naměřených dat**

Homogenně nanesené analyty se po nasprejování na vybrané povrchy nechaly zaschnout při laboratorní teplotě a následně byly vzorky umístěny do ablační komory. Pomocí programu Chromium 2.1 (Photon Machines) byly nastaveny ablační linie v 6 opakováních na každém povrchu. Poté byla spuštěna r-DUV-LAESCI-MS analýza zaměřená na detekci rozdílných intenzit signálů analytu na jednotlivých površích. Nastavení parametrů laserové ablace i hmotnostního spektrometru je uvedeno v kapitole 5.2.6. Naměřená data byla následně korigována na přesnou hmotu a zpracována pomocí softwaru MassLynx V4.1 (SCN851). Rozdělení dat na jednotlivé linie a odečtení pozadí bylo provedeno v softwaru Ilaps [40], který byl speciálně vyvinut pro zpracování LA-ICP-MS dat pro kvalitativní, kvantitativní analýzu a hmotnostně spektrometrické zobrazování. Finální vyhodnocení dat a vytvoření grafů bylo provedeno v excelu.

#### **5.2.5. Hmotnostní zobrazování otisku prstu pro porovnání povrchů**

Na základě vyhodnocení dat z analýzy povrchů bylo provedeno porovnávací hmotnostní zobrazování otisku prstu na rozhraní měděného plátu a referenčního mikroskopického sklíčka, označeného „Ref“. Povrchy byly připraveny obdobně jako v kapitole 5.2.1, akorát byly nachystány větší plochy povrchů (přibližně  $2,5 \times 2,0$  cm). Takto nachystané povrchy byly pomocí oboustranné lepicí pásky nalepeny na podložní mikroskopické sklíčko tak, aby byla minimální mezera mezi nimi, a aby byly na stejné výškové úrovni pro vhodné zaostření laseru v ose z. Následně se naněs otisk prstu doprostřed na rozhraní těchto povrchů tak, aby otisk pokryl oba povrchy. Pro toto hmotnostní zobrazování s rychlostí 1 pixel/s byly nastaveny parametry laserové ablace: velikost spotu 110  $\mu\text{m}$  s rychlostí posuvu vzorku 110  $\mu\text{m/s}$ . Analýza byla simultánně provedena v obou módech ESI+ i APCI+ s dobou skenu 0,485 s (součet doby skenů a doby potřebné pro změnu ionizačních módů ESI a APCI odpovídá 1 s). Naměřená data byla zpracována do 2D map pomocí speciálního softwaru Ilaps, dle postupu uvedeném v práci Papoušková et al. (2025).

### 5.2.6. Nastavení měřících parametrů r-DUV-LAESCI-MS

Detailní optimalizace a nastavení r-DUV-LAESCI-MS proběhlo v rámci článku publikovaném v *Analytical Chemistry* (viz Papoušková et al., 2025). Přehled použitých parametrů pro optimalizaci a analýzu povrchů je shrnut v tabulce 11.

Tabulka 11 Souhrn měřících parametrů r-DUV-LAESCI-MS

Přístroj	Parametr	Údaj/ hodnota
Laserová ablace	typ laseru	UV excimerový (ArF)
	vlnová délka laseru	193 nm
	hustota zářivé energie laseru	1,21 J/cm <sup>2</sup>
	frekvence pulzního laseru	20 Hz
	velikost ablatovaného spotu	135 μm
	rychlost posuvu vzorku	135 μm/s
	průtok He ablační komorou	0,65 l/min
Organický hmotnostní spektrometr	hmotnostní rozsah	50-1200 <i>m/z</i>
	doba skenu	0,485 s
	pauza mezi skeny	0,015 s
	teplota iontového zdroje	120 °C
	tlak zmlžovače	2250 Torr (3 bar)
	průtok desolvatačního plynu	300 l/h
	desolvatační teplota	400 °C
	napětí na kapiláře v módu ESI+	3,8 kV
	napětí na kapiláře v módu ESI-	-2,2 kV
	napětí na výbojové jehle v módu APCI+	3,5 kV
	napětí na výbojové jehle v módu APCI-	-3,5 kV
	„sheath liquid“	MeOH + voda 1:1 ( <i>v/v</i> )
	průtok „sheath liquid“	5 μl/min

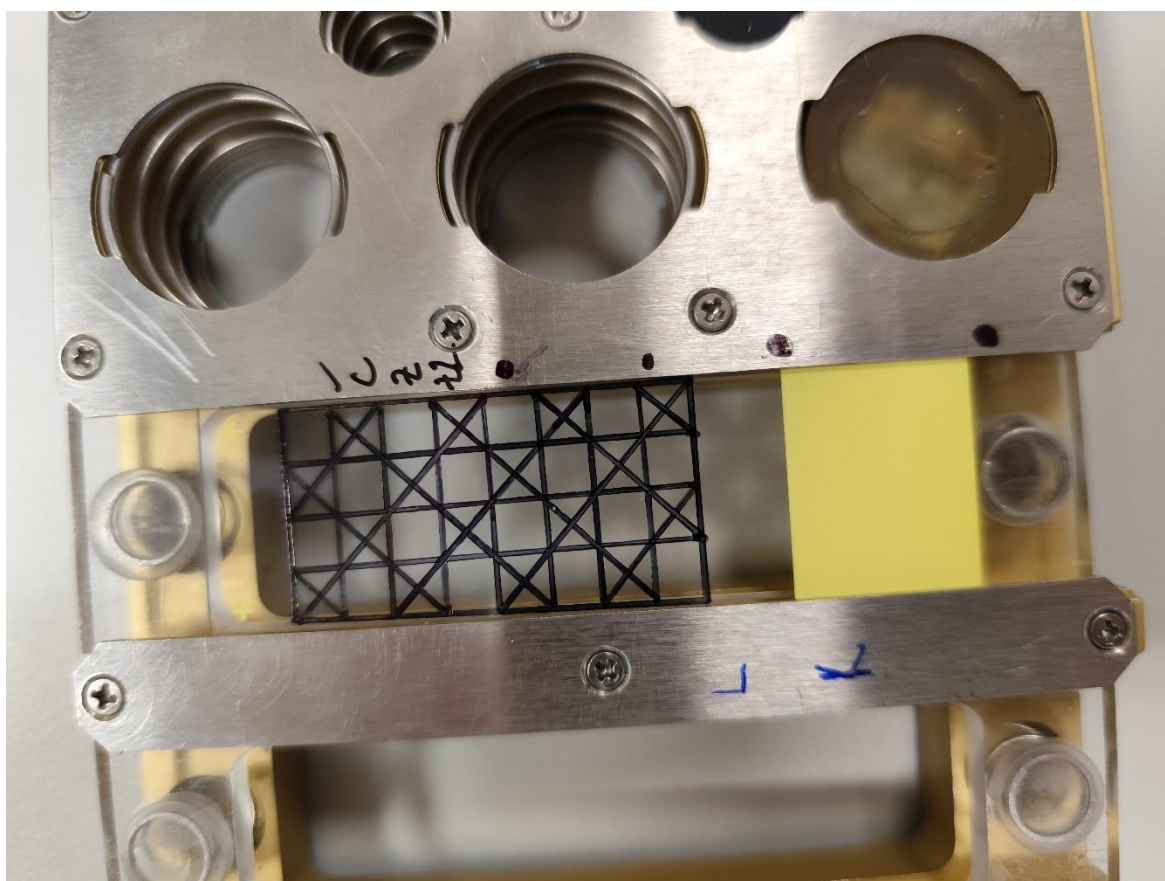
### 5.3. Optimalizace parametrů LA a MS pro účely hmotnostně spektrometrického zobrazování s vysokou rychlostí posuvu vzorku

V rámci hmotnostně spektrometrického zobrazování bylo provedeno několik experimentů se záměrem testování omezení r-DUV-LAESCI-MSI a také její optimalizace/synchronizace sběru dat. Základem úspěšného hmotnostního zobrazování bylo synchronizovat frekvenci laserových pulzů s frekvencí detekce jednotlivých hmotnostních spekter, tak aby nedoházelo k ovlivnění kvality získávaných 2D map (obrázků). Optimalizovanými parametry byly velikost spotu, rychlost posuvu vzorku, frekvence laseru pro LA a nastavení vhodné doby skenu včetně fixní pauzy mezi skeny (15 ms) pro hmotnostní spektrometr. Pokud bylo hmotnostní zobrazování měřeno současně v obou ionizačních módech ESI i APCI, tak se počet skenů dělil mezi oba módy a celkový počet pixelů pro každý ze získaných obrázků byl poloviční.

Hmotnostně spektrometrické zobrazování pomocí r-DUV-LAESCI bylo již provedeno v rámci článku (Papoušková et al., 2025) s rychlostí 1 pixel/s a nastavenou velikostí spotu 110, 50 a 25  $\mu\text{m}$  při zobrazování otisků prstů a 3  $\mu\text{m}$  pro analýzu kapky kofeinu. V této diplomové práci bylo testováno 4x a 5x rychlejší zobrazování otisků prstů s rychlostí posuvu vzorku 440 a 550  $\mu\text{m/s}$  při nastavené velikosti spotu 110  $\mu\text{m}$  (nastavení doby skenu s ohledem na rychlost ablace vzorku). Z následného vyhodnocení v podobě 2D map byly zjištěny potíže, v podobě znatelného a nepravidelného posuvu pixelů v jednotlivých liniích obrázků. Z tohoto důvodu bylo nutné provést optimalizaci v ESI+ módu s nastavenou frekvencí laserů 20 Hz, jejíž testované parametry jsou uvedeny v tabulce 12. Tato optimalizace byla provedena postupným zobrazováním černých křížků, o rozměrech přibližně  $0,5 \times 0,5$  cm, narýsovaných černou fixou na mikroskopickém sklíčku (viz Obrázek 11). Dále bylo provedeno srovnání dvou verzí softwaru MassLynx V4.1 (SCN851) a V4.2 (SCN1049) (Waters Corporation, UK), kdy novější verze umožnila export dat (závislost intenzity pro danou hodnotu  $m/z$  na čase) s hodnotami časové osy na 5 desetinných míst oproti 3 desetinným místům ze starší verze MassLynx V4.1 (SCN851). Toto vyhodnocení bylo provedeno pro obrázky měřené s rychlostí 4 pixely/s v již zmíněné optimalizaci. V případě posledního testu bylo přistoupeno k synchronizaci obou přístrojů z pohledu nastavení vhodné doby skenu tak, aby odpovídala celočíselnému násobku a nedocházelo tak během exportu k nutnosti zaokrouhlení dat pro jednotlivé pixely. Toto nastavení hmotnostního spektrometru odpovídalo ablaci 5 pixelů za 1,5 s s nastavenou velikostí spotu 135  $\mu\text{m}$ , rychlostí posuvu vzorku 450  $\mu\text{m/s}$  a dobou skenu 0,285 s.

Tabulka 12 Parametry optimalizace vysokorychlostního zobrazování

Označení experimentu	Rychlost zobrazování [pixel/s]	Velikost ablatovaného spotu [ $\mu\text{m}$ ]	Rychlost pohybu vzorku [ $\mu\text{m/s}$ ]	Doba skenu [s]	Číslo obrázku
A	1	135	135	0,985	16
B	1	65	65	0,985	18
C	1	40	40	0,985	20
D	4	135	540	0,235	17
E	4	65	260	0,235	19
F	4	40	160	0,235	21

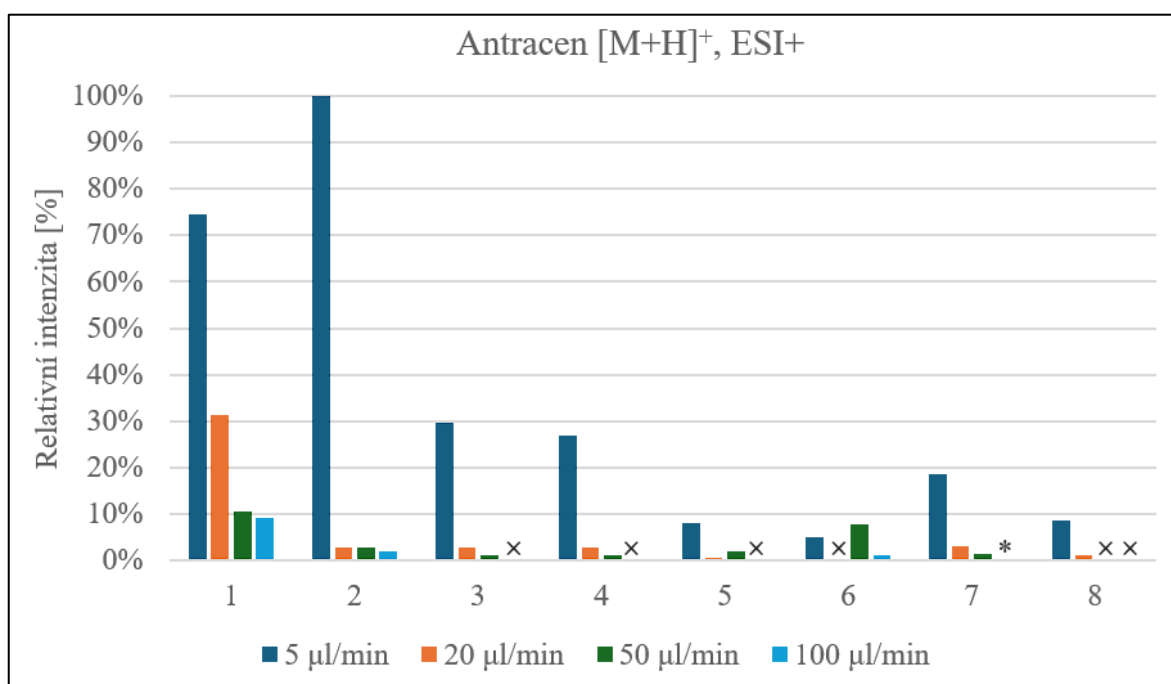


Obrázek 11 Narýsovaný motiv na mikroskopickém sklíčku v ablační cele

## 6. Výsledky a diskuse

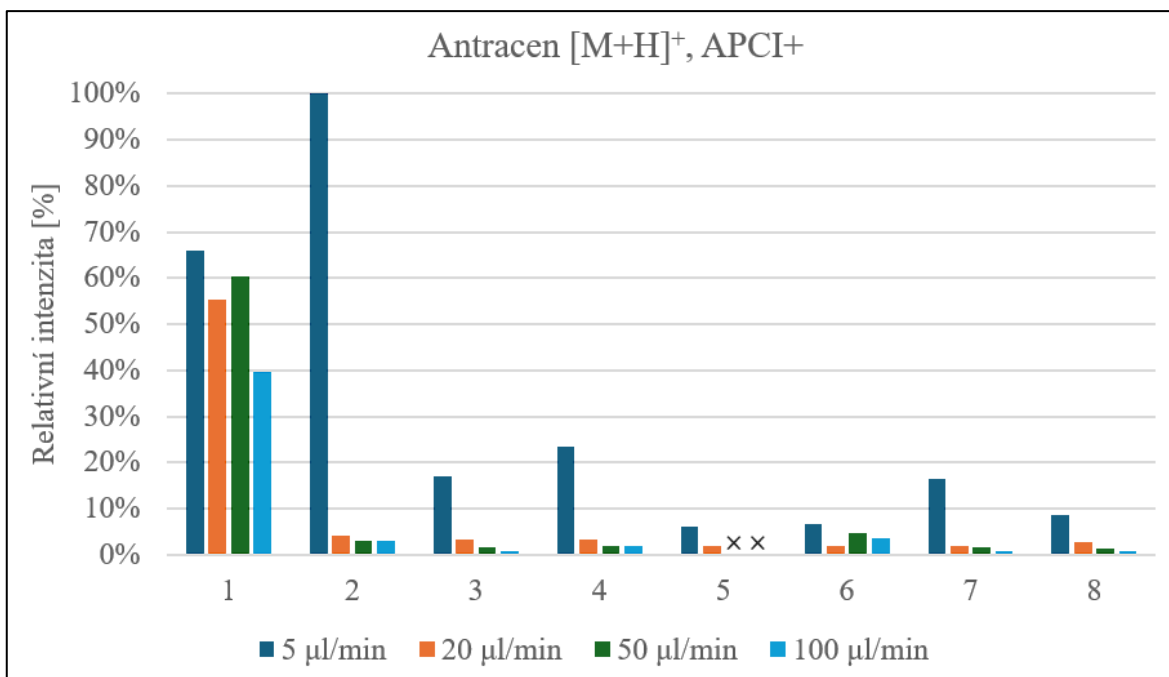
### 6.1. Vyhodnocení optimalizace průtoku a typu „sheath liquid“

Data byla naměřena a vyhodnocena pro antracen a kofein. Testované peptidy: myoglobin, albumin a angiotensin a polymer: PEG (4000) nebyly detekovány při daných podmínkách. Data byla naměřena a vyhodnocena v obou módech ESI+ i APCI+. Pro obě látky byly vyhodnoceny intenzity signálu pro molekulové ionty  $[M+H]^+$  a pro antracen i kation radikál  $[M^{\bullet+}]$ . Naměřená data byla zpracována do grafů 1–6 a také do tabulky (viz kapitola S.1) v příloze 1. Grafy vyjadřují relativní porovnání naměřených intenzit signálu antracenu a kofeinu pro jednotlivé sprejovací kapaliny („sheath liquid“, SL) při testovaných průtocích. Relativní poměr byl dopočítán podělením všech naměřených intenzit maximální naměřenou intenzitou pro daný ion v daném módu.



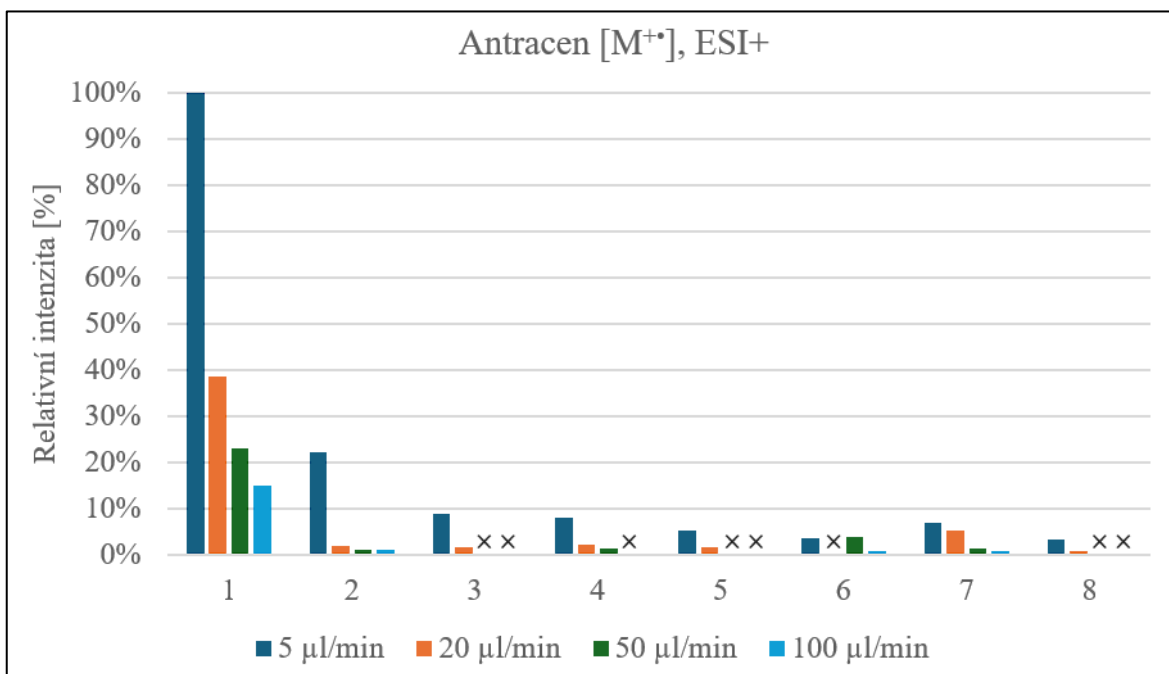
(Pozn.: „x“ - látka nebyla detekována, „\*“ - látka byla naměřena pod 0,5 %)

Graf 1 Relativní vyhodnocení optimalizace průtoku a testování SL pro  $[M+H]^+$  antracenu v ESI+ módu, SL: 1-ACN+H<sub>2</sub>O; 2-MeOH+H<sub>2</sub>O; 3-IPA+H<sub>2</sub>O; 4-ACN+MeOH+IPA+H<sub>2</sub>O; 5-ACN+H<sub>2</sub>O+0,1% FA; 6-MeOH+H<sub>2</sub>O+0,1% FA; 7-IPA+H<sub>2</sub>O+0,1% FA; 8-ACN+MeOH+IPA+H<sub>2</sub>O+0,1% FA



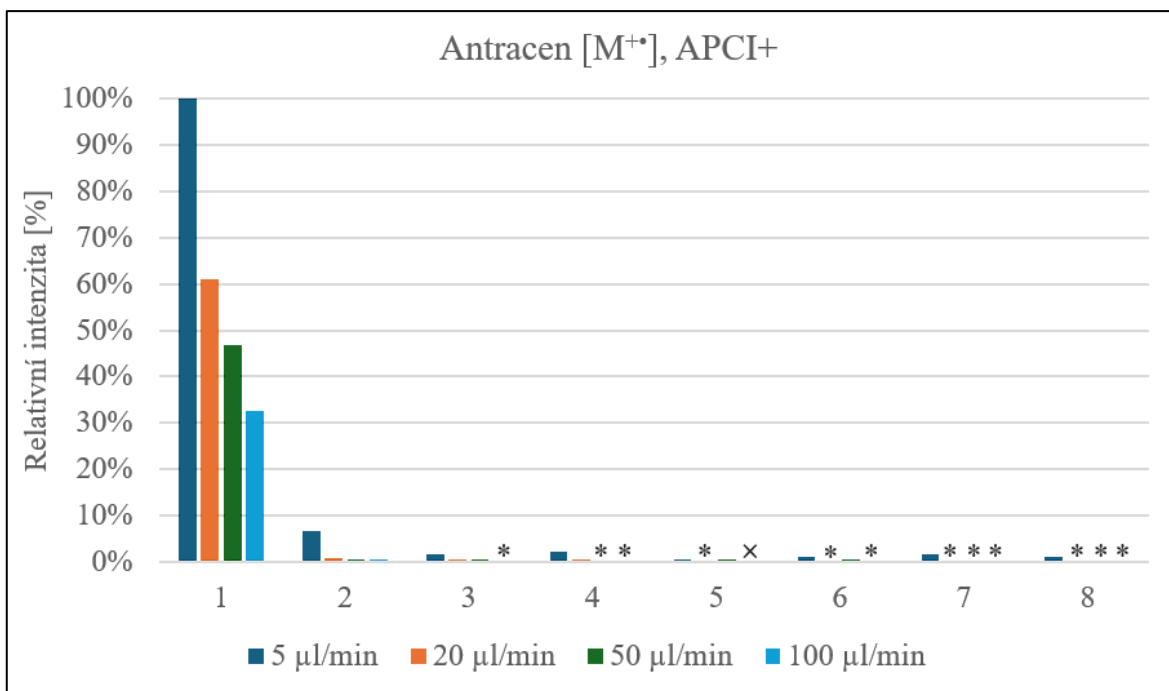
(Pozn.: „, ×“ - látka nebyla detekována)

**Graf 2** Relativní vyhodnocení optimalizace průtoku a testování SL pro [M+H]<sup>+</sup> antracenu v APCI+ módu, SL: 1-ACN+H<sub>2</sub>O; 2-MeOH+H<sub>2</sub>O; 3-IPA+H<sub>2</sub>O; 4-ACN+MeOH+IPA+H<sub>2</sub>O; 5-ACN+H<sub>2</sub>O+0,1% FA; 6-MeOH+H<sub>2</sub>O+0,1% FA; 7-IPA+H<sub>2</sub>O+0,1% FA; 8-ACN+MeOH+IPA+H<sub>2</sub>O+0,1% FA



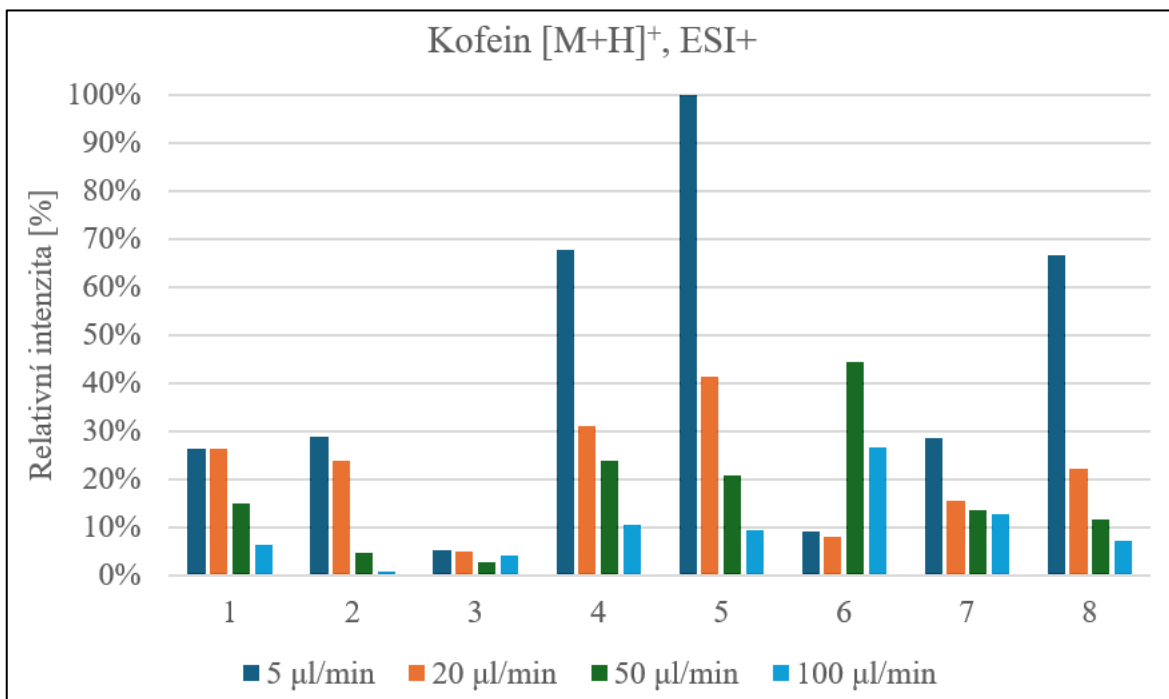
(Pozn.: „, ×“ - látka nebyla detekována)

**Graf 3** Relativní vyhodnocení optimalizace průtoku a testování SL pro [M<sup>++</sup>] antracenu v ESI+ módu, SL: 1-ACN+H<sub>2</sub>O; 2-MeOH+H<sub>2</sub>O; 3-IPA+H<sub>2</sub>O; 4-ACN+MeOH+IPA+H<sub>2</sub>O; 5-ACN+H<sub>2</sub>O+0,1% FA; 6-MeOH+H<sub>2</sub>O+0,1% FA; 7-IPA+H<sub>2</sub>O+0,1% FA; 8-ACN+MeOH+IPA+H<sub>2</sub>O+0,1% FA

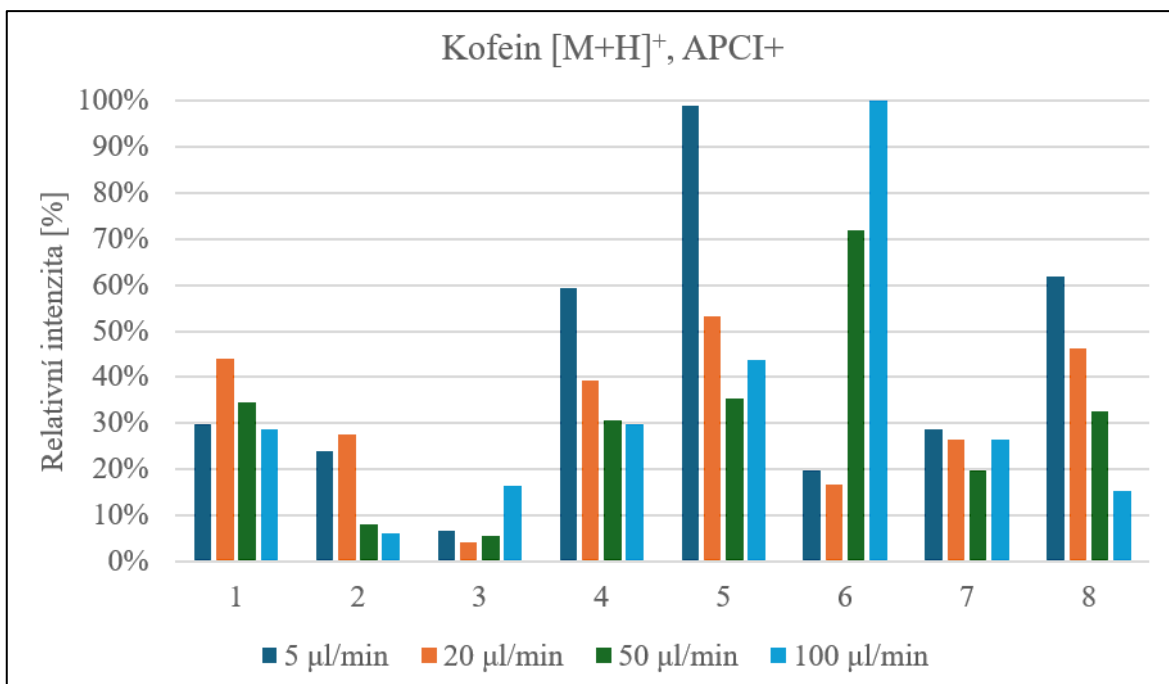


(Pozn.: „×“ - látka nebyla detekována, „\*“ - látka byla naměřena pod 0,5 %)

**Graf 4** Relativní vyhodnocení optimalizace průtoku a testování SL pro [M<sup>+</sup>] antracenu v APCI+ módu, SL: 1-ACN+H<sub>2</sub>O; 2-MeOH+H<sub>2</sub>O; 3-IPA+H<sub>2</sub>O; 4-ACN+MeOH+IPA+H<sub>2</sub>O; 5-ACN+H<sub>2</sub>O+0,1% FA; 6-MeOH+H<sub>2</sub>O+0,1% FA; 7-IPA+H<sub>2</sub>O+0,1% FA; 8-ACN+MeOH+IPA+H<sub>2</sub>O+0,1% FA



**Graf 5** Relativní vyhodnocení optimalizace průtoku a testování SL pro [M+H]<sup>+</sup> kofeinu v ESI+ módu, SL: 1-ACN+H<sub>2</sub>O; 2-MeOH+H<sub>2</sub>O; 3-IPA+H<sub>2</sub>O; 4-ACN+MeOH+IPA+H<sub>2</sub>O; 5-ACN+H<sub>2</sub>O+0,1% FA; 6-MeOH+H<sub>2</sub>O+0,1% FA; 7-IPA+H<sub>2</sub>O+0,1% FA; 8-ACN+MeOH+IPA+H<sub>2</sub>O+0,1% FA



Graf 6 Relativní vyhodnocení optimalizace průtoku a testování SL pro [M+H]<sup>+</sup> kofeinu v APCI+ módu, SL: 1-ACN+H<sub>2</sub>O; 2-MeOH+H<sub>2</sub>O; 3-IPA+H<sub>2</sub>O; 4-ACN+MeOH+IPA+H<sub>2</sub>O; 5-ACN+H<sub>2</sub>O+0,1% FA; 6-MeOH+H<sub>2</sub>O+0,1% FA; 7-IPA+H<sub>2</sub>O+0,1% FA; 8-ACN+MeOH+IPA+H<sub>2</sub>O+0,1% FA

### 6.1.1. Závěr a diskuse optimalizace průtoku a typu „sheath liquid“

V rámci analýzy antracenu byla naměřena nejvyšší intenzita signálu pro nejmenší průtok 5 µl/min v obou módech s výjimkou směsi č. 6 v ESI+ módu. Velice častý byl trend poklesu signálu s rostoucím průtokem. Nejvyšší naměřená intenzita signálu pro [M+H]<sup>+</sup> byla naměřena v obou módech pro směs č. 2 (MeOH+H<sub>2</sub>O 1:1 (v/v)) při průtoku 5 µl/min. [M+H]<sup>+</sup> antracenu nebyl detekován v ESI+ módu při průtoku 100 µl/min ve směsích č. 3, 4, 5 a 8, při průtoku 50 µl/min pro směs č. 8, při průtoku 20 µl/min pro směs č. 6 a také v APCI+ módu při průtocích 50 a 100 µl/min pro směs č. 5. Odlišný výsledek byl pozorován pro [M<sup>++</sup>], kdy největší naměřené intenzity signálu byly naměřeny pro směs č. 1 (ACN+H<sub>2</sub>O 1:1 (v/v)). Všechny ostatní naměřené intenzity signálu, s výjimkou ESI+ módu při průtoku 5 µl/min pro směs č. 2, byly pod 10 % maximální intenzity. [M<sup>++</sup>] antracenu nebyl detekován v ESI+ módu při průtoku 100 µl/min pro směsi č. 3, 4, 5 a 8, při průtoku 50 µl/min pro směsi č. 3, 5 a 8, při průtoku 20 µl/min pro směs č. 6 a také v APCI+ módu při průtoku 100 µl/min pro směs č. 5.

Při vyhodnocení naměřených dat kofeinu byly výsledky o něco vyrovnanější a méně jednoznačné. Nejvyšší naměřené intenzity signálu byly naměřeny při použití směsi č. 5 (ACN+H<sub>2</sub>O 1:1 (v/v) + 0,1% FA) v obou módech při průtoku 5 μl/min a také pro směs č. 6 (MeOH+H<sub>2</sub>O 1:1 (v/v) + 0,1% FA) v APCI+ módu při průtoku 100 μl/min. Podobně jako u antracenu je zde možné pozorovat částečný trend poklesu signálu s rostoucím průtokem především v ESI+ módu a opět lze konstatovat, že průměrně nejvyšší intenzity signálu byly naměřeny s nejnižším průtokem 5 μl/min. Oproti antracenu byl kofein detekován ve všech případech při daných podmínkách.

Závěrem lze konstatovat, že průměrně větší intenzity signálů byly naměřeny pro kofein (polární látka) v ESI+ módu, a naopak pro antracen (nepolární látka) v APCI+ módu (viz Tabulka S1). Pro analýzu antracenu i kofeinu byly vhodnější nižší průtoky, konkrétně 5 μl/min. Zároveň u většiny případů bylo možné pozorovat trend poklesu signálu s rostoucím průtokem. Nejvhodnější směsí pro detekci [M+H]<sup>+</sup> antracenu byla směs č. 2 (MeOH+H<sub>2</sub>O 1:1 (v/v)) a pro [M]<sup>+</sup> antracenu byla méně polární směs č. 1 (ACN+H<sub>2</sub>O 1:1 (v/v)). U kofeinu bylo těžší vyvodit jednoznačný závěr, ale jako nejvhodnější směs byla vyhodnocena směs č. 5 (ACN+H<sub>2</sub>O 1:1 (v/v) + 0,1% FA), pro kterou měl kofein velice intenzivní signál v obou módech. Zajímavý byl také trend vzrůstu signálu s rostoucím průtokem při analýze kofeinu pro směs č. 6 v APCI+ módu.

Na základě těchto výsledků a výsledků z experimentů v rámci článku Analytical Chemistry (Papoušková et al., 2025) byly vybrány parametry průtoku 5 μl/min a směs č. 2 (MeOH + H<sub>2</sub>O 1:1 (v/v)) pro studium vlivu povrchů na intenzitu signálu i pro následné hmotnostně spektrometrické zobrazování s vysokou rychlostí.

## 6.2. Vyhodnocení charakterizace povrchů - XRF a MS/MS analýza

Všech 10 povrchů bylo jednotlivě podrobena XRF analýze a naměřené hodnoty obsahů jednotlivých prvků (> 0,5 %) byly zaznamenány do tabulky 13. Dále bylo detekováno a identifikováno 5 charakteristických hodnot  $m/z$ , vyskytujících se u všech sklíček s barevným potahem (viz Tabulka 14). Tyto prekurzorové ionty byly následně podrobena MS/MS analýze za účelem bližší charakterizace/identifikace složek materiálu potahů. MS/MS analýza byla provedena v APCI+ módu na mikroskopickém sklíčku se žlutým potahem s nastavenou kolizní rampou v rozmezí 10-30 eV a naměřené přesné hodnoty  $m/z$  na 4 desetinná místa byly korigovány na standard kofeinu ( $m/z$ : 195,0882). Jednotlivé ionty byly identifikovány pomocí databáze v softwaru MassLynx V4.1. Souhrn identifikovaných fragmentových iontů je popsán v tabulce 15.

Tabulka 13 Naměřené procentuální obsahy prvků v jednotlivých površích pomocí XRF analýzy

Označení povrchů	LP [%]	Si [%]	Al [%]	Ca [%]	Mg [%]	Ti [%]	K [%]	Cu [%]
blank	48,7	39,9	0,6	7,4	3,1	-	-	-
Ž	59,6	22,2	9,4	4,3	0,7	3,5	-	-
R	61,0	21,4	9,5	4,1	-	3,9	-	-
B	63,3	19,5	8,8	3,7	-	4,5	-	-
M	62,2	18,9	10,4	3,3	-	5,0	-	-
Z	62,5	19,5	9,4	3,8	-	4,4	-	-
P	65,0	18,1	9,1	2,6	-	4,9	-	-
ITO	62,4	25,1	1,6	5,8	1,5	-	3,4	-
Ref	50,3	38,1	-	8,2	2,5	-	-	-
Cu	-	-	-	-	-	-	3,0	96,1
SF	64,0	18,9	9,2	2,7	-	4,7	-	-

(Pozn.: „LP“ – lehké prvky, „-“ - bez naměřené hodnoty, „blank“ – průhledné mikroskop. sklíčko)

Tabulka 14 Identifikované prekurzorové ionty pro MS/MS analýzu

Sumární vzorec [M+H] <sup>+</sup>	Přesná hodnota $m/z$	Změřená hodnota $m/z$	Chyba [ppm]	DBE
C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> N	104,0500	104,0502	1,9	5,5
C <sub>13</sub> H <sub>10</sub> N	180,0813	180,0821	4,4	9,5
C <sub>14</sub> H <sub>13</sub> O	197,0966	197,0969	1,5	8,5
C <sub>14</sub> H <sub>13</sub> O <sub>2</sub>	213,0916	213,0923	3,3	8,5
C <sub>15</sub> H <sub>13</sub> O <sub>2</sub>	225,0916	225,0926	4,4	9,5

(Pozn.: „DBE“ – „double bonds equivalent“)

Tabulka 15 Souhrn fragmentových iontů (FI) v rámci MS/MS analýzy

Sumární vzorec prekurzorového [M+H] <sup>+</sup>	Sumární vzorec FI	Typ FI	Přesná hodnota m/z	Změřená hodnota m/z	Chyba [ppm]	DBE pro FI
C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> N	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	77,0391	77,0400	11,7	4,5
C <sub>13</sub> H <sub>10</sub> N	C <sub>12</sub> H <sub>9</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	153,0704	153,0717	8,5	8,5
	C <sub>12</sub> H <sub>8</sub>	[M <sup>+</sup> ]	152,0626	152,0620	-3,9	9,0
	C <sub>10</sub> H <sub>7</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	127,0548	127,0548	0,0	7,5
	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	77,0391	77,0375	-20,8	4,5
C <sub>14</sub> H <sub>13</sub> O	C <sub>13</sub> H <sub>10</sub> O	[M <sup>+</sup> ]	182,0732	182,0731	-0,5	9,0
	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub>	[M <sup>+</sup> ]	178,0783	178,0785	1,1	10,0
	C <sub>12</sub> H <sub>10</sub>	[M <sup>+</sup> ]	154,0783	154,0789	3,9	8,0
	C <sub>11</sub> H <sub>9</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	141,0704	141,0724	14,2	7,5
	C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> O	[M+H] <sup>+</sup>	119,0497	119,0484	-10,9	5,5
	C <sub>8</sub> H <sub>7</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	103,0548	103,0557	8,7	5,5
	C <sub>7</sub> H <sub>7</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	91,0548	91,0554	6,6	4,5
	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	77,0391	77,0396	6,5	4,5
C <sub>14</sub> H <sub>13</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>13</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	[M <sup>+</sup> ]	198,0681	198,0687	3,0	9,0
	C <sub>13</sub> H <sub>11</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	167,0861	167,0868	4,2	8,5
	C <sub>13</sub> H <sub>9</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	165,0704	165,0728	14,5	9,5
	C <sub>12</sub> H <sub>8</sub>	[M <sup>+</sup> ]	152,0626	152,0635	5,9	9,0
	C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> O	[M+H] <sup>+</sup>	119,0497	119,0513	13,4	5,5
	C <sub>7</sub> H <sub>7</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	91,0548	91,0557	9,9	4,5
	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	77,0391	77,0383	-10,4	4,5
C <sub>15</sub> H <sub>13</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub>	[M <sup>+</sup> ]	178,0783	178,0785	1,1	10,0
	C <sub>9</sub> H <sub>7</sub> O	[M+H] <sup>+</sup>	131,0497	131,0502	3,8	6,5
	C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> O	[M+H] <sup>+</sup>	119,0497	119,0490	-5,9	5,5
	C <sub>8</sub> H <sub>7</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	103,0548	103,0546	-1,9	5,5
	C <sub>7</sub> H <sub>7</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	91,0548	91,0548	0,0	4,5
	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	77,0391	77,0391	0,0	4,5
	C <sub>5</sub> H <sub>5</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	65,0391	65,0403	18,5	3,5

(Pozn.: „FI“ – fragmentový ion, „DBE“ – „double bonds equivalent“)

### 6.2.1. Závěr a diskuse charakterizace povrchů - XRF a MS/MS analýza

Z výsledků analýzy pomocí techniky XRF bylo možné vyvodit závěr, že složení mikroskopických sklíček odpovídá složení sodnovápenatých skel s obsahem  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{Na}_2\text{O}$ ,  $\text{CaO}$ ,  $\text{Al}_2\text{O}_3$  a  $\text{MgO}$ . U všech mikroskopických sklíček s potahem byl stanoven Ti s obsahem 3-5 %, který indikoval pravděpodobný obsah titanové běloby ( $\text{TiO}_2$ ). Dále v rámci různých barevných potahů mikroskopických sklíček bohužel nebyly stanoveny žádné další charakteristické prvky, které by více přiblížily jejich anorganické složení. Zvláštní také byla absence obsahů prvků In a Sn při analýze ITO sklíčka potaženého tenkou vrstvou z důvodu získání průměrných výsledků pro studovaný povrch. V neposlední řadě byl analyzován kovový plát, který obsahoval z 96,1 % měď.

Dále byla provedena MS/MS analýza 5 vybraných prekurzorových iontů (viz Tabulka 14) charakteristických pro potahy mikroskopických sklíček. Stanovením přesné hodnoty  $m/z$  a jejím vyhodnocením v databázi MassLynx V4.1 byla umožněna jejich identifikace a také identifikace vzniklých fragmentových iontů. Všechny identifikované fragmentové ionty odpovídaly, jak zastoupením jednotlivých prvků, tak hmotnostním schodkem, složení prekurzorových iontů, což potvrdilo jejich správnou identifikaci. Byl identifikován prekurzorový ion  $[\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{N}]^+$ , který naměřenou hodnotou  $m/z$  i sumárním vzorcem odpovídal protonované molekule akridinu, která je součástí akridinových barviv. Jelikož se jednalo o analýzu žlutého povrchu, tak by tento ion mohl fragmentovat z molekuly akridinové žluti ( $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{ClN}_3$ ). Toto tvrzení by se však v ideálním případě muselo potvrdit MS/MS analýzou jejího standardu. Přítomnost akridinu dále podpořilo srovnání s fragmentačním spektrem z databáze PubChem [41] a také identifikace pravděpodobného primárního fragmentu  $[\text{C}_7\text{H}_6\text{N}]^+$ . Dále byly identifikovány 3 ionty aromatických oxoproduktů  $[\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{O}]^+$ ,  $[\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{O}_2]^+$  a  $[\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{O}_2]^+$ , u kterých si lze povšimnout některých shodných fragmentových iontů např.  $[\text{C}_8\text{H}_7\text{O}]^+$ ,  $[\text{C}_7\text{H}_7]^+$  a  $[\text{C}_6\text{H}_5]^+$ . To by mohlo napovídat o jejich vzniku ze stejné či strukturně podobné prekurzorové molekuly/molekul. Pro bližší charakterizaci by bylo nutné provést rozsáhlejší studii a rozbor materiálů povrchů, což se nevešlo do časového rámce této diplomové práce.

### 6.3. Vyhodnocení testování vlivu povrchů na intenzitu signálu analytů

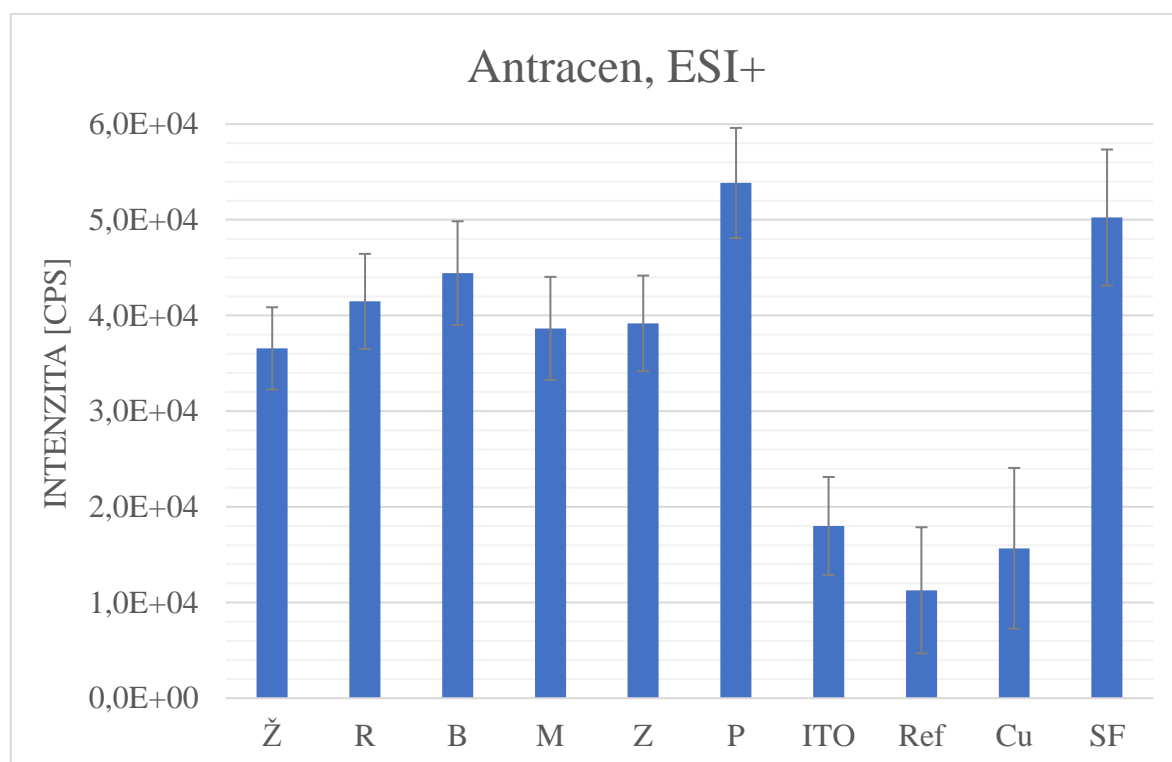
Bylo proměřeno všech 11 analytů a vzorek olivového oleje na vybraných 10 površích v obou ionizačních módech. Data byla naměřena pro všechny látky kromě naftalenu a fiefedronu, které nebyly detekovány. Naftalen nebyl detekován kvůli špatné ionizační účinnosti. Fiefedron nebyl detekován především kvůli degradaci zásobního roztoku, protože byl delší dobu rozpuštěn a skladován při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Všechny látky byly měřeny jen v kladném módu, s výjimkou kyseliny palmitové, která byla změřena i v záporném módu. Grafy znázorňují závislosti průměrné intenzity signálu, kdy chybovými úsečkami jsou hodnoty výběrových odhadů směrodatné odchylky ( $n=6$ ).

Pro všechny látky byly vyhodnoceny především nejintenzivnější píky, jak molekulových iontů, tak případných aduktů a fragmentů. Pokud daná látka měla více intenzivních píků (přibližně nad 10 % relativní intenzity), tak výsledný graf byl vytvořen jejich součtem a chybové úsečky byly dopočítány ze zákona šíření nejistot. U některých látek byly vyhodnoceny pouze  $[\text{M}+\text{H}]^+$  ionty, jelikož netvořily žádné charakteristické fragmenty ani adukty např.: kofein ( $m/z$ : 195,0882) a skvalen ( $m/z$ : 411,3991). U některých látek bylo vyhodnoceno více iontů např.: antracen  $[\text{M}+\text{H}]^+$  ( $m/z$ : 179,0861) +  $[\text{M}^+]$  ( $m/z$ : 178,0783); PEG (600)  $[\text{M}+\text{H}]^+$  ( $m/z$ : 371,2279+415,2534+459,2816) a  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  ( $m/z$ : 393,2102+437,2369+481,2708); kathinon  $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$  ( $m/z$ : 132,0813) a  $[\text{M}-2\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$  ( $m/z$ : 117,0636); methedron  $[\text{M}+\text{H}]^+$  ( $m/z$ : 194,1181) a  $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$  ( $m/z$ : 176,1075); kyselina palmitová v kladném módu  $[\text{M}+\text{H}]^+$  ( $m/z$ : 257,2481),  $[\text{M}+\text{CH}_2+\text{H}]^+$  ( $m/z$ : 271,2637) a  $[\text{M}-\text{CH}_2+\text{H}]^+$  ( $m/z$ : 243,2324); kyselina palmitová v záporném módu  $[\text{M}-\text{H}]^-$  ( $m/z$ : 255,2324) a  $[\text{M}+2\text{CH}_2-\text{H}]^-$  ( $m/z$ : 283,2637); cholesterol  $[\text{M}+\text{H}]^+$  ( $m/z$ : 387,3627) a  $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$  ( $m/z$ : 369,3521); stearyl stearát  $[\text{M}+\text{H}]^+$  ( $m/z$ : 537,5611) a  $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$  ( $m/z$ : 554,5876) a navíc v ESI+ módu  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  ( $m/z$ : 559,5430). Dále v olivovém oleji: kyselina olejová  $[\text{M}+\text{H}]^+$  ( $m/z$ : 283,2637) a její fragmenty  $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$  ( $m/z$ : 265,2531) a  $[\text{M}-2\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$  ( $m/z$ : 247,2426); kyselina palmitová  $[\text{M}+\text{H}]^+$  ( $m/z$ : 257,2481) a  $[\text{M}+\text{CH}_2+\text{H}]^+$  ( $m/z$ : 271,2637). A u diacylglycerolů byl vyhodnocen jeden charakteristický ion:  $[\text{PO}-\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$  ( $m/z$ : 577,5220);  $[\text{OO}-\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$  ( $m/z$ : 603,5369) a  $[\text{M}+\text{H}]^+$  triacylglycerolu konkrétně trielaidinu  $[\text{OOO}+\text{H}]^+$  ( $m/z$ : 885,7911). Příkladné vyhodnocení pro antracen je uvedeno v tabulce 16 a grafu 7 v ESI+ módu a v tabulce 17 a grafu 8 v APCI+ módu.

Tabulka 16 Výsledky analýzy antracenu v ESI+ módu

Označení povrchu	Průměrná intenzita [cps]	Výběrový odhad směrodatné odchylky [cps]	SNR	Normalizovaná intenzita [%]
Ž	3,66E+04	4,31E+03	7,7	68
R	4,15E+04	4,97E+03	7,5	77
B	4,44E+04	5,42E+03	7,6	82
M	3,87E+04	5,38E+03	6,4	72
Z	3,92E+04	5,00E+03	6,5	73
P	5,39E+04	5,75E+03	7,2	100
ITO	1,80E+04	5,13E+03	10,2	33
Ref	1,13E+04	6,59E+03	10,1	21
Cu	1,57E+04	8,40E+03	12,1	29
SF	5,02E+04	7,11E+03	7,0	93

(Pozn.: „cps“ – počet dopadu iontů za sekundu; SNR – poměr signálu k šumu (signal to noise ratio), SNR: <3 – nedetekováno; 3-10 detekováno a nestanoveno; >10 – stanoveno)

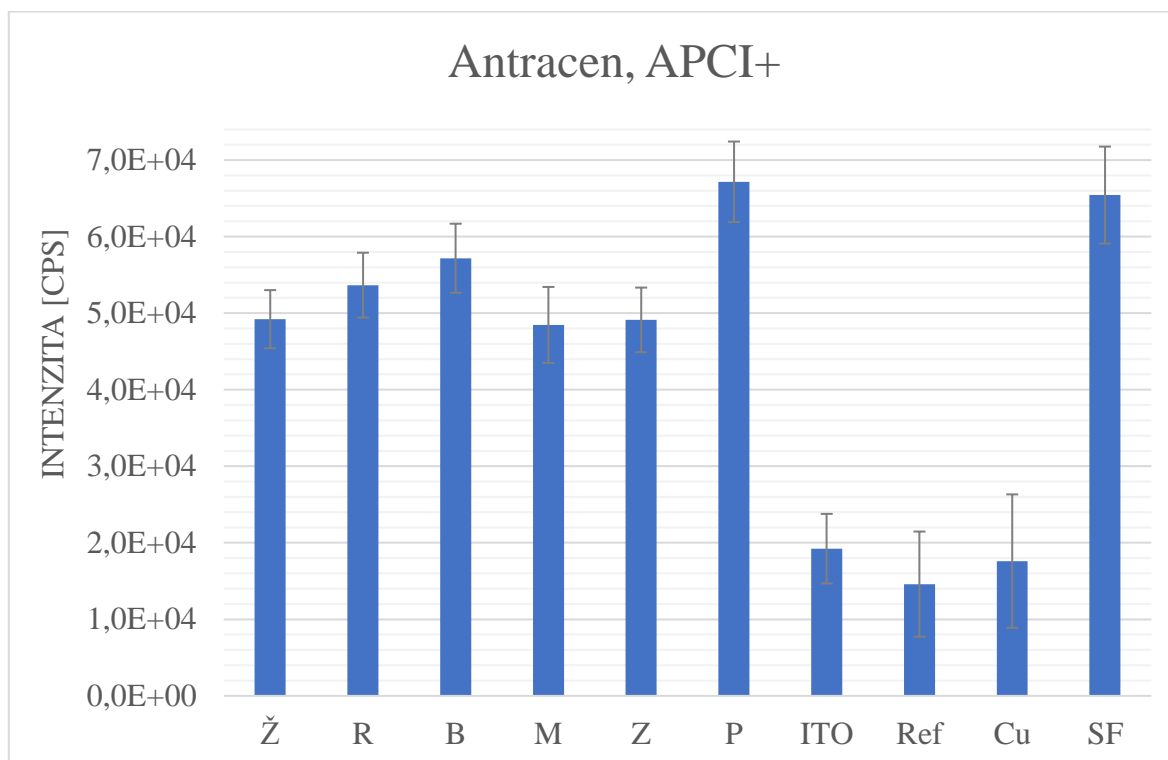


Graf 7 Výsledky analýzy povrchů pro antracen v ESI+ módu

Tabulka 17 Výsledky analýzy antracenu v APCI+ módu

Označení povrchu	Průměrná intenzita [cps]	Výběrový odhad směrodatné odchylky [cps]	SNR	Normalizovaná intenzita [%]
Ž	4,92E+04	3,80E+03	9,2	73
R	5,37E+04	4,24E+03	9,0	80
B	5,72E+04	4,51E+03	9,3	85
M	4,85E+04	4,96E+03	7,5	72
Z	4,91E+04	4,22E+03	7,7	73
P	6,72E+04	5,26E+03	8,4	100
ITO	1,92E+04	4,54E+03	9,8	29
Ref	1,46E+04	6,87E+03	11,8	22
Cu	1,76E+04	8,71E+03	12,7	26
SF	6,54E+04	6,34E+03	9,2	97

(Pozn.: „cps“ – počet dopadu iontů za sekundu; SNR – poměr signálu k šumu (signal to noise ratio), SNR: <3 – nedetkováno; 3-10 detkováno a nestanoveno; >10 – stanoveno)



Graf 8 Výsledky analýzy povrchů pro antracen v APCI+ módu

Vyhodnocení ostatních analytů v podobě obdobných tabulek a grafů je kvůli svojí rozsáhlosti uvedeno v kapitole S.2 v příloze 1. Jejich hromadné vyhodnocení bylo provedeno v tabulkách 18 a 19. Tabulky 18 a 19 zahrnují vybraný nejvhodnější povrch, na kterém byla nejvyšší hodnota poměru signálu k šumu (SNR), naměřenou absolutní intenzitu a také normalizovanou intenzitu v %. Pro dopočítání hodnot SNR bylo proměřeno všech 10 tentokrát čistých povrchů, ze který se obdobně vyhodnotila absolutní intenzita (šum) pro jednotlivé analyty. Touto absolutní intenzitou (šumu) byly poděleny absolutní intenzity signálu analytů vyhodnocených v rámci analýzy sprejovaných povrchů, čímž byly získány hodnoty SNR pro všechny analyty analyzovány bez přítomnosti matrice. Normalizovaná intenzita analytu byla získána pro každý studovaný povrch dělením průměrné intenzity nejvyšší zaznamenanou průměrnou intenzitou daného analytu získanou pro daný soubor testovaných povrchů.

Tabulka 18 Vyhodnocení testování vlivu povrchů na intenzitu signálu analytů bez přítomnosti matrice

		ESI mód				APCI mód			
Analyt	Mód	Označení nejvhodnějšího povrchu	Průměrná intenzita na vybraném povrchu [cps]	SNR	Normalizovaná intenzita [%]	Označení nejvhodnějšího povrchu	Průměrná intenzita na vybraném povrchu [cps]	SNR	Normalizovaná intenzita [%]
antracen	+	Cu	1,57E+04	12,1	29	Cu	1,76E+04	12,7	26
naftalen	+	×	×	×	×	×	×	×	×
kofein	+	Cu	1,60E+05	183,6	88	Cu	1,87E+05	233,1	100
PEG (600)	+	Cu	3,21E+04	163,7	100	Cu	2,91E+04	940,9	100
kathinon	+	Cu	3,56E+03	10,5	100	Cu	4,65E+03	15,8	100
methedron	+	Cu	1,03E+04	25,2	100	Cu	2,20E+04	40,7	100
flefedron	+	×	×	×	×	×	×	×	×
kyselina palmitová	+	Cu	1,40E+05	35,3	100	Cu	4,25E+05	86,1	100
kyselina palmitová	-	Cu	8,36E+04	11,2	100	Cu	2,38E+05	15,6	100
skvalen	+	ITO	1,11E+04	123,3	100	ITO	1,96E+04	621	100
cholesterol	+	Cu	7,41E+03	95,4	100	Cu	2,04E+04	211,7	100
stearyl stearát	+	B	1,51E+04	99,4	67	P	2,01E+04	226	100

(Pozn.: „+“ – kladný mód; „-“ – záporný mód; „×“ – nebylo detekováno; „cps“ – počet dopadu iontů za sekundu)

Tabulka 19 Vyhodnocení testování vlivu povrchů na intenzitu signálu analytů ve vzorku olivového oleje

		ESI mód			APCI mód		
Analyt	Mód	Označení nejvhodnějšího povrchu	Průměrná intenzita na vybraném povrchu [cps]	Normalizovaná intenzita [%]	Označení nejvhodnějšího povrchu	Průměrná intenzita na vybraném povrchu [cps]	Normalizovaná intenzita [%]
kyselina olejová	+	Z	2,65E+05	81	Z	3,10E+05	72
kyselina palmitová	+	Z	8,02E+04	78	Z	1,22E+05	72
DAG ( <i>m/z</i> : 577,5220)	+	SF	1,83E+04	100	SF	1,17E+04	100
DAG ( <i>m/z</i> : 603,5369)	+	SF	2,13E+04	100	SF	1,31E+04	100
TAG ( <i>m/z</i> : 885,7911)	+	SF	3,28E+03	100	SF	2,24E+03	100

(Pozn.: „+“ – kladný mód, „DAG“ – diacylglycerol, „TAG“ – triacylglycerol, „cps“ – počet dopadu iontů za sekundu)

### **6.3.1. Závěr a diskuse testování vlivu povrchů na intenzitu signálu analytů**

V rámci analýzy povrchů byla vyhodnocena data pro všech 9 detekovaných analytů analyzovaných bez přítomnosti matrice a také pro 5 analytů ve vzorku olivového oleje (viz Tabulka 18 a 19). Všechny tyto analyty byly analyzovány v obou módech ESI+ i APCI+ a kyselina palmitová navíc ještě v záporném módu, tedy ESI- a APCI-. Vybrané povrchy měly různý vliv na naměřené intenzity signálu studovaných látek, což bylo následně potvrzeno dopočítáním poměru signálu k šumu (SNR) u všech látek analyzovaných bez přítomnosti matrice. Z dopočítaného parametru SNR bylo vyhodnoceno, že antracen, kofein, PEG (600), skvalen, cholesterol a stearyl stearát byly detekovány na všech površích v obou módech APCI+ i ESI+. Kyselina palmitová byla detekována na všech površích v APCI+ módu a v ESI+ módu byla detekována jen na sklíčkách s bílým potahem (Epredia a Prosolia), ITO sklíčku a měděném plátu. V záporném módu byla detekována na bílých sklíčkách (Epredia a Prosolia) a měděném plátu v obou módech ESI- , APCI- a v ESI- módu ještě navíc na ITO sklíčku. Dále byly analyzovány psychoaktivní látky: katinon byl detekován v obou módech ESI+ i APCI+ na ITO sklíčku, referenčním sklíčku a měděném plátu a methedron jen na měděném plátu v ESI+ módu a na ITO sklíčku, referenčním sklíčku a měděném plátu v APCI+ módu (viz kapitola S.2 v příloze 1). V rámci vyhodnocení byly povrchy rozděleny na 4 charakteristické skupiny/typy podle poskytovaného signálu, konkrétně mikroskopická sklíčka s potahem, měděný plát, ITO sklíčko a referenční sklíčko (Marienfeld).

První skupinu tvořila mikroskopická sklíčka s potahem, u kterých byl pozorován dvojitý trend. Při analýze látek: kofeinu, methedronu, katinonu, skvalenu, antracenu i analytů v olivovém oleji byly naměřené intenzity signálu na mikroskopických sklíčkách s potahem vždy v rámci jedné látky srovnatelné. Tento trend však neplatil pro látky stearyl stearát, cholesterol, kyselinu palmitovou v kladném a záporném módu a PEG (600), kdy byl pozorován nárůst intenzity signálu u sklíček s bílým potahem (sklíček Epredia a Prosolia) oproti sklíčkům s barevným potahem. Tento pozorovaný rozdíl v signálu byl buď, méně významný u stearyl stearátu, kde byl nárůst intenzity přibližně dvojnásobný až trojnásobný nebo také velice významný např. u PEG (600), kde se jednalo o přibližně 24x větší intenzitu signálu v APCI+ módu oproti sklíčkům s barevným potahem. Těmto rozdílům přibližně odpovídaly i dopočítané parametry SNR. U sklíček s barevným potahem (Ž, R, Z a M) se dále potvrdilo, že barva sklíčka měla minimální vliv na intenzitu signálu a intenzity signálu

i hodnoty SNR byly v rámci analýzy jedné látky víceméně srovnatelné. Dále se prokázalo, že přítomnost potahů také ovlivňuje intenzitu signálu. Zvýšením intenzity signálu se projeví všechny potahy sklíček při analýze antracenu (v rozmezí 3,2x-4,8x), methedronu (v rozmezí 1,7-2,5x) a nárůstem intenzity signálu jen u sklíček s bílým potahem (Epredia a Prosolia) u kyseliny palmitové v kladném módu (v rozmezí 5,5x-8,5x) a stearyl stearátu (v rozmezí 1,5x-2x) oproti referenčnímu sklíčku. Tyto nárůsty intenzity byly však spojeny s nárůstem pozadí u antracenu a methedronu, kdy po dopočítání SNR byl zřejmý dokonce opačný trend, resp. pokles intenzity signálu oproti referenčnímu povrchu. Snížením signálu se projeví potahy u látek PEG (600) (v rozmezí 2x-3x pro sklíčka s bílým potahem (Epredia a Prosolia) a až 20x pro sklíčka s barevným potahem (Epredia) a pro skvalen také snížením intenzity signálu (v rozmezí 2x-4x) oproti referenčnímu sklíčku. Tyto poklesy byly opět potvrzeny po dopočítání SNR. U látek kofein a katinon byly naměřené intenzity signálu na sklíčkách s potahem víceméně v souladu s referenčním sklíčkem. Nicméně po dopočítání SNR bylo zřejmé, že došlo k poklesu signálu oproti referenci, a to se projevilo u obou látek.

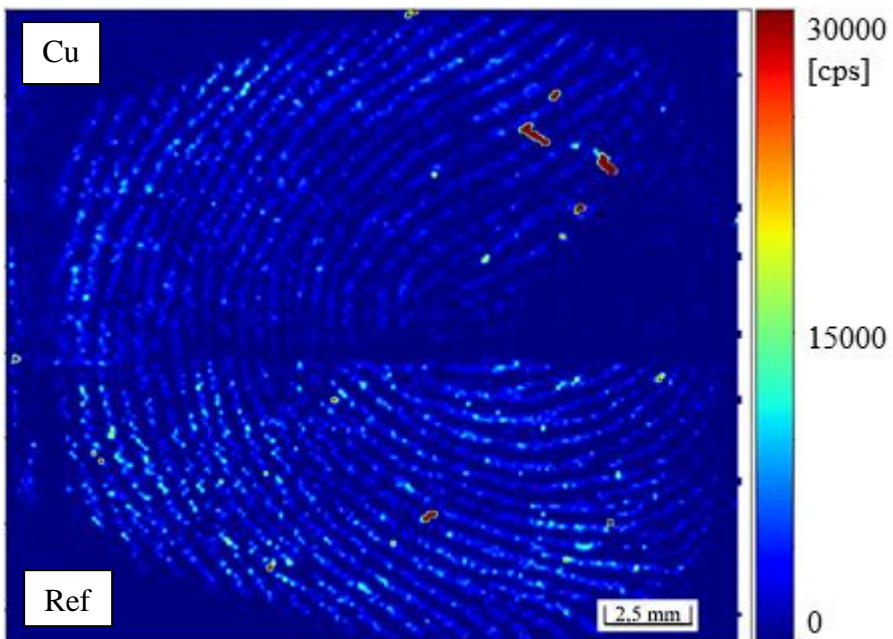
Dalším typem povrchu byl měděný plát, který po dopočítání SNR byl vyhodnocen jako nejvhodnější povrch u všech látek s výjimkou skvalenu, stearyl stearátu a také analytů analyzovaných v přítomnosti matrice. Největší nárůst intenzity signálu byl naměřen u kyseliny palmitové v kladném módu, jejíž intenzita byla přibližně 28x větší oproti referenčnímu sklíčku v obou módech ESI+ i APCI+. Dopčítané hodnoty SNR tento nárůst potvrdily, avšak byl přibližně poloviční. Tento rozdíl v intenzitách nebyl pozorován pro kyselinu palmitovou v olivovém oleji, avšak bez možnosti dopočítání SNR, by se o nárůstu signálu pouze spekulovalo. Dalším a posledním typem bylo ITO sklíčko, které bylo vyhodnoceno jako nejvhodnější povrch pro skvalen. Pro většinu látek však poskytovalo průměrnou až podprůměrnou intenzitu signálu s výraznou variabilitou, a proto by se dalo považovat za méně vhodné pro tuto aplikaci.

Všechny látky byly měřeny v obou módech ESI i APCI, mezi nimiž byl znatelný rozdíl v naměřených intenzitách signálu pro polární a nepolární látky. ESI mód poskytoval větší intenzity signálu pro polární látky například pro polymer PEG (600) (nárůst signálu minimálně o 10 % na všech površích). Naopak intenzivnější signály pro nepolární látky poskytoval APCI mód, např. pro kyselinu palmitovou v kladném módu byl nárůst signálu v rozmezí 2-5,2x v porovnání s ESI módem či pro skvalen byl nárůst signálu pro všechny povrchy v rozmezí 1,1-2,5x oproti ESI módu.

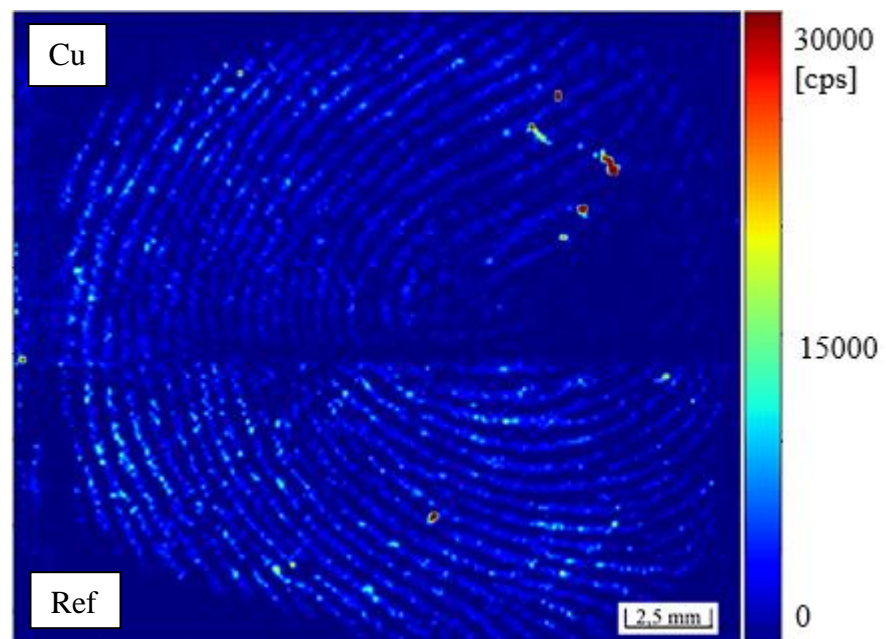
Co se týče analýzy olivového oleje, tak u všech pěti analytů byly naměřené intenzity signálu v rámci srovnávání povrchů mezi sebou dosti vyrovnané. Zajímavé bylo porovnání naměřených intenzit v ESI+ a APCI+ módech. Pro kyselinu olejovou a kyselinu palmitovou byl pozorován nárůst signálu v APCI+ módu přibližně o 10-75 % oproti ESI+ módu. U ostatních analytů DAG [PO-H<sub>2</sub>O+H]<sup>+</sup> (*m/z*: 577,5220), DAG [OO-H<sub>2</sub>O+H]<sup>+</sup> (*m/z*: 603,5369) a TAG [OOO+H]<sup>+</sup> (*m/z*: 885,7911) byl pozorován opačný trend, a to nárůstu signálu v rozmezí 11-107 % v ESI+ módu oproti APCI+ módu. Zároveň byly zaznamenány dosti výrazné odchylky měření olivového oleje na ITO sklíčku a měděném plátu. Tyto odchylky na měděném plátu pravděpodobně souvisí s nerovností povrchu a v důsledku toho došlo k nerovnoměrnému rozvrstvení olivového oleje při sprejování. ITO sklíčko vykazovalo velkou variabilitu signálu u většiny látek.

#### **6.4. Vyhodnocení a diskuse hmotnostního zobrazování otisku prstu pro porovnání povrchů**

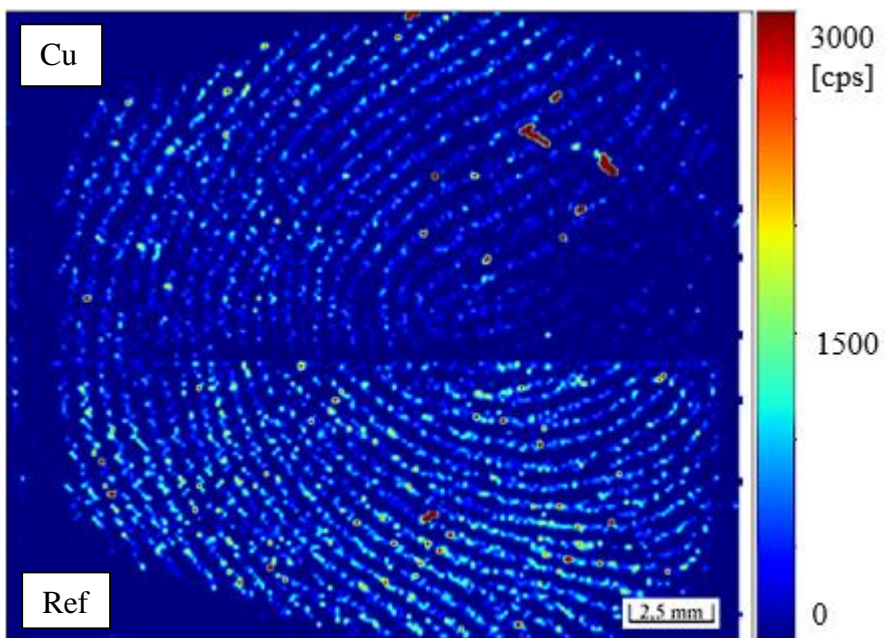
V rámci tohoto experimentu bylo provedeno hmotnostní zobrazování otisku prstu na rozhraní dvou povrchů měděného plátu a referenčního mikroskopického sklíčka. Detekovány byly všechny konstituenty kožního mazu (např. kyselina palmitová, skvalen, cholesterol, vosky, DAG, TAG atd.), ale pro názornost byly vybrány jen ionty s hodnotami *m/z*: 257,2559 + 271,2693 pro kyselinu palmitovou a *m/z*: 411,3629 pro skvalen. Z naměřených dat byly pro obě látky vyhodnoceny 2D mapy (obrázky) prostorové distribuce vybraných analytů v obou módech ESI+ i APCI+ (viz Obrázek 12-15). Na těchto obrázcích je patrné zachování informací o průběhu papilárních linií, a tedy i kompletní profil otisku prstu. Nicméně oproti analýze modelových vzorků dopadly výsledky víceméně obráceně, než bylo očekáváno. Byla pozorována vyšší intenzita signálu na referenčním sklíčku oproti měděnému plátu. Vliv na tento výsledek mohla mít z části přítomnost matrice v lidském mazu nebo také nerovnoměrné nanesení otisku prstu, což mohlo být zaviněno různými fyzikálními vlastnostmi povrchu. Další možností je rozdíl v přípravě vzorků, kdy zde se jednalo o pouhé nanesení otisku přitlačením prstu na povrch, kdežto v rámci testování povrchů se jednalo o vytvoření homogenní vrstvy v podobě sprejování v několika vrstvách. Objasnění dosaženého výsledku bude předmětem dalších experimentů.



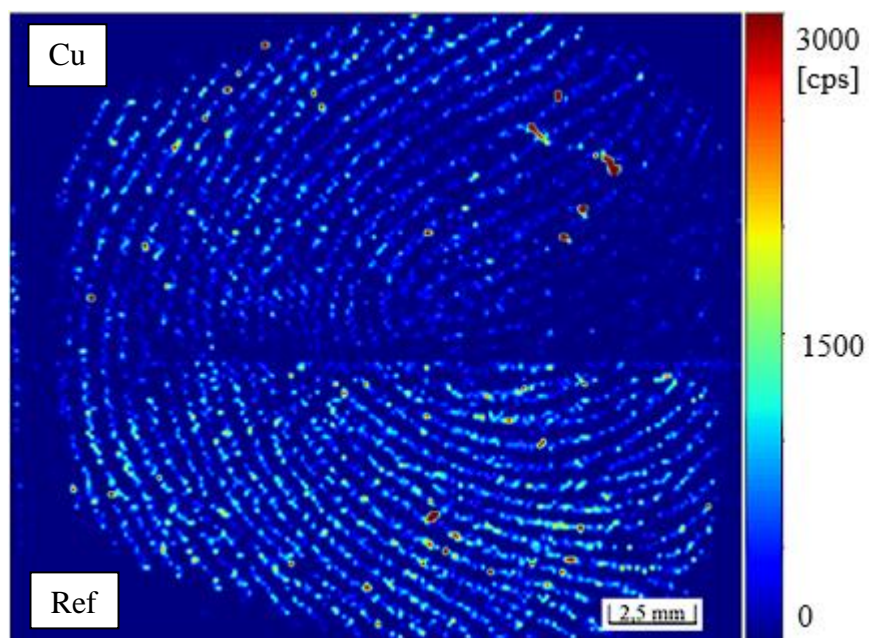
Obrázek 12 Kyselina palmitová v APCI+ módu



Obrázek 13 Kyselina palmitová v ESI+ módu



Obrázek 14 Skvalen v APCI+ módu



Obrázek 15 Skvalen v ESI+ módu

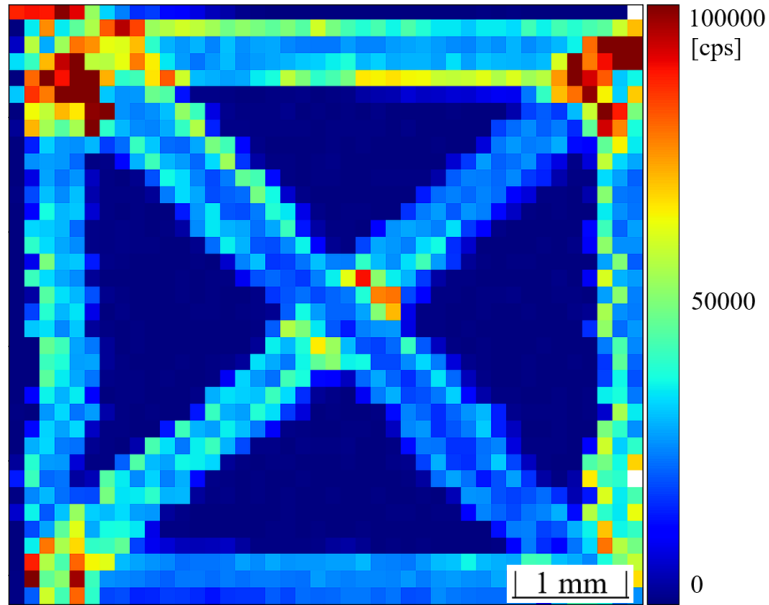
## 6.5. Vyhodnocení a diskuse optimalizace hmotnostně spektrometrického zobrazování s vysokou rychlostí

Prvotní experimenty byly zaměřeny na srovnání hmotnostního zobrazování s rychlostí zobrazování 1 pixel/s a 4 pixely/s s nastavenou velikostí spotu 135, 65 a 40  $\mu\text{m}$  (viz Obrázek 16-21). U obou typů zobrazování bylo možné sledovat, že se snižující se velikostí ablačního spotu se výrazně zlepšuje kvalita obrázků, resp. jejich prostorové rozlišení. Nejvyšší prostorové rozlišení a kvalitu zobrazení bylo možné pozorovat na obrázku 20, na němž jsou rozeznatelné i jednotlivé vrstvy nanesené fixy z opakovaných tahů při rýsování daného motivu. Nicméně při prvním pohledu na obrázky ze zobrazování s rychlejším posuvem vzorku (4 pixely/s) byl patrný náhodný posun jednotlivých pixelů analyzovaných linií (viz Obrázek 17, 19 a 21). V důsledku těchto posunů byla řešena dvě potenciální úskalí spojená se zpracováním dat.

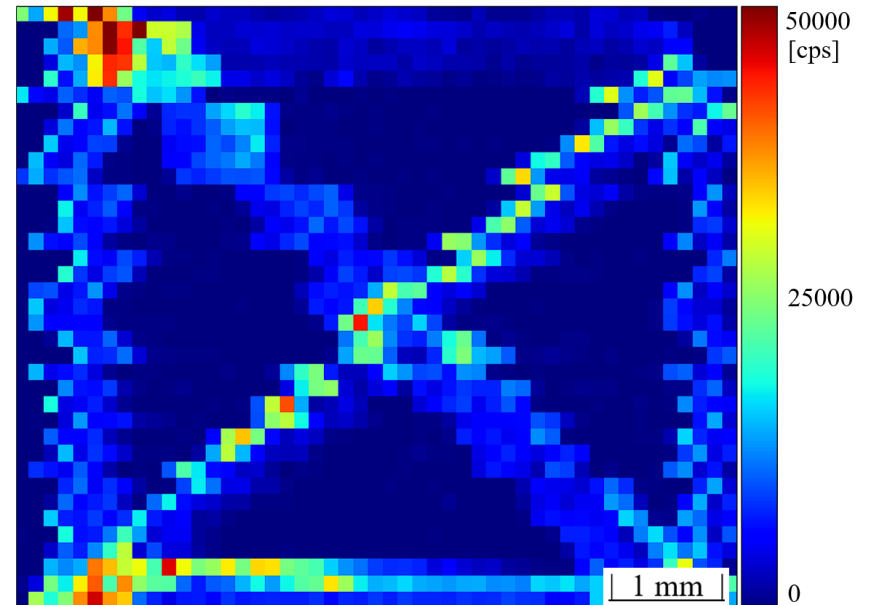
Prvním možným problémem byla existence nepravidelných odchylek ( $\pm 0,001$  min) v hodnotách času (pozice pixelu) vyexportovaných MS dat. Pokusem o nápravu tohoto problému bylo vyzkoušení novější verze softwaru MassLynx V4.2 (SCN1049). Tato verze softwaru umožnila export dat s vyšším počtem desetinných míst (5 desetinných míst) vedoucí k potlačení úskalí způsobeného zaokrouhlováním hodnot času, respektive pixelu pouze na 3 desetinná místa (60 ms). Z tohoto důvodu byla naměřená data zpracována v obou verzích softwaru pro jejich srovnání. Ze získaných obrázků (viz Obrázek 22-25) bylo však patrné, že nová verze softwaru problém nevyřešila a vzniklé obrázky se, v rámci posunu jednotlivých linií, moc nelišily od obrázků z původní verze softwaru.

Druhým možným problémem bylo zaokrouhlování doby skenu přímo během analýzy na přístroji Synapt G2-S, a to zejména v případech, kdy jsou použity doby skenu v sekundách, které neposkytují definované číslo po převodu na minuty. Např. při hmotnostním zobrazování s rychlostí 4 pixely/s by doba skenu bez započítané pauzy mezi skeny byla 0,250 s, tedy  $0,0041\bar{6}$  min. Z této hodnoty bylo zřejmé, že při opakovaných skenech a exportu dat, resp. hodnot časové osy na 3 desetinná místa, že Synapt musel tyto hodnoty zaokrouhlovat. V důsledku toho byl finální experiment založen na definování vhodné doby skenu a zpětném dopočítání měřicích parametrů laserové ablace. Byla zvolena doba skenu 0,005 min, tedy 0,3 s, která byla vynásobena zvoleným počtem pixelů (5). Tímto byla stanovena rychlost zobrazování 5 pixelů/1,5 s. Dále byla zvolena velikost ablačního spotu 135  $\mu\text{m}$  a vynásobením této hodnoty počtem pixelů byla získána dráha, kterou ablační

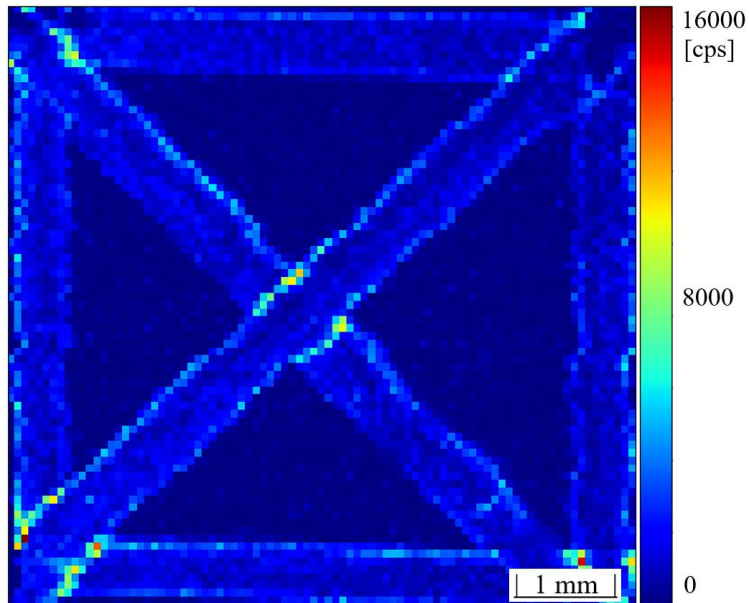
komora urazí za 1,5 vteřiny. Výsledná rychlost pohybu ablační komory ( $450 \mu\text{m/s}$ ) byla následně dopočítána jednoduchým podělením dráhy ( $675 \mu\text{m}$ ) časem ( $1,5 \text{ s}$ ). Z vyhodnocených dat (viz Obrázek 26) bylo však zřejmé, že ani tento postup řešení problém neodstranil.



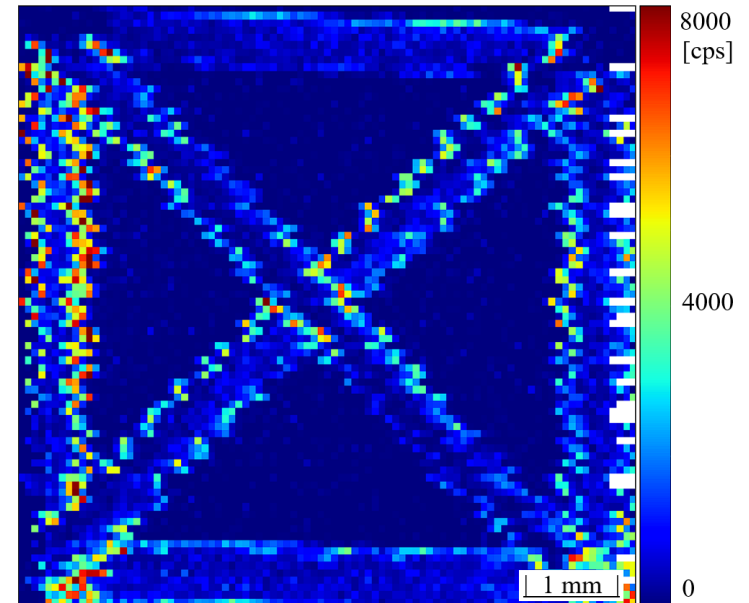
Obrázek 16 MassLynx V4.1, 1 pixel/s, ablační spot 135 μm



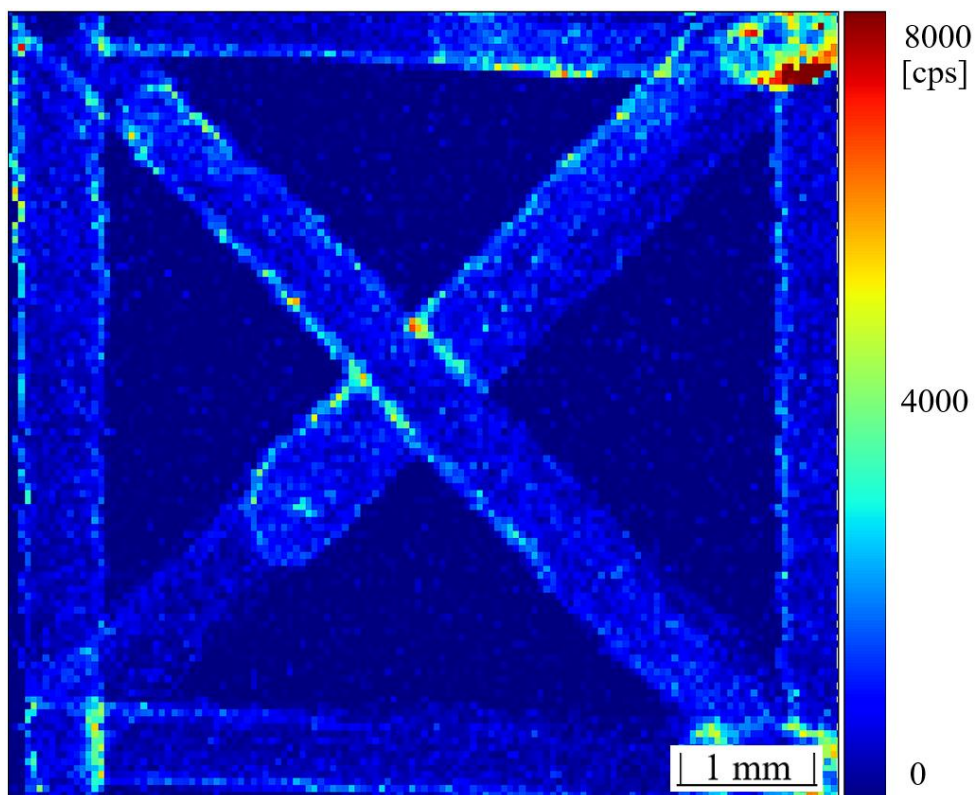
Obrázek 17 MassLynx V4.1, 4 pixely/s, ablační spot 135 μm



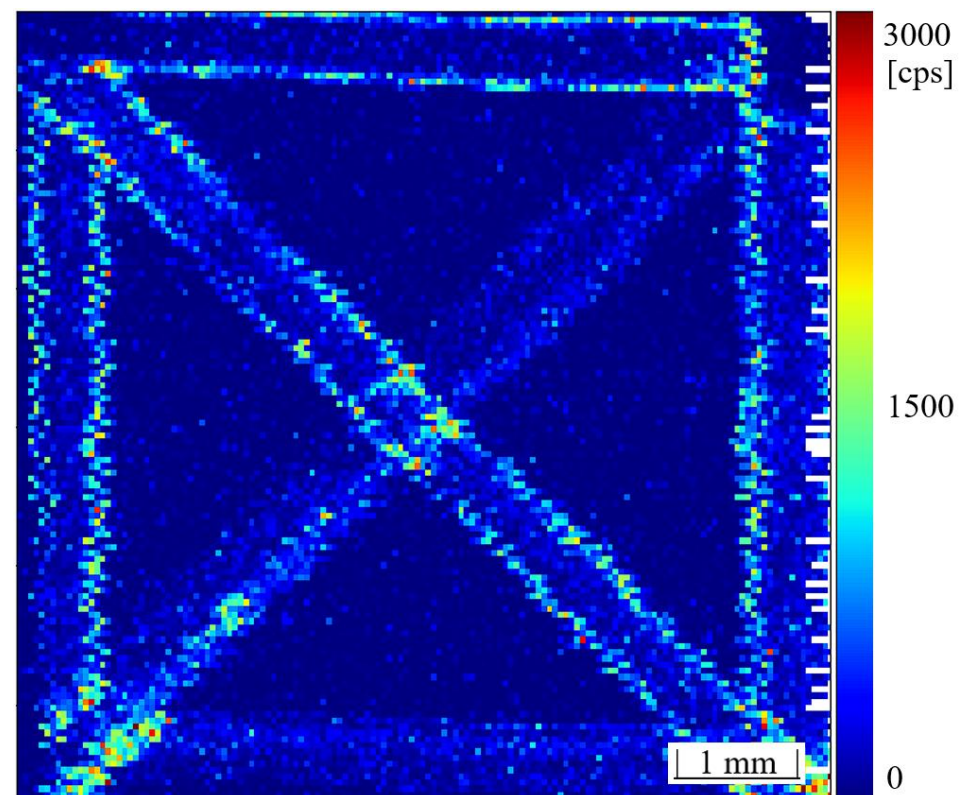
Obrázek 18 MassLynx V4.1, 1 pixel/s, ablační spot 65 μm



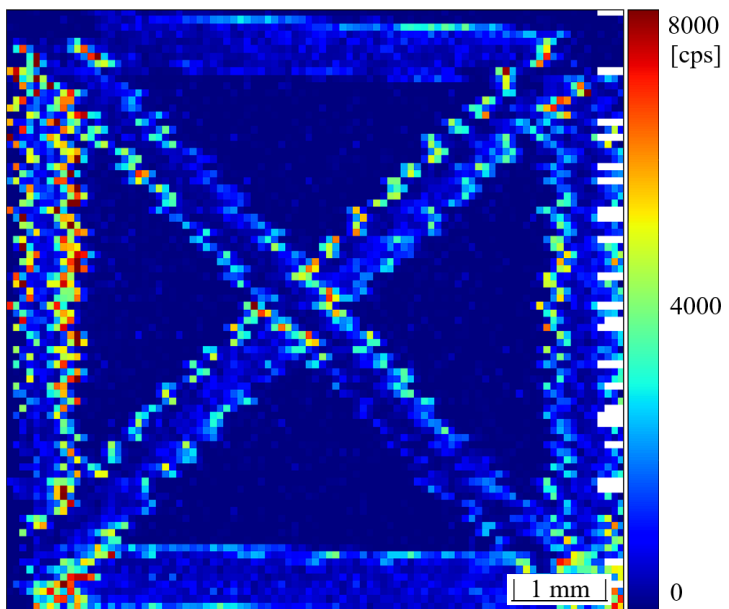
Obrázek 19 MassLynx V4.1, 4 pixely/s, ablační spot 65 μm



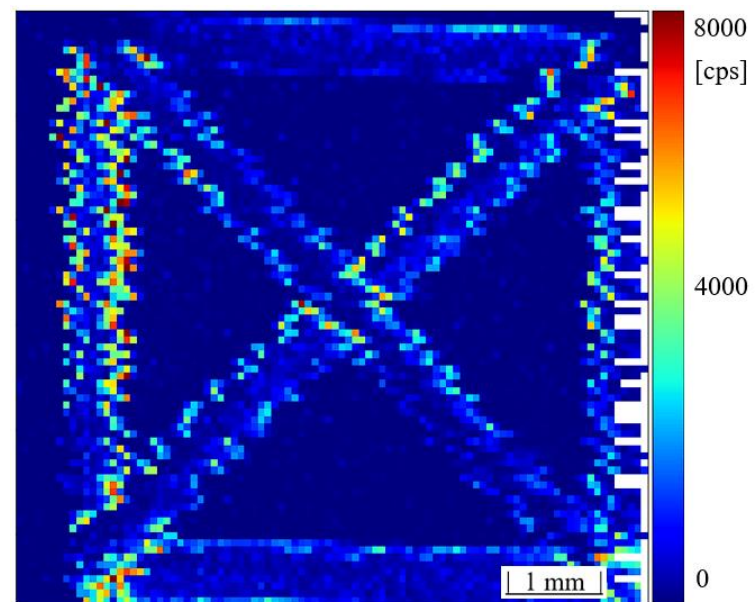
Obrázek 20 MassLynx V4.1, 1 pixel/s, ablační spot  $40\mu\text{m}$



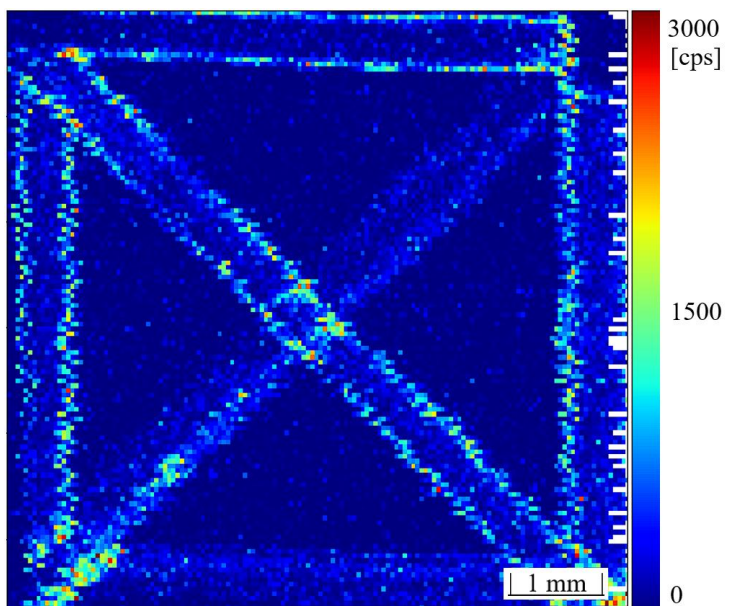
Obrázek 21 MassLynx V4.1, 4 pixely/s, ablační spot  $40\mu\text{m}$



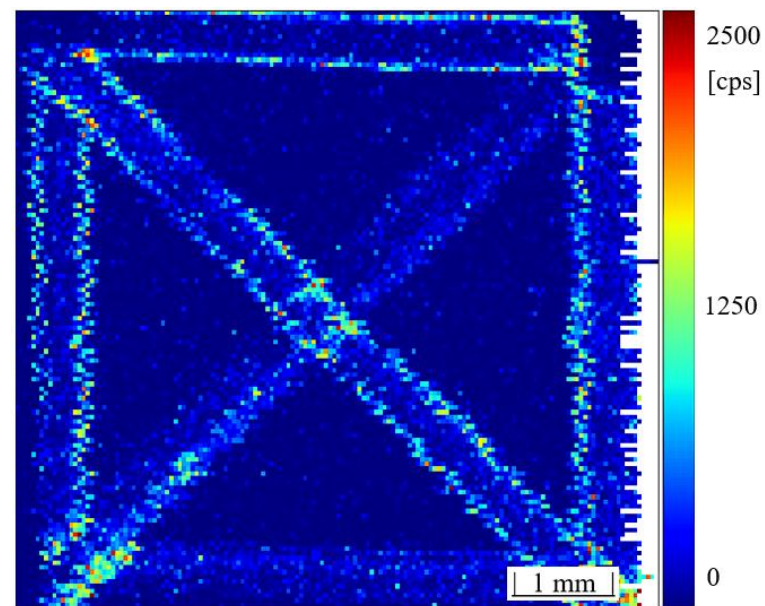
Obrázek 22 MassLynx V4.1, 4 pixely/s, ablační spot 65 $\mu$ m



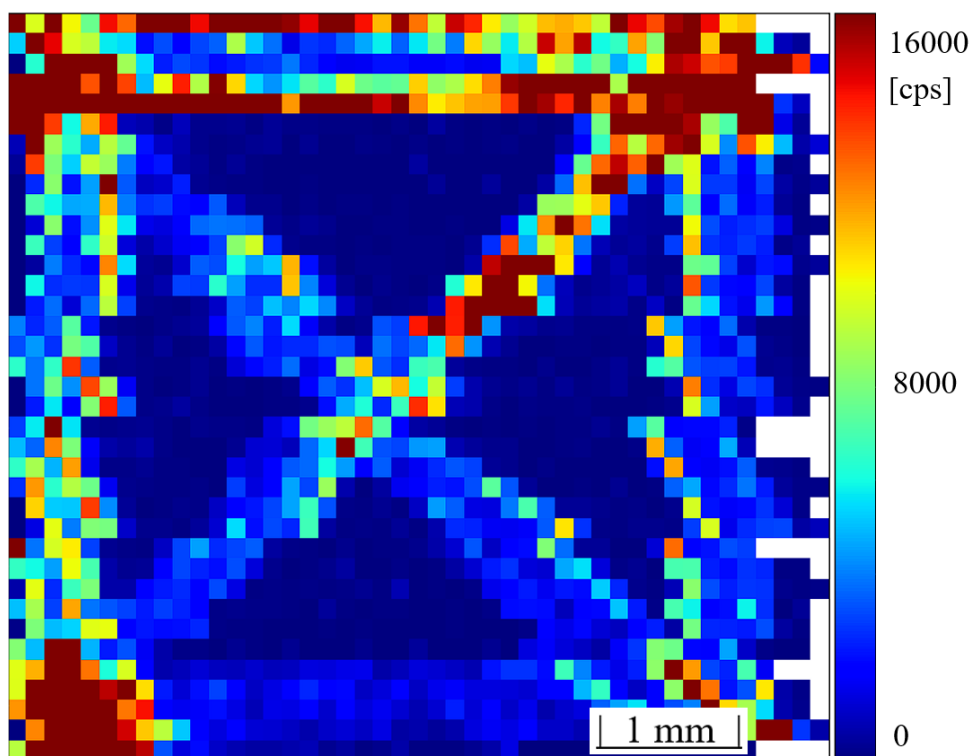
Obrázek 23 MassLynx V4.2, 4 pixely/s, ablační spot 65 $\mu$ m



Obrázek 24 MassLynx V4.1, 4 pixely/s, ablační spot 40 $\mu$ m



Obrázek 25 MassLynx V4.2, 4 pixely/s, ablační spot 40 $\mu$ m



*Obrázek 26 MassLynx V4.2, 5 pixelů/1,5s, ablační spot 135  $\mu$ m*

## 7. Závěrečná diskuse a shrnutí

Tato diplomová práce navázala na článek (Papoušková et al., 2025), který poprvé představil unikátní vlastnosti nové ambientní techniky r-DUV-LAESCI-MS/MSI, včetně její aplikovatelnosti na reálných vzorcích. Tato diplomová práce tento článek rozšiřuje o její optimalizaci se záměrem nalezení vhodných podmínek měření a také zlepšení měřících parametrů. Zároveň se snaží o optimalizaci parametrů laserové ablace a hmotnostního spektrometru pro účely rychlého hmotnostně spektrometrického zobrazování, které by výrazně zkrátilo dobu zobrazování se zachováním stejného rozlišení, respektive umožnilo provést zobrazování s vyšším prostorovým rozlišením za stejný čas.

V rámci optimalizací ionizačních podmínek v podobě testování různých typů sprejovacích kapalin „sheath liquid“ a také jejich průtoku do iontového zdroje, byly vyhodnoceny následující závěry. Pro  $[M^{**}]$  antracenu byla naměřena nejvyšší intenzita signálu při použití směsi ACN + H<sub>2</sub>O 1:1 (v/v), pro  $[M+H]^+$  antracenu směsi MeOH+H<sub>2</sub>O 1:1 (v/v) a pro kofein směsi ACN+H<sub>2</sub>O + 0,1% FA. Co se týče průtoku, tak bezkonkurenčně nejvyšší intenzity signálu poskytoval průtok 5  $\mu$ l/min u obou látek. Dále byly testovány vysokomolekulární látky peptidy (albumin, angiotensin a myoglobin) a polymer (PEG (4000)), které při daných podmínkách nebyly detekovány. Obdobně byly „sheath liquid“ testovány v rámci článku Papoušková et al. (2025) na látkách kofein, butylon, ethyl palmitát a antracen, kde jako nejvhodnější směs byla vyhodnocena směs MeOH + H<sub>2</sub>O 1:1 (v/v), jelikož u ostatních směsí docházelo ke ztrátě signálu pro ethyl palmitát. Tudíž na základě změřených dat v rámci této diplomové práce v kombinaci s naměřenými daty z článku Papoušková et al. (2025) byla vybrána směs MeOH + H<sub>2</sub>O 1:1 (v/v) s průtokem 5  $\mu$ l/min pro další experimenty.

V rámci testování různého vlivu povrchů na intenzitu signálu byl vyhodnocen jako nejvhodnější povrch měděný plát, který po dopočítání poměru signálu k šumu poskytoval nejvyšší hodnoty u většiny látek. Nezbytné je však zmínit, že se jednalo o analýzu látek bez přítomnosti matrice. Při analýze olivového oleje je zřejmé, že absolutní intenzity signálu jsou výrazně vyrovnanější, avšak zde nebylo dopočítáno SNR, jelikož by hodnoty byly zkresleny neznámým příspěvkem matrice. V rámci této analýzy je zajímavé porovnání naměřených intenzit v ESI+ a APCI+ módech. Pro kyselinu olejovou a kyselinu palmitovou byl pozorován nárůst signálu v APCI+ módu přibližně o 10-75 % oproti ESI+ módu. U ostatních analytů DAG [PO-H<sub>2</sub>O+H]<sup>+</sup>, DAG [OO-H<sub>2</sub>O+H]<sup>+</sup> a TAG [OOO+H]<sup>+</sup> byl

pozorován opačný trend, a to nárůstu signálu v rozmezí 11-107 % v ESI+ módu oproti APCI+ módu. Tyto výsledky pro reálný vzorek olivového oleje obsahujícího spektrum rozličných látek lišících se svou polaritou a molekulovou hmotností potvrzují nutnost vývoje komplementárních technik umožňujících současnou detekci signálů v obou ionizačních módech s cílem získat komplexní informace o složení vzorku. Dále bylo zjištěno, že potahy sklíček mají spíše negativní vliv na intenzitu signálu, jelikož ve většině případů byly u těchto povrchů naměřeny nižší hodnoty SNR. Po bližší charakterizaci potahů pomocí MS/MS analýzy bylo zřejmé, že ve složení potahů převládají aromatické sloučeniny potenciálně např. z akridinových barviv, které by mohly výrazně konkurovat sledovaným analytům při ionizaci. Výjimku tvořily bílé potahy sklíček Epredia a Prosolia u látek kyseliny palmitové a stearyl stearátu, u kterých byly dopočítány vyšší hodnoty SNR oproti ostatním sklíčkům s potahy. Pro tento trend však z XRF a MS/MS analýzy nebylo nalezeno žádné experimentálně doložitelné vysvětlení.

Dále bylo záměrně provedeno zobrazování otisku prstu na rozhraní referenčního mikroskopického sklíčka a měděného plátu, který měl nejvyšší hodnoty SNR u většiny látek v předchozích analýzách bez přítomnosti matrice. Toto zobrazování však poskytlo opačné výsledky z pohledu předpokládaného zvýšení SNR pro měděný plát. Byla naměřena vyšší intenzity signálu na referenčním sklíčku oproti měděnému plátu pro látky: kyselina palmitová a skvalen. Možným a nejjednodušším vysvětlením by bylo nerovnoměrné nanesení otisku prstu, především kvůli různým fyzikálním vlastnostem (např. drsnost) povrchu nebo také nerovnosti povrchu relativně měkkého měděného plátu. Dalším faktorem by mohl být vliv přítomné matrice v lidském mazu, který by potenciálně mohl rozdíly v intenzitách signálu mezi povrchy ovlivnit. Dalším důvodem by mohl být také vliv přípravy vzorků. V rámci testování vlivu povrchů na intenzitu signálu byla nanášena homogenní vrstva látky opakovaným sprejováním, kde by potenciálně mohl hrát vliv odlišné krystalizace na různých površích.

Na závěr experimentální části byla provedena optimalizace hmotnostně spektrometrického zobrazování s výrazně vyšším posuvem vzorku (4-5x), které bylo ve výsledku bohužel zatím neúspěšné. Oba potenciální problémy, které byly vyřešeny nenapravily posuny jednotlivých pixelů (resp. ablatovaných liniových skenů) v rekonstruovaných 2D mapách prostorové distribuce analytů. Z tohoto důvodu zatím zůstává maximální rychlost zobrazování pomocí r-DUV-LAESCI-MSI na hodnotě 2

pixely/s v rámci analýzy v jednom módu, nebo 1 pixel/s při simultánní analýze v obou módech ESI a APCI.

Závěrem lze konstatovat, že byla provedena detailní optimalizace r-DUV-LAESCI-MS/MSI. Snahou bylo bližší pochopení klíčových mechanismů, zlepšení měřících parametrů a také posun jejich limitů. I přes neúspěchy v průběhu vypracování experimentální části bylo doplněno mnoho nových a zajímavých informací, které jsou užitečné a aplikovatelné pro další výzkum. Díky unikátním vlastnostem r-DUV-LAESCI-MS/MSI má tato technika velký potenciál do budoucna především v analýze biologických vzorků/povrchů. Velkou motivací by byla její optimalizace pro rozsáhlou studii lipidových profilů, a tudíž její aplikovatelnost v klinické diagnostice. Touto cestou by bylo možné např. diagnostikovat pacienty z jejich otisků prstů, a to by bylo naprosto průlomové. Jelikož v tom sám vidím velký potenciál, plánuji navázat na toto téma v rámci mého doktorského studia.

## Seznam použitých zkratek

2D	Dvourozměrný ( <i>Two-dimensional</i> )
ACN	Acetonitril ( <i>Acetonitrile</i> )
AP	Atmosferický tlak ( <i>Atmospheric pressure</i> )
APCI	Chemická ionizace za atmosférického tlaku ( <i>Atmospheric pressure chemical ionization</i> )
APPI	Fotoionizace za atmosférického tlaku ( <i>Atmospheric pressure photoionization</i> )
CCD	Elektronická součástka pro snímání obrazové informace ( <i>Charged coupled device</i> )
CE	Kapilární elektroforéza ( <i>Capillary electrophoresis</i> )
cps	Počet dopadu iontů za sekundu ( <i>Counts per second</i> )
DAG	Diacylglycerol ( <i>Diacylglycerol</i> )
DART	Přímá analýza v reálném čase ( <i>Direct analysis in real time</i> )
DBE	Počet dvojných vazeb a kruhů ( <i>Double bonds equivalent</i> )
DC	Stejnoseměrný proud ( <i>Direct current</i> )
DESI	Desorpční elektrosprejová ionizace ( <i>Desorption electrospray ionization</i> )
EI	Elektronová ionizace ( <i>Electron ionization</i> )
ELDI-MS	Spojení laserové desorpce s elektrosprejovou ionizací s hmotnostní spektrometrií ( <i>Electrospray laser desorption ionization – mass spectrometry</i> )
ESCI	Duální iontový zdroj elektrosprejové ionizace a chemické ionizace za atmosférického tlaku ( <i>Electrospray ionization-atmospheric pressure chemical ionization dual source</i> )
ESI	Elektrosprejová ionizace ( <i>Electrospray ionization</i> )
FA	Kyselina mravenčí ( <i>Formic acid</i> )
FAB	Bombardování urychlenými atomy ( <i>Fast atom bombardment</i> )
FT-ICR-MS	Hmotnostní spektrometrie s iontovou cyklotronovou rezonancí s Fourierovou transformací ( <i>Fourier-transform ion cyclotron resonance mass spectrometry</i> )
GC-MS	Plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií ( <i>Gas chromatography -mass spectrometry</i> )

HPLC-MS	Vysoce-účinná kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií ( <i>High performance liquid chromatography – mass spectrometry</i> )
ICP	Indukčně vázané plazma ( <i>Inductively coupled plasma</i> )
IČ	Infračervená oblast elektromagnetického záření ( <i>Infrared</i> )
IPA	Isopropanol ( <i>Isopropanol</i> )
ITO	Skličko pokryté vodivou vrstvou oxidů In a Sn ( <i>Indium tin oxide</i> )
LA	Laserová ablace ( <i>Laser ablation</i> )
LAESI	Laserová ablace ve spojení s elektrosprejovou ionizací ( <i>Laser ablation-electrospray ionization</i> )
LC-MS	Kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií ( <i>Liquid chromatography-mass spectrometry</i> )
LDI-MS	Hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpční-ionizací ( <i>Laser desorption-ionization mass spectrometry</i> )
LIBS	Spektrometrie laserem buzeného plazmatu ( <i>Laser-Induced breakdown spectroscopy</i> )
LOD	Meze detekce ( <i>Limit of detection</i> )
MALDI	Matricí asistovaná laserová desorpce-ionizace ( <i>Matrix assisted laser desorption-ionization</i> )
MALDESI	Matricí asistovaná laserová desorpce s elektrosprejovou ionizací ( <i>Matrix assisted laser desorption-electrospray ionization</i> )
MS	Hmotnostní spektrometrie ( <i>Mass spectrometry</i> )
MSI	Hmotnostní zobrazování ( <i>Mass spectrometry imaging</i> )
MS/MS	Tandemová hmotnostní spektrometrie ( <i>Tandem mass spectrometry</i> )
m/z	poměr hmotnosti ku náboji ( <i>mass to charge ratio</i> )
Nd:YAG	Yttrium aluminium granát dopovaný neodymem ( <i>Neodymium-doped yttrium aluminum garnet</i> )
N/A	Není dostupný ( <i>Not available</i> )
OES	Optická emisní spektrometrie ( <i>Optical emission spectrometry</i> )
OO	Diacylglycerol s dvěma navázanými olejovými kyselinami ( <i>Diacylglycerol bonded with two oleic acids</i> )
OOO	Triacylglycerol s navázanými třemi olejovými kyselinami ( <i>Triacylglycerol bonded with three oleic acids</i> )
OT	Orbitrap ( <i>Orbitrap</i> )

PEG	Polyethylenglykol ( <i>Polyethylenglycol</i> )
PI	Fotoionizace ( <i>Photoionization</i> )
PO	Diacylglycerol s dvěma navázanými kyselinami palmitovou a olejovou ( <i>Diacylglycerol bonded with palmitic and oleic acid</i> )
ppm	Milíontina ( <i>Parts per milion</i> )
RF	Radiofrekvenční ( <i>Radiofrequency</i> )
RSD	Relativní směrodatná odchylka ( <i>Relative standard deviation</i> )
r-DUV-LAESCI-MS	Spojení laserové ablace s laserem ve vzdálené UV oblasti a hmotnostní spektrometrií obsahující duální iontový zdroj kombinace elektrosprejové ionizace a chemické ionizace za atmosférického tlaku ( <i>remote-Deep ultraviolet-laser ablation with electrospray ionization-atmospheric pressure chemical ionization dual source – mass spectrometry</i> )
SL	Sprejovací kapalina ( <i>Sheath liquid</i> )
SNR	Poměr signálu k šumu ( <i>Signal to noise ratio</i> )
TAG	Triacylglycerol ( <i>Triacylglycerol</i> )
TOF	Analyzátor doby letu ( <i>Time of flight</i> )
UHPLC	Ultra vysoce-účinná kapalinová chromatografie ( <i>Ultra-high performance liquid chromatography</i> )
UV	Ultrafialová oblast elektromagnetického záření ( <i>Ultraviolet</i> )
Q-TOF	Hybridní hmotnostní analyzátor-kvadrupól a analyzátor doby letu ( <i>Quadrupole-time of flight</i> )
XRF	Rentgenová fluorescence ( <i>X-ray fluorescence</i> )

## Seznam použité literatury

- [1] PAPOUSKOVA, Barbora, Petr FRYCAK, Filip GREGAR, Karel LEMR a Tomasc PLUHACEK. Remote Deep-Ultraviolet Laser Ablation in Connection with Electrospray Ionization-Atmospheric Pressure Chemical Ionization (rDUVLAESCI): A Novel Dual Ionization Source for Molecular Mass Spectrometry. *ANALYTICAL CHEMISTRY* [online]. 2025, **97**(4), 2062–2069. ISSN 0003-2700, 1520-6882. Dostupné z: doi:10.1021/acs.analchem.4c04392
- [2] DE HOFFMANN, Edmond, Vincent STROOBANT a Edmond DE HOFFMANN. *Mass spectrometry: principles and applications*. 3. ed., reprinted. Chichester Weinheim: Wiley, 2011. ISBN 978-0-470-03310-4.
- [3] DOWNARD, Kevin. *Mass Spectrometry: A Foundation Course*. B.m.: Royal Society of Chemistry, 2007. ISBN 978-1-84755-130-6.
- [4] BERDIÉ, Lourdes, Isidre CASALS, Irene FERNÁNDEZ, Olga JÁUREGUI, Maria MARIMON, Joaquim PERONA a Pilar TEIXIDOR. Basics of Mass Spectrometry. nedatováno.
- [5] CHEN, Ruohong, Jiewei DENG, Ling FANG, Yao YAO, Baowei CHEN, Xiaowei WANG a Tiangang LUAN. Recent applications of ambient ionization mass spectrometry in environmental analysis. *Trends in Environmental Analytical Chemistry* [online]. 2017, **15**, 1–11. ISSN 2214-1588. Dostupné z: doi:10.1016/j.teac.2017.07.001
- [6] HSU, Cheng-Chih a Pieter C DORRESTEIN. Visualizing life with ambient mass spectrometry. *Current Opinion in Biotechnology* [online]. 2015, **31**, Analytical Biotechnology, 24–34. ISSN 0958-1669. Dostupné z: doi:10.1016/j.copbio.2014.07.005
- [7] YANG, Yunyun a Jiewei DENG. Analysis of pharmaceutical products and herbal medicines using ambient mass spectrometry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2016, **82**, 68–88. ISSN 0165-9936. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2016.04.011
- [8] ZHANG, Wenpeng, Xiao WANG, Yu XIA a Zheng OUYANG. Ambient Ionization and Miniature Mass Spectrometry Systems for Disease Diagnosis and Therapeutic Monitoring. *Theranostics* [online]. 2017, **7**(12), 2968–2981. ISSN 1838-7640. Dostupné z: doi:10.7150/thno.19410
- [9] XIE, Lijun, Huian ZHAO, Peng ZHOU, Tengao ZHU, Yongzi LIU a Huanwen CHEN. Ambient Mass Spectrometry for Forensic Analysis. 2015.
- [10] FEIDER, Clara L., Anna KRIEGER, Rachel J. DEHOOG a Livia S. EBERLIN. Ambient Ionization Mass Spectrometry: Recent Developments and Applications. *Analytical Chemistry* [online]. 2019, **91**(7), 4266–4290. ISSN 0003-2700, 1520-6882. Dostupné z: doi:10.1021/acs.analchem.9b00807
- [11] WOODHEAD, Jon D., John HELLSTROM, Janet M. HERGT, Alan GREIG a Roland MAAS. Isotopic and Elemental Imaging of Geological Materials by Laser

- Ablation Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry. *Geostandards and Geoanalytical Research* [online]. 2007, **31**(4), 331–343. ISSN 1751-908X. Dostupné z: doi:10.1111/j.1751-908X.2007.00104.x
- [12] QI, Keke, Yongmei LV, Ying XIONG, Changlin TIAN, Chengyuan LIU a Yang PAN. Development of Transmission Ambient Pressure Laser Desorption Ionization/Postphotoionization Mass Spectrometry Imaging. *Analytical Chemistry* [online]. 2024, **96**(14), 5489–5498. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/acs.analchem.3c05605
- [13] NELMS, Simon M., ed. *Inductively coupled plasma mass spectrometry handbook*. Oxford: Blackwell [u.a.], 2005. ISBN 978-1-4051-0916-1.
- [14] RUSSO, Richard E, Xianglei MAO, Haichen LIU, Jhanis GONZALEZ a Samuel S MAO. Laser ablation in analytical chemistry—a review. *Talanta* [online]. 2002, **57**(3), 425–451. ISSN 0039-9140. Dostupné z: doi:10.1016/S0039-9140(02)00053-X
- [15] RUSSO, Richard E., Xianglei MAO, Jhanis J. GONZALEZ, Vassilia ZORBA a Jong YOO. Laser Ablation in Analytical Chemistry. *Analytical Chemistry* [online]. 2013, **85**(13), 6162–6177. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/ac4005327
- [16] Nd:YAG laser. *oneindustry – průmyslový portál, výroba a technologie* [online]. [vid. 2025-03-04]. Dostupné z: <https://www.oneindustry.cz/lexikon/ndyag-laser/>
- [17] PETTIT, G. H. a R. SAUERBREY. Pulsed ultraviolet laser ablation. *Applied Physics A* [online]. 1993, **56**(1), 51–63. ISSN 1432-0630. Dostupné z: doi:10.1007/BF00351903
- [18] GROSS, Jürgen H. *Mass Spectrometry: A Textbook*. B.m.: Springer Science & Business Media, 2006. ISBN 978-3-540-36756-7.
- [19] LINSCHIED, Michael. Instrumental developments in organic mass spectrometry. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* [online]. 1990, **337**(6), 648–661. ISSN 1432-1130. Dostupné z: doi:10.1007/BF00323099
- [20] MCCULLAGH, James S. O. a Neil J. OLDHAM. *Mass spectrometry*. Oxford: Oxford University Press, 2019. Oxford chemistry primers. ISBN 978-0-19-878904-8.
- [21] LEMR, K. a L. BOROVCOVÁ. Electrospray ionization. *Chemické Listy* [online]. 2020, **114**(3), 169–178. ISSN 12137103. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-642-10711-5\_12
- [22] GROSS, Jürgen H. *Mass spectrometry: a textbook*. Softcover reprint of the hardcover 3rd edition. Cham: Springer, 2017. ISBN 978-3-319-54397-0.
- [23] THOMAS, Robert. *Practical guide to ICP-MS: a tutorial for beginners*. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, 2008. Practical spectroscopy, 33. ISBN 978-1-4200-6786-6.
- [24] BECKER, Johanna Sabine. *Inorganic Mass Spectrometry*. nedatováno.

- [25] AGILENT TECHNOLOGIES. *ICP-MS Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry - Primer course* [online]. 2005. ISBN 5989-3526EN. Dostupné z: [www.agilent.com/chem/icpms](http://www.agilent.com/chem/icpms)
- [26] GREPL, Jakub. *Prvková analýza rostlinných olejů a tuků, bakalářská práce*. Olomouc, 2023. Bakalářská práce. Univerzita Palackého.
- [27] DEAN, John R. *Practical Inductively Coupled Plasma Spectroscopy*. nedatováno.
- [28] SEYFRIED, Birgit K., Jürgen SIEKMANN, Omar BELGACEM, Ryan J. WENZEL, Peter L. TURECEK a Günter ALLMAIER. MALDI linear TOF mass spectrometry of PEGylated (glyco)proteins. *Journal of mass spectrometry: JMS* [online]. 2010, **45**(6), 612–617. ISSN 1096-9888. Dostupné z: [doi:10.1002/jms.1746](https://doi.org/10.1002/jms.1746)
- [29] *SYNAPT G2-Si HDMS Mass Spectrometer Overview and Maintenance Guide* [online]. B. m.: Waters, 2014 [vid. 2024-10-08]. Dostupné z: <https://www.waters.com/waters/support.htm?lid=134764920&lcid=134764919&type=USRM>
- [30] SHIEA, Jentaie, Min-Zon HUANG, Hsiu-Jung HSU, Chi-Yang LEE, Cheng-Hui YUAN, Iwona BEECH a Jan SUNNER. Electrospray-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry for direct ambient analysis of solids. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* [online]. 2005, **19**(24), 3701–3704. ISSN 1097-0231. Dostupné z: [doi:10.1002/rcm.2243](https://doi.org/10.1002/rcm.2243)
- [31] SAMPSON, Jason S., Adam M. HAWKRIDGE a David C. MUDDIMAN. Generation and detection of multiply-charged peptides and proteins by matrix-assisted laser desorption electrospray ionization (MALDESI) fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* [online]. 2006, **17**(12), 1712–1716. Dostupné z: [doi:10.1016/j.jasms.2006.08.003](https://doi.org/10.1016/j.jasms.2006.08.003)
- [32] CHENG, Chi-Yuan, Cheng-Hui YUAN, Sy-Chyi CHENG, Min-Zong HUANG, Hui-Chiu CHANG, Tien-Lu CHENG, Chen-Sheng YEH a Jentaie SHIEA. Electrospray-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry for continuously monitoring the states of ongoing chemical reactions in organic or aqueous solution under ambient conditions. *Analytical Chemistry* [online]. 2008, **80**(20), 7699–7705. ISSN 1520-6882. Dostupné z: [doi:10.1021/ac800952e](https://doi.org/10.1021/ac800952e)
- [33] SCHÄFER, Karl-Christian, Tamás SZANISZLÓ, Sabine GÜNTHER, Júlia BALOG, Júlia DÉNES, Márta KESERŰ, Balázs DEZSŐ, Miklós TÓTH, Bernhard SPENGLER a Zoltán TAKÁTS. In Situ, Real-Time Identification of Biological Tissues by Ultraviolet and Infrared Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* [online]. 2011, **83**(5), 1632–1640. ISSN 0003-2700. Dostupné z: [doi:10.1021/ac102613m](https://doi.org/10.1021/ac102613m)
- [34] KAO, Yi-Ying, Chu-Nian CHENG, Sy-Chyi CHENG, Hsiu-O HO a Jentaie SHIEA. Distinguishing authentic and counterfeit banknotes by surface chemical composition determined using electrospray laser desorption ionization mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* [online]. 2013, **48**(11), 1129–1135. ISSN 1096-9888. Dostupné z: [doi:10.1002/jms.3263](https://doi.org/10.1002/jms.3263)

- [35] CHO, Yi-Tzu, Min-Zong HUANG, Sih-You WU, Ming-Feng HOU, Jianjun LI a Jentaie SHIEA. Using electrospray laser desorption ionization mass spectrometry to rapidly examine the integrity of proteins stored in various solutions. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2014, **406**(2), 577–586. ISSN 1618-2650. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-013-7491-z
- [36] LAWAL, Remilekun O., Fabrizio DONNARUMMA a Kermit K. MURRAY. Deep-ultraviolet Laser Ablation Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Journal of mass spectrometry : JMS* [online]. 2019, **54**(3), 281–287. ISSN 1076-5174. Dostupné z: doi:10.1002/jms.4338
- [37] LAWAL, Remilekun O., Luke T. RICHARDSON, Chao DONG, Fabrizio DONNARUMMA, Touradj SOLOUKI a Kermit K. MURRAY. Deep-ultraviolet laser ablation sampling for proteomic analysis of tissue. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2021, **1184**, 339021. ISSN 0003-2670. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2021.339021
- [38] YAN, Bin, Teresa MURTA, Efsthathios A. ELIA, Rory T. STEVEN a Josephine BUNCH. Direct Tissue Mass Spectrometry Imaging by Atmospheric Pressure UV-Laser Desorption Plasma Postionization. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* [online]. 2021, **32**(2), 429–435. ISSN 1044-0305, 1879-1123. Dostupné z: doi:10.1021/jasms.0c00315
- [39] XIANG, Piliang, Andrey LIYU, Yumi KWON, Dehong HU, Sarah M. WILLIAMS, Dušan VELIČKOVIĆ, Lye Meng MARKILLIE, William B. CHRISLER, Ljiljana PAŠA-TOLIĆ a Ying ZHU. Spatial Proteomics toward Subcellular Resolution by Coupling Deep Ultraviolet Laser Ablation with Nanodroplet Sample Preparation. *ACS Measurement Science Au* [online]. 2023, **3**(6), 459–468. ISSN 2694-250X, 2694-250X. Dostupné z: doi:10.1021/acsmeasuresciau.3c00033
- [40] FALTUSOVÁ, Veronika, Tomáš VACULOVIČ, Markéta HOLÁ a Viktor KANICKÝ. Ilaps – python software for data reduction and imaging with LA-ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* [online]. 2022, **37**(4), 733–740. ISSN 1364-5544. Dostupné z: doi:10.1039/D1JA00383F
- [41] PUBCHEM. *Acridine* [online]. [vid. 2025-04-08]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/9215>

## Příloha 1

### S.1. Tabulkové vyhodnocení optimalizace průtoku a „sheath liquid“

Tabulka S1 Naměřená data z optimalizace průtoku a „sheath liquid“

„sheath liquid“	Průtok μl	Antracen				Kofein	
		ESI+		APCI+		ESI+	APCI+
		[M <sup>++</sup> ]	[M+H] <sup>+</sup>	[M <sup>++</sup> ]	[M+H] <sup>+</sup>	[M+H] <sup>+</sup>	[M+H] <sup>+</sup>
ACN+H <sub>2</sub> O 1:1 (v/v)	5	7,22E+04	8,81E+04	5,35E+05	1,31E+05	4,19E+05	3,29E+05
	20	2,79E+04	3,70E+04	3,26E+05	1,10E+05	4,18E+05	4,85E+05
	50	1,66E+04	1,23E+04	2,51E+05	1,20E+05	2,37E+05	3,81E+05
	100	1,08E+04	1,09E+04	1,74E+05	7,89E+04	1,03E+05	3,17E+05
MeOH+H <sub>2</sub> O 1:1 (v/v)	5	1,60E+04	1,18E+05	3,60E+04	1,99E+05	4,59E+05	2,63E+05
	20	1,45E+03	3,13E+03	3,98E+03	8,02E+03	3,80E+05	3,03E+05
	50	8,40E+02	3,25E+03	2,94E+03	5,96E+03	7,52E+04	8,91E+04
	100	7,16E+02	2,12E+03	2,44E+03	5,94E+03	1,18E+04	6,63E+04
IPA+H <sub>2</sub> O 1:1 (v/v)	5	6,44E+03	3,51E+04	8,68E+03	3,41E+04	8,32E+04	7,29E+04
	20	1,20E+03	3,22E+03	2,80E+03	6,49E+03	7,94E+04	4,56E+04
	50	×	1,16E+03	2,16E+03	3,49E+03	4,17E+04	6,14E+04
	100	×	×	8,63E+02	1,46E+03	6,76E+04	1,81E+05
ACN+MeOH+IPA+H <sub>2</sub> O 1:1:1:1 (v/v)	5	5,74E+03	3,17E+04	1,24E+04	4,66E+04	1,08E+06	6,52E+05
	20	1,64E+03	3,13E+03	2,99E+03	6,38E+03	4,94E+05	4,32E+05
	50	9,84E+02	1,39E+03	1,56E+03	3,54E+03	3,79E+05	3,38E+05
	100	×	×	7,72E+02	3,86E+03	1,69E+05	3,28E+05
ACN+H <sub>2</sub> O 1:1 (v/v) +FA 0,1%	5	3,73E+03	9,47E+03	3,17E+03	1,24E+04	1,59E+06	1,09E+06
	20	1,12E+03	4,74E+02	1,71E+03	3,73E+03	6,59E+05	5,86E+05
	50	×	2,09E+03	3,00E+03	×	3,31E+05	3,90E+05
	100	×	×	×	×	1,51E+05	4,82E+05
MeOH+H <sub>2</sub> O 1:1 (v/v) +FA 0,1%	5	2,64E+03	5,91E+03	5,07E+03	1,30E+04	1,46E+05	2,16E+05
	20	×	×	9,40E+02	3,85E+03	1,27E+05	1,85E+05
	50	2,86E+03	9,01E+03	3,09E+03	9,43E+03	7,07E+05	7,92E+05
	100	6,25E+02	1,15E+03	1,72E+03	6,93E+03	4,25E+05	1,10E+06
IPA+H <sub>2</sub> O 1:1 (v/v) +FA 0,1%	5	5,04E+03	2,18E+04	8,64E+03	3,28E+04	4,54E+05	3,14E+05
	20	3,81E+03	3,52E+03	1,82E+03	4,05E+03	2,45E+05	2,91E+05
	50	1,07E+03	1,48E+03	1,48E+03	3,51E+03	2,15E+05	2,16E+05
	100	4,79E+02	4,32E+02	7,83E+02	1,54E+03	2,03E+05	2,90E+05
ACN+MeOH+IPA+H <sub>2</sub> O 1:1:1:1 (v/v) +FA 0,1%	5	2,29E+03	1,02E+04	5,48E+03	1,71E+04	1,06E+06	6,81E+05
	20	6,13E+02	1,12E+03	1,63E+03	5,28E+03	3,53E+05	5,08E+05
	50	×	×	1,89E+03	2,62E+03	1,86E+05	3,58E+05
	100	×	×	8,26E+02	1,65E+03	1,13E+05	1,69E+05

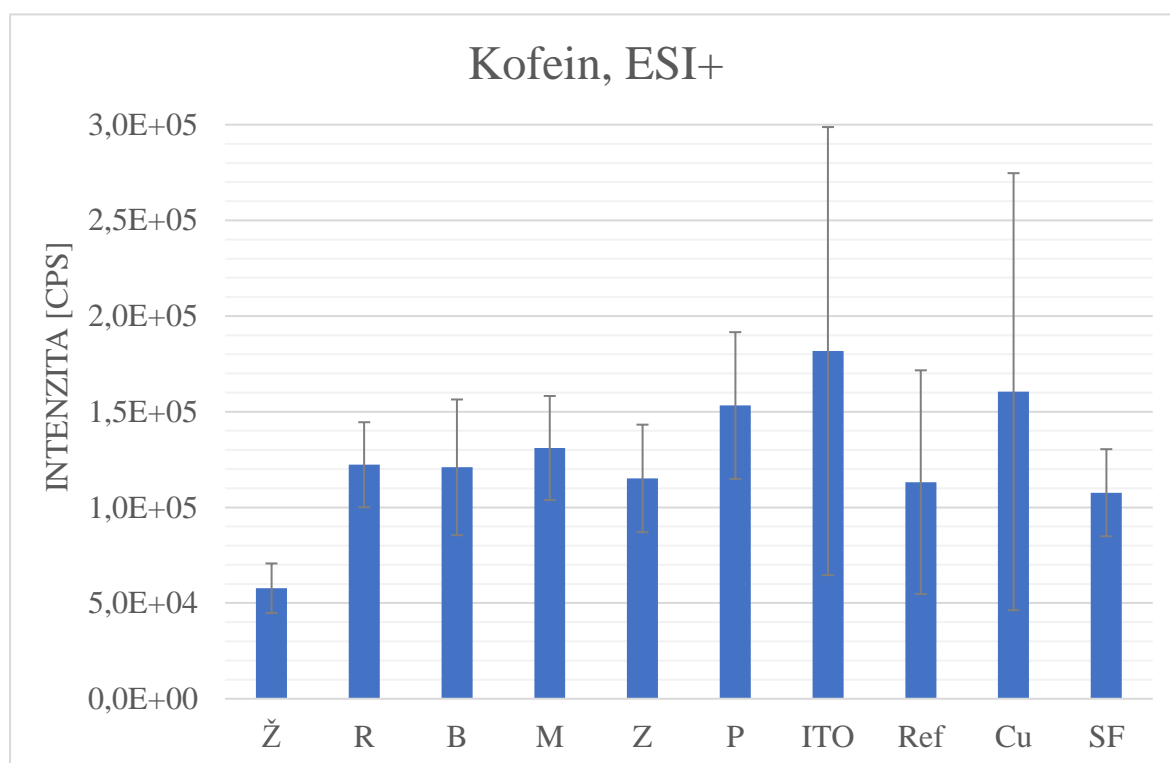
(Pozn.: „×“ – analyt nebyl detekován)

## S.2. Vyhodnocení testování vlivu povrchů na intenzitu signálu analytů

Tabulka S2 Výsledky analýzy kofeinu v ESI+ módu

Označení povrchu	Průměrná intenzita [cps]	Výběrový odhad směrodatné odchylky [cps]	SNR	Normalizovaná intenzita [%]
Ž	5,77E+04	1,30E+04	22,1	32
R	1,22E+05	2,22E+04	40,3	67
B	1,21E+05	3,55E+04	44,4	67
M	1,31E+05	2,72E+04	44,6	72
Z	1,15E+05	2,81E+04	35,6	63
P	1,53E+05	3,83E+04	42,9	84
ITO	1,82E+05	1,17E+05	132,3	100
Ref	1,13E+05	5,85E+04	147,8	62
Cu	1,60E+05	1,14E+05	183,6	88
SF	1,08E+05	2,28E+04	27,3	59

(Pozn.: „cps“ – počet dopadu iontů za sekundu; SNR – poměr signálu k šumu (signal to noise ratio), SNR: <3 – nedetekováno; 3-10 detekováno a nestanoveno; >10 – stanoveno)

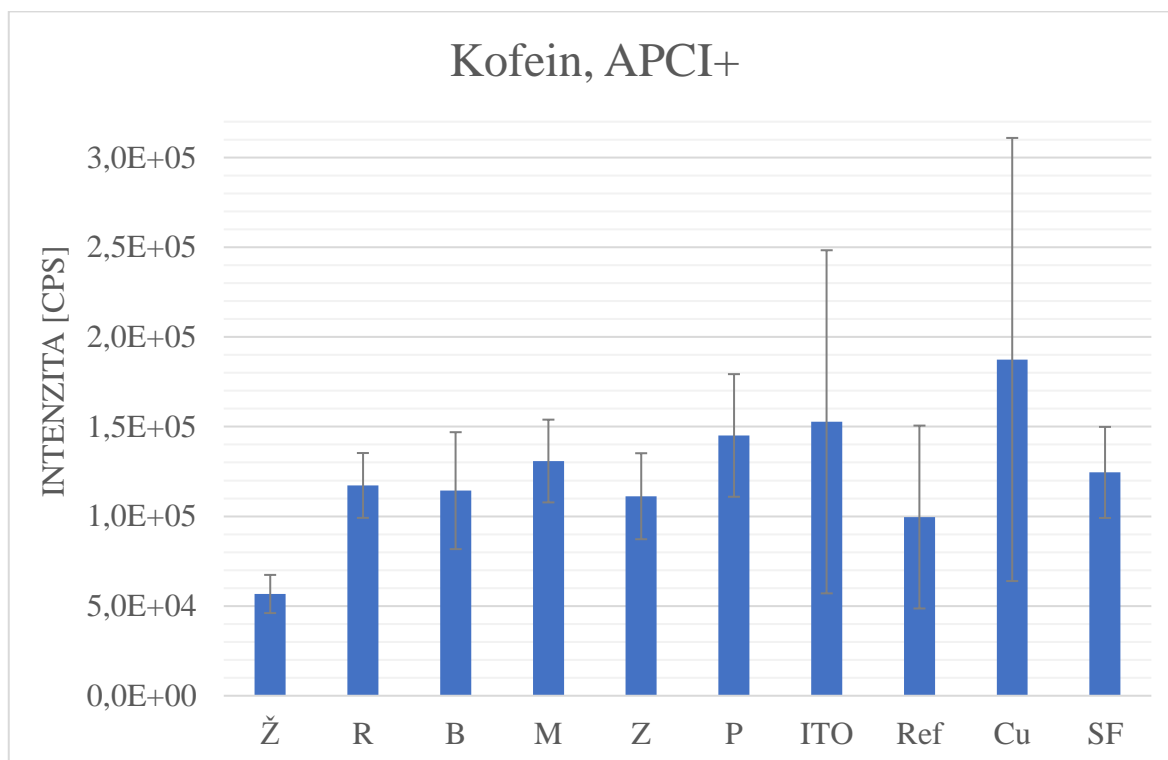


Graf S1 Výsledky analýzy povrchů pro kofein v ESI+ módu

Tabulka S3 Výsledky analýzy kofeinu v APCI+ módu

Označení povrchu	Průměrná intenzita [cps]	Výběrový odhad směrodatné odchylky [cps]	SNR	Normalizovaná intenzita [%]
Ž	5,67E+04	1,06E+04	22,0	30
R	1,17E+05	1,81E+04	42,5	63
B	1,14E+05	3,26E+04	42,5	61
M	1,31E+05	2,31E+04	48,8	70
Z	1,11E+05	2,40E+04	39,1	59
P	1,45E+05	3,42E+04	47,6	77
ITO	1,53E+05	9,56E+04	139,9	81
Ref	9,96E+04	5,10E+04	151,5	53
Cu	1,87E+05	1,24E+05	233,1	100
SF	1,24E+05	2,54E+04	36,8	66

(Pozn.: SNR – poměr signálu k šumu (signal to noise ratio), SNR: <3 – nedetekováno; 3-10 detekováno a nestanoveno; >10 – stanoveno)

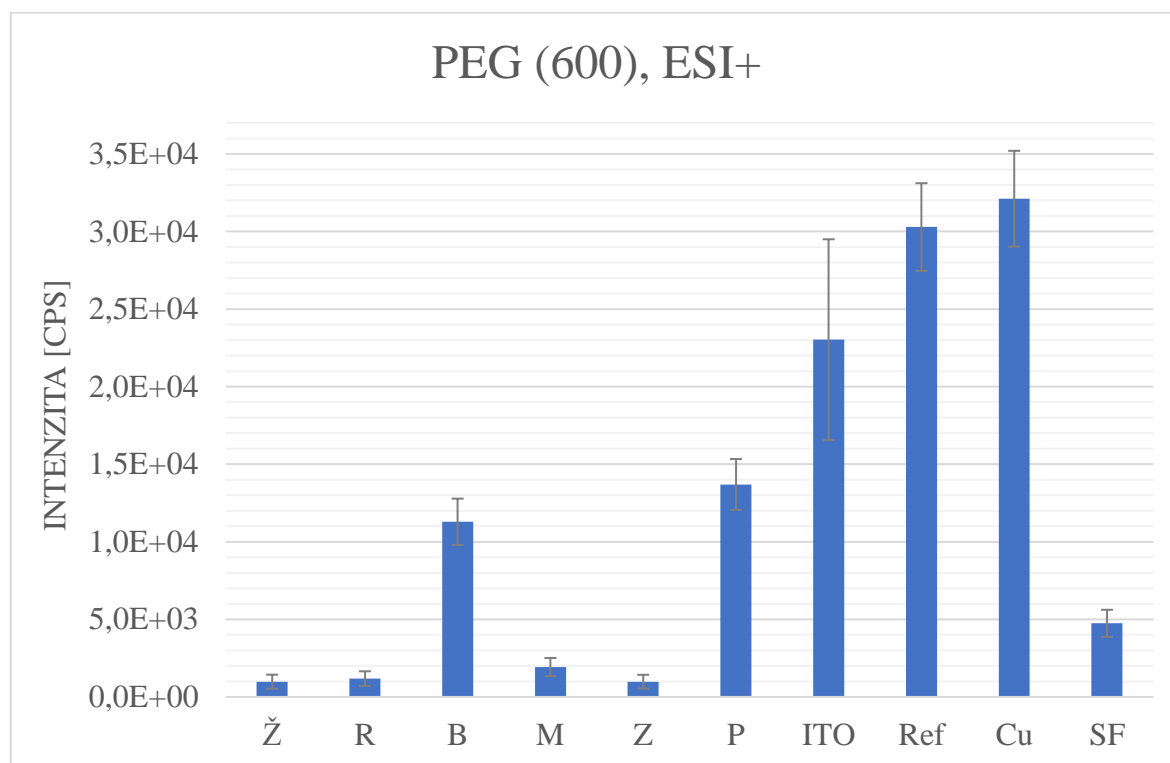


Graf S2 Výsledky analýzy povrchů pro kofein v APCI+ módu

Tabulka S4 Výsledky analýzy PEG (600) v ESI+ módu

Označení povrchu	Průměrná intenzita [cps]	Výběrový odhad směrodatné odchylky [cps]	SNR	Normalizovaná intenzita [%]
Ž	9,84E+02	4,51E+02	4,6	3
R	1,18E+03	4,75E+02	6,0	4
B	1,13E+04	1,49E+03	47,9	35
M	1,93E+03	5,87E+02	8,5	6
Z	9,86E+02	4,43E+02	4,2	3
P	1,37E+04	1,64E+03	55,8	43
ITO	2,30E+04	6,48E+03	106,8	72
Ref	3,03E+04	2,82E+03	148,5	94
Cu	3,21E+04	3,09E+03	163,7	100
SF	4,74E+03	8,74E+02	21,1	15

(Pozn.: SNR – poměr signálu k šumu (signal to noise ratio), SNR: <3 – nedetekováno; 3-10 detekováno a nestanoveno; >10 – stanoveno)

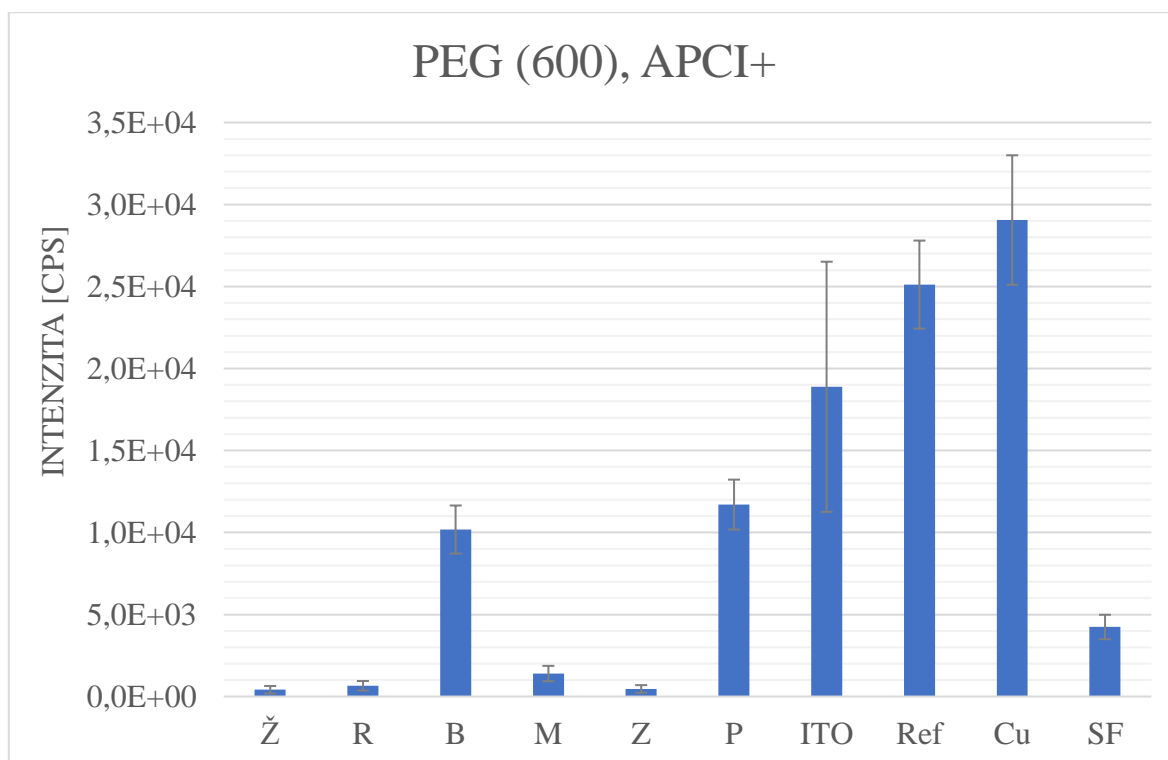


Graf S3 Výsledky analýzy povrchů pro PEG (600) v ESI+ módu

Tabulka S5 Výsledky analýzy PEG (600) v APCI+ módu

Označení povrchu	Průměrná intenzita [cps]	Výběrový odhad směrodatné odchylky [cps]	SNR	Normalizovaná intenzita [%]
Ž	4,15E+02	2,27E+02	8,3	1
R	6,58E+02	2,91E+02	16,8	2
B	1,02E+04	1,47E+03	212,4	35
M	1,40E+03	4,68E+02	31,2	5
Z	4,63E+02	2,34E+02	14,6	2
P	1,17E+04	1,52E+03	195,9	40
ITO	1,89E+04	7,63E+03	589,3	65
Ref	2,51E+04	2,68E+03	501,9	86
Cu	2,91E+04	3,95E+03	940,9	100
SF	4,24E+03	7,45E+02	53,0	15

(Pozn.: SNR – poměr signálu k šumu (signal to noise ratio), SNR: <3 – nedetekováno; 3-10 detekováno a nestanoveno; >10 – stanoveno)

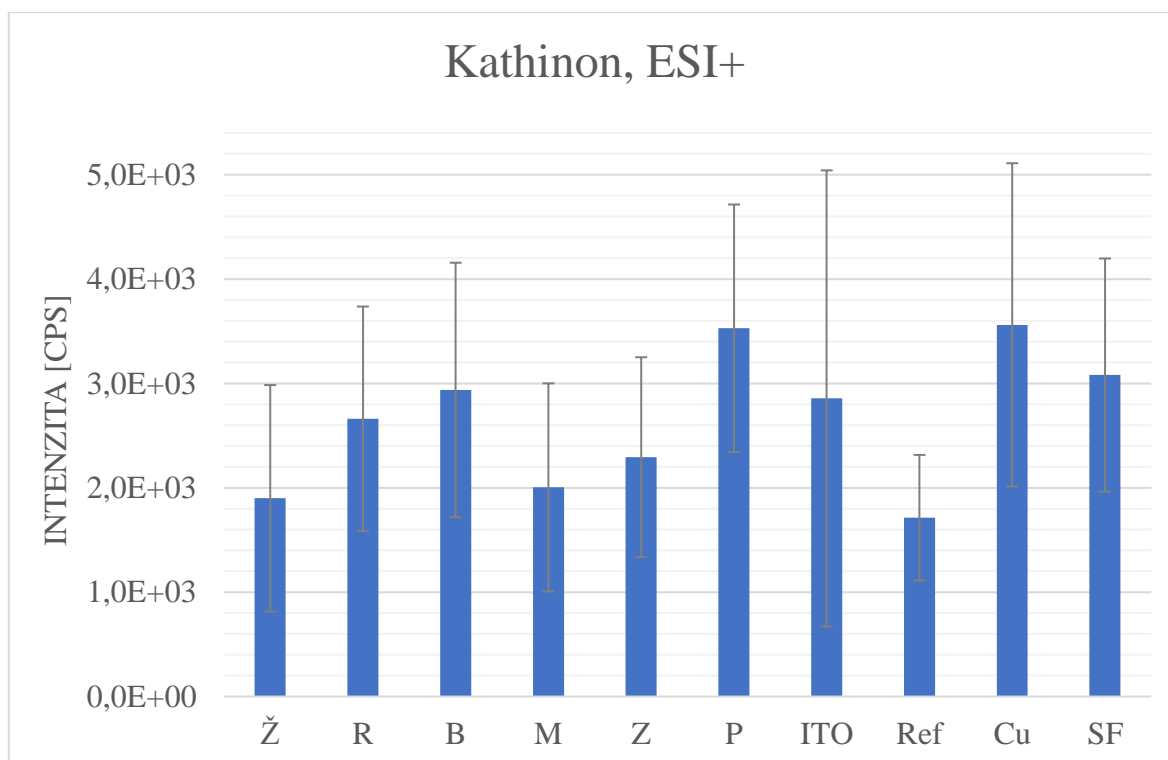


Graf S4 Výsledky analýzy povrchů pro PEG (600) v APCI+ módu

Tabulka S6 Výsledky analýzy kationu v ESI+ módu

Označení povrchu	Průměrná intenzita [cps]	Výběrový odhad směrodatné odchylky [cps]	SNR	Normalizovaná intenzita [%]
Ž	1,90E+03	1,09E+03	1,8	53
R	2,66E+03	1,08E+03	1,9	75
B	2,94E+03	1,22E+03	1,9	82
M	2,00E+03	9,97E+02	1,2	56
Z	2,29E+03	9,58E+02	1,4	64
P	3,53E+03	1,19E+03	2,0	99
ITO	2,86E+03	2,19E+03	4,4	80
Ref	1,71E+03	6,02E+02	6,7	48
Cu	3,56E+03	1,55E+03	10,5	100
SF	3,08E+03	1,12E+03	2,0	86

(Pozn.: SNR – poměr signálu k šumu (signal to noise ratio), SNR: <3 – nedetekováno; 3-10 detekováno a nestanoveno; >10 – stanoveno)

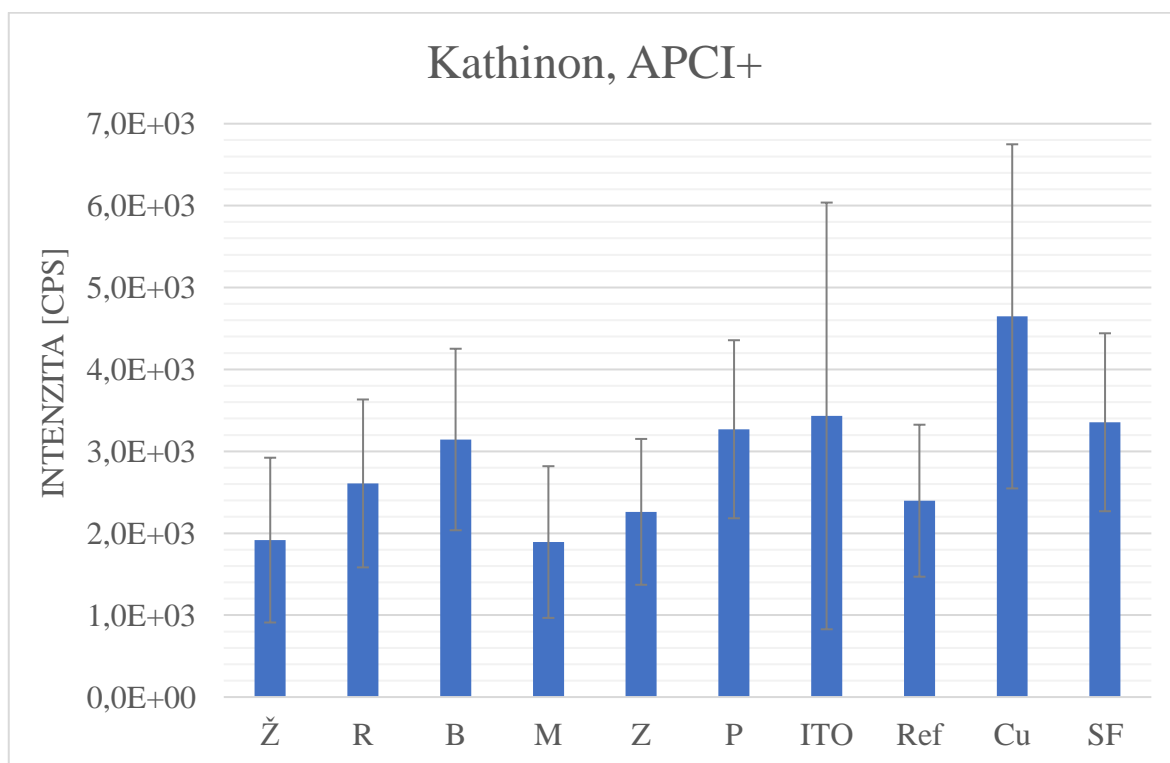


Graf S5 Výsledky analýzy povrchů pro kation v ESI+ módu

Tabulka S7 Výsledky analýzy kathionu v APCI+ módu

Označení povrchu	Průměrná intenzita [cps]	Výběrový odhad směrodatné odchylky [cps]	SNR	Normalizovaná intenzita [%]
Ž	1,92E+03	1,01E+03	1,9	41
R	2,61E+03	1,03E+03	1,8	56
B	3,14E+03	1,11E+03	1,9	68
M	1,89E+03	9,26E+02	1,3	41
Z	2,26E+03	8,90E+02	1,4	49
P	3,27E+03	1,09E+03	2,0	70
ITO	3,43E+03	2,61E+03	5,5	74
Ref	2,40E+03	9,28E+02	8,5	52
Cu	4,65E+03	2,10E+03	15,8	100
SF	3,36E+03	1,09E+03	2,2	72

(Pozn.: SNR – poměr signálu k šumu (signal to noise ratio), SNR: <3 – nedetekováno; 3-10 detekováno a nestanoveno; >10 – stanoveno)

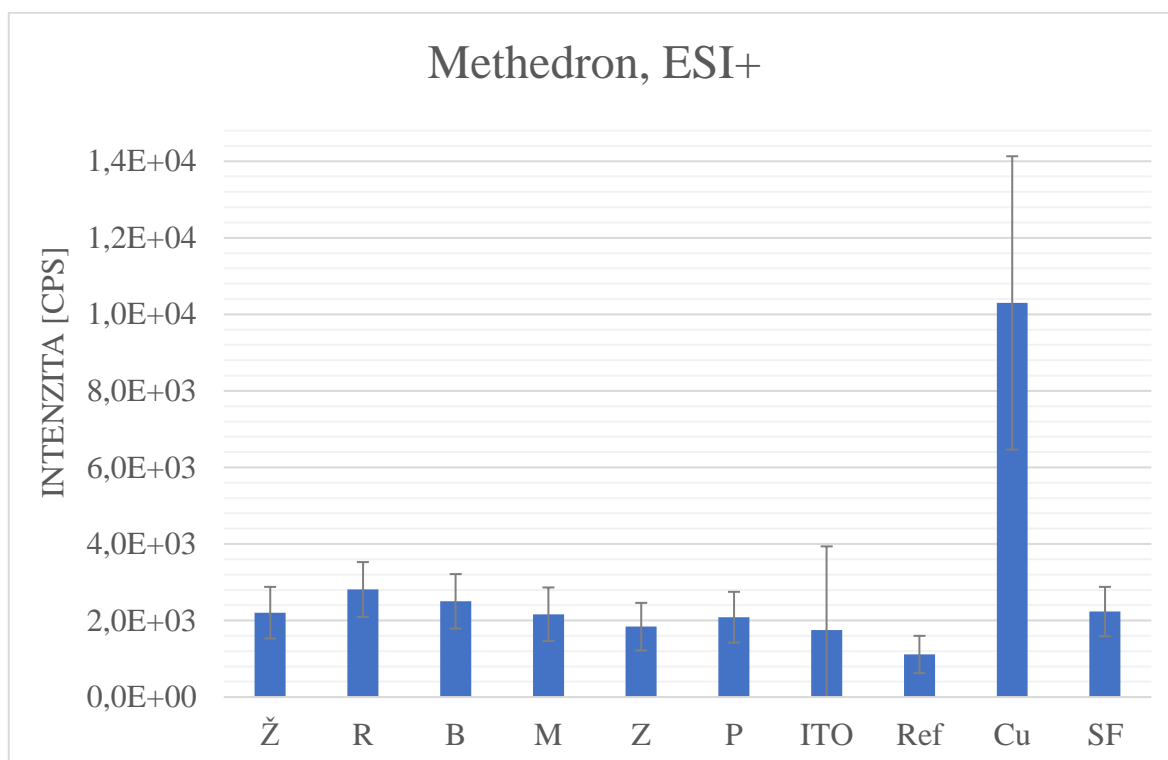


Graf S6 Výsledky analýzy povrchů pro kathion v APCI+ módu

Tabulka S8 Výsledky analýzy methedronu v ESI+ módu

Označení povrchu	Průměrná intenzita [cps]	Výběrový odhad směrodatné odchylky [cps]	SNR	Normalizovaná intenzita [%]
Ž	2,20E+03	6,75E+02	1,2	21
R	2,81E+03	7,17E+02	1,3	27
B	2,50E+03	7,11E+02	1,1	24
M	2,16E+03	7,01E+02	0,9	21
Z	1,84E+03	6,22E+02	0,8	18
P	2,09E+03	6,63E+02	0,8	20
ITO	1,75E+03	2,18E+03	2,4	17
Ref	1,11E+03	4,87E+02	2,8	11
Cu	1,03E+04	3,83E+03	25,2	100
SF	2,23E+03	6,46E+02	0,9	22

(Pozn.: SNR – poměr signálu k šumu (signal to noise ratio), SNR: <3 – nedetekováno; 3-10 detekováno a nestanoveno; >10 – stanoveno)

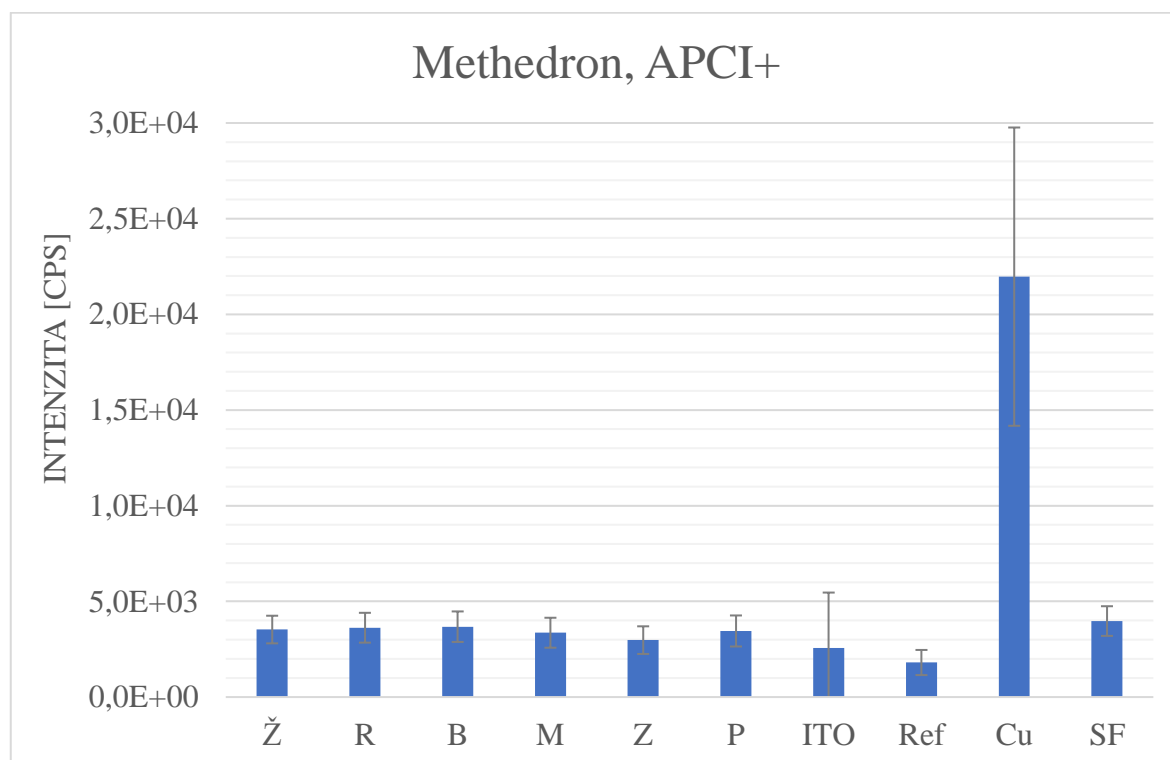


Graf S7 Výsledky analýzy povrchů pro methedron v ESI+ módu

Tabulka S9 Výsledky analýzy methedronu v APCI+ módu

Označení povrchu	Průměrná intenzita [cps]	Výběrový odhad směrodatné odchylky [cps]	SNR	Normalizovaná intenzita [%]
Ž	3,53E+03	7,22E+02	1,7	16
R	3,62E+03	7,79E+02	1,5	16
B	3,68E+03	7,97E+02	1,5	17
M	3,36E+03	7,83E+02	1,4	15
Z	2,98E+03	7,22E+02	1,3	14
P	3,45E+03	8,10E+02	1,3	16
ITO	2,57E+03	2,89E+03	4,1	12
Ref	1,81E+03	6,56E+02	4,3	8
Cu	2,20E+04	7,79E+03	40,7	100
SF	3,97E+03	7,75E+02	1,5	18

(Pozn.: SNR – poměr signálu k šumu (signal to noise ratio), SNR: <3 – nedetekováno; 3-10 detekováno a nestanoveno; >10 – stanoveno)

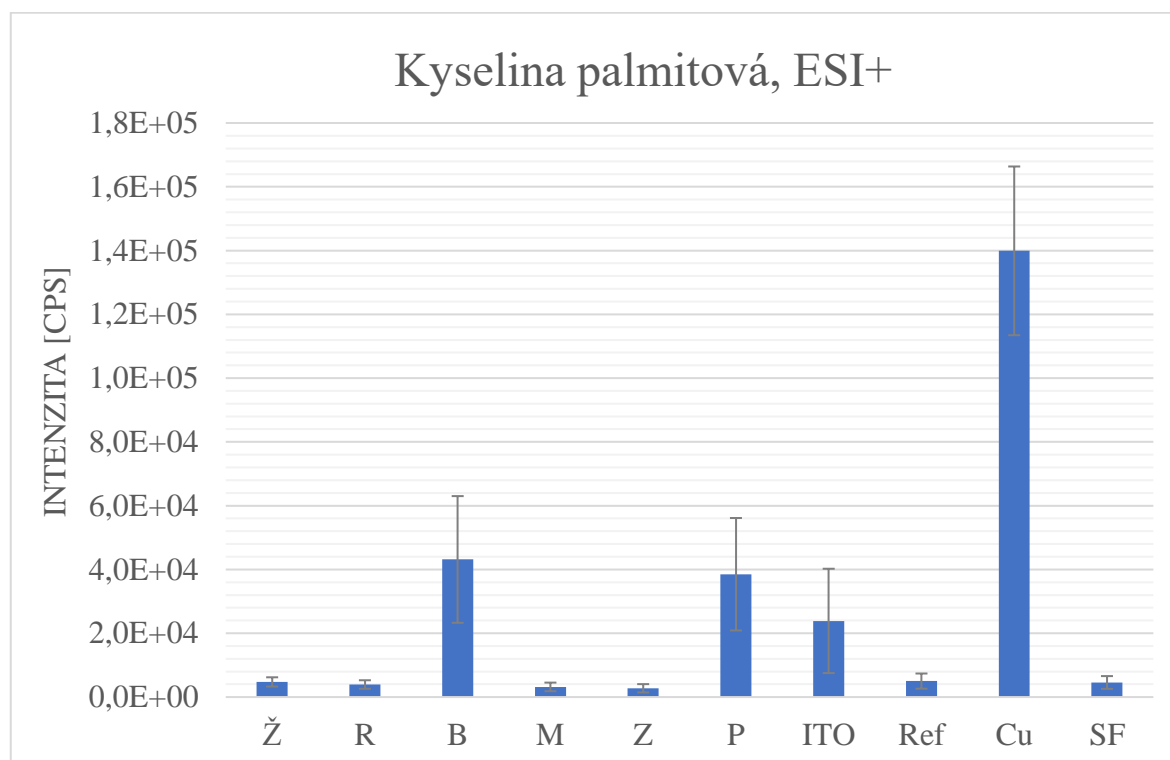


Graf S8 Výsledky analýzy povrchů pro methedron v APCI+ módu

Tabulka S10 Výsledky analýzy kyseliny palmitové v ESI+ módu

Označení povrchu	Průměrná intenzita [cps]	Výběrový odhad směrodatné odchylky [cps]	SNR	Normalizovaná intenzita [%]
Ž	4,75E+03	1,45E+03	2,0	3
R	3,93E+03	1,34E+03	1,5	3
B	4,32E+04	1,99E+04	15,8	31
M	3,18E+03	1,35E+03	1,2	2
Z	2,75E+03	1,31E+03	1,0	2
P	3,85E+04	1,76E+04	14,8	28
ITO	2,39E+04	1,64E+04	10,1	17
Ref	5,01E+03	2,38E+03	2,7	4
Cu	1,40E+05	2,65E+04	35,3	100
SF	4,57E+03	2,00E+03	1,7	3

(Pozn.: SNR – poměr signálu k šumu (signal to noise ratio), SNR: <3 – nedetekováno; 3-10 detekováno a nestanoveno; >10 – stanoveno)

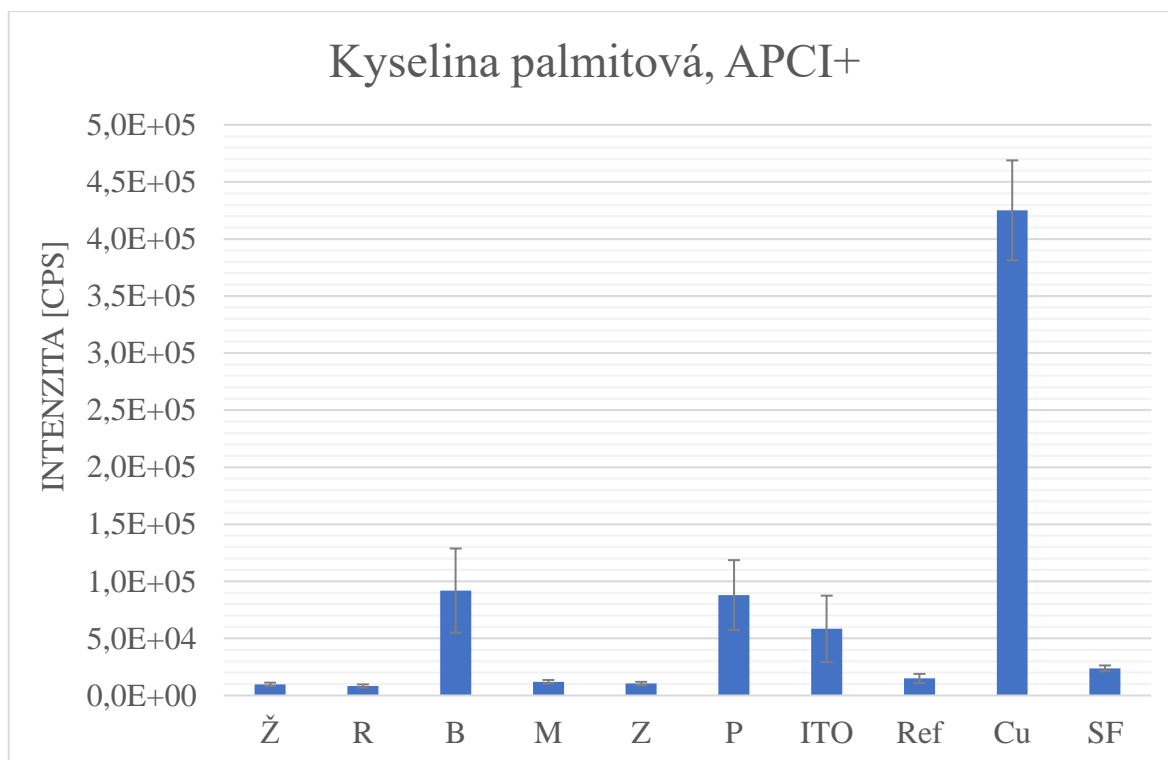


Graf S9 Výsledky analýzy povrchů pro kyselinu palmitovou v ESI+ módu

Tabulka S11 Výsledky analýzy kyseliny palmitové v APCI+ módu

Označení povrchu	Průměrná intenzita [cps]	Výběrový odhad směrodatné odchylky [cps]	SNR	Normalizovaná intenzita [%]
Ž	9,77E+03	1,49E+03	4,2	2
R	8,30E+03	1,41E+03	3,4	2
B	9,19E+04	3,69E+04	36,1	22
M	1,20E+04	1,55E+03	4,9	3
Z	1,04E+04	1,51E+03	4,1	2
P	8,80E+04	3,06E+04	38,6	21
ITO	5,84E+04	2,91E+04	25,3	14
Ref	1,49E+04	4,04E+03	7,5	4
Cu	4,25E+05	4,38E+04	81,6	100
SF	2,37E+04	2,56E+03	9,6	6

(Pozn.: SNR – poměr signálu k šumu (signal to noise ratio), SNR: <3 – nedetekováno; 3-10 detekováno a nestanoveno; >10 – stanoveno)

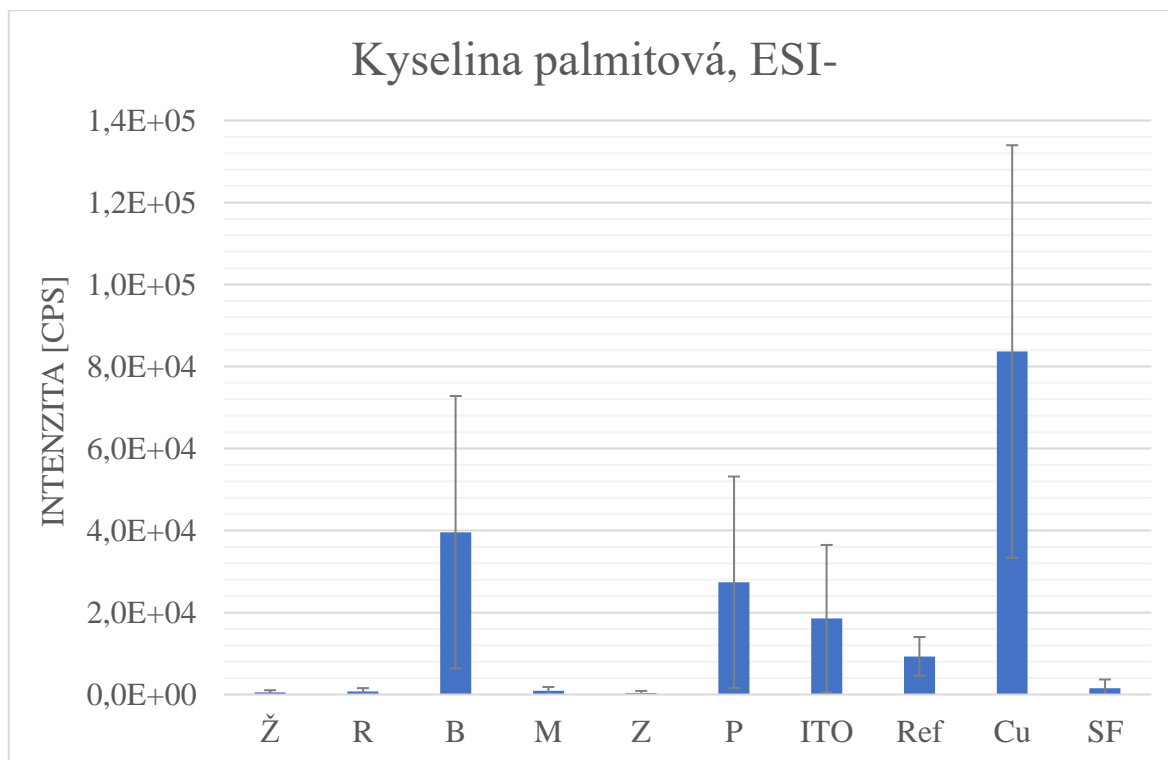


Graf S10 Výsledky analýzy povrchů pro kyselinu palmitovou v APCI+ módu

Tabulka S12 Výsledky analýzy kyseliny palmitové v ESI- módu

Označení povrchu	Průměrná intenzita [cps]	Výběrový odhad směrodatné odchylky [cps]	SNR	Normalizovaná intenzita [%]
Ž	4,97E+02	5,55E+02	0,1	1
R	7,77E+02	7,90E+02	0,1	1
B	3,96E+04	3,32E+04	5,3	47
M	9,25E+02	9,27E+02	0,1	1
Z	3,42E+02	5,44E+02	0,1	<0,5
P	2,74E+04	2,58E+04	3,7	33
ITO	1,85E+04	1,80E+04	2,5	22
Ref	9,31E+03	4,73E+03	1,3	11
Cu	8,36E+04	5,03E+04	11,2	100
SF	1,52E+03	2,15E+03	0,2	2

(Pozn.: SNR – poměr signálu k šumu (signal to noise ratio), SNR: <3 – nedetekováno; 3-10 detekováno a nestanoveno; >10 – stanoveno)

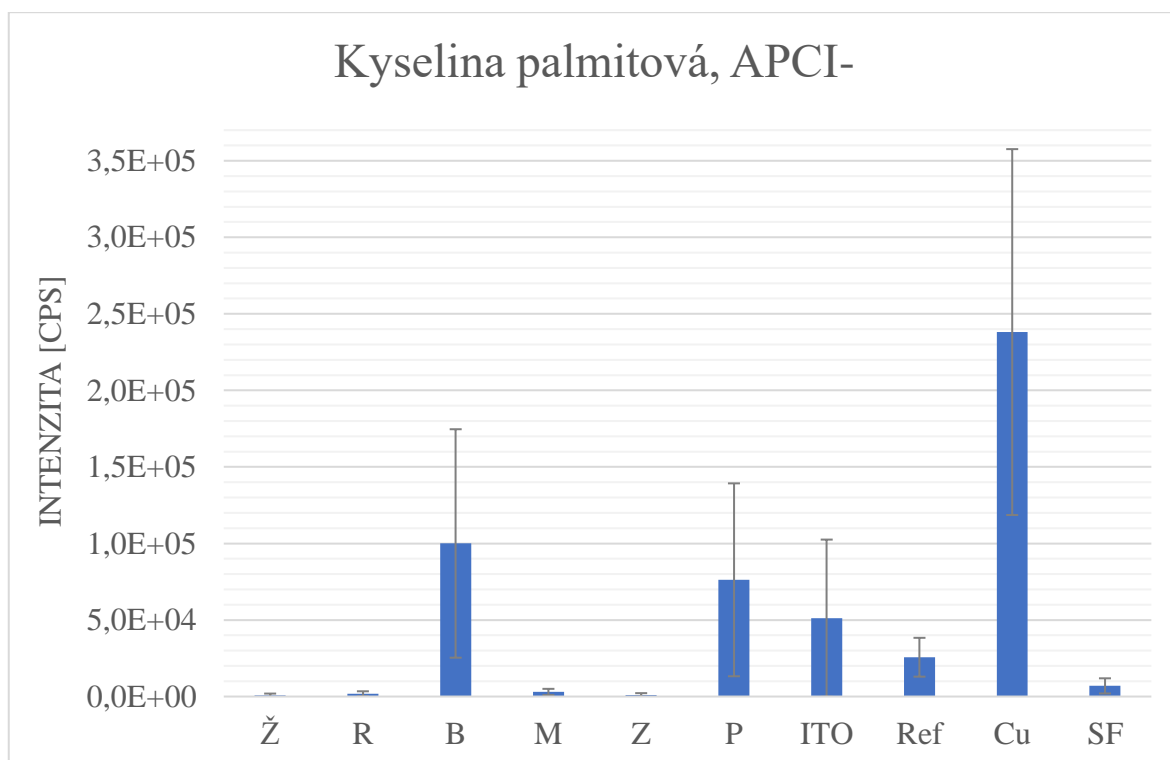


Graf S11 Výsledky analýzy povrchů pro kyselinu palmitovou v ESI- módu

Tabulka S13 Výsledky analýzy kyseliny palmitové v APCI- módu

Označení povrchu	Průměrná intenzita [cps]	Výběrový odhad směrodatné odchylky [cps]	SNR	Normalizovaná intenzita [%]
Ž	8,20E+02	1,12E+03	0,1	<0,5
R	1,81E+03	1,62E+03	0,1	1
B	1,00E+05	7,46E+04	6,6	42
M	3,00E+03	2,02E+03	0,2	1
Z	1,05E+03	1,18E+03	0,1	<0,5
P	7,63E+04	6,30E+04	5,0	32
ITO	5,12E+04	5,13E+04	3,4	22
Ref	2,57E+04	1,27E+04	1,7	11
Cu	2,38E+05	1,20E+05	15,6	100
SF	6,96E+03	4,94E+03	0,5	3

(Pozn.: SNR – poměr signálu k šumu (signal to noise ratio), SNR: <3 – nedetekováno; 3-10 detekováno a nestanoveno; >10 – stanoveno)

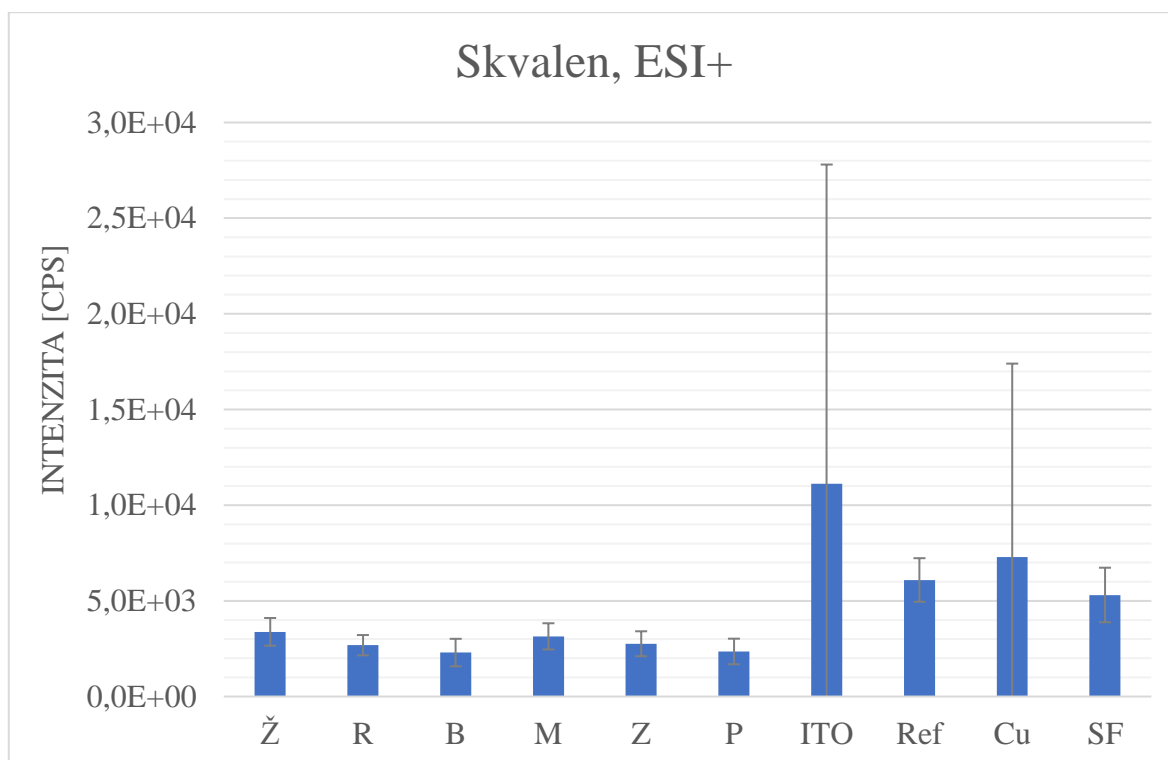


Graf S12 Výsledky analýzy povrchů pro kyselinu palmitovou v APCI- módu

Tabulka S14 Výsledky analýzy skvalenu v ESI+ módu

Označení povrchu	Průměrná intenzita [cps]	Výběrový odhad směrodatné odchylky [cps]	SNR	Normalizovaná intenzita [%]
Ž	3,38E+03	7,25E+02	48,0	30
R	2,69E+03	5,30E+02	30,3	24
B	2,30E+03	7,19E+02	30,5	21
M	3,15E+03	6,85E+02	49,0	28
Z	2,76E+03	6,52E+02	34,6	25
P	2,36E+03	6,69E+02	23,9	21
ITO	1,11E+04	1,67E+04	123,3	100
Ref	6,09E+03	1,14E+03	58,5	55
Cu	7,28E+03	1,01E+04	86,2	66
SF	5,31E+03	1,43E+03	44,4	48

(Pozn.: SNR – poměr signálu k šumu (signal to noise ratio), SNR: <3 – nedetekováno; 3-10 detekováno a nestanoveno; >10 – stanoveno)

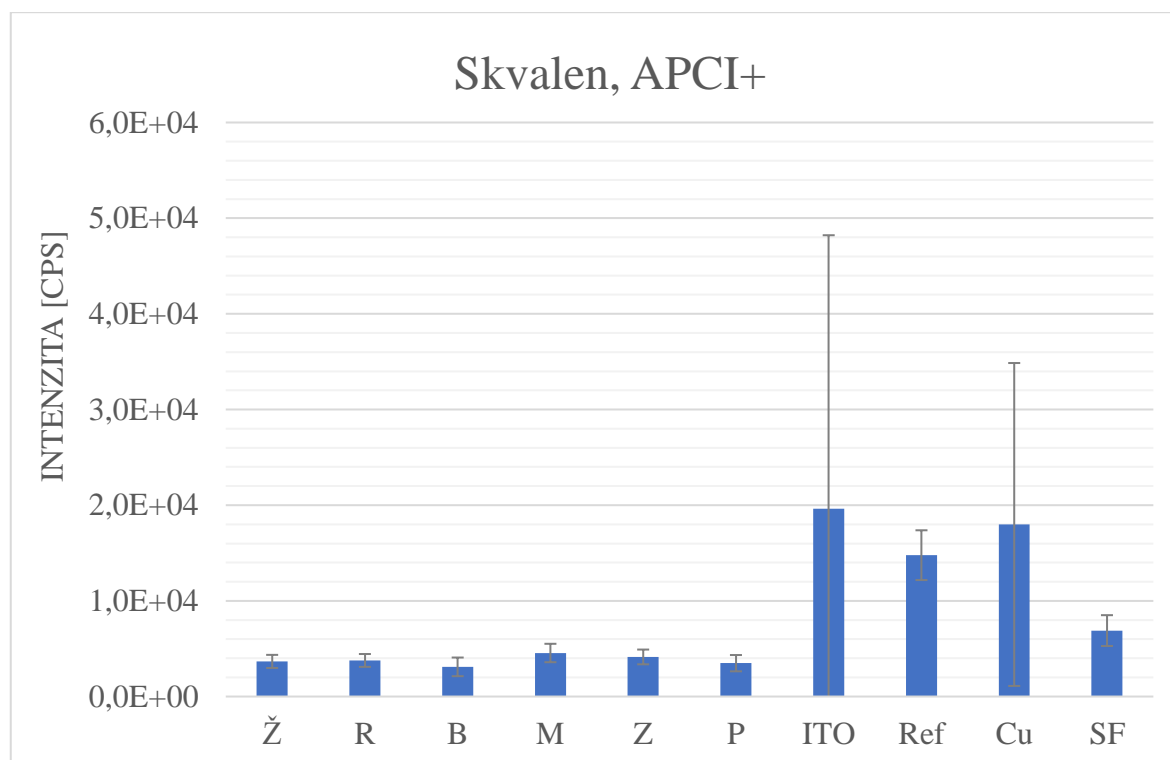


Graf S13 Výsledky analýzy povrchů pro skvalen v ESI+ módu

Tabulka S15 Výsledky analýzy skvalenu v APCI+ módu

Označení povrchu	Průměrná intenzita [cps]	Výběrový odhad směrodatné odchylky [cps]	SNR	Normalizovaná intenzita [%]
Ž	3,67E+03	6,85E+02	73,1	19
R	3,78E+03	6,72E+02	62,0	19
B	3,10E+03	9,75E+02	105,4	16
M	4,55E+03	9,61E+02	105,0	23
Z	4,14E+03	7,71E+02	141,7	21
P	3,49E+03	8,51E+02	80,9	18
ITO	1,96E+04	2,86E+04	621,0	100
Ref	1,48E+04	2,60E+03	223,9	75
Cu	1,80E+04	1,69E+04	242,3	92
SF	6,89E+03	1,61E+03	105,0	35

(Pozn.: SNR – poměr signálu k šumu (signal to noise ratio), SNR: <3 – nedetekováno; 3-10 detekováno a nestanoveno; >10 – stanoveno)

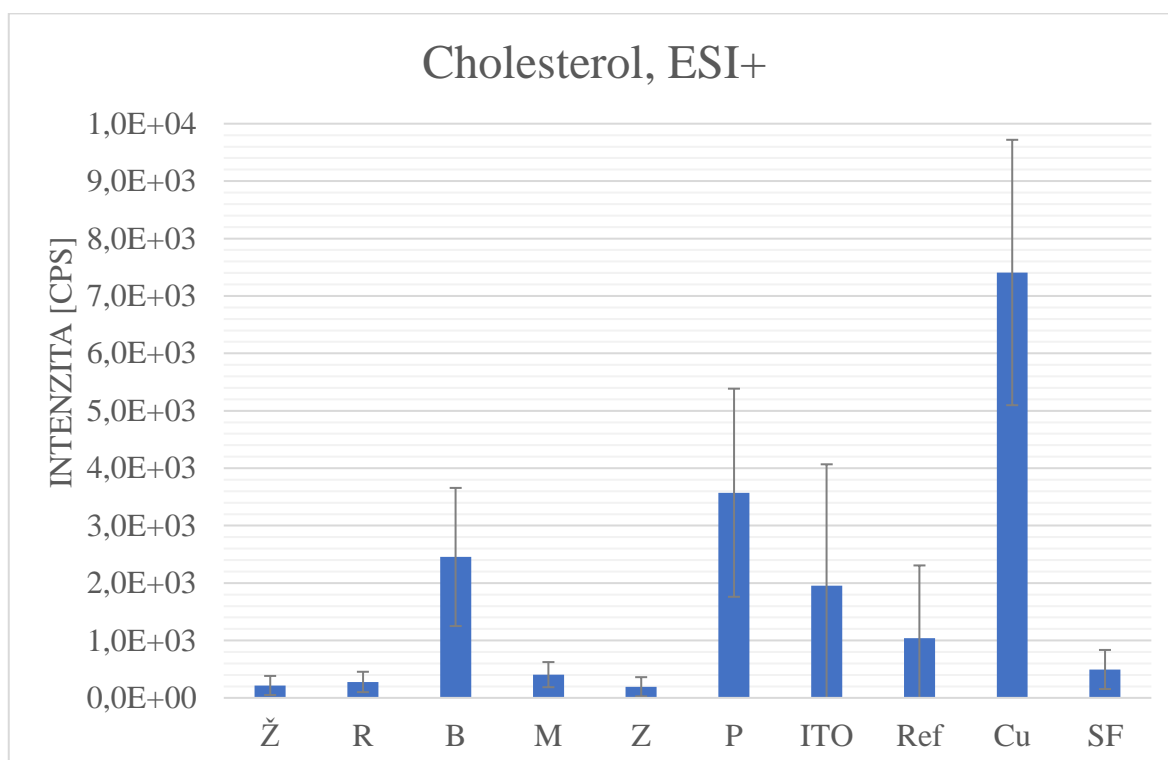


Graf S14 Výsledky analýzy povrchů pro skvalen v APCI+ módu

Tabulka S16 Výsledky analýzy cholesterolu v ESI+ módu

Označení povrchu	Průměrná intenzita [cps]	Výběrový odhad směrodatné odchylky [cps]	SNR	Normalizovaná intenzita [%]
Ž	2,16E+02	1,66E+02	4,5	3
R	2,77E+02	1,77E+02	4,3	4
B	2,45E+03	1,20E+03	45,8	33
M	4,05E+02	2,18E+02	11,2	5
Z	1,94E+02	1,67E+02	6,2	3
P	3,57E+03	1,81E+03	72,6	48
ITO	1,96E+03	2,11E+03	52,8	26
Ref	1,04E+03	1,27E+03	18,3	14
Cu	7,41E+03	2,31E+03	95,4	100
SF	4,94E+02	3,40E+02	10,0	7

(Pozn.: SNR – poměr signálu k šumu (signal to noise ratio), SNR: <3 – nedetekováno; 3-10 detekováno a nestanoveno; >10 – stanoveno)

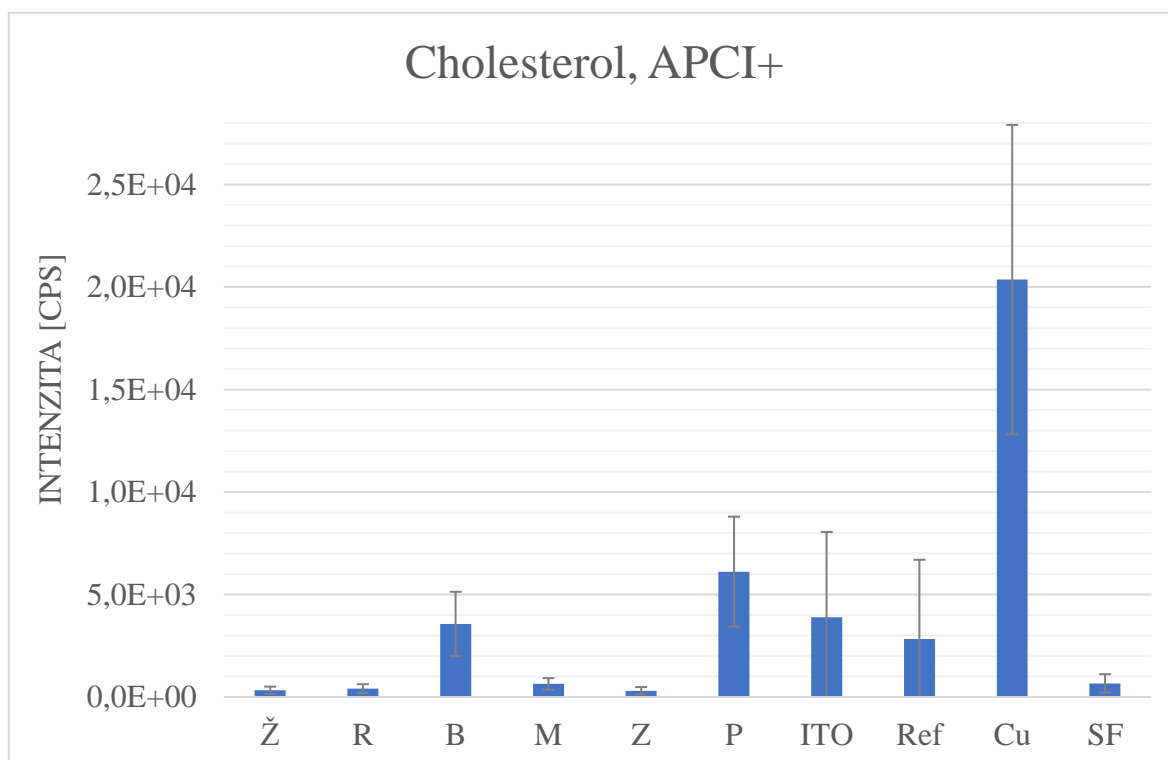


Graf S15 Výsledky analýzy povrchů pro cholesterol v ESI+ módu

Tabulka S17 Výsledky analýzy cholesterolu v APCI+ módu

Označení povrchu	Průměrná intenzita [cps]	Výběrový odhad směrodatné odchylky [cps]	SNR	Normalizovaná intenzita [%]
Ž	3,30E+02	1,79E+02	9,2	2
R	4,16E+02	2,11E+02	14,6	2
B	3,56E+03	1,57E+03	136,7	18
M	6,40E+02	2,83E+02	13,6	3
Z	3,03E+02	1,84E+02	4,9	1
P	6,12E+03	2,68E+03	135,7	30
ITO	3,89E+03	4,17E+03	94,3	19
Ref	2,83E+03	3,86E+03	63,8	14
Cu	2,04E+04	7,55E+03	211,7	100
SF	6,68E+02	4,48E+02	17,7	3

(Pozn.: SNR – poměr signálu k šumu (signal to noise ratio), SNR: <3 – nedetekováno; 3-10 detekováno a nestanoveno; >10 – stanoveno)

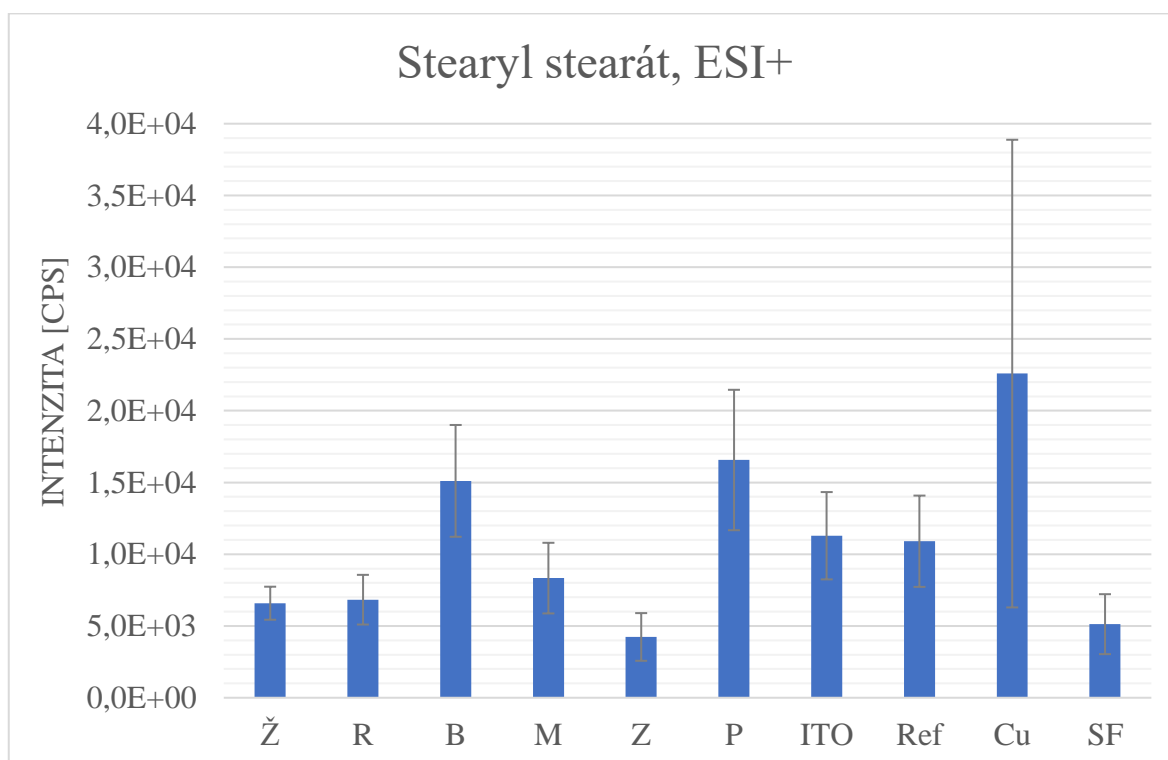


Graf S16 Výsledky analýzy povrchů pro cholesterol v APCI+ módu

Tabulka S18 Výsledky analýzy stearyl stearátu v ESI+ módu

Označení povrchu	Průměrná intenzita [cps]	Výběrový odhad směrodatné odchylky [cps]	SNR	Normalizovaná intenzita [%]
Ž	6,59E+03	1,15E+03	29,6	29
R	6,83E+03	1,73E+03	32,8	30
B	1,51E+04	3,90E+03	99,4	67
M	8,34E+03	2,46E+03	29,7	37
Z	4,24E+03	1,66E+03	16,5	19
P	1,66E+04	4,89E+03	65,0	73
ITO	1,13E+04	3,04E+03	19,6	50
Ref	1,09E+04	3,18E+03	30,3	48
Cu	2,26E+04	1,63E+04	66,4	100
SF	5,13E+03	2,09E+03	17,7	23

(Pozn.: SNR – poměr signálu k šumu (signal to noise ratio), SNR: <3 – nedetekováno; 3-10 detekováno a nestanoveno; >10 – stanoveno)

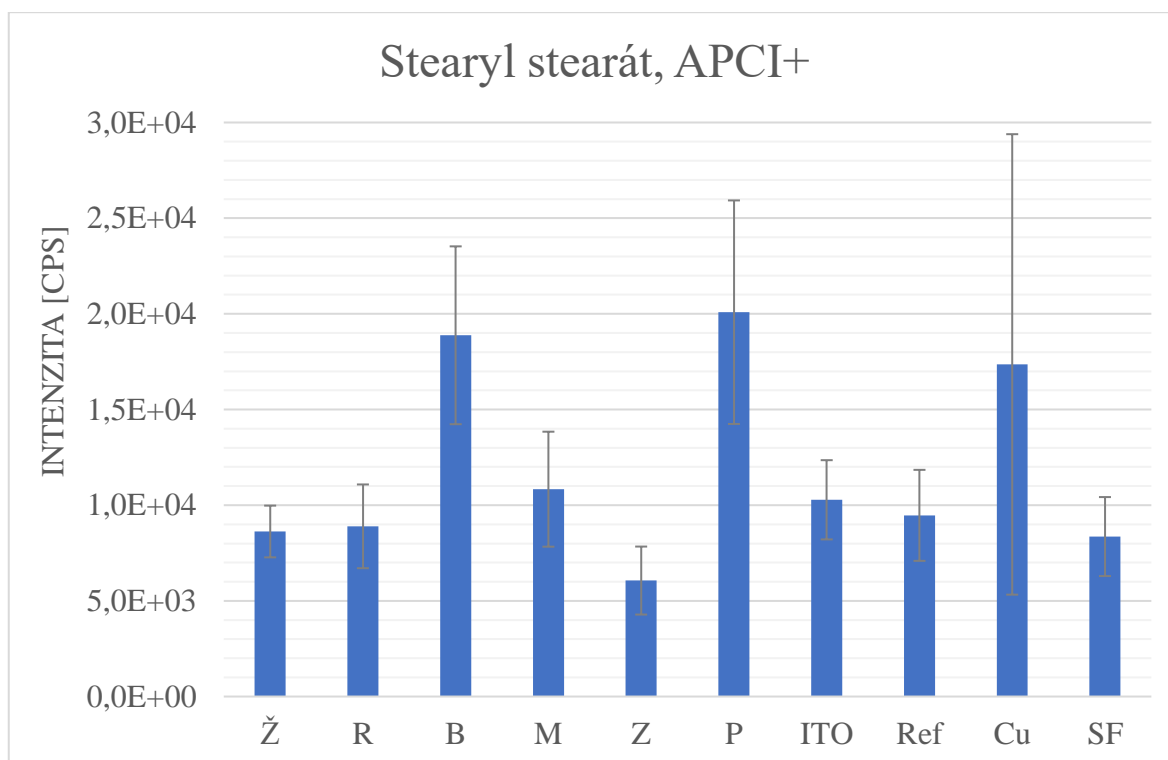


Graf S17 Výsledky analýzy povrchů pro stearyl stearát v ESI+ módu

Tabulka S19 Výsledky analýzy stearyl stearátu v APCI+ módu

Označení povrchu	Průměrná intenzita [cps]	Výběrový odhad směrodatné odchylky [cps]	SNR	Normalizovaná intenzita [%]
Ž	8,63E+03	1,35E+03	72,7	43
R	8,90E+03	2,19E+03	96,7	44
B	1,89E+04	4,65E+03	222,4	94
M	1,08E+04	3,01E+03	134,7	54
Z	6,06E+03	1,78E+03	69,6	30
P	2,01E+04	5,84E+03	226,0	100
ITO	1,03E+04	2,07E+03	115,1	51
Ref	9,47E+03	2,38E+03	83,9	47
Cu	1,74E+04	1,20E+04	197,7	86
SF	8,36E+03	2,06E+03	71,7	42

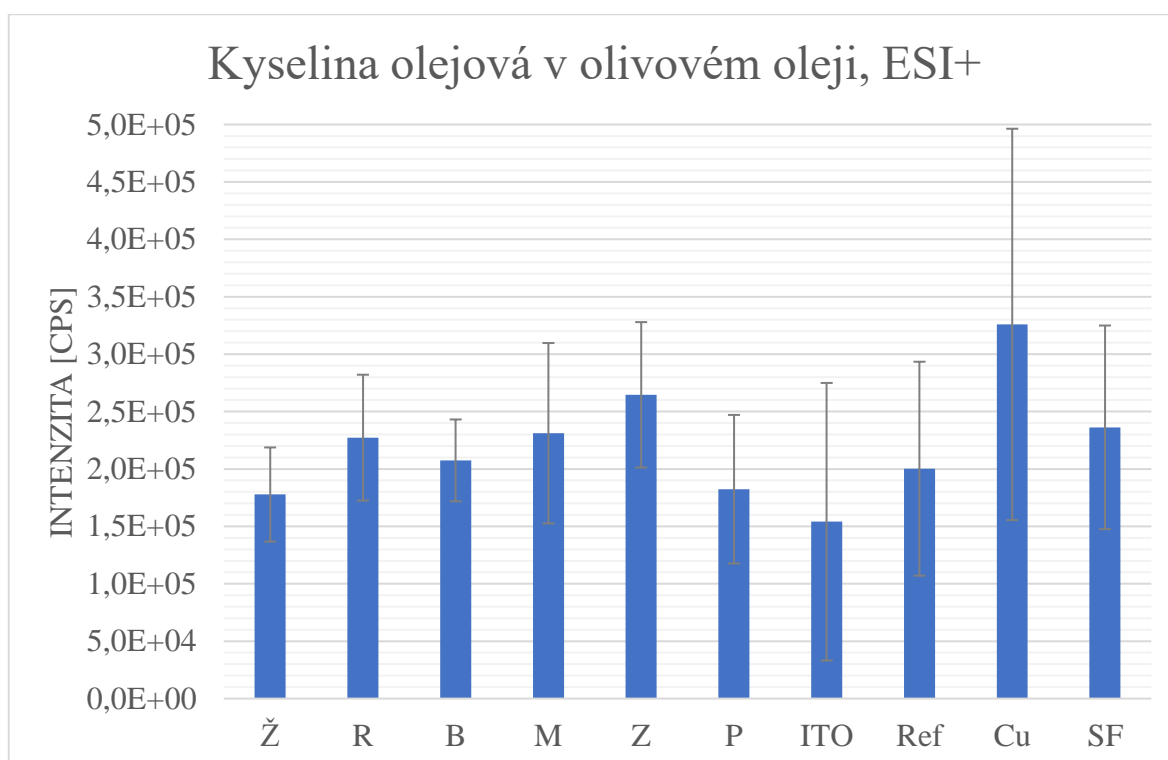
(Pozn.: SNR – poměr signálu k šumu (signal to noise ratio), SNR: <3 – nedetekováno; 3-10 detekováno a nestanoveno; >10 – stanoveno)



Graf S18 Výsledky analýzy povrchů pro stearyl stearát v APCI+ módu

Tabulka S20 Výsledky analýzy kyseliny olejové v olivovém oleji v ESI+ módu

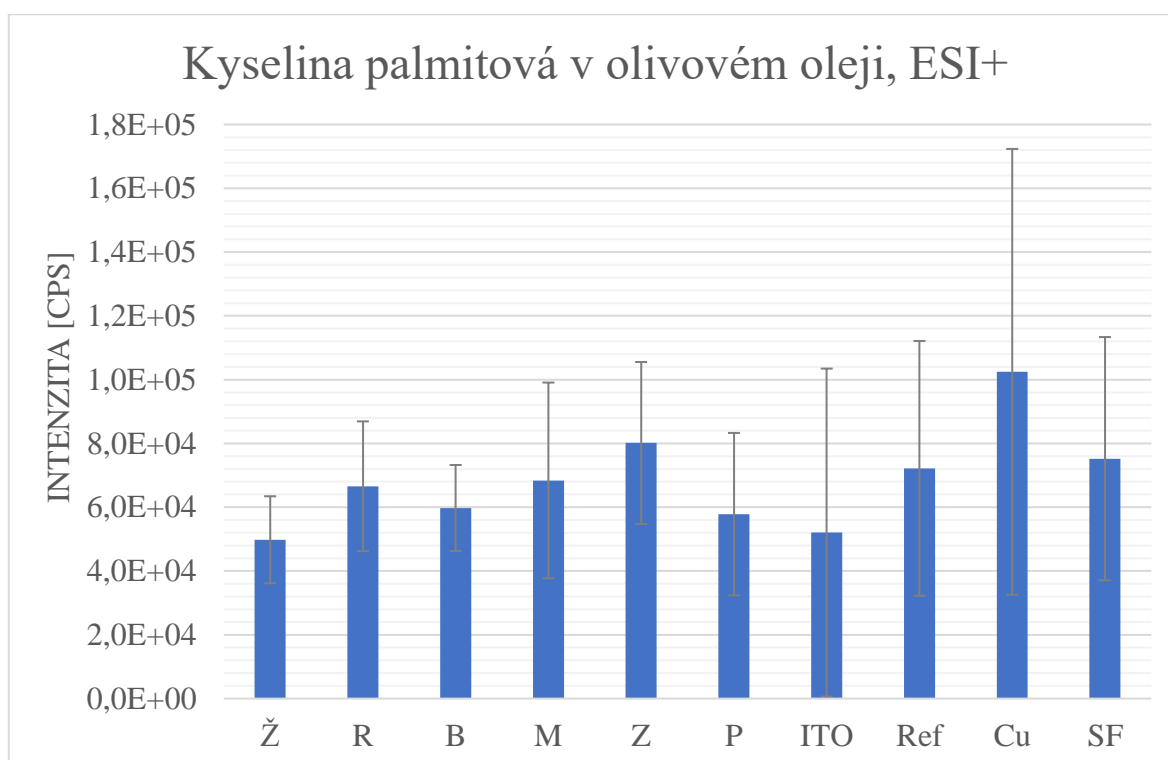
Označení povrchu	Průměrná intenzita [cps]	Výběrový odhad směrodatné odchylky [cps]	Normalizovaná intenzita [%]
Ž	1,78E+05	4,10E+04	55
R	2,27E+05	5,48E+04	70
B	2,07E+05	3,56E+04	64
M	2,31E+05	7,86E+04	71
Z	2,65E+05	6,33E+04	81
P	1,82E+05	6,47E+04	56
ITO	1,54E+05	1,21E+05	47
Ref	2,00E+05	9,32E+04	61
Cu	3,26E+05	1,70E+05	100
SF	2,36E+05	8,87E+04	72



Graf S19 Výsledky analýzy povrchů pro kyselinu olejovou v olivovém oleji v ESI+ módu

Tabulka S21 Výsledky analýzy kyseliny palmitové v olivovém oleji v ESI+ módu

Označení povrchu	Průměrná intenzita [cps]	Výběrový odhad směrodatné odchylky [cps]	Normalizovaná intenzita [%]
Ž	4,98E+04	1,36E+04	49
R	6,66E+04	2,03E+04	65
B	5,98E+04	1,35E+04	58
M	6,84E+04	3,07E+04	67
Z	8,02E+04	2,54E+04	78
P	5,78E+04	2,55E+04	56
ITO	5,21E+04	5,14E+04	51
Ref	7,22E+04	3,99E+04	70
Cu	1,02E+05	6,99E+04	100
SF	7,52E+04	3,81E+04	73



Graf S20 Výsledky analýzy povrchů pro kyselinu palmitovou v olivovém oleji v ESI+ módu

Tabulka S22 Výsledky analýzy DAG [PO-H<sub>2</sub>O+H]<sup>+</sup> v olivovém oleji v ESI+ módu

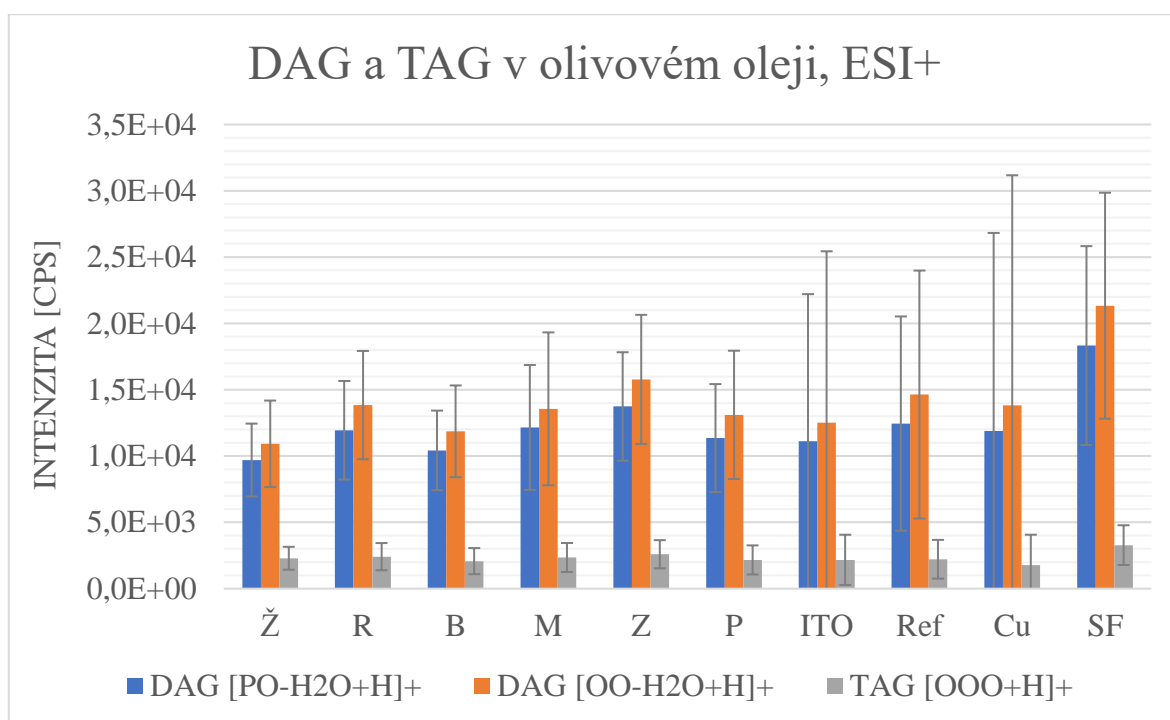
Označení povrchu	Průměrná intenzita [cps]	Výběrový odhad směrodatné odchylky [cps]	Normalizovaná intenzita [%]
Ž	9,70E+03	2,75E+03	53
R	1,19E+04	3,72E+03	65
B	1,04E+04	3,00E+03	57
M	1,22E+04	4,71E+03	66
Z	1,37E+04	4,09E+03	75
P	1,14E+04	4,07E+03	62
ITO	1,11E+04	1,11E+04	61
Ref	1,24E+04	8,08E+03	68
Cu	1,19E+04	1,49E+04	65
SF	1,83E+04	7,50E+03	100

Tabulka S23 Výsledky analýzy DAG [OO-H<sub>2</sub>O+H]<sup>+</sup> v olivovém oleji v ESI+ módu

Označení povrchu	Průměrná intenzita [cps]	Výběrový odhad směrodatné odchylky [cps]	Normalizovaná intenzita [%]
Ž	1,09E+04	3,26E+03	51
R	1,38E+04	4,08E+03	65
B	1,19E+04	3,46E+03	56
M	1,36E+04	5,77E+03	64
Z	1,58E+04	4,87E+03	74
P	1,31E+04	4,84E+03	61
ITO	1,25E+04	1,29E+04	59
Ref	1,46E+04	9,35E+03	69
Cu	1,38E+04	1,73E+04	65
SF	2,13E+04	8,52E+03	100

Tabulka S24 Výsledky analýzy TAG (trielaidin) v olivovém oleji v ESI+ módu

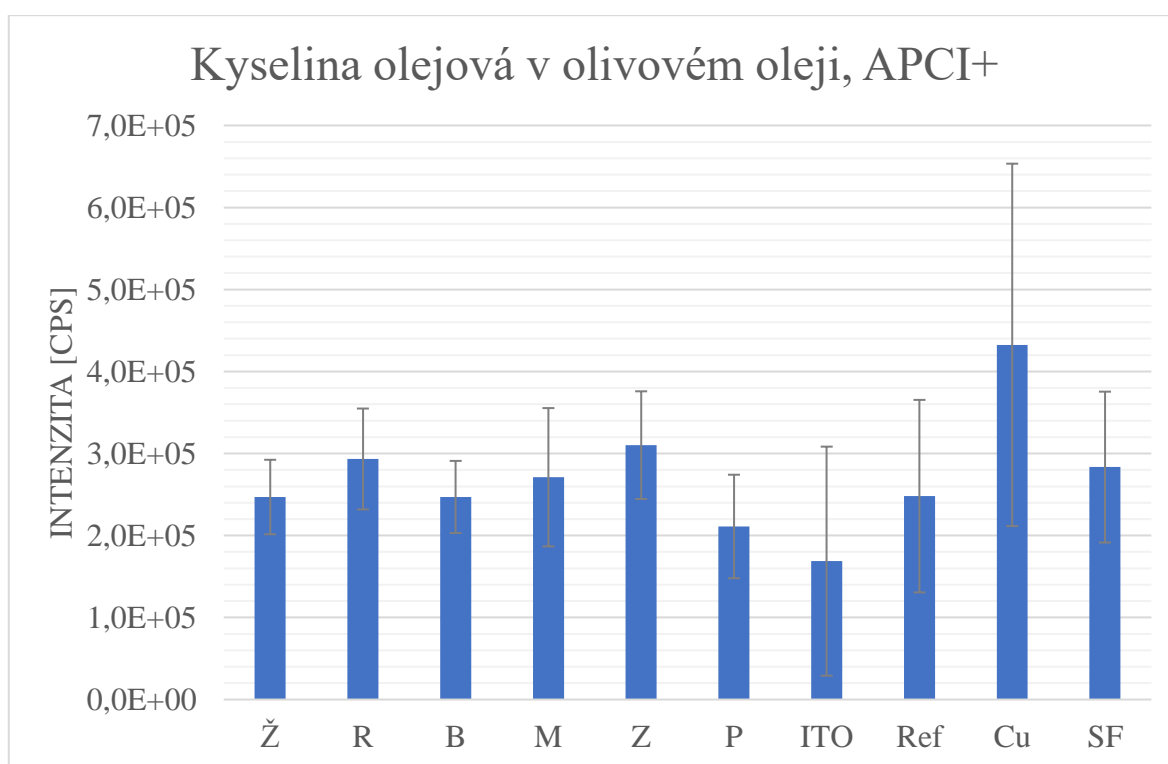
Označení povrchu	Průměrná intenzita [cps]	Výběrový odhad směrodatné odchylky [cps]	Normalizovaná intenzita [%]
Ž	2,29E+03	8,65E+02	70
R	2,41E+03	1,03E+03	73
B	2,08E+03	9,85E+02	63
M	2,35E+03	1,09E+03	72
Z	2,60E+03	1,06E+03	79
P	2,17E+03	1,09E+03	66
ITO	2,17E+03	1,89E+03	66
Ref	2,22E+03	1,46E+03	68
Cu	1,78E+03	2,29E+03	54
SF	3,28E+03	1,50E+03	100



Graf S21 Výsledky analýzy povrchů pro dva DAG a TAG v olivovém oleji v ESI+ módu

Tabulka S25 Výsledky analýzy kyseliny olejové v olivovém oleji v APCI+ módu

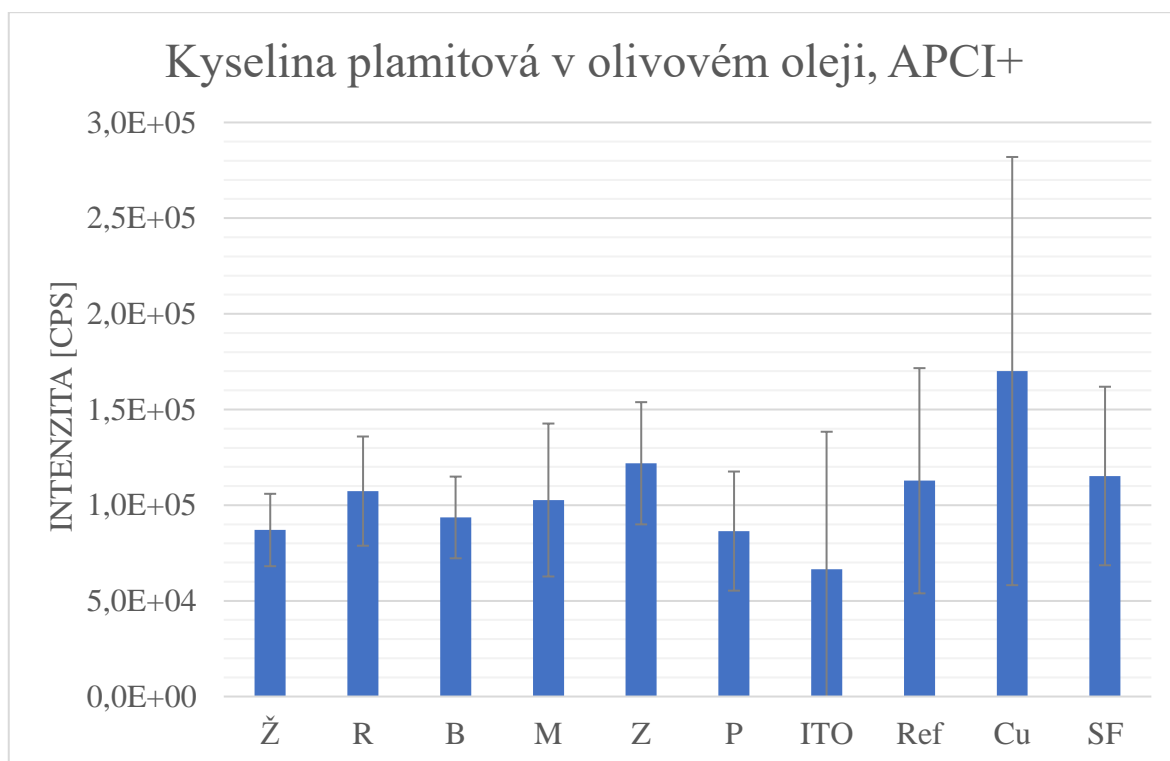
Označení povrchu	Průměrná intenzita [cps]	Výběrový odhad směrodatné odchylky [cps]	Normalizovaná intenzita [%]
Ž	2,47E+05	4,54E+04	57
R	2,93E+05	6,15E+04	68
B	2,47E+05	4,40E+04	57
M	2,71E+05	8,43E+04	63
Z	3,10E+05	6,57E+04	72
P	2,11E+05	6,31E+04	49
ITO	1,69E+05	1,40E+05	39
Ref	2,48E+05	1,17E+05	57
Cu	4,32E+05	2,21E+05	100
SF	2,83E+05	9,20E+04	66



Graf S22 Výsledky analýzy povrchů pro kyselinu olejovou v olivovém oleji v APCI+ módu

Tabulka S26 Výsledky analýzy kyseliny palmitové v olivovém oleji v APCI+ módu

Označení povrchu	Průměrná intenzita [cps]	Výběrový odhad směrodatné odchylky [cps]	Normalizovaná intenzita [%]
Ž	8,70E+04	1,89E+04	51
R	1,07E+05	2,85E+04	63
B	9,36E+04	2,13E+04	55
M	1,03E+05	4,00E+04	60
Z	1,22E+05	3,19E+04	72
P	8,65E+04	3,11E+04	51
ITO	6,65E+04	7,19E+04	39
Ref	1,13E+05	5,88E+04	66
Cu	1,70E+05	1,12E+05	100
SF	1,15E+05	4,67E+04	68



Graf S23 Výsledky analýzy povrchů pro kyselinu palmitovou v olivovém oleji v APCI+ módu

Tabulka S27 Výsledky analýzy DAG [PO-H<sub>2</sub>O+H]<sup>+</sup> v olivovém oleji v APCI+ módu

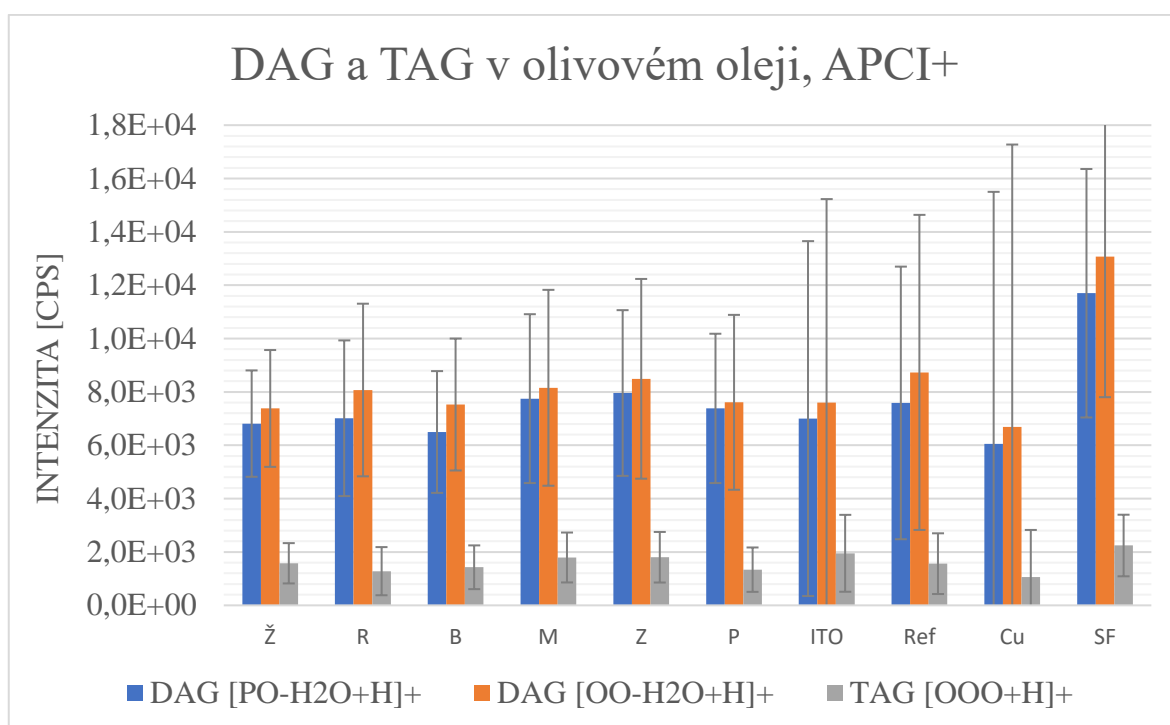
Označení povrchu	Průměrná intenzita [cps]	Výběrový odhad směrodatné odchylky [cps]	Normalizovaná intenzita [%]
Ž	6,81E+03	1,99E+03	58
R	7,01E+03	2,92E+03	60
B	6,50E+03	2,28E+03	56
M	7,75E+03	3,16E+03	66
Z	7,96E+03	3,11E+03	68
P	7,38E+03	2,80E+03	63
ITO	7,00E+03	6,65E+03	60
Ref	7,59E+03	5,11E+03	65
Cu	6,05E+03	9,45E+03	52
SF	1,17E+04	4,66E+03	100

Tabulka S28 Výsledky analýzy DAG [OO-H<sub>2</sub>O+H]<sup>+</sup> v olivovém oleji v APCI+ módu

Označení povrchu	Průměrná intenzita [cps]	Výběrový odhad směrodatné odchylky [cps]	Normalizovaná intenzita [%]
Ž	7,38E+03	2,19E+03	56
R	8,07E+03	3,24E+03	62
B	7,53E+03	2,47E+03	58
M	8,16E+03	3,67E+03	62
Z	8,49E+03	3,74E+03	65
P	7,61E+03	3,28E+03	58
ITO	7,60E+03	7,63E+03	58
Ref	8,73E+03	5,91E+03	67
Cu	6,69E+03	1,06E+04	51
SF	1,31E+04	5,26E+03	100

Tabulka S29 Výsledky analýzy TAG (trielaidin) v olivovém oleji v APCI+ módu

Označení povrchu	Průměrná intenzita [cps]	Výběrový odhad směrodatné odchylky [cps]	Normalizovaná intenzita [%]
Ž	1,58E+03	7,56E+02	70
R	1,28E+03	9,03E+02	57
B	1,43E+03	8,20E+02	64
M	1,80E+03	9,35E+02	80
Z	1,80E+03	9,48E+02	80
P	1,34E+03	8,32E+02	60
ITO	1,95E+03	1,44E+03	87
Ref	1,56E+03	1,14E+03	70
Cu	1,07E+03	1,76E+03	48
SF	2,24E+03	1,15E+03	100



Graf S 24 Výsledky analýzy povrchů pro dva DAG a TAG v olivovém oleji v APCI+ módu