

NANOMATERIAŁY STOSOWANE W SPEKTROMETRII MAS Z LASEROWĄ DESORPCJĄ/JONIZACJĄ WSPOMAGANĄ POWIERZCHNIĄ

NANOMATERIALS APPLIED IN SURFACE-ASSISTED LASER DESORPTION/IONIZATION MASS SPECTROMETRY

Adrian Arendowski

*Interdyscyplinarne Centrum Nowoczesnych Technologii,
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
ul. Wileńska 4, 87-100 Toruń
e-mail: adrian@arendowski.hub.pl*

Abstract

Wykaz stosowanych symboli i oznaczeń

Wprowadzenie

1. Laserowa desorpcja/jonizacja wspomagana powierzchnią
2. Nanomateriały stosowane w SALDI MS
 - 2.1. Nanomateriały na bazie węgla
 - 2.2. Nanomateriały na bazie krzemu
 - 2.3. Nanomateriały na bazie złota
 - 2.4. Nanomateriały na bazie srebra
 - 2.5. Nanomateriały na bazie platyny
 - 2.6. Nanomateriały na bazie tlenku tytanu (IV)
 - 2.7. Inne nanomateriały

Uwagi końcowe

Piśmiennictwo cytowane

Dr inż. Adrian Arendowski Absolwent studiów inżynierskich i magisterskich z biotechnologii na Wydziale Chemicznym Politechniki Rzeszowskiej im. Ignacego Łukasiewicza. Doktorat w dziedzinie nauk inżyneryjno-technicznych w dyscyplinie inżynieria chemiczna obronił z wyróżnieniem w roku 2021 również na Politechnice Rzeszowskiej. Bezpośrednio po doktoracie podjął pracę w Instytucie Nauk Medycznych Uniwersytetu Rzeszowskiego, obecnie zatrudniony na stanowisku adiunkta w Interdyscyplinarnym Centrum Nowoczesnych Technologii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu. Laureat V edycji programu “Diamentowy Grant”. Stypendysta Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z roku 2015 oraz Fundacji im. Czesława M. Rodkiewicza z 2020 roku. W kręgu jego zainteresowań naukowych leżą metody bezmatrycowe do laserowej spektrometrii mas, metabolomika i lipidomika.



<https://orcid.org/0000-0002-8496-6800>

ABSTRACT

Laser desorption/ionization (LDI) is one of the most popular ionization techniques currently used in mass spectrometry (MS). This technique is most commonly used in a variant of matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI), which uses low molecular weight organic acid mixed with the sample to support the ionization process. However, this approach has some shortcomings such as: high chemical background in the spectral region below m/z 700 making it difficult to analyze compounds giving signals in this spectral region, inhomogeneous co-crystallization of analyte and matrix leading to the formation of so-called "sweet spots", i.e. inhomogeneous distribution of analyte in the crystallizing matrix. For these reasons, increasing research attention is focused on the possibilities offered by the use of matrix-free systems based on nanostructures in laser methods, which are referred to as surface-assisted laser desorption/ionization (SALDI). The use of nanostructures in LDI MS has made it possible to analyze low molecular compounds, often at very low concentrations, without the presence of matrix-derived chemical background, contributing to more applications of the LDI MS method.

This work describes what the SALDI technique is and reviews the nanomaterials used in different variations of the approach. Among the described materials used in SALDI there are nanomaterials based on carbon and silicon, including the DIOS method, as well as techniques based on nanoparticles of gold, silver, platinum and titanium oxide. For each method, application examples are given for the detection of different classes of chemical compounds, often also in complex biological mixtures.

Keywords: laser desorption/ionization, mass spectrometry, matrix-free methods, nanoparticles, SALDI

Słowa kluczowe: laserowa desorpcja/jonizacja, metody bezmatrycowe, nanocząstki, SALDI, spektrometria mas

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

| | |
|------------|---|
| AgNPET | – płytka wzbogacona nanocząstkami srebra (<i>ang. Silver Nanoparticle-Enhanced Target</i>) |
| AuNPET | – płytka wzbogacona nanocząstkami złota (<i>ang. Gold Nanoparticle-Enhanced Target</i>) |
| CNTs | – nanorurki węglowe (<i>ang. Carbon Nanotubes</i>) |
| DIOS | – desorpcja/ionizacja na krzemie (<i>ang. Desorption/Ionization On Silicon</i>) |
| LDI | – desorpcja/ionizacja laserowa (<i>ang. Laser Desorption/Ionization</i>) |
| LMW | – mała masa cząsteczkowa (<i>ang. Low Molecular Weight</i>) |
| LOD | – granica wykrywalności (<i>ang. Limit of Detection</i>) |
| MALDI | – laserowa desorpcja/ionizacja wspomagana matrycą (<i>ang. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization</i>) |
| MS | – spektrometria mas (<i>ang. Mass Spectrometry</i>) |
| <i>m/z</i> | – stosunek masy do niesionego ładunku |
| NFs | – nanokwiaty (<i>ang. Nanoflowers</i>) |
| NPs | – nanocząstki (<i>ang. Nanoparticles</i>) |
| NWs | – nanodruty (<i>ang. Nanowires</i>) |
| PVD | – fizyczne osadzanie z fazy gazowej (<i>ang. Physical Vapour Deposition</i>) |
| SALDI | – laserowa desorpcja/ionizacja wspomagana powierzchnią (<i>ang. Surface-Assisted Laser Desorption/Ionization</i>) |
| SEM | – skaningowy mikroskop elektronowy (<i>ang. Scanning Electron Microscope</i>) |
| TLC | – chromatografia cienkowarstwowa (<i>ang. Thin Layer-Chromatography</i>) |
| UV | – promieniowanie ultrafioletowe |

WPROWADZENIE

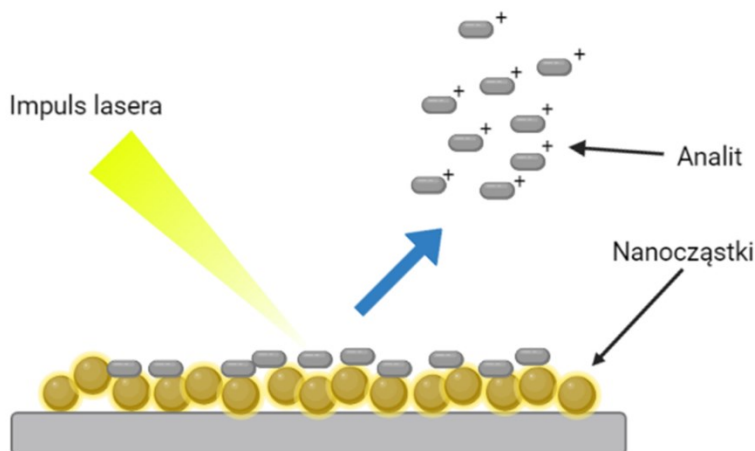
Spektrometria mas z laserową desorpcją/ionizacją wykorzystuje wiązkę lasera do wytwarzania jonów w fazie gazowej. Zogniskowane na powierzchni próbki nanosekundowe impulsy lasera powodują jej desorpcję oraz jonizację cząsteczek analitu. W spektrometrach stosowane są lasery dające światło w zakresie długości fal od ultrafioletu, przez światło widzialne, aż po podczerwień.

Metody laserowej desorpcji/ionizacji są szeroko rozpowszechnionymi technikami stosowanymi w spektrometrii mas. Swoją popularność zawdzięczają przede wszystkim stosunkowo łatwemu przygotowaniu próbki oraz braku, bądź niewielkiej fragmentacji analitu. Technika ta jest najczęściej stosowana w wariantcie wspomaganą matrycą laserowej desorpcji/ionizacji (MALDI), który do wspomaganie procesu jonizacji wykorzystuje niskocząsteczkowy kwas organiczny zmieszany z próbką. Podejście to ma jednak pewne niedoskonałości takie jak: wysokie tło chemiczne w rejonie widma poniżej m/z 700 utrudniające analizowanie związków dających sygnały w tym obszarze widma, niejednorodna współkrystalizacja analitu i matrycy prowadząca do powstawania tzw. „sweet spots”, czyli niejednorodnego rozmieszczenia analitu w krystalizującej matrycy. Z tych powodów coraz większa uwaga badaczy skupia się na możliwościach, jakie daje wykorzystanie w metodach laserowych układów bezmatrycowych opartych o nanostrukturę, które określane są mianem laserowej desorpcji/ionizacji wspomaganą powierzchnią (SALDI).

Celem tej pracy jest przegląd nanomateriałów stosowanych w metodach SALDI MS.

1. LASEROWA DESORPCJA/JONIZACJA WSPOMAGANA POWIERZCHNIĄ

Wspomagana powierzchnią laserowa desorpcja/ionizacja (*ang. Surface-Assisted Laser Desorption/Ionization*, SALDI) to odmiana laserowej spektrometrii mas, w której powszechnie używane w MALDI matryce organiczne zastąpiono nanomateriałami [1]. Według definicji IUPAC – laserowa desorpcja/ionizacja wspomaganą powierzchnią to grupa metod bezmatrycowych stosowanych w analizie MS cząsteczek pochodzenia biologicznego [2]. W przypadku SALDI powierzchnia składająca się z różnego rodzaju nanostruktur spełnia podobną rolę do matrycy w technice MALDI, tj. pochłania światło wiązki laserowej i przenosi jej energię na substancję badaną, która ulega ablacji i jonizacji z powierzchni (Rysunek 1). Zadaniem nanostruktur jest również ochrona próbki przed bezpośrednim uderzeniem lasera, co mogłoby doprowadzić do fragmentacji analitu [3].



Rysunek 1. Schemat eksperymentu SALDI MS
Figure 1. Scheme of the SALDI MS experiment

O wspomaganej powierzchni LDI po raz pierwszy wspomnieli Jan Sunner, Edward Dratz i Yu-Chie Chen w artykule z roku 1995 [4]. Zastosowany w badaniach układ aktywny składał się z cząstek grafitu o wielkości 2-150 μm zawieszonych w glicerolu. Widma MS wykonane przez autorów charakteryzowały się obecnością małego tła chemicznego, dlatego też podobne metody oparte o nanocząstki z powodzeniem zaczęto stosować w analizie związków o małych masach cząsteczkowych (*ang. Low Molecular Weight, LMW*).

Oprócz mniejszego tła chemicznego do niewątpliwych zalet SALDI można również zaliczyć: łatwe przygotowanie próbki, dużą szybkość analizy oraz możliwość badania związków o masach w zakresie poniżej 1000 Da.

W przeciągu ostatnich lat powstało wiele różnych typów powierzchni, które znalazły zastosowanie w SALDI MS. Powierzchnie te stworzono w oparciu o nanocząstki metali, ich tlenków, jak również węgla i krzemu [5]. Nanomateriały stosowane w laserowej spektrometrii mas zostały bardziej szczegółowo opisane w kolejnych rozdziałach.

2. NANOMATERIAŁY STOSOWANE W SALDI MS

2.1. NANOMATERIAŁY NA BAZIE WĘGLA

Materiałem węglowym, od którego swój początek wzięła laserowa desorpcja

/jonizacja wspomagana powierzchnią był grafit. W cytowanym wcześniej artykule Sunner i współautorzy zastosowali cząstki grafitu o średnicy 2-150 μm zawieszona w glicerolu w analizie peptydów i białek [4].

Kolejnym materiałem były mikrometrowej wielkości proszki węgla aktywnego, które nałożono na płytkę do TLC. Tak przygotowany układ generował małe tło chemiczne w rejonie niskiego m/z i skutecznie jonizował zarówno małe związki organiczne, jak i peptydy, łącząc jednocześnie rozdział związków metodą chromatografii cienkowarstwowej oraz ich detekcję za pomocą spektrometrii mas [6].

Alternatywą dla matryc organicznych stosowanych w MALDI stały się także nanorurki węglowe (*ang. Carbon Nanotubes*, CNTs). Spełniają one swoją rolę silnie absorbując i przekazując energię niesioną przez impuls laserowy na analit. Grupa badawcza Gao zastosowała CNTs w analizie mono- i disacharydów z ich roztworów wodnych oraz w próbkach moczu. Uzyskane wyniki pokazały, że CNTs generują niskie tło chemiczne, a granica wykrywalności metody osiągnięta dla fruktozy wynosiła zaledwie 5 attomoli [7].

Zdolność do absorbowania światła laserowego w zakresie UV przez kolejne materiały węglowe takie jak diamentopodobny węgiel amorficzny oraz nanodrutu diamentowe domieszkowane borem wykorzystywano w LDI MS. Diamentopodobny węgiel wydajnie przenosił energię niesioną przez laser na badane związki chemiczne i umożliwił powtarzalną analizę szerokiej gamy związków testowych, którymi były aminokwasy, cukry, peptydy oraz kwasy tłuszczowe [8]. Laserowa desorpcja/jonizacja związków niskocząsteczkowych z powierzchni nanodrutów diamentowych domieszkowanych borem pozwoliła na skuteczną ich analizę w spektrometrze mas z granicą wykrywalności na poziomie 200 $\text{zmol}/\mu\text{l}$, zaś peptydy oznaczono już w ilościach femtomolowych [9].

Jednym z najnowszych osiągnięć naukowych dotyczącym metod bezmatrycowych jest możliwość zastosowania grafenu jako powierzchni aktywnej w LDI MS. Ze względu na bardzo dobre parametry absorpcji promieniowania świetlnego z powierzchni grafenu dochodzi do wydajnej jonizacji analitów, również przy zastosowaniu niskich energii lasera. Wykorzystanie tego materiału w analizach MS pozwoliło na uproszczenie procedury przygotowania próbki oraz poprawienie powtarzalności pomiarów. Na widmach podłoże z grafenu wykazywało niewielkie tło chemiczne, co pozwoliło na analizę małych cząsteczek [10]. Nanopłatki (*ang. Nanoflakes*) grafenu posłużyły jako układ aktywny do analizy lipidów wyekstrahowanych z hodowli komórek raka piersi i komórek niezmiennych nowotworowo, dając dobrej jakości widmo masowe bez tła chemicznego [11]. Rozwinięciem wdrożenia grafenu jako matrycy w LDI było zastosowanie „nanościan” (*ang. Nanowalls*) węglowych stworzonych z arkuszy grafenu ułożonych

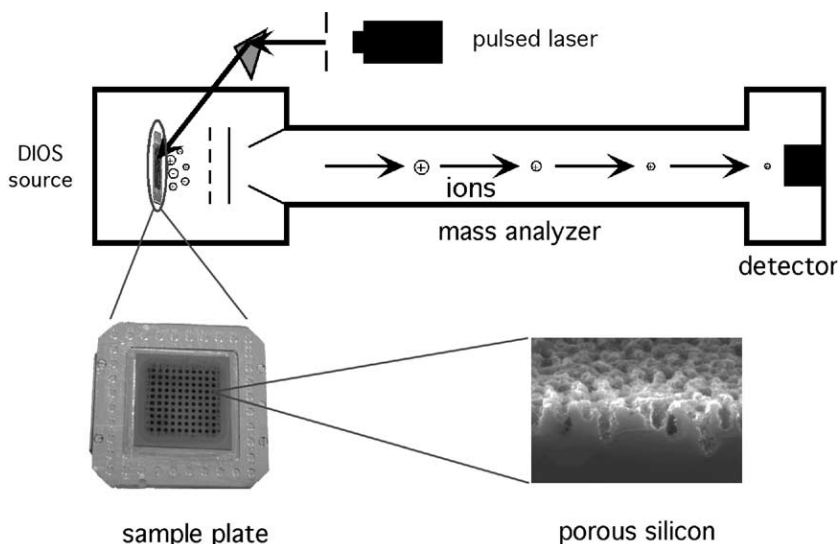
ponowo względem płytki. Przyciągnęły one uwagę badaczy ze względu na wysoką wytrzymałość mechaniczną i bardzo dobrą absorpcję promieniowania świetlnego, a hydrofobowość tych nanostruktur zapewniła łatwe osadzanie analitu na płytce. W pomiarach MS z ich powierzchni zostały osiągnięte granice wykrywalności na poziomie piko- i femtomolowym dla różnych grup związków o zastosowaniu klinicznym lub przemysłowym, takich jak kwasy tłuszczowe, lipidy, sacharydy i peptydy. Ponadto metodykę tę zastosowano także do ilościowego oznaczania glukozy we krwi oraz napojach [12].

Kolejnym przykładem nanomateriału na bazie węgla zastosowanego w laserowej spektrometrii mas są nanokropki węglowe, które testowano w oznaczaniu aminokwasów, peptydów, kwasów tłuszczowych, oligosacharydów i polimerów, osiągając granicę wykrywalności na poziomie 0,2 fmola dla kwasu oktadekanowego. Ponadto autorzy badań użyli nanokropek węglowych do wykrywania ilościowego glukozy we krwi i kwasu moczowego w ludzkim moczu [13].

2.2. NANOMATERIAŁY NA BAZIE KRZEMU

Jedną z najważniejszych metod zaliczanych do SALDI opartych o nanostruktury krzemowe jest DIOS (*ang. Desorption/Ionization On Silicon*). Została ona opracowana w 1999 roku przez Wei i współpracowników stając się pierwszą całkowicie wolną od matrycy techniką LDI MS [14]. W tej metodzie analit nanoszony jest na powierzchnię porowatego krzemu (Rysunek 2), uzyskanego z płaskiego kawałka krystalicznego krzemu w procesie trawienia chemicznego bądź elektrochemicznego. Tak spreparowana porowata powierzchnia posiada wysoki współczynnik absorpcji promieniowania ultrafioletowego, a pochłoniętą energię jest w stanie przekazać na cząsteczki analitu, doprowadzając do jego przejścia w stan gazowy oraz jonizacji [15]. Cechą charakterystyczną płytki DIOS jest duża powierzchnia właściwa, która może dochodzić nawet do kilkuset metrów kwadratowych na gram [16]. Wytrawiona powierzchnia krzemu jest hydrofobowa, dlatego w analizach DIOS MS używane są rozpuszczalniki polarne takie jak woda bądź metanol. Roztwór analitu w takim rozpuszczalniku po osadzeniu na płycie zajmuje niewielki obszar oraz penetruje pory krzemu, co korzystnie wpływa na pomiar w spektrometrze [14]. Metodę desorpcji/jonizacji na krzemie używano do analizy MS związków chemicznych o masach w przedziale od 150 do 12000 Da. Przebadano nią między innymi glikolipidy, peptydy, cukry [14], kwasy tłuszczowe [17] oraz większe cząsteczki takie jak białka [18]. Najlepsze rezultaty w pomiarach DIOS osiągnane są dla analitów poniżej 3000 Da, a niewielkie tło chemiczne obserwowane w rejonie niskiego m/z sprawia, że technika ta może być dobrym

wyborem dla związków niskocząsteczkowych [16]. Badacze donoszą, iż DIOS MS pozwala na wykrycie femto-, a nawet attomolowych ilości badanego związku [14].



Rysunek 2. Schemat analizy DIOS MS. Przedrukowano za zezwoleniem W. G. Lewis, Z. Shen, M. G. Finn, G. Siuzdak, *International Journal of Mass Spectrometry*, 2003, 226, 107 [18]. Wszelkie prawa (2002) należą do Elsevier Science B.V.

Figure 2. Scheme of the DIOS MS analysis. Reprinted with permission from W. G. Lewis, Z. Shen, M. G. Finn, G. Siuzdak, *International Journal of Mass Spectrometry*, 2003, 226, 107 [18]. Copyright 2002 Elsevier Science B.V.

Jako przykłady innych materiałów na bazie krzemu wykorzystywanych w pomiarach LDI MS można wymienić nanocząstki krzemowe. Testowany materiał zawierał cząstki krzemu o wielkościach od 5 do 50 nm, spośród których najlepsze wyniki uzyskano przy zastosowaniu nanocząstek Si o średnicy 30 nm. Pomiarzy MS przeprowadzone zarówno w trybie jonów ujemnych, jak i dodatnich dla peptydów, zasad azotowych, nukleotydów i lipidów wykazały dobre granice wykrywalności oraz niski poziom szumów. Nanocząstki krzemowe posiadały dużą tolerancję na obecność soli w próbce badanej, a także wydajnie pochłaniały promieniowanie ultrafioletowe [19].

Kim i współautorzy zastosowali cienką warstwę amorficznego krzemu o grubości 100 nm do różnicowania dziewięciu gatunków bakterii na podstawie profilowania lipidów. Uzyskane wyniki poddali analizie statystycznej, która pozwoliła na skuteczne odróżnienie poszczególnych gatunków. Dla porównania wykonali także podobne analizy używając matryc krystalicznych w MALDI. Uzyskane przez nich wyniki wykazały, że sygnały lipidów uzyskane na widmach

masowych z zastosowaniem amorficznego krzemu są średnio 1,6-raza wyższe niż w eksperymencie MALDI MS, a przy tym próbki naniesione na warstwy krzemu mają bardziej równomierny rozkład, bez tzw. „sweet spot”, co zapewnia dużą powtarzalność pomiarów [20].

Płytki z nanodrutów krzemowych (SiNWs) funkcjonalizowanych nanocząstkami srebra wykorzystano do analizy składu olejów roślinnych. Połączenie hydrofobowości i wydajnej absorpcji promieniowania UV przez SiNWs ze zdolnością AgNPs do kationizowania badanych związków pozwoliło na uzyskanie sygnałów na widmach MS od typowych nienasyconych składników żywności takich jak skwalen, czy kwas oleinowy [21].

Grupa badawcza Vertesa wielokrotnie przedstawiała możliwości płynące z zastosowania w LDI MS tablic z nanosłupkami (*ang. Nanopost*) krzemowymi. Technikę tę zastosowali między innymi do analizy metabolitów w ekstraktach komórkowych i ludzkim moczu, a wyniki porównano z rezultatami uzyskanymi metodą MALDI. Autorzy wykazali, że pomiary z nanosłupków krzemu pozwoliły na wykrycie większej ilości metabolitów w badanych próbkach. W eksperymencie sprawdzili także możliwość ilościowego oznaczania kreatyny w moczu. Dodając do próbki znakowany izotopowo wzorzec, skonstruowali krzywą kalibracyjną dla oznaczanego związku, a odczytane z niej stężenie było zgodne z literaturowym [22]. Podobna metodyka została zastosowana do analizy ludzkiej surowicy krwi, w której udało się wykryć ponad 300 różnych związków w tym aminokwasy, nukleotydy, węglowodany i lipidy [23].

2.3. NANOMATERIAŁY NA BAZIE ZŁOTA

Nanostruktury złota są najczęściej wykorzystywanymi nanomateriałami w spektrometrii mas z laserową desorpcją/ionizacją. Nanocząstki złota (AuNPs) posiadają bardzo wysoki współczynnik absorpcji promieniowania powyżej 400 nm, co jest spowodowane ich dużą powierzchnią właściwą. Ze względu na chemiczną obojętność i biogodność - złoto może być wykorzystywane w badaniach biologicznych nie wpływając przy tym na cząsteczki analitu. Otrzymywanie nanostruktur złota jest stosunkowo łatwe, istnieje też wiele możliwości modyfikacji ich powierzchni [24].

Początkowo nanocząstki złota stosowano jako sondy do ekstrakcji i zateżniania próbek przed pomiarami MALDI. AuNPs selektywnie łączą się z grupami tiolowymi, dlatego były stosowane do wyodrębniania i wzbogacania związków zawierających tę grupę funkcyjną. Przykładem może być zastosowanie magnetycznych koniugatów nanocząstek złota o średnicy 2 nm jako sond do prekoncentracji krótkich peptydów, co umożliwiło ich wykrywanie z bardzo dobrymi wartościami LOD [25]. AuNPs były również używane w tzw. matrycach binarnych,

jako dodatek do konwencjonalnej matrycy stosowanej w MALDI, zapewniając wydajne przenoszenie energii impulsu laserowego i jonizację analitu, co dawało nawet 35-krotne wzmocnienie sygnałów na widmach MS [25].

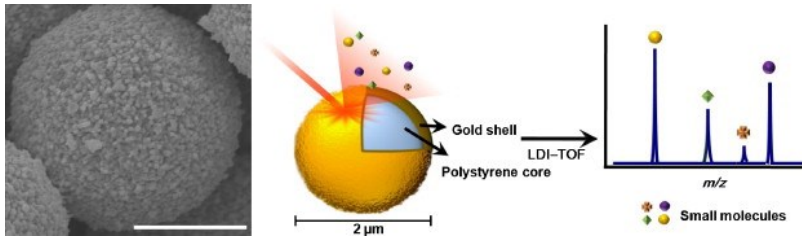
Grupa Russella opublikowała w 2005 roku artykuł, w którym jako pierwsza przedstawiła zastosowanie nanocząstek złota o wielkości od 2 do 10 nm do jonizacji peptydów w laserowej spektrometrii mas bez udziału matrycy [26]. Od tego czasu można zauważyć wzrost liczby publikacji w tematyce zastosowań nanostruktur złotych w spektrometrii mas z laserową desorpcją/jonizacją, bowiem wcześniej przygotowanie AuNPs o wąskiej dyspersji wielkości było kosztowne i kłopotliwe.

Wśród wielu metod LDI MS z wykorzystaniem nanocząstek złota można znaleźć takie, w których nanostruktury złota osadzano na materiałach polimerowych. Przykładem takiego podejścia jest nanokompozyt złożony z miceli kopolimeru styrenu z jodkiem N-metylo-4-winylopirydyniowym oraz AuNPs z cytrynianem amonu, który zagregowano na podłożu krzemowym. Materiał ten zastosowano do jonizacji peptydów przy obecności niewielkiego tła chemicznego na widmach masowych [27].

Podobną metodykę wykorzystano, tworząc wielowarstwową folię z AuNPs i poli(chlorowodoru alliloaminy) ułożonych na płycie krzemowej. Przy pięciu poziomach warstw polimer/AuNPs udało się efektywnie zjonizować małe cząsteczki w bardzo niskich stężeniach, rzędu 10^{-10} mg/ml dla pirenu [28].

Rozwinięciem metod osadzania nanostruktur złota na materiałach polimerowych było wytworzenie mikropowłoki złota opłaszczającej rdzeń polistyrenowy. Uzyskane nanostruktury złota miały rozmiar około 20 nm, przy 2 μm średnicy całej cząstki (Rysunek 3). Tak spreparowane struktury z powodzeniem zastosowano w pomiarach związków niskocząsteczkowych takich jak sacharydy, aminokwasy i peptydy, a uzyskane wyniki charakteryzowały się bardzo dobrymi granicami wykrywalności i wysokim stosunkiem sygnału do szumu [29].

Interesującą techniką jest zaproponowana przez Li i współpracowników desorpcja/jonizacja na membranie celulozowej modyfikowanej nanocząstkami złota. Autorzy zastosowali opracowaną metodę do wykrywania jonów jodu w soli kuchennej i moczu, wykorzystując silne oddziaływania złoto-jod do zateżnienia analitu, który na widmach pojawiał się w postaci jonów $[\text{Au}_2\text{I}]^+$. Pozwoliło to na powtarzalny i selektywny pomiar stężenia jodu w skomplikowanych próbkach z LOD na poziomie 5×10^{-10} M przy obecności niewielkiego tła chemicznego na widmach MS [30].



Rysunek 3. Obraz SEM nanostruktur złota na rdzeniu z polistyrenu i schematyczna ilustracja analizy LDI MS małych cząsteczek przy ich użyciu. Przedrukowano za zezwoleniem J. Lee, J. Lee, T. D. Chung, W.-S. Yeo, *Analytica Chimica Acta*, 2012, 736, 1 [29]. Wszelkie prawa (2012) należą do Elsevier B.V.

Figure 3. SEM image of gold nanostructures on a polystyrene core and schematic illustration of the LDI MS analysis of small molecules using them. Reprinted with permission from J. Lee, J. Lee, T. D. Chung, and W.-S. Yeo, *Analytica Chimica Acta*, 2012, 736, 1 [29]. Copyright 2012 Elsevier B.V.

Nanostruktury wytworzone przez elektrochemiczne osadzenie warstwy złota na porowatym krzemie stały się narzędziem do analizy peptydów obecnych w ludzkiej krwi. Ten hybrydowy nanomateriał skutecznie zataczał peptydy w próbce, jednocześnie wykluczając z niego liczne białka. Pozwoliło to badaczom na szybkie rozróżnienie osób ze zdiagnozowanym nowotworem jelita grubego od osób zdrowych na podstawie profilowania peptydowego krwi na widmach LDI MS [31].

Kolejnym przykładem materiału hybrydowego, który znalazł zastosowanie w laserowej spektrometrii mas jest Au@MnO NFs, czyli nanokwiaty (*ang. Nanoflowers*, NFs) złota i tlenku manganu(II). Badania przeprowadzone z użyciem tych nanostruktur pokazały, że są wydajnym podłożem do jonizacji małych związków chemicznych bez udziału innej matrycy. Dodatkowo, w pracy przedstawionej przez Ocoy i wsp., Au@MnO NFs były funkcjonalizowane przyłączonym doń aptamerem, który miał selektywnie wychwytywać cząsteczki ATP z lizatu komórkowego, co pozwoliło na ich oznaczenie w spektrometrze mas [32].

Niedawno grupa Kuo zastosowała nałożone na siebie cienkie warstwy o grubości 2,7 μm zbudowane z nanocząstek złota do ilościowego oznaczania hydroksyproliny w próbkach krwi osób zdrowych i chorujących na osteoporozę. Wykonana krzywa kalibracyjna wykazała wysoką korelację liniową między intensywnością sygnałów na widmach masowych, a stężeniem analizowanego związku w zakresie od 1 do 100 μM [33].

Sporą niedogodnością w stosowaniu nanocząstek złota jest konieczność stabilizowania ich powierzchni np. cytrynianem, czego skutkiem jest obecność tła chemicznego w rejonie poniżej m/z 500. Powodowało to trudności w analizach związków, których sygnały pojawiały się właśnie w tym obszarze widma masowego.

Rozwiązaniem umożliwiającym pokonanie tej niedogodności okazała się laserowa ablacja z syntezą w roztworze (LASiS). Nanocząstki złota uzyskane w tej metodzie miały na swej powierzchni grupy Au-O- i wykazywały znikome tło chemiczne. Autorzy badań z powodzeniem zastosowali wytworzone przez siebie nanocząstki do analizy kilku związków LMW takich jak arginina, fruktoza czy paklitaksel, które wykryli na widmach MS w ilościach pikomolowych [34].

Inną techniką niewymagającą stabilizacji nanocząstek złota jest AuNPET (*ang. Gold Nanoparticle-Enhanced Target*). Target wzbogacony nanocząstkami złota został po raz pierwszy opisany w 2015 roku [35] i od tego czasu był stosowany do analizy LDI MS związków o małych masach cząsteczkowych zarówno o wysokiej, jak i niskiej polarności, nie wykazując przy tym ich fragmentacji. Płytki AuNPET generują tło chemiczne jedynie w postaci sygnałów pochodzących od klastrów złota, które umożliwiają zastosowanie precyzyjnej, wewnętrznej kalibracji [36]. Układ ten z sukcesem został użyty do badań związków chemicznych należących do różnych grup takich jak nukleozydy, aminokwasy, węglowodany, czy lipidy [35], a także skomplikowanych mieszanin biologicznych jak na przykład surowica krwi [37], moczu [38] oraz ekstrakty z komórek pleśni [39].

2.4. NANOMATERIAŁY NA BAZIE SREBRA

Zastosowanie nanostruktur srebrowych jako aktywnych powierzchni w SALDI MS zapewnia bardzo dobrą absorpcję promieniowania powyżej 400 nm oraz wydajne przenoszenie energii na cząsteczki analitu. Dodatkowo AgNPs mogą stanowić źródło jonów do kationizacji badanych związków [40]. Wśród zalet nanocząstek srebra można wymienić wysoką tolerancję na obecność soli, możliwość zastosowania wewnętrznej kalibracji na sygnałach pochodzących od klastrów srebra oraz dużą powtarzalność wyników. Korzystanie z nanostruktur srebra w pomiarach LDI MS powoduje zmniejszenie tła chemicznego w rejonie niskich wartości parametru m/z , z tego względu są one z powodzeniem stosowane w analizie związków niskocząsteczkowych [41]. Nanocząstki srebra były początkowo stosowane w spektrometrii mas jako dodatki kationizujące w eksperymentach MALDI, jednak z czasem zaadaptowano je jako powierzchnie aktywne w SALDI [40]. Wykazano, iż AgNPs skutecznie jonizują aminokwasy, peptydy oraz lipidy, a dolna granica ich wykrywalności jest często na poziomie femtomolowym [41].

Powinowactwo srebra do atomów siarki wykorzystali w swoich badaniach Shrivastava i Wu, skutecznie zateżając cząsteczki zawierające grupę tiolową, przez co możliwe stało się ich selektywne oznaczenie w spektrometrze mas. Swoją metodę z powodzeniem zastosowali do analizy ilościowej cysteiny i homocysteiny w próbkach ludzkiego moczu przy użyciu wzorca wewnętrznego, osiągając wartość LOD dla tych cząsteczek na poziomie 7 nM [42].

Jednym z przykładów syntezy nanomateriałów na bazie srebra jest otrzymywanie porowatych nanocząstek Ag metodą zol-żel, które zastosowane w LDI ułatwiają desorpcję i jonizację peptydów, trójglicerydów i fosfolipidów. Autorzy wykazali również, że tak przygotowane AgNPs selektywnie jonizują sterole z pęcherzyków złożonych z olefinowych fosfosfatydylocholin, oferując możliwość uproszczonego podejścia do analizy steroli ze złożonych mieszanin [43].

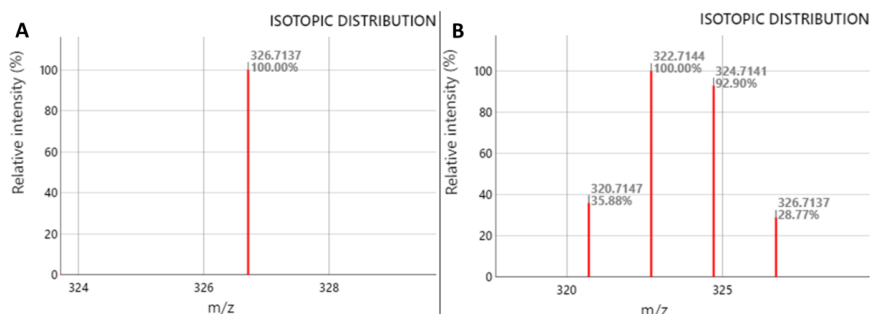
Opracowano także proste podejście do wytwarzania nanostruktur srebra i palladu z łatwo regulowanymi morfologiami, stosując osadzanie elektrolityczne. Warstwy grubości około 100 nm zastosowano w technice laserowej desorpcji/jonizacji wspomaganej powierzchnią do analizy małych cząsteczek biologicznych, takich jak cukry, kwasy tłuszczowe, triglicerydy i antybiotyki [44].

Hybrydowy nanomateriał składający się z warstwy disiarczku molibdenu i nanocząstek srebra (MoS_2/Ag) został niedawno opisany jako skuteczne podłoże do jonizacji związków LMW. Materiał ten przetestowano w analizie aminokwasów, peptydów, kwasów tłuszczowych, antybiotyków i leków w pojedynczych roztworach, mieszaninach, a także w próbkach biologicznych, takich jak surowica ludzkiej krwi. Uzyskane wyniki badań ilościowych charakteryzowały się dużym zakresem liniowości sygnałów, a wartość LOD wyniosła 0,5 pmola w przypadku histydyny [45].

Prysiazhnyi i współpracownicy przedstawili możliwość pokrywania nanostrukturami srebra analitu naniesionego na płytkę. Wykorzystali do tego celu metodę niewymagającą rozpuszczalników tj. fizycznego osadzania z fazy gazowej (PVD). Związkami badanymi były małe cząsteczki pochodzenia biologicznego: kreatynina, fruktoza i sacharoza w przypadku rozpylania magnetronowego [46], oraz węglowodany, lipidy, nukleozydy, aminokwasy, witaminy czy wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne [47]. Przeprowadzone analizy LDI MS wykazały, iż zastosowane metody nanoszenia AgNPs umożliwiły skuteczną jonizację badanych próbek, jednak granice wykrywalności nie były duże i wynosiły pomiędzy 0,1, a 0,5 $\mu\text{g/ml}$ [47].

Jedną z metod chemicznej syntezy nanocząstek srebra stosowanych w SALDI MS jest opracowana w 2013 roku technika AgNPET. W tej metodzie syntezę AgNPs przeprowadza się bezpośrednio na stalowej płytce otrzymując cienką warstwę kationowych nanocząstek srebra elektrostatycznie związanych z płytką. Technikę tę przetestowano wykonując na niej oznaczenia wielu związków LMW, a także mysiej surowicy krwi i moczu [48]. Rozwinięciem tej metodyki był target wzbogacony nanocząstkami srebra monoizotopowego ($^{109}\text{AgNPET}$), do którego wytworzenia wykorzystano reagent zawierający tylko jeden z występujących w naturze izotopów srebra. Takie rozwiązanie przyczyniło się do ułatwienia interpretacji wyników analiz MS ze względu na uproszczenie rozkładu izotopowego na widmach masowych

(Rysunek 4) [49]. Płytką $^{109}\text{AgNPET}$ pozwoliła na skuteczną i wydajną jonizację kilkudziesięciu związków niskocząsteczkowych pochodzenia biologicznego [49], ilościową analizę aminokwasów [50], a także analizę złożonych mieszanin takich jak mocz [51] czy surowica [52].



Rysunek 4. Symulowane rozkłady izotopowe dla jonów $^{109}\text{Ag}_3^+$ (A) i Ag_3^+ (B)
 Figure 4. Simulated isotopic distributions for ions $^{109}\text{Ag}_3^+$ (A) and Ag_3^+ (B)

2.5. NANOMATERIAŁY NA BAZIE PLATYNY

Wśród nanostruktur metalicznych stosowanych w SALDI MS znalazły się także nanomateriały na bazie platyny. Nanocząstki platynowe mają kolor czarny, dlatego mogą być stosowane przy każdej długości światła emitowanego przez lasery. Posiadają wysoką temperaturę topnienia oraz niską przewodność cieplną, wykazując przy tym bardzo dużą wydajność jonizacji analitu. Dodatkowym atutem jest duża inertność chemiczna platyny, która nie wykazuje starzenia w warunkach atmosferycznych [5].

Grupa badawcza Arakawy wielokrotnie prezentowała możliwości zastosowania nanostruktur platynowych w laserowej spektrometrii mas. W 2010 roku opublikowali pracę dotyczącą syntezy PtNPs na powierzchni krzemu w wyniku bezprądowego procesu galwanicznego. Nanocząstki te, które ze względu na swój wygląd badacze określili jako nanokwiaty (*ang. Nanoflowers, Nfs*), zostały użyte jako aktywne powierzchnie, z których przeprowadzono desorpcję/jonizację cząsteczek powstałych w wyniku trawienia kazeiny oraz innych analitów, w tym peptydów, fosfopeptydów, fosfolipidów, węglowodanów, syntetycznych polimerów [53] oraz wszystkich aminokwasów biogennych [54].

Nanostruktury platyny osadzano na różnych materiałach również w wyniku fizycznego osadzania z fazy gazowej. W ten sposób naniesiono warstwę Pt o grubości 20 nm na zadrukowany papier oraz płytkę TLC z rozdzielonymi związkami, co pozwoliło na sprawdzenie rozkładu powierzchniowego cząsteczek w tych obiektach

podczas obrazowania LDI MS [55]. Tę samą metodę fizycznego osadzania zastosowano także do obiektu biologicznego, jakim był skrawek szurzego mózgu. Tkanę pokryto warstwą nanostruktur platynowych o grubości 3 nm i wykonano na niej eksperyment obrazowania spektrometrią mas. Zabiegi te umożliwiły zbadanie rozkładu przestrzennego glicerolipidów w tkance [56].

2.6. NANOMATERIAŁY NA BAZIE TLENKU TYTANU (IV)

Kolejnym materiałem, który znalazł zastosowanie w laserowej spektrometrii mas są nanocząstki tlenku tytanu (IV) (TiO_2). Z ich udziałem analizowano między innymi katechiny, kwas askorbinowy i teinę wyekstrahowane z liści herbaty. TiO_2 NPs w tym eksperymencie wykorzystywane były jako sondy do zatężania związków chemicznych, a także jako układ aktywny, z którego przeprowadzano desorpcję/ionizację analitu. To podejście zapewniło wiele korzyści, jak chociażby małe tło chemiczne w obszarze niskiego m/z oraz prostsze przygotowanie próbki i dobrą powtarzalność wyników [57]. Nanocząstki tlenku tytanu (IV) zostały także wykorzystane przy analizie cukrów w ekstraktach z cebuli tulipana i czosnku, jak również bezpośrednio w cienkich skrawkach tych tkanek roślinnych pokrytych warstwą TiO_2 NPs [58].

Płytki stalowe z warstwą dwutlenku tytanu o grubości 50 nm naniesioną w procesie fizycznego osadzania z fazy gazowej zastosowano w pomiarach LDI MS mieszanin cukrów i aminokwasów oraz ekstraktów z karczocha zwyczajnego. TiO_2 okazała się być dobrym układem aktywnym w analizie SALDI małych cząsteczek, wykazując niewielkie tło chemiczne pochodzące głównie od jonów tlenku tytanu (IV). Na wykonanych widmach MS widoczne były addukty wszystkich aminokwasów i węglowodanów obecnych w mieszaninach, zaś w ekstraktach zidentyfikowano m. in. kwasy monokofeilochinowe, flawonoidy i laktony seskwiterpenowe [59].

Warstwy nanorurek z dwutlenku tytanu wykonane przez anodowanie elektrochemiczne folii tytanowej opisano jako skuteczne podłoże do laserowej desorpcji/ionizacji peptydów i małych cząsteczek. W pracy opublikowanej przez Pireta i wsp., TiO_2 NTs umożliwiły analizę mieszaniny peptydów z granicą wykrywalności dla neurotensyny wynoszącą 10 femtomoli. Wydajność nanorurek TiO_2 w jonizacji małych cząsteczek została również przetestowana pod kątem wykrywania sunitynibu (inhibitora kinazy tyrozynowej) i werapamilu. Granica wykrywalności obu cząsteczek za pomocą tej techniki wyniosła 50 fmoL [60].

Dwuwymiarowe nanopłatki (*ang. Nanoflakes*) TiO_2 zostały wykorzystane przez Gao i współpracowników jako adsorbent i matryca w detekcji barwników i ich toksycznych metabolitów metodą SALDI MS. Autorzy oznaczali małe cząsteczki takie jak zieleń malachitowa, fiolet krystaliczny i ich homologi w różnych typach

złożonych próbek, w tym w rybiej krwi czy ekstraktach rybich tkanek, w których zostały zidentyfikowane z granicą wykrywalności 0,001-10 pg/ml [61].

2.7. INNE NANOMATERIAŁY

Nanomateriałem umożliwiającym analizowanie dużych cząsteczek metodą SALDI MS są nanostruktury rtęciowo-tellurowe (HgTe), za pomocą których istnieje możliwość oznaczenia związków o masach dochodzących do 150 kDa. Swoje unikatowe, jak na nanostruktury zastosowania zawdzięczają właściwościom, do których należą niska temperatura topnienia i niska przewodność cieplna. Wykorzystywanie ich w analizie białek [62] oraz oligonukleotydów [63] zapewnia łatwiejsze przygotowanie próbki, większą tolerancję na sole oraz dużą powtarzalność wyników w porównaniu do metody MALDI z udziałem matrycy organicznej.

Struktury telluru w postaci nanoarkuszy (*ang. Nanosheet*) zostały zastosowane jako rozwiązanie w analizie małych cząsteczek metodą LDI MS. Wyniki pomiarów zasad azotowych nukleotydów, kwasów tłuszczowych i aminokwasów pokazują, że nanostruktury telluru wydajnie pochłaniają promieniowanie UV, a widma uzyskane w trybie jonów ujemnych mają niewielkie tło chemiczne [64].

Również nanomateriał oparty o tlenek żelaza (II) znalazł swoje zastosowanie w spektrometrii mas z laserową desorpcją/ionizacją wspomaganą powierzchnią. Płytką pokryta nanocząstkami Fe_3O_4 została użyta do analizy lipidów zarówno w roztworach, jak i w przypadku substancji pozostawionych na płycie przez dotknięcie palcem [65].

Ciekawym przykładem zastosowania nanostruktur w badaniach materiału biologicznego metodą laserowej spektrometrii mas jest opisana przez Gedda i Wu technika analizy bakterii na powierzchni sfunkcjonalizowanych nanoprętów tlenku cynku. Autorzy wykazali, że hydrofobowe nanopręty ZnO zapewniają znaczną poprawę jonizacji analitu w porównaniu do konwencjonalnej techniki MALDI, a przy tym nie wykazują tła chemicznego na widmach MS. Użycie tej powierzchni do detekcji bakterii *Escherichia coli* w kroplach wody morskiej i moczu pozwoliło na osiągnięcie wartości LOD dla komórek bakteryjnych na poziomie $2,1 \times 10^2$ cfu* μL^{-1} [66].

UWAGI KOŃCOWE

W powyższych rozdziałach przybliżono metody stosowane w SALDI MS, jednak ze względu na znaczną ilość literatury dostępnej na ten temat przytoczono jedynie wybrane doniesienia naukowe. Prace nad tworzeniem kolejnych metod ciągle trwają, czego dowodem może być różnorodność technik zaliczanych do SALDI MS oraz ich zastosowanie w wielu obszarach analityki chemicznej i biochemicznej.

W przeciągu kilkunastu ostatnich lat widać wyraźny postęp w tworzeniu nowych metod bezmatrycowych do laserowej spektrometrii mas, które zarówno zwiększyły czułość oznaczeń, jak i znacząco poszerzyły zakres ich możliwości, zwłaszcza w badaniach związków chemicznych o małych masach cząsteczkowych. Pomimo zalet powyższych metod brak jest komercyjnych rozwiązań dostępnych w handlu, przez co metody te nie znalazły do chwili obecnej zastosowania w rutynowych analizach. Brak jest również badań dotyczących powtarzalności technik SALDI i stabilności w czasie wytwarzanych w laboratoriach płytek pokrytych nanocząstkami. Z tych względów opisane metody należy traktować jako uzupełnienie metody MALDI MS.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] C.-C. Hu, M.-F. Huang, H.-T. Chang, *Bioanalysis*, **2013**, 5, 633.
- [2] K.K. Murray, R.K. Boyd, M.N. Eberlin, G.J. Langley, L. Li, Y. Naito, *Pure Appl. Chem.*, **2013**, 85, 1515.
- [3] A.Y. Lim, J. Ma, Y.C.F. Boey, *Adv. Mater.*, **2012**, 24, 4211.
- [4] J. Sunner, E. Dratz, Y.-Chie. Chen, *Anal. Chem.*, **1995**, 67, 4335.
- [5] R. Arakawa, H. Kawasaki, *Anal. Sci.*, **2010**, 26, 1229.
- [6] Y.-C. Chen, J. Shiea, J. Sunner, *J. Chromatogr. A*, **1998**, 826, 77.
- [7] S. Ren, L. Zhang, Z. Cheng, Y. Guo, *J Am Soc Mass Spectrom*, **2005**, 16, 333.
- [8] M. Najam-ul-Haq, M. Rainer, C.W. Huck, P. Hausberger, H. Kraushaar, G.K. Bonn, *Anal. Chem.*, **2008**, 80, 7467.
- [9] Y. Coffinier, S. Szunerits, H. Drobecq, O. Melnyk, R. Boukherroub, *Nanoscale*, **2012**, 4, 231.
- [10] X. Dong, J. Cheng, J. Li, Y. Wang, *Anal. Chem.*, **2010**, 82, 6208.
- [11] P.-Y. Hua, M. Manikandan, H. N. Abdelhamid, H.-F. Wu, *J. Mater. Chem. B*, **2014**, 2, 7334.
- [12] I.S. Hosu, M. Sobaszek, M. Ficek, R. Bogdanowicz, H. Drobecq, L. Boussekey, A. Barras, O. Melnyk, R. Boukherroub, Y. Coffinier, *Nanoscale*, **2017**, 9, 9701.
- [13] S. Chen, H. Zheng, J. Wang, J. Hou, Q. He, H. Liu, C. Xiong, X. Kong, Z. Nie, *Anal. Chem.*, **2013**, 85, 6646.
- [14] J. Wei, J. M. Buriak, G. Siuzdak, *Nature*, **1999**, 399, 243.
- [15] S. Tuomikoski, K. Huikko, K. Grigoras, P. Östman, R. Kostiainen, M. Baumann, J. Abian, T. Kotiaho, S. Franssila, *Lab Chip*, **2002**, 2, 247.
- [16] K. Wanner and G. Höfner, "Mass Spectrometry in Medicinal Chemistry", John Wiley & Sons, Ltd., 2007.
- [17] N. Budimir, J.-C. Blais, F. Fournier, J.-C. Tabet, *J. Mass Spectrom.*, **2007**, 42, 42.
- [18] W.G. Lewis, Z. Shen, M.G. Finn, G. Siuzdak, *Int. J. Mass Spectrom.*, **2003**, 226, 107.
- [19] X. Wen, S. Dagan, V.H. Wsocki, *Anal. Chem.*, **2007**, 79, 434.
- [20] S.H. Kim, J. Kim, S.-H. Jo, J.-H. Kim, K.J. Kim, S. Yoon, *Biointerphases*, **2016**, 11, 041008.
- [21] R.A. Picca, C.D. Calvano, M.J. Lo Faro, B. Fazio, S. Trusso, P.M. Ossi, F. Neri, C. D'Andrea, A. Irrera, N. Cioffi, *J. Mass Spectrom.*, **2016**, 51, 849.
- [22] A.R. Korte, N.J. Morris, A. Vertes, *Anal. Chem.*, **2019**, 91, 3951.
- [23] A.R. Korte, S.A. Stopka, N. Morris, T. Razunguzwa, A. Vertes, *Anal. Chem.*, **2016**, 88, 8989.
- [24] H.N. Abdelhamid, H.-F. Wu, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2016**, 408, 4485.
- [25] R. Pilolli, F. Palmisano, N. Cioffi, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2012**, 402, 601.
- [26] J.A. McLean, K.A. Stumpo, D.H. Russell, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127, 5304.

- [27] A. Tarui, H. Kawasaki, T. Taiko, T. Watanabe, T. Yonezawa, R. Arakawa, *J. Nanosci. Nanotech.*, **2009**, 9, 159.
- [28] H. Kawasaki, T. Sugitani, T. Watanabe, T. Yonezawa, H. Moriwaki, R. Arakawa, *Anal. Chem.*, **2008**, 80, 7524.
- [29] J. Lee, J. Lee, T.D. Chung, W.-S. Yeo, *Anal. Chim. Acta*, **2012**, 736, 1.
- [30] Y.-J. Li, Y.-T. Tseng, B. Unnikrishnan, C.-C. Huang, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2013**, 5, 9161.
- [31] X. Li, J. Tan, J. Yu, J. Feng, A. Pan, S. Zheng, J. Wu, *Anal. Chim. Acta*, **2014**, 849, 27.
- [32] I. Ocoy, B. Gulbakan, M.I. Shukoor, X. Xiong, T. Chen, D.H. Powell, W. Tan, *ACS Nano*, **2013**, 7, 417.
- [33] X.-Y. Pan, C.-H. Chen, Y.-H. Chang, D.-Y. Wang, Y.-C. Lee, C.-C. Liou, Y.-X. Wang, C.-C. Hu, T.-R. Kuo, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2019**, 411, 2793.
- [34] V. Amendola, L. Litt, M. Meneghetti, *Anal. Chem.*, **2013**, 85, 11747.
- [35] J. Sekuła, J. Nizioł, W. Rode, T. Ruman, *Anal. Chim. Acta*, **2015**, 875, 61.
- [36] J. Sekuła, J. Nizioł, M. Misiołek, P. Dec, A. Wrona, A. Arendowski, T. Ruman, *Anal. Chim. Acta*, **2015**, 895, 45.
- [37] A. Arendowski, K. Ossoliński, J. Nizioł, T. Ruman, *Int. J. Mass Spectrom.*, **2020**, 456, 116396.
- [38] A. Arendowski, K. Ossolinski, J. Nizioł, T. Ruman, *Anal. Sci.*, **2020**, 36, 1521.
- [39] A. Arendowski, J. Szulc, J. Nizioł, B. Gutarowska, T. Ruman, *Anal. Biochem.*, **2018**, 549, 45.
- [40] J. Sekuła, J. Nizioł, T. Ruman, *Wiadomości Chemiczne*, **2016**, 70, 519.
- [41] J. Sekuła, J. Nizioł, W. Rode, T. Ruman, *Analyst*, **2015**, 140, 6195.
- [42] K. Shrivastava, H.-F. Wu, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2008**, 22, 2863.
- [43] R.C. Gamez, E.T. Castellana, D.H. Russell, *Langmuir*, **2013**, 29, 6502.
- [44] Y.E. Silina, F. Meier, V.A. Nebolsin, M. Koch, D.A. Volmer, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2014**, 25, 841.
- [45] Y. Zhao, G. Deng, X. Liu, L. Sun, H. Li, Q. Cheng, K. Xi, D. Xu, *Anal. Chim. Acta*, **2016**, 937, 87.
- [46] V. Prysiaznyh, F. Dycka, J. Kratochvil, V. Stranak, P. Ksirova, Z. Hubicka, *J. Vac. Sci. Technol. B*, **2019**, 37, 012906.
- [47] V. Prysiaznyh, F. Dycka, J. Kratochvil, J. Sterba, V. Stranak, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2020**, 412, 1037.
- [48] J. Nizioł, W. Rode, Z. Zieliński, T. Ruman, *Int. J. Mass Spectrom.*, **2013**, 335, 22.
- [49] J. Nizioł, W. Rode, B. Laskowska, T. Ruman, *Anal. Chem.*, **2013**, 85, 1926.
- [50] A. Arendowski, J. Nizioł, T. Ruman, *J. Mass Spectrom.*, **2018**, 53, 369.
- [51] J. Nizioł, K. Ossoliński, B. P. Tripet, V. Copié, A. Arendowski, T. Ruman, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2021**, 193, 113752.
- [52] J. Nizioł, K. Ossoliński, B. P. Tripet, V. Copié, A. Arendowski, T. Ruman, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2020**, 412, 5827.
- [53] H. Kawasaki, T. Yao, T. Sugauma, K. Okumura, Y. Iwaki, T. Yonezawa, T. Kikuchi, R. Arakawa, *Chem. Eur. J.*, **2010**, 16, 10832.
- [54] S. Nitta, H. Kawasaki, T. Sugauma, Y. Shigeri, R. Arakawa, *J. Phys. Chem. C*, **2013**, 117, 238.
- [55] H. Kawasaki, T. Ozawa, H. Hisatomi, R. Arakawa, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2012**, 26, 1849.
- [56] T. Ozawa, I. Osaka, T. Ihozaki, S. Hamada, Y. Kuroda, T. Murakami, A. Miyazato, H. Kawasaki, R. Arakawa, *J. Mass Spectrom.*, **2015**, 50, 1264.
- [57] K.-H. Lee, C.-K. Chiang, Z.-H. Lin, H.-T. Chang, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2007**, 21, 2023.
- [58] Y. Gholipour, S.L. Giudicessi, H. Nonami, R. Erra-Balsells, *Anal. Chem.*, **2010**, 82, 5518.
- [59] H. Sonderegger, C. Rameshan, H. Lorenz, F. Klauser, M. Klerks, M. Rainer, R. Bakry, C.W. Huck, G.K. Bonn, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2011**, 401, 1963.

- [60] G. Piret, D. Kim, H. Drobecq, Y. Coffinier, O. Melnyk, P. Schmuki, R. Boukherroub, *Analyst*, **2012**, 137, 3058.
- [61] C. Gao, D. Zhen, N. He, Z. An, Q. Zhou, C. Li, C.A. Grimes, Q. Cai, *Talanta*, **2019**, 196, 1.
- [62] W.-T. Chen, C.-K. Chiang, C.-H. Lee, H.-T. Chang, *Anal. Chem.*, **2012**, 84, 1924.
- [63] W.-T. Chen, M.-F. Huang, H.-T. Chang, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2013**, 24, 877.
- [64] Y.-S. Chen, J. Ding, X.-M. He, J. Xu, Y.-Q. Feng, *Microchim. Acta*, **2018**, 185, 368.
- [65] M. Kusano, S. Kawabata, Y. Tamura, D. Mizoguchi, M. Murouchi, H. Kawasaki, R. Arakawa, K. Tanaka, *Mass Spectrometry*, **2014**, 3, A0026.
- [66] G. Gedda, H.-F. Wu, *Sens. Actuators B Chem.*, **2019**, 288, 667.

Praca wpłynęła do Redakcji 6 kwietnia 2022 r.