

**ZASTOSOWANIE NANOCZĄSTEK SREBRA
W LASEROWEJ SPEKTROMETRII MAS
ORAZ W OBRAZOWANIU MS – PRZEGLĄD**

**APPLICATION OF SILVER NANOSTRUCTURES
IN LASER DESORPTION/IONIZATION MASS
SPECTROMETRY AND MASS SPECTROMETRY
IMAGING**

Justyna Sekuła^{1*}, Joanna Nizioł¹, Tomasz Ruman¹

*Politechnika Rzeszowska, Wydział Chemiczny
al. Powstańców Warszawy 6, 35-959 Rzeszów
e-mail: justynasekulaa@gmail.com

Abstract

Wprowadzenie

1. AgNPs w analizie związków jonowych
2. AgNPs w analizie związków niejonowych
3. Nanostruktury srebra do analizy mikrobiologicznej
4. Aktywne powierzchnie z nanostrukturami srebra stosowane w LDI MS
5. AgNPs w obrazowaniu LDI MS

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane

Dr hab. inż. Tomasz Ruman jest profesorem nadzwyczajnym w Zakładzie Polimerów i Biopolimerów na Wydziale Chemicznym Politechniki Rzeszowskiej od 2012 roku. Tytuł magistra inżyniera uzyskał w 2003 roku. Pracę doktorską pt. „Ligandy polipirazoliloboranowe: homoskorpionianowe, heteroskorpionianowe i chiralne” obronił w 2004 roku pod kierunkiem prof. dr hab. inż. Stanisława Wołowca. W roku 2011 uzyskał stopień doktora habilitowanego nauk chemicznych w Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN w Łodzi. Aktualnie realizowane kierunki prac badawczych to nowe metody do laserowej spektrometrii mas oraz obrazowania MS, analizy metabolomiczne tkanek roślinnych i zwierzęcych, borowe nukleozydy i nukleotydy jako inhibitory enzymów istotnych w procesach nowotworzenia oraz w BNCT czy także badania potranslacyjnych modyfikacji białek.

Mgr inż. Justyna Sekuła ukończyła studia inżynierskie na Wydziale Chemicznym Politechniki Rzeszowskiej, broniąc w 2012 roku pracę pt. „*Borowe pochodne nukleozydów*”. Następnie podjęła studia II stopnia na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej na kierunku biotechnologia przemysłowa. Studia magisterskie ukończyła w 2013 roku otrzymując tytuł magistra inżyniera za pracę pt. „Badania nad syntezą nowych analogów arabinocytozyny (AraC)”. W październiku 2013 roku rozpoczęła studia doktoranckie na Wydziale Chemicznym Politechniki Rzeszowskiej w dziedzinie nauk chemicznych w dyscyplinie technologia chemiczna. Pracę pod tytułem „*Nowe układy bezmatrycowe do laserowej spektrometrii mas*” realizuje pod kierownictwem dr hab. inż. Tomasza Rumana, prof. PRz.

Dr Joanna Nizioł urodzona w 1984 r. w Rzeszowie, ukończyła studia chemiczne na Uniwersytecie Jagiellońskim w 2008 r. Doktorat nauk chemicznych uzyskała na Politechnice Rzeszowskiej im. Ignacego Łukasiewicza w 2015 r. Odbiła dwumiesięczny staż podoktorski w zespole prof. Jana Sunnera na Wydziale Mikrobiologii i Biologii Roślin na Uniwersytecie w Oklahomie. Od 2010 r. do chwili obecnej pracuje na Wydziale Chemicznym Politechniki Rzeszowskiej im. Ignacego Łukasiewicza, od 2015 r. na stanowisku asystenta w Zakładzie Polimerów i Biopolimerów.

ABSTRACT

Metallic nanoparticles, especially silver nanoparticles, have attracted much attention due to their unique physical, chemical and opto-electronic properties. Silver nanoparticles have been successfully applied as a matrix replacement for the laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (LDI-ToF-MS). Silver nanoparticles (AgNPs) can efficiently absorb ultraviolet laser radiation, transfer energy to the analyte and promote analyte desorption, but also constitute a source of silver ions suitable for analyte cationisation. Nanoparticles, producing spectra with highly reduced chemical background in the low m/z region, are perfectly suited for low-molecular weight compound analysis and imaging.

AgNPs have been demonstrated to allow efficient capture of different chemical compounds (including amino acids, cholesterol, fatty acids) on their surface, thus efficiently promoting their desorption and gas phase cationisation. The minimum detectable amount for those organic and biological molecules is often in the fmol range [23]. Despite the fact that scientists have developed a variety of methods for the synthesis of silver nanoparticles, there are still problems with obtaining surfaces with nanoparticles of high durability and chemical purity. Recently, a successful application of cationic silver nanoparticles (AgNPs), which were placed on MALDI targets for highly sensitive detection of D-ribose at attomolar levels as well as analysis of biological samples such as urine and blood serum [51] was shown. The application of new $^{109}\text{AgNPET}$ surface has been presented with examples of analysis of nucleosides and nucleic bases [60].

One of the main directions of development of LDI-MS is the imaging mass spectrometry (MSI), enabling the visualization of surface distribution of biological samples. The critical limitations of the spatial resolution of MALDI-MSI are the size of the organic matrix crystals and the analyte migration during the matrix application process. To overcome these problems, researchers tried to use nanoparticles as substitutes of organic matrices. In 2013 Ruman group presented that direct contact of the analysed object with Ag nanoparticle-covered target permits direct surface transfer of chemical compounds. The active surface becomes then a “chemical photograph” of an object and allows MS analysis and MS imaging [68].

Keywords: low molecular weight compounds, mass spectrometry, mass spectrometry imaging, matrices, matrix free-system, silver nanoparticles

Słowa kluczowe: związki niskocząsteczkowe, spektrometria mas, obrazowanie spektrometrią mas, matryca, układy bezmatrycowe, nanocząstki srebra

WPROWADZENIE

W ciągu ostatnich 15 lat znacznie wzrosła liczba doniesień naukowych na temat wykorzystania spektrometrii mas z laserową desorpcją/ionizacją wspomaganą matrycą (MALDI MS). Technikę MALDI MS charakteryzuje wysoka czułość oraz szybkość analizy nie tylko związków jonowych, takich jak białka, peptydy czy kwasy nukleinowe, ale także różnych niejonowych związków chemicznych, wśród których bardzo istotnymi są lipidy czy sacharydy [1–6]. Technika ta umożliwia wykrywanie substancji w szerokim zakresie mas, co pozwala na jej zastosowanie w różnych dziedzinach chemii i biologii.

Poważną wadą techniki MALDI MS jest obecność na widmie pików pochodzących od jonów związanych z obecnością matryc organicznych, które przyczyniają się do tłumienia pików analitu [7–12] i są źródłem znacznej ilości pików w zakresie poniżej m/z 1000. Efektu tłumienia można uniknąć poprzez zastosowanie metod bezmatrycowych opierających się na zastosowaniu różnych nanostruktur. Nanostruktury często pozwalają nie tylko na redukcję tła chemicznego w niskim zakresie m/z , ale także znacznie polepszają klarowność widma, ponadto w znacznym stopniu ułatwiają przygotowanie próbek. Co więcej, metody oparte na nanostrukturach, a zwłaszcza te, w których nanostruktury tworzą aktywną powierzchnię, pozwalają na wyeliminowanie szeregu problemów niejednorodności powierzchni badanej (efekt „sweet spot”) [13].

Kilka lat po przedstawieniu metody MALDI opartej na matrycach organicznych, Karas [1] i Tanaka [14, 15] eksperymentowali z mieszaniną proszków nieorganicznych, badając ich zdolność do jonizacji analitu. Tanaka, jako pierwszy wykrył białka i polimery za pomocą układu dwufazowego, zawierającego kobalt w postaci bardzo drobnego proszku (30 nm) zawieszonego w glicerolu [14]. W 1995 Sunner i wsp. zastosowali zamiast matryc organicznych cząstki grafitu zawieszony w glicerolu [16]. Cząstki nieorganiczne wspierają proces jonizacji poprzez pochłanianie energii lasera i ułatwienie desorpcji termicznej analitu. Inni autorzy także testowali różnej wielkości cząstki metaliczne zawieszony w glicerolu lub w innych cieczach.

Jednak główną wadą takich rozwiązań jest występowanie zjawiska „sweet spot”, a także problem z zastosowaniem tych rozwiązań dla instrumentów z pionową pozycją płytki (targetu) [14, 16–18].

Zastosowanie AgNPs w analizie biomolekularnej zapewnia wiele korzyści m.in.: (i) relatywnie wysoka tolerancja na sole, (ii) eliminacja zakłóceń pochodzących od jonów matrycy organicznej, (iii) występowanie na widmie wysoce powtarzalnych sygnałów oraz (iv) możliwość kalibracji wewnętrznej na pikach pochodzących od jonów srebrnych. Ponadto, aktywność przeciwbakteryjna i przeciwgrzybicza nanocząstek srebra zapewnia pewną ochronę badanych tkanek.

Niniejsze opracowanie jest podzielone na pięć rozdziałów opisujących różne aspekty zastosowania nanocząstek srebra w technice laserowej desorpcji/ionizacji (LDI MS). Pierwsze dwa rozdziały dotyczą zastosowania nanocząstek srebra w „konwencjonalnej” analizie LDI MS, gdzie nanostruktury srebra stosowane są

jako dodatki ułatwiające jonizację jonowych i niejonowych analitów. Trzeci rozdział skupia się na zastosowaniu AgNPs w analizie mikroorganizmów oraz produktów ich metabolizmu. Czwarty natomiast dotyczy przykładów zastosowania aktywnych powierzchni zawierających nanostruktury srebrowe. Ostatni rozdział opisuje zastosowanie AgNPs w obrazowaniu LDI MS różnych powierzchni.

1. AgNPs W ANALIZIE ZWIĄZKÓW JONOWYCH

Mechanizm desorpcji i jonizacji w układach z nanostrukturami srebrowymi jest skomplikowany i nie do końca jeszcze poznany. Podobnie jest także w przypadku szeregu innych nanostruktur. Zwykle zakłada się, że mechanizm desorpcji/jonizacji dla analitu znajdującego się na lub w pobliżu nanocząstek polega na absorpcji nanosekundowych impulsów lasera przez nanocząstki, czego skutkiem jest niemal natychmiastowe, gwałtowne ogrzewanie analitu i wybuchowe przejścia fazowe. Jednak Silina i in. sugerują istnienie innego mechanizmu – indukowanej światłem desorpcji akustycznej (ang. *laser-induced acoustic desorption*, LIAD), gdzie jony są desorbowane w wyniku efektów mechanicznych.

Efekt LIAD jest wywołany poprzez impulsy akustyczne w obrębie cienkiej warstwy nanostrukturalnej i jego charakter zmienia się znacząco wraz ze wzrostem grubości warstwy [19]. Poza efektami typowo fizycznymi opisanymi powyżej, nanostruktury wykazują także szereg interesujących właściwości związanych raczej z charakterem chemicznym [20, 21].

Hua i in. [21], a następnie także inni badacze [22, 23] opracowali metodę nano-PALDI, w której wykorzystali AgNPs stabilizowane cytrynianem w celu skutecznej desorpcji/jonizacji kilku peptydów [21–23]. Autorzy zastosowali dwa modelowe peptydy: bradykininę (0,1 mg/ml) oraz angiotensynę I (0,5 mg/ml) w obecności środka powierzchniowo czynnego oraz odpowiedniej soli, aby zbadać potencjał nanocząstek srebra pełniących funkcję matrycy w procesie jonizacji [21]. Nanocząstki srebra otrzymano w wyniku redukcji chemicznej azotanu srebra z zastosowaniem procedury opisaną wcześniej w literaturze [24], wg której do roztworu 2 mM cyjanoborowodoru sodu w 1% roztworze cytrynianu sodu wkraplano 5 mM roztwór azotanu srebra w warunkach intensywnego mieszania. Powstałe AgNPs wielkości 160 ± 20 nm umożliwiły skuteczną desorpcję/jonizację wspomnianych peptydów nie powodując fragmentacji [21, 22]. Procedura opisana przez tę grupę [21] jest dosyć prosta do zastosowania, jako że autorzy zalecają naniesienie na płytkę MALDI 0,5 μ l zawiesiny nanocząstek, a następnie 0,5 μ l roztworu analitu oraz suszenie strumieniem powietrza [21].

Co ciekawe, Hua i in. w swoich badaniach wykazali, że nanocząstki srebra mogą być stosowane do desorpcji/jonizacji peptydów, a rozdzielczość otrzymanych widm jest identyczna jak w przypadku analizy MALDI z użyciem matrycy organicznej. Ponadto, w przeciwieństwie do wcześniejszych prac tych autorów, nie zaobserwo-

wano na widmie obecności pików adduktów peptydów z kationami sodu czy potasu [21].

Powszechnie znane powinowactwo tioli do jonów srebra lub złota zostało wykorzystane w celu wykrycia peptydów zawierających cysteinę przez Shrivasa i in. [23]. Autorzy wykazali, że AgNPs z powodzeniem mogą być stosowane w metodzie AP-MALDI-ITMS (ang. *atmospheric pressure matrix-assisted laser desorption/ionization ion-trap mass spectrometry*) do analizy biotioli (tj. glutation) czy tiopeptydów obecnych w moczu.

Nanocząstki srebrne wielkości 10 oraz 20 nm bez stabilizatora oraz stabilizowane CTAB (ang. cetyl trimethylammonium bromide) oraz cytrynianem otrzymano poprzez redukcję jonów srebra za pomocą NaBH_4 [23]. Autorzy przedstawili rezultaty analizy leków zawierających siarkę oraz biotioli bez konieczności wykonywania dodatkowego etapu rozdzielania i przemywania [23].

Niemodyfikowane AgNPs w porównaniu z stabilizowanymi CTAB oraz cytrynianem nanocząstkami srebra, wykazują najlepszą wydajność jonizacji. Powodem wysokiego powinowactwa AgNPs do biotioli jest, jak twierdzą autorzy, tworzenie się wiązań kowalencyjnych Ag-S. Adsorpcja biotioli na powierzchni AgNPs spowodowała 4–15-krotne zwiększenie czułości analizy badanych biotioli [23].

Biorąc pod uwagę opisane oddziaływania nanocząstek metali szlachetnych z biomolekułami [25–27], Shrivasa i in. [28], zastosowali do analizy peptydów i białek nanocząstki srebra zmodyfikowane ligandami hydrofobowymi. Reakcją pomiędzy AgNPs, a dodekanotiolem i oktadekanotiolem prowadzono w toluenie stosując mikroekstrakcję ciecz-ciecz (ang. *liquid-liquid microextraction*, LLME).

Ta sama grupa naukowców opracowała jednoetapową metodę ekstrakcji peptydów z próbek biologicznych z zastosowaniem nanocząstek srebra w procesie ekstrakcji do pojedynczej kropli (ang. *single drop microextraction*, SDME). Nanocząstki srebra wytworzono w układzie wodnym przez redukcję AgNO_3 za pomocą NaBH_4 , a następnie derywatyzację nanocząstek i przeniesienie do fazy organicznej zawierającej dodekanotiol lub oktadekanotiol.

Otrzymane tą metodą zmodyfikowane AgNPs posiadały zwykle rozmiary mniejsze niż 50 nm [28]. Shrivasa i in. opisali także tworzenie nanocząstek srebra stabilizowanych bromkiem tetraalkiloamoniowym [29]. Stabilizowane nanostruktury wytworzone w toluenie zostały zastosowane w funkcji elektrostatycznych sond powinowactwa do wstępnego zateżenia mieszaniny peptydów z próbek biologicznych, te ostatnie analizowane były następnie metodą laserowej desorpcji/ionizacji wspomaganą matrycą pod ciśnieniem atmosferycznym AP MALDI z pułapką jonową.

Stabilizowane bromkiem tetraoktyloamoniowym (ang. *tetraoctylammonium bromide*, TOAB) nanocząstki srebra wytworzono poprzez redukcję AgNO_3 za pomocą NaBH_4 w układzie dwufazowym zawierającym TOAB w toluenie. Roztwory wodne badanych peptydów wytrząsano z 0,8 μL zawiesiny AgNPs w toluenie, po czym fazę toluenową zebrano i umieszczono na płytce do analizy MS [29].

W roku 2010 Kailasa i in. [30] opisali zastosowanie nanocząstek selenku srebra (Ag_2Se) modyfikowanych oktadekanotiolem (ang. *octadecanethiol*, ODT) i kwasem 11-merkaptoundekanoowym (ang. *11-mercaptoundecanoic acid*, MUA) jako „sond ekstrakcyjnych” do analizy hydrofobowych peptydów i białek w roztworach wodnych. Funkcjonalizowane Ag_2Se NPs wytworzono w reakcji azotanu srebra ze sproszkowanym selenem i oktadekanoaminą. Reakcję prowadzono w temperaturze 180°C przez 10 minut. Otrzymane w postaci zawiesiny w toluenie nanocząstki miały kulisty kształt i rozmiary w zakresie od 7 do 10 nm. W celu analizy peptydów wymagane było zmieszanie sfunkcjonalizowanych Ag_2Se NPS zawieszonych w toluenie z mieszaniną peptydów oraz wirowanie, a następnie umieszczenie 2 μl fazy organicznej z tą samą objętością roztworu matrycy CHCA na płytce MALDI.

Nanocząstki $\text{Ag}_2\text{Se}@ODT$ i $\text{Ag}_2\text{Se}@MUA$ okazały się być dobrymi hydrofobowymi nanosondami umożliwiającymi skuteczną ekstrakcję peptydów w obecności substancji przeszkadzających, takich jak mocznik, Triton X-100 czy chlorek sodu [30].

Wspomniana wcześniej grupa pod kierunkiem Shastri uzyskała interesujące wyniki w mikroekstrakcji oraz identyfikacji markerów białkowych stosując zmodyfikowane nanocząstki srebra: $\text{Ag}@ODT/AMP$ (ang. *1-octadecanethiol/4-aminothiophenol*, ODT/AMP) oraz $\text{Ag}@ODT/TG$ (ang. *1-octadecanethiol/1-thioglycerol*, ODT/TG). W porównaniu z konwencjonalną metodą MALDI ToF MS przy zastosowaniu optymalnych parametrów systemu $\text{Ag}@ODT/AMP$ zaobserwowano 10–15-krotny wzrost intensywność sygnałów.

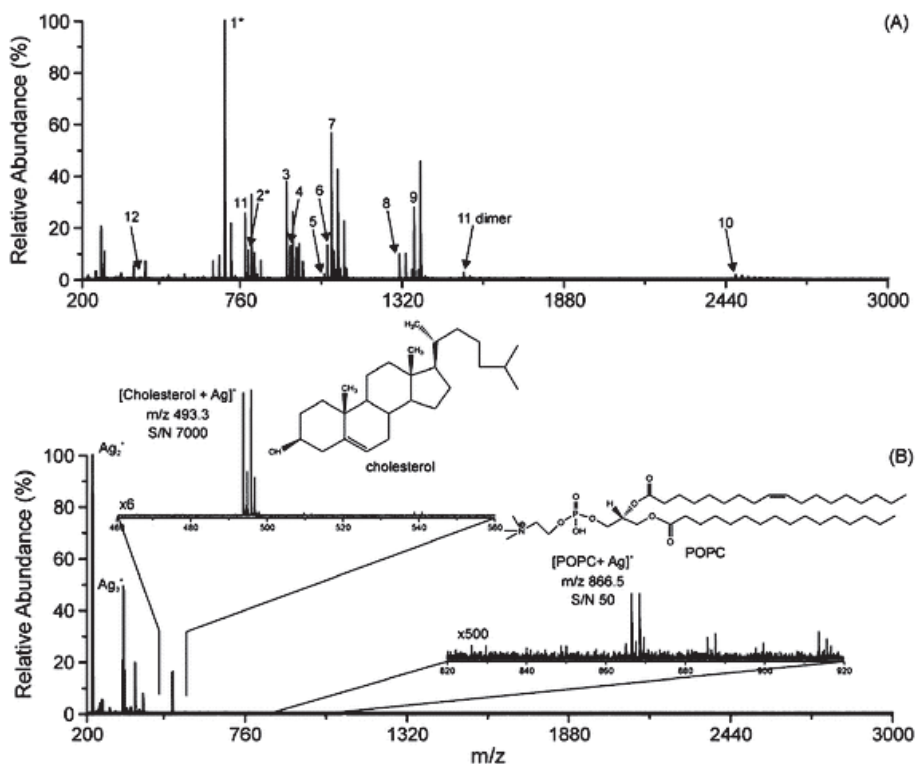
Niedawno Kawasaki i in. [32] przedstawili metodę analityczną polegającą na zastosowaniu efektu zlokalizowanego powierzchniowo rezonansu plazmonowego (ang. *localized surface plasmon resonance*, LSPR) w laserowej desorpcji/ionizacji wspomaganej matrycą (ang. *matrix-assisted laser desorption/ionization*, MALDI) z wykorzystaniem trójkątnych nanopłytek srebrowych (ang. *silver nanoplates*, AgNPLs) unieruchomionych na podłożu stałym. AgNPLs wytworzono w prostej reakcji azotanu srebra z borowodorkiem sodu w obecności stabilizatora – cytrynianu trisodowego. Pierwszym krokiem tej syntezy była redukcja AgNO_3 za pomocą borowodorku w obecności cytrynianu trójsodowego. Otrzymano stabilizowane cytrynianem zarodki AgNPL, które napromieniowano światłem 550 ± 100 nm w temperaturze 50°C . Drugim krokiem tej syntezy była kontrola wzrostu nanostruktur srebra, w celu ułatwienia dalszego wzrostu AgNPLs, aż do uzyskania rozmiaru 30–70 nm. Zmodyfikowane trypsyną AgNPLs unieruchomiono na płytce MALDI z dodatkiem kwasu synapinowego jako matrycy, w celu przebadania ich zastosowania jako inhibitorów trypsyny sojowej (SBTI) [32].

Fujino i in. [33] w celu polepszenia stabilności zawiesiny AgNPs zastosowali unieruchomione zeolitem nanocząstki srebra o rozmiarach 20–35 nm. Otrzymany układ zeolit-nanocząstki (ang. *nanoparticle-zeolite system*, AgNPs- NH_4ZSM_5) może być skutecznym donorem Ag^+ . Autorzy przewidują, że zeolit może działać jako dobry odbiornik energii cieplnej zapobiegając niszczeniu AgNPs w procesie fotow-

zbudzania. Nowy materiał zastosowano w technice LDI MS do analizy jonowych i niejonowych substancji biologicznie czynnych o małej masie cząsteczkowej, w tym do analizy kwasu acetylosalicylowego, L-histydyny, glukozy, mocznika, cholesterolu, a także małych związków występujących w surowicy ludzkiej.

2. AgNPs W ANALIZIE ZWIĄZKÓW NIEJONOWYCH

Sherrod i in. [22], w swojej pracy wykorzystali oddziaływania jony srebra-olefiny, w celu selektywnej jonizacji steroli i lipidów w obecności nanocząstek srebra o rozmiarach 20 oraz 60 nm. Autorzy w swoich badaniach analizowali próbkę składającą się z mieszaniny 12 związków o różnej polarności, stosując do tego celu mieszaninę składającą się z matrycy DHB i azotanu srebra (Rys. 1A), lub tylko AgNPs (Rys. 1B).

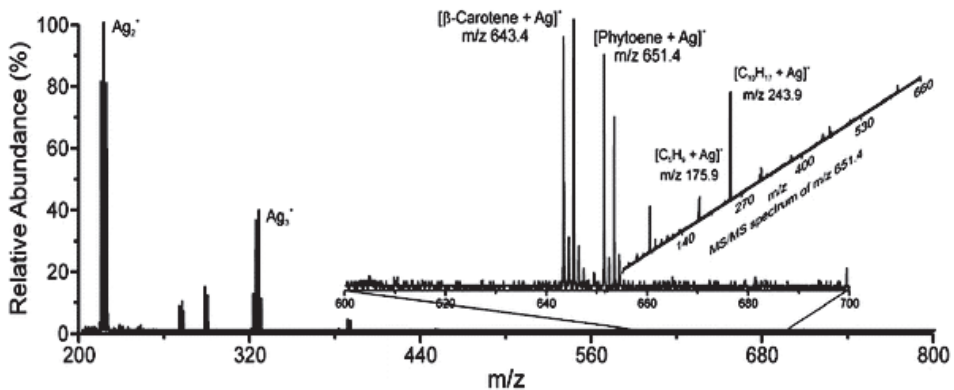


Rysunek 1. Widma MS mieszaniny peptydów (góra, A) wykonane z wykorzystaniem DHB/AgNO₃ oraz fosfocholiny i cholesterolu (dół, B) wykonane z wykorzystaniem AgNPs. Przedrukowano za zezwoleniem D. Sherrod, A.J. Diaz, W.K. Russell, P.S. Cremer, D.H. Russell, *Anal. Chem.*, 2008, **80**, 6796. Prawa autorskie (2008) należą do American Chemical Society

Figure 1. MS spectra of a peptide mixture obtained with DHB/AgNO₃ (A), phosphocholine and cholesterol obtained with AgNPs (B). Reprinted with permission from D. Sherrod, A.J. Diaz, W.K. Russell, P.S. Cremer, D.H. Russell, *Anal. Chem.*, 2008, **80**, 6796. Copyright 2008 American Chemical Society

Szczególnie interesujące okazało się, że przy wykorzystaniu matrycy organicznej na widmie zaobserwowano jedynie addukt $[\text{cholesterol-H}_2\text{O+H}]^+$ natomiast nie zaobserwowano adduktów ze srebrem. Natomiast w przypadku wykorzystania AgNPs (Rys. 1A), na widmie widoczne są piki pochodzące od adduktu $[\text{cholesterol+Ag}]^+$ oraz dodatkowe wysokie piki Ag_2^+ i Ag_3^+ (Rys. 1B) [22].

Ta sama grupa naukowców z powodzeniem wykorzystwała 20 nm AgNPs, w celu ułatwienia jonizacji dwóch karotenoidów (β -karotenu i fitoenu) występujących w próbce soku marchwiowego (Rys. 2), będącego złożoną mieszaniną witamin, minerałów, terpenoidów, lipidów, węglowodanów, cukrów, białek, karotenoidów oraz aminokwasów. Rysunek 2 przedstawia widmo LDI MS, na którym wyraźnie widoczne są dwa sygnały odpowiadające adduktom $[\beta\text{-karoten+Ag}]^+$ (m/z 643,3) oraz $[\text{fitoen+Ag}]^+$ (m/z 651,4). Przy czym wart podkreślenia jest fakt, iż obydwa te związki charakteryzują się niską, a nawet bardzo niską polarnością [22].



Rysunek 2. Widmo MS świeżo wyciśniętego soku z marchwi otrzymane z wykorzystaniem 20 nm AgNPs. Przedrukowano za zezwoleniem D. Sherrod, A.J. Diaz, W.K. Russell, P.S. Cremer, D.H. Russell, *Anal. Chem.*, 2008, **80**, 6796. Prawa autorskie (2008) należą do American Chemical Society

Figure 2. Mass spectrum of freshly squeezed carrot juice obtained with 20 nm AgNPs. Reprinted with permission from D. Sherrod, A.J. Diaz, W.K. Russell, P.S. Cremer, D.H. Russell, *Anal. Chem.*, 2008, **80**, 6796. Copyright 2008 American Chemical Society

W 2008 roku Chiu i in. [34] zastosowali nanocząstki srebra w technice laserowej desorpcji/ionizacji wspomaganą powierzchnią (SALDI MS), w celu identyfikacji trzech estrogenów: E1, E2 i E3. Po wstępnym zatężeniu, badane związki były adsorbowane na AgNPs, a następnie bezpośrednio analizowane. Próg detekcji tych trzech związków wynosił odpowiednio 2,23 μM dla estronu (E1), 0,23 μM dla estradiolu (E2) oraz 2,11 μM dla estriolu (E3). Nanostruktury srebra o rozmiarach 34 ± 3 nm otrzymano nieco zmodyfikowaną metodą zaproponowaną przez Lee i in. [33], w której wodny roztwór azotanu srebra gotowano z dodatkiem cytrynianu trisodowego. Należy jednak zaznaczyć, że omówiona procedura zalicza się raczej do grupy metod nano-PALDI jako, że nie stosowano modyfikowanych nanostrukturami powierzchni targetu pomiarowego.

Wang i in. [36] opisali możliwość analizy antybiotyków aminoglikozydowych występujących w próbkach osocza ludzkiego za pomocą techniki SALDI MS z wykorzystaniem nanocząstek srebra pokrytych warstwą złota (Au@AgNPs). W swoich badaniach naukowcy założyli, że stabilizowane cytrynianem Au@AgNPs przyciągają dodatnio naładowane aminoglikozydy poprzez oddziaływanie elektrostatyczne. Syntezę ujemnie naładowanych nanocząstek srebra przeprowadzono wykorzystując metodę kontrolowanego wzrostu zarodków (seed-mediated growth). Bimetaliczne nanocząstki Au@AgNPs o rozmiarach 39 ± 5 nm otrzymano poprzez zmieszanie wodnego roztworu AgNO_3 z roztworem koloidalnego złota, tak powstałą mieszaninę dodano następnie do roztworu hydrochinonu. Otrzymaną zawiesinę Au@AgNPs mieszano z roztworem aminoglikozydów przez 1 godzinę, po czym odwirowano. Po usunięciu supernatantu, nanocząstki przemyto wodą, a następnie osadzono na płytce (target) i wysuszone na powietrzu. Granice wykrywalności aminoglikozydów w próbkach osocza określono na 9, 130, 81 i 180 nM odpowiednio dla paromomycyny, kanamycyny, neomycyny i gentamycyny [36].

Gholipour i in. [37] jako pierwsi zbadali możliwość zastosowania nanocząstek diamentowych, srebrowych, dwutlenku tytanu, tlenku barowo-strontowo-tytanowego ($(\text{BaTiO}_3)(\text{SrTiO}_3, \text{BaSrTiO})$), oraz tlenku tytanowo-krzemowego (TiSiO_4) w analizie MALDI-MS węglowodanów zawartych w tkankach roślinnych. Autorzy wykorzystali dostępne handlowo nanocząstki srebra o rozmiarach mniejszych niż 20 nm do analizy sacharozy i fruktanów za pomocą laserowej desorpcji/ionizacji w trybie jonów dodatnich i ujemnych. Wszystkie badane nanocząstki z wyjątkiem Ag umożliwiały desorpcję i jonizację węglowodanów w trybie jonów dodatnich i ujemnych. Należy zaznaczyć, iż obserwacja dotycząca AgNPs jest nieoczekiwana oraz sprzeczna z innymi wynikami opisywanymi w tym przeglądzie i prawdopodobnie wynika ze zbyt dużego stężenia środków stabilizujących albo ze zbyt wysokiego pH zawiesiny AgNPs lub AgNPs-analit.

W 2012 Nie i in. [38] zaproponowali zastosowanie dostępnych handlowo 20 nm AgNPs w technice powierzchniowo wzmocnionej spektroskopii Ramana i LDI MS (ang. *surface-enhanced Raman spectroscopy and LDI MS*, SER/LDI MS), w celu wykrycia oraz pozyskiwania informacji z próbek stałych bez konieczności stosowania dodatkowych etapów przygotowania i oczyszczenia próbki. W eksperymentach LDI, nanocząstki srebra zawieszono w układzie metanol-woda zawierającym cytryniany, a następnie mieszano przez noc z badanymi próbkami (1 mM), po czym 1 μL powstałej mieszaniny nałożono na warstwę tlenku indowo-cynowego (ITO) osadzonego na podłożu szklanym.

Związki takie jak *p*-aminotiofenol, rodamina 6G i cholesterol wybrane do analizy przy użyciu techniki SER/LDI MS wykazują silne interakcje z AgNPs. Dla pierwszego związku zaobserwowane na widmie piki pochodziły od jonów zawierających w swym składzie *p*-aminotiofenol oraz 1-3 jony/atomy srebra, natomiast w przypadku rodamin 6G i cholesterolu znaleziono piki będące prostymi adduktami z kationami H^+ oraz Ag^+ [38].

Grupa Preisler'a opracowała metodę identyfikacji steroli tj. brassikasterol (BR), cholesterol (CH), stigmasterol (ST), kampesterol (CA) oraz β -sitosterol (SI) występujących w próbkach oliwy z oliwek, oleju lnianego oraz słonecznikowego za pomocą chromatografii cieczowej w odwróconym układzie faz z zastosowaniem wspomaganą powierzchnią laserowej desorpcji/ionizacji (RPLC-SALDI MS). W opracowanej metodzie badane próbki poddano zmydłaniu w środowisku alkalicznym, po którym wykonano ekstrakcje frakcji niezmydlających się eterem dietylowym. Sterole rozdzielano na kolumnie z wypełnieniem typu C_{18} w gradientcie metanolowo-wodnym. Próbkę do analizy SALDI przygotowano wykorzystując metodę automatycznego nakładania kropli badanej substancji na płytkę, po czym w to samo miejsce nakroplona została zawiesina srebra. Zastosowanie nanocząstek srebra jako matrycy w technice SALDI pozwoliło na jonizację niepolarnych analitów zapewniając bardzo niskie granice wykrywalności 12 i 6 fmol odpowiednio dla cholesterolu oraz β -sitosterolu [39].

Nanostruktury tlenku srebra (I) otrzymane metodą strącania na mokro podobnie jak nanocząstki srebra zostały zastosowane przez Taira i in. jako środki kationizujące. Autorzy w swoich badaniach przeprowadzili analizę LDI MS tyminy oraz promotorów wzrostu włosów (*t*-flawanon oraz minoksydyl). Na otrzymanych przez nich widmach widoczne są addukty tych związków z kationami H^+ , Na^+ oraz Ag^+ [40].

3. NANOSTRUKTURY SREBRA W ANALIZIE MIKROBIOLOGICZNEJ

Metodę MALDI MS z użyciem nanostruktur srebra wykorzystano do scharakteryzowania gatunków bakterii patogennych. AgNPs mają wysoki stosunek powierzchni do objętości, dlatego też zostały zastosowane jako sondy powinowactwa (*affinity probes*) do wiązania całych komórek mikroorganizmów [41]. Generalnie, uważa się, że do przeprowadzenia analizy potrzebne są minimum $\sim 10^4$ komórek bakteryjnych, dlatego też próbki zakaźnych płynów biologicznych oraz próbki płynów fizjologicznych pobranych od osób z zatruciem pokarmowym mogą być trudne do przeanalizowania bezpośrednio za pomocą MALDI MS ze względu na stosunkowo niską zawartość komórek w cieczy.

Poważnym problemem w analizie mikroorganizmów za pomocą techniki MALDI/nanoPALDI/SALDI są szeroko opisywane w literaturze właściwości przeciwbakteryjne i przeciwgrzybicze jonów oraz nanostruktur srebrowych. Aktywność przeciwbakteryjna wzrasta wraz ze wzrostem stężenia AgNPs i prowadzi do spadku intensywności sygnałów pochodzących od białek sygnałowych na widmie masowym. Problem ten zauważono nie tylko przy zastosowaniu srebra, ale także w przypadku innych nanocząstek, takich jak nanocząstki TiO_2 i ZnO . Dlatego też w analizach LDI MS kluczowym czynnikiem jest kontrola stężenia nanocząstek [41]. Niedawno ten ważny temat dotyczący analizy oraz identyfikacji drobnoustrojów metodami laserowymi MS z wykorzystaniem nanostruktur został opisany przez

Chiu [41]. Podobne badania przedstawiła grupa Bright'a, opisując zastosowanie techniki MALDI ToF MS w identyfikacji mikroorganizmów, takich jak wirusy, bakterie, zarodniki i komórki grzybów [42]. Równolegle Yao i in. [43] opisali zastosowanie MALDI MS do identyfikacji i scharakteryzowania peptydów, jak również białek w „nienaruszonych” mikroorganizmach. W celu zwiększenia czułości analizy mikroorganizmów tj. *Escherichia coli* i *Serratia marcescens* techniką MALDI MS Wu i in. [44] zastosowali niemodyfikowane nanocząstki srebra. Wyniki badań tych naukowców wskazują, że zsyntetyzowane nanocząstki srebra o rozmiarach 50–100 nm i odpowiednich stężeniach mogą być stosowane do wychwytywania i analizy bakterii w próbkach jogurtu.

Ci sami badacze wykonali badania, w których do bakterii w trakcie ich początkowej fazy wzrostu dodali AgNPs, w celu przystosowania mikroorganizmów do obecności ciał obcych. Ponadto opisali możliwość zastosowania techniki MALDI MS do oceny jakości oraz przydatności do spożycia mikroorganizmów zawartych w jogurcie [45].

Niemodyfikowanych AgNPs użyto także w analizie MALDI MS, celu zwiększenia czułości detekcji mikroorganizmów tj. *E. coli*, *S. marcescens*, *B. lactis*; *L. acidophilus*, *S. thermophilus*, *L. bulgaricus*, *L. acidophilus*, *B. longum*, *L. bulgaricus* and *S. thermophilus* w próbkach żywności [44]. Badane były także wzajemne oddziaływania bakterii z nanocząstkami odpowiedzialnymi za możliwość wykrywania i identyfikacji substancji mikrobiologicznych za pomocą techniki MALDI MS.

4. AKTYWNE POWIERZCHNIE Z NANOSTRUKTURAMI SREBRA W LDI-MS

MALDI MS jest dosyć rzadko stosowany w analizie związków małowymiarowych (MW < 800 Da), ponieważ najczęściej stosowane matryce to małowymiarowe kwasy organiczne przyczyniające się do powstania większej ilości sygnałów w niskim zakresie mas [40, 45, 46]. Problem ten może zostać częściowo rozwiązany poprzez zastosowanie techniki SALDI (laserowa desorpcja/ionizacja wspomagana powierzchnią), którą pierwotnie opracował Sunner i in. [16]. W technice SALDI proces desorpcji/ionizacji odbywa się z wykorzystaniem aktywnych powierzchni bez konieczności stosowania „tradycyjnej” organicznej matrycy. Powierzchnie SALDI często zawierają organiczne, nieorganiczne lub metaliczne mikro- lub nanostruktury. SALDI należy traktować jako ogólne określenie metod z zastosowaniem nanocząstek np. AgNPET, AuNPET, NALDI (laserowa desorpcja/ionizacja wspomagana nanostrukturami) [49], nano-PALDI (laserowa desorpcja/ionizacja wspomagana nanocząstkami) lub inne metody [50], w których nanostruktury związane są do powierzchni płytki przed nałożeniem badanej próbki. Należy zaznaczyć, że pomimo, iż NALDI jest ogólną nazwą metod opartych o zastosowanie powierzchni złożonych z nanostruktur to w literaturze nazwa ta głównie odnosi się do metody

opracowanej przez firmę Bruker Daltonics wykorzystującej powierzchnie zawierające nanodruły krzemowe.

Metody LDI zaliczają się do metod miękkiej jonizacji gdzie fragmentacja analitu jest stosunkowo niewielka w porównaniu do innych metod jonizacji, dzięki czemu znacznie ułatwiają analizy delikatnych związków chemicznych czy makrocząsteczek [51]. Metody SALDI z wykorzystaniem AgNPs mają ogromny potencjał, ponieważ AgNPs wyjątkowo skutecznie pochłaniają ultrafioletowe promieniowanie lasera, energia ta jest następnie przekazywana w procesie desorpcji/jonizacji m.in. do cząsteczek analitu [52–54].

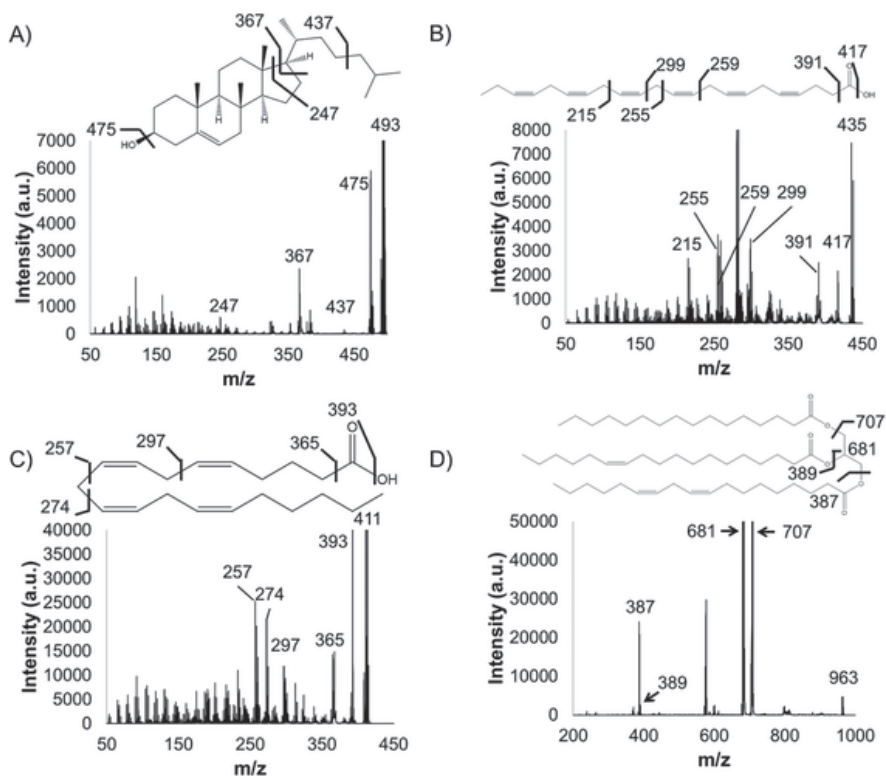
W literaturze można znaleźć liczne doniesienia naukowe dowodzące, iż srebro jest bardzo dobrym czynnikiem kationizującym, często stosowanym w spektrometrii mas do analizy różnych olefin tj. cholesterol, kwasy tłuszczowe, ale także do analizy średnio- oraz mało polarnych polimerów. Zostało również udowodnione, że AgNPs mają zdolność do skutecznego wiązania na swojej powierzchni różnych związków chemicznych. Promują tym samym ich kationizację. Limity detekcji dla związków wykrywanych z ich użyciem są rzędu fmol [23].

W 1999 roku grupy Buriak'a i Siuzdak'a opracowały metodę laserowej desorpcji/jonizacji na porowatym krzemie (DIOS) (ang. *desorption/ionization on porous silicon*, DIOS) pozwalającą na analizę cząsteczek o małych masach cząsteczkowych [55]. W metodzie tej stosuje się stałe podłoża, najczęściej porowaty krzem lub zmodyfikowaną krzemionkę, spełniające funkcję matrycy. Porowaty krzem, uzyskano poprzez trawienie płytek krzemowych, np. metodą galwanostatyczną. Materiał ten charakteryzuje się dobrze rozwiniętą powierzchnią, co umożliwia nie tylko skuteczne osadzanie na niej analitu, ale i intensywną absorpcję promieniowania laserowego. Wadą metody DIOS jest często ograniczony zakres mas badanych związków. Podejście to zostało rozwinięte przez możliwość wykorzystania różnych nanostruktur krzemu oraz kilku rodzajów nanocząstek (Ag, Au, P, HgTe, ZnS, nanokrystaliczne TiO_2 , MnO_2 , Mn_2O_3) [56]. Jednakże główną wadą materiałów porowatych jest utrata aktywności po odparowaniu wody, proces ten może nastąpić już w ciągu kilku dni.

Kilka lat temu grupa Xiao zaproponowała ulepszoną metodę DIOS (desorpcja jonizacja na porowatym krzemie) do LDI MS, w której porowatą powierzchnię krzemu zmodyfikowano poprzez osadzenie AgNPs. Autorzy do testów zmodyfikowanej metody wykorzystali tetra-pirydylo porfiryne (TPyP), oligomery glikolu polietylenowego (PEG 400 i 2300) oraz peptyd oksytocynę. Wartości limitu wykrywalności (ang. *limit of detection*, LOD) dla PEG-400, PEG-2300, oksytocyny oraz TPyP są bardzo niskie i wynoszą odpowiednio 3,0 pmol, 30 pmol, 400 fmol, 5 fmol. Należy jednak zaznaczyć, że porfiryne były proponowane wcześniej jako potencjalne matryce, dlatego też nie są najlepszym przykładem związków testowych [57].

Dufresne i in. zbadali możliwość napylenia metalicznego srebra na skrawki tkanek w celu umożliwienia analizy MS oraz wysokorozdzielczego obrazowania spektrometrią mas olefin metodą laserowej desorpcji/jonizacji [58]. Na Rysunku 3

przedstawiono widma MS/MS wykonane dla skrawka nerki, na którym osadzona została bardzo cienka warstwa srebra grubości 16 ± 2 nm. Zaproponowano także ścieżki fragmentacji adduktu srebra z kwasem arachidowym, kwasem dokozaheksaenowym, cholesterolem oraz triacyloglicerydem typu 52:3. Zaproponowana metoda jest interesującym podejściem pozwalającym za uzyskanie dużej ilości informacji z fragmentu badanej tkanki [58].



Rysunek 3. Widma MS/MS cholesterolu (A), kwasu dokozaheksaenowego (B) kwasu arachidowego (C) oraz triacyloglicerydu 52:3 (D) uzyskane dla skrawka nerki, na którym osadzona została bardzo cienka warstwa srebra oraz zaproponowane ścieżki fragmentacji badanych molekuł. Przedrukowano za zezwoleniem M. Dufresne, A. Thomas, J. Breault-Turcot, J.-F. Masson, P. Chaurand, *Anal. Chem.*, 2013, **85**, 3318. Prawa autorskie (2013) należą do American Chemical Society

Figure 3. MS/MS spectra of cholesterol (A), docosahexaenoic acid (B), arachidonic acid (C), and triacylglyceride 52:3 (D) acquired from a kidney tissue section after silver sputtering with fragmentation pathways proposed for each molecule. Reprinted with permission from M. Dufresne, A. Thomas, J. Breault-Turcot, J.-F. Masson, P. Chaurand, *Anal. Chem.*, 2013, **85**, 3318. Copyright 2013 American Chemical Society

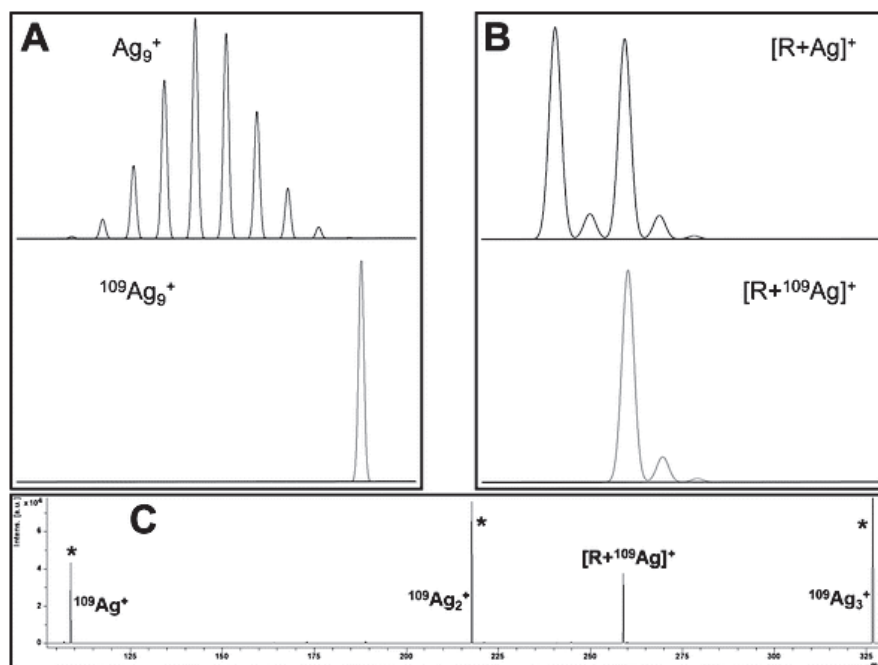
Niedawno grupa Volmera zaprezentowała doskonałą pracę na temat elektrochemicznej metody osadzania ok. 100 nm grubości warstwy nanostruktur palladu i srebra oraz ich zastosowania w metodzie SALDI MS do analizy małych cząsteczek biologicznych. Autorzy do testów nowej metody wykorzystali kwasy tłuszczowe, triglicerydy, węglowodany i antybiotyki. Co ciekawe, autorzy stwierdzili, że addukty

potasowe były widoczne jedynie gdy grubość warstwy była niższa niż 100 nm, podczas gdy addukty Pd i Ag są generowane gdy grubość warstwy jest równa lub większa niż 120 nm [48]. Pomimo, iż metoda ta pozwala na analizę związków cechujących się małym ciężarem cząsteczkowym to jednak jej główną wadą jest brak na widmach pików przypisanych do nanostruktur srebra, które mogłyby posłużyć do precyzyjnej kalibracji wewnętrznej.

Niedawno naukowcom udało się otrzymać metodą zol-żel porowate nanocząstki srebra [59]. Cienki film porowatych AgNPs wytworzono na powierzchni szkła przez powlekanie wirowe z roztworu kompleksu zawierającego ortokrzemian tetraetylu, kwas azotowy, 2-etoksyetanol oraz azotan srebra. Świeżo pokryte płytki poddano obróbce cieplnej w atmosferze powietrza w temperaturze 700°C w ciągu 7 godzin. Otrzymane cienkie folie były następnie bezpośrednio nanoszone na powierzchnię stali nierdzewnej płytki MALDI i wykorzystane do analizy. Na widmach MS widoczne są piki pochodzące od adduktów angiotensyny II, a także różnych triglicerydów i fosfatydylocholino ze srebrem [59].

Metoda syntezy nanocząstek srebra bezpośrednio na powierzchni płytki stalowej zaprezentowała niedawno nasza grupa. W wyniku przeprowadzonych prac udało się otrzymać bardzo cienkie warstwy kationowych nanocząstek srebra wielkości około 100 nm zarówno na zmodyfikowanych jak również komercyjnie dostępnych płytkach MALDI. Syntezę nanocząstek srebra elektrostatycznie związanych z płytką stalową przeprowadzono poprzez redukcję trifluorooctanu srebra z DHB w tetrahydrofuranie w temperaturze pokojowej bezpośrednio nad powierzchnią płytki. Przygotowanie próbki do analizy wymagało jedynie naniesienia 0,5–1 µl roztworu analitu na płytkę oraz wysuszenia na powietrzu. Za pomocą tej metody analizowano różne grupy związków różniące się m.in. polarnością tj. aminokwasy, sacharydy, nukleozydy, glikozydy, kwasy sulfonowe, aldehydy i zasady nukleinowe. Zastosowanie kationowych nanocząstek srebra pozwoliło na wykrycie D-rybozy na poziomie attomolowym, jak również analizę próbek biologicznych, takich jak mocz czy osocze krwi [47, 51]. Ponadto, nasza grupa jako pierwsza zaprezentowała możliwość zastosowania w technice LDI MS monoizotopowych $^{109}\text{AgNPs}$ pozwalających na uzyskanie wyższej czułości, dokładności i rozdzielczości, m.in. ze względu na uproszczony rozkład izotopowy.

Metoda $^{109}\text{AgNPET}$ pozwala osiągnąć około 2-krotnie wyższe poziomy intensywności adduktów z $^{109}\text{Ag}^+$ (Rys. 4B), a nawet 10- do 100-krotnie wyższe w przypadku złożonych adduktów z $^{109}\text{Ag}_5^+ - ^{109}\text{Ag}_0^+$ (Rys. 4A). Na widmie D-rybozy wykonanym metodą $^{109}\text{AgNPET}$ (Rys. 4C) występuje pojedynczy pik przypisany do adduktu [rybozy + ^{109}Ag] $^+$ o m/z 256,96.



Rysunek 4. Obliczone rozkłady izotopowe dla jonów $^{109}Ag_9^+$ (A, dół), Ag_9^+ (A, góra) oraz adduktów [ryboza+ ^{109}Ag] $^+$ (B, dół) i [ryboza+ Ag] $^+$ (B, góra). Widmo LDI MS wykonane dla D-rybozy (R) na płytce $^{109}AgNPET$ w trybie dodatnim z reflektorem. Przedrukowano za zezwoleniem J. Nizioł, W. Rode, B. Laskowska, T. Ruman, *Anal. Chem.*, 2013, **85**, 1926. Prawa autorskie (2013) należą do American Chemical Society

Figure 4. Calculated isotopic distributions of a $^{109}Ag_9^+$ (A, bottom), Ag_9^+ (A, top), [ribose + ^{109}Ag] $^+$ (B, bottom) and [ribose + Ag] $^+$ (B, top) ions along with $^{109}AgNPET$ mass spectrum (C) of D-ribose (R) in positive reflection mode. Reprinted with permission from J. Nizioł, W. Rode, B. Laskowska, T. Ruman, *Anal. Chem.*, 2013, **85**, 1926. Copyright 2013 American Chemical Society

Hong i współpracownicy zaproponowali metodę redukcji srebra na powierzchni ciała stałego. Nowe nanostruktury otrzymane poprzez redukcję jonów srebra za pomocą powierzchniowo związanej polidopaminy były testowane w celu określenia wydajności jonizacji małych peptydów [61].

5. AgNPs W OBRAZOWANIU LDI-MS

Obrazowanie spektrometrią mas (ang. *MS imaging*, MSI) to technika wykorzystywana do wizualizacji rozkładu powierzchniowego biomolekuł bez konieczności wykonywania ekstrakcji, oczyszczania, rozdzielania oraz znakowania próbek biologicznych. O ile najczęściej stosowane obrazowanie MS to analiza powierzchni (2D MS) to należy pamiętać, że wyniki mają charakter 4-wymiarowy ponieważ każdy analizowany punkt posiada dwie współrzędne powierzchniowe, a także 2-wymiarowe (m/z oraz intensywność). Poza szeregiem problemów z zastosowaniem MALDI

do analizy małych cząsteczek, pozostaje problem ograniczenia rozdzielczości przestrzennej w MALDI-MSI. Aby przezwyciężyć ten problem, naukowcy wykorzystali nanostruktury srebrne jako zamienniki organicznych matryc [58, 62].

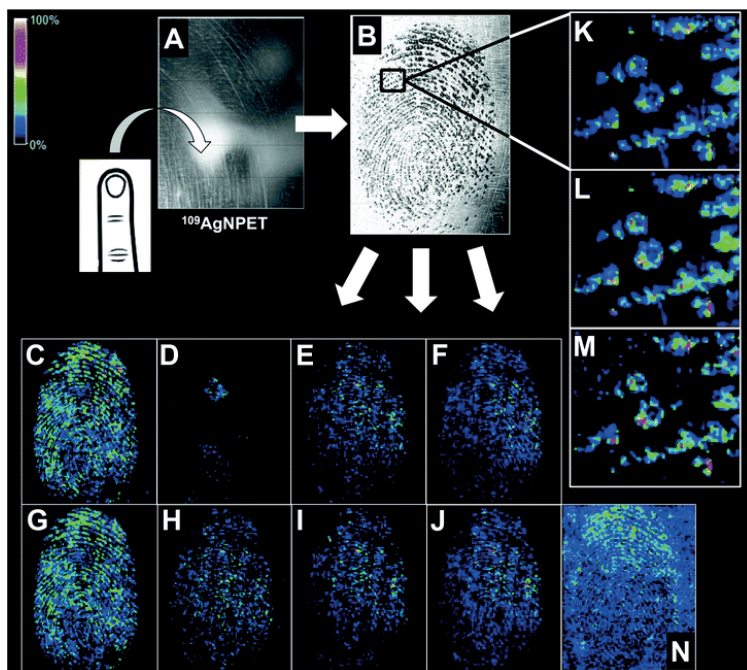
Dufresne i współpracownicy zaprezentowali metodę obrazowania MS, w której metaliczne srebro zostało napyłone na powierzchnię skrawków tkanek myszy i szczura. Autorzy uzyskali obrazy jonowe m.in. dla adduktu cholesterolu z kationem srebra w warstwie zwojowej oraz ziarnistej kory mózdzku myszy [58]. Grupa Lee zastosowała obrazowanie LDI-MS, w celu określenia lokalizacji poszczególnych astrocytów oraz zbadania rozkładu cholesterolu na poziomie pojedynczej komórki. W celu zapewnienia jednorodnego pokrycia komórek nanocząstkami srebra zastosowano procedurę polegającą na ośmiokrotnym rozpyleniu zawiesiny AgNPs za pomocą nebulizera. Co ciekawe autorzy dostrzegli, że niemal wyłącznym widocznym na widmie MS składnikiem komórkowym był cholesterol [64].

Jackson i współpracownicy zastosowali matryce AgNP, aby uzyskać lokalizację kilku klas lipidów występujących w tkance serca poprzez bezpośrednią iniekcję AgNPs do skrawka tkanki oraz następnie analizę tkanek metodą LDI MSI w trybie jonów dodatnich. Autorzy w celu wykonania badań pokryli metodą napyłania magnetronowego nanocząstkami srebra wielkości 0,5–15 nm cały wieńcowy przekrój mózgu szczura [65]. Godne uwagi jest to, że zastosowanie AgNPs pozwoliło na uzyskanie wysokiej wydajności jonizacji triacyloglicerydów (TAG) cechujących się niską polarnością, co bywa problematyczne np. w analizie metodami opartymi o ESI. Na widmach masowych wykonanych w regionie naczyń krwionośnych serca wyraźnie widoczne są piki przypisane do TAG, natomiast widma z regionu mięśnia sercowego zawierają głównie piki przypisane do fosfatydylocholin (PC) i fosfatydyloetanoloamin (PE) [65].

Niedawno grupa Ewing'a przedstawiła ciekawą możliwość wykorzystania nanocząstek srebra oraz złota w technice LDI oraz spektrometrii mas jonów wtórnych (SIMS). Autorzy wykorzystali nanocząstki srebra i złota w analizie LDI próbki lipidu zawierającego 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfocholiny (ang. *1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine*, POPC), w celu identyfikacji fragmentów lipidów zawierających POPC. Ponadto, autorzy zaobserwowali dwukrotne wzmocnienie sygnałów dla pików przy m/z 184 i 86 przypisanych do fragmentów POPC, jak również do adduktu POPC z protonem (m/z 760) [66].

Metodę nano-PALDI-MSI z wykorzystaniem AgNPs zastosowano, w celu wizualizacji rozkładu przestrzennego kwasów tłuszczowych w skrawkach wątroby oraz siatkówki myszy. Nanocząstki srebra o rozmiarach $3,84 \pm 0,45$ nm otrzymano w reakcji prekursora – $n\text{-C}_{13}\text{H}_{27}\text{COOAg}$ z stearylamina [15, 62]. Istotnym jest fakt, iż zidentyfikowanych metodą nano-PALDI-MSI z wykorzystaniem AgNPs kwasów tłuszczowych, nie można było wykryć przy użyciu metody MALDI z użyciem matrycy DHB. Wyniki otrzymane metodą nano-PALDI-MSI wskazują, że limit detekcji dla kwasu palmitynowego jest mniejszy niż 50 pmol [62]. Nanocząstki srebra zastosowano także do stworzenia map rozkładu powierzchniowego różnych klas kwasów tłuszczowych w przekroju siatkówki myszy [62].

Grupa Lee przedstawiła szereg ciekawych usprawnień systemu obrazowania LDI MS z pałąką jonową. Wspomnianej grupie udało się zmodyfikować typowy układ optyczny poprzez zmianę światłowodu o średnicy 25 mikrometrów na ok. 12 μm , w wyniku czego uzyskali rozdzielczość przestrzenną umożliwiającą obrazowanie MS pojedynczych komórek w kwiatach *Arabidopsis thaliana* [67]. Związki występujące w kwiatach i korzeniach rośliny jonizowano przy pomocy koloidalnego srebra rozpylonego na materiale biologicznym z wykorzystaniem nebulizera własnej konstrukcji. Przy zastosowaniu wspomnianych ulepszeń autorzy skoncentrowali się na związkach o długich łańcuchach, takich jak alkanany, alkohole, kwasy tłuszczowe i ketony zawierające 27–31 atomów węgla [67].



Rysunek 5. Analiza MSI odcisku palca (rozmiar piksela 150 μm) na płytce $^{109}\text{AgNPET}$. A, B – zdjęcia mikroskopowe powierzchni $^{109}\text{AgNPET}$ bez (A) oraz z odciskiem palca (B). C–J – reprezentacje graficzne (normalizacja TIC) związków występujących w odcisku palca o m/z : 131,895 (C), 315,036 (D), 312,301 (E), 240,259 (F), 147,864 (G), 396,150 (H), 284,286 (I), 311,303 (J) i 168,982 (N). Obrazy K (m/z 96,922), L (m/z 80,948) i M (m/z 83,022) przedstawiają reprezentacje graficzne innego doświadczenia wykonanego z rozdzielczością przestrzenną $50 \times 50 \mu\text{m}$. Przedrukowano za zezwoleniem J. Nizioł, T. Ruman, *Anal. Chem.*, 2013, **85**, 12070. Prawa autorskie (2013) należą do American Chemical Society

Figure 5. Latent fingerprint MSI analysis (150 μm pixel size) on $^{109}\text{AgNPET}$. A, B – Optical microscopy images of a $^{109}\text{AgNPET}$ surface without (A) and with a fingerprint (B). C–J – Graphical representations (TIC normalization) of fingerprint compounds at m/z : 131.895 (C), 315.036 (D), 312.301 (E), 240.259 (F), 147.864 (G), 396.150 (H), 284.286 (I), 311.303 (J) and 168.982 (N). The K (m/z 96.922), L (m/z 80.948) and M (m/z 83.022) representations are from another experiment of $50 \times 50 \mu\text{m}$ spatial resolution. Reprinted with permission from J. Nizioł, T. Ruman, *Anal. Chem.*, 2013, **85**, 12070. Copyright 2013 American Chemical Society

Metodę pokrywania standardowej płytki MALDI kationowymi nanocząstkami ^{109}Ag ($^{109}\text{AgNPs}$) zastosowano w obrazowaniu MS organicznych i nieorganicznych związków chemicznych pochodzenia endo- i egzogenne obecnych w odcisku palca, który uzyskano przez bezpośrednie dotknięcie palcem do płytki-targetu oraz takiego transferowanego przy użyciu winylowej taśmy klejącej [51]. Metoda $^{109}\text{AgNPET}$ może być również użyta do obrazowania MS śladów obcej substancji umieszczonej na palcu (Rys. 5) [68]. Odciski palca były także badane przez grupę Lauzon'a proponującą metodę obrazowania odcisków palca z użyciem napyłonego srebra [69].

PODSUMOWANIE

W niniejszej pracy zostały zaprezentowane przykłady zastosowania nanostruktur srebrowych w rodzinie metod LDI MS. Metody te zostały z powodzeniem zastosowane do analizy budowy związków chemicznych zarówno jonowych jak i niejonowych, o dużym i małym ciężarze cząsteczkowym. Przedstawione w tym przeglądzie metody umożliwiają analizę złożonych mieszanin biologicznych, takich jak osocze krwi czy mocz, nawet w ilościach śladowych. Omówiono również wiele zastosowań nanostruktur srebra w obrazowaniu LDI-MS. Wizualizacja lokalizacji związków w różnych typach tkanek roślinnych i zwierzęcych, a także możliwość analizy kryminalistycznej odcisków palców za pomocą obrazowania LDI-MS z wykorzystaniem AgNPs ma ogromny potencjał dla przyszłego rozwoju laserowej spektrometrii mas.

Publikacja została sfinansowana ze środków Narodowego Centrum Nauki przyznanych na podstawie decyzji numer UMO-2015/19/N/ST4/00379.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] M. Karas, D. Bachmann, U. Bahr, F. Hillenkamp, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes*, 1987, **78**, 53.
- [2] F. Hillenkamp, M. Karas, R.C. Beavis, B.T. Chait, *Anal. Chem.*, 1991, **63**, 1193.
- [3] F. Hillenkamp, M. Karas, *Methods Enzymol.*, 1990, **193**, 280.
- [4] J. Albrethsen, *Clin. Chem.*, 2007, **53**, 852.
- [5] R. Knochenmuss, F. Dubois, M.J. Dale, R. Zenobi, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 1996, **10**, 871.
- [6] M. Karas, F. Hillenkamp, *Anal. Chem.*, 1988, **60**, 2299.
- [7] P.C. Lin, P.H. Chou, S.H. Chen, K.L. Liao, K.Y. Wang, Y.J. Chen, C.C. Lin, *Small*, 2006, **4**, 485.
- [8] B. Domon, R. Aebersold, *Science*, 2006, **312**, 212.
- [9] S. Berkenkamp, F. Kirpekar, F. Hillenkamp, *Science*, 1998, **281**, 260.
- [10] K.C. Ho, P.J. Tsai, Y.S. Lin, Y.C. Chen, *Anal. Chem.*, 2004, **76**, 7162.
- [11] K. Shrivasa, H.F. Wu, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2007, **21**, 3103.
- [12] K. Shrivasa, H.F. Wu, *J. Mass Spectrom.*, 2007, **42**, 1637.
- [13] R. Pilolli, F. Palmisano, N. Cioffi, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2012, **402**, 601.
- [14] K. Tanaka, H. Waki, Y. Ido, S. Akita, Y. Yoshida, T. Yoshida, T. Matsuo, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 1988, **2**, 151.

- [15] N. Cioffi, L. Colaianne, R. Pilolli, C.D. Calvano, F. Palmisano, P.G. Zambonin, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2009, **394**, 1375.
- [16] J. Sunner, E. Dratz, Y.C. Chen, *Anal. Chem.*, 1995, **67**, 4335.
- [17] M.J. Dale, R. Knochenmuss, R. Zenobi, *Anal. Chem.*, 1996, **68**, 3321.
- [18] M. Schurenberg, K. Dreisewerd, F. Hillenkamp, *Anal. Chem.*, 1999, **71**, 221.
- [19] Y.E. Silina, M. Koch, D.A. Volmer, *J. Mass Spectrom.*, 2014, **49**, 468.
- [20] I.D.G. Macdonald, W.E. Smith, *Langmuir*, 1999, **12**, 706.
- [21] L. Hua, J. Chen, L. Ge, S.N. Tan, *J. Nanopart. Res.*, 2007, **9**, 1133.
- [22] S.D. Sherrod, A.J. Diaz, W.K. Russell, P.S. Cremer, D.H. Russell, *Anal. Chem.*, 2008, **80**, 6796.
- [22] K. Shrivastava, H.F. Wu, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2008, **22**, 2863.
- [23] F. Frederix, J. Friedt, K. Choi, W. Laureyn, A. Campitelli, D. Mondelaers, G. Maes, G. Borghs, *Anal. Chem.*, 2003, **75**, 6894.
- [24] C.L. Su, W.L. Tseng, *Anal. Chem.*, 2007, **79**, 1626.
- [25] C.H. Teng, K.C. Ho, Y.S. Lin, Y.C. Chen, *Anal. Chem.*, 2004, **76**, 4337.
- [26] P.R. Sudhir, H.F. Wu, Z.C. Zhou, *Anal. Chem.*, 2005, **77**, 7380.
- [27] K. Shrivastava, H.F. Wu, *Anal. Chem.*, 2008, **80**, 2583.
- [28] P.T. Sudhir, K. Shrivastava, Z.C. Zhou, H.F. Wu, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2008, **22**, 3076.
- [29] S.K. Kailasa, H.F. Wu, *Talanta*, 2010, **83**, 527.
- [30] L. Shastri, H.N. Abdelhamid, M. Nawaz, H.-F. Wu, *RSC Adv.*, 2015, **5**, 41595.
- [31] M. Inuta, R. Arakawa, H. Kawasaki, *Anal. Methods*, 2013, **19**, 5031.
- [32] M. Yang, T. Fujino, *Chem. Phys. Lett.*, 2013, **576**, 61.
- [33] T.C. Chiu, L.C. Chang, C.K. Chiang, H.T. Chang, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2008, **19**, 1343.
- [34] P.C. Lee, D. Meisel, *J. Phys. Chem.*, 1982, **86**, 3391.
- [35] M.T. Wang, M.H. Liu, C.R.C. Wang, S.Y. Chang, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2009, **20**, 1925.
- [36] Y. Gholipour, S.L. Giudicessi, H. Nonami, R. Erra-Balsells, *Anal. Chem.*, 2010, **82**, 5518.
- [37] B. Nie, R.N. Masyukova, P.W. Bohn, *Analyst*, 2012, **137**, 1421.
- [38] B. Vrbková, V. Roblová, E.S. Yeung, J. Preisler, *J. Chromatogr. A*, 2014, **1358**, 102.
- [39] S. Taira, H. Taguchi, R. Fukuda, K. Uematsu, Y. Ichiyanagi, Y. Tanaka, Y. Fujii, H. Katano, *Mass Spectrom.*, 2014, **3**, S0025.
- [40] T.C. Chiu, *Int. J. Mol. Sci.*, 2014, **15**, 7266.
- [41] J.J. Bright, M.A. Claydon, M. Soufian, D.B. Gordon, *J. Microbiol. Methods*, 2002, **48**, 127.
- [42] Z.P. Yao, P.A. Demirev, C. Fenselau, *Anal. Chem.*, 2002, **74**, 2529.
- [43] C.H. Lee, J. Gopal, H.F. Wu, *Biosens. Bioelectron.*, 2012, **31**, 77.
- [44] J. Gopal, H.-F. Wu, C.H. Lee, *Analyst*, 2011, **136**, 5077.
- [45] J. Gopal, M. Manikandan, N. Hasan, C.-H. Lee, H.-F. Wu, *J. Mass Spectrom.*, 2013, **48**, 119.
- [46] J. Nizioł, Z. Zieliński, W. Rode, T. Ruman, *Int. J. Mass Spectrom.*, 2013, **335**, 22.
- [47] Y.E. Silina, F. Meier, V.A. Nebolsin, M. Koch, D.A. Volmer, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2014, **25**, 841.
- [48] M.F. Wyatt, S. Ding, B.K. Stein, A.G. Brenton, R.H. Daniels, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2010, **21**, 1256.
- [49] K.P. Law, J.R. Larkin, *Bioanal. Chem.*, 2011, **399**, 2597.
- [50] J. Nizioł, W. Rode, B. Laskowska, T. Ruman, *Anal. Chem.*, 2013, **85**, 1926.
- [51] C. Lei, K. Qian, O. Noonan, A. Nouwens, C. Yu, *Nanoscale*, 2013, **5**, 12033.
- [52] C.-C. Hu, M.-F. Huang, H.-T. Chang, *Bioanalysis*, 2013, **5**, 633.
- [53] J.A. Stolee, B.N. Walker, V. Zorba, R.E. Russo, A. Vertes, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2012, **14**, 8453.
- [54] J. Wei, J.M. Buriak, G. Siuzdak, *Nature*, 1999, **399**, 243.
- [55] O.A. Boryak, M.V. Kosevich, V.V. Chagovets, V.G. Zobnina, V.V. Orlov, V.S. Shelkovsky, S.G. Stepanian, *J. Anal. Chem.*, 2012, **67**, 994.

- [56] H. Yan, N. Xu, W.-Y. Huang, H.-M. Han, S.-J. Xiao, *Int. J. Mass Spectrom.*, 2009, **281**, 1.
- [57] M. Dufresne, A. Thomas, J. Breault-Turcot, J.-F. Masson, P. Chaurand, *Anal. Chem.*, 2013, **85**, 3318.
- [58] R.C. Gamez, E.T. Castellana, D.H. Russell, *Langmuir*, 2013, **29**, 6502.
- [59] J. Nizioł, T. Ruman, *Int. J. Chem. Eng. Appl.*, 2013, **2**, 46.
- [60] S. Hong, J.S. Lee, J. Ryu, S.H. Lee, D.Y. Lee, D.-P. Kim, C.B. Park, H. Lee, *Nanotechnology*, 2011, **22**, 494020.
- [61] T. Hayasaka, N. Goto-Inoue, N. Zaima, K. Shrivasa, Y. Kashiwagi, M. Yamamoto, M. Nakamoto, M. Setou, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2010, **21**, 1446.
- [62] J.C. Jurchen, S.S. Rubakhin, J.V. Sweedler, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2005, **16**, 1654.
- [63] D.C. Perdian, S. Cha, J. Oh, D.S. Sakaguchi, E.S. Yeung, Y.J. Lee, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2010, **24**, 1147.
- [64] S.N. Jackson, K. Baldwin, L. Muller, V.M. Womack, J.A. Schultz, C. Balaban, A.S. Woods, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2014, **406**, 1377.
- [65] A.S. Mohammadi, J.S. Fletcher, P. Malmberg, A.G. Ewing, *Surf. Interface Anal.*, 2014, **46**, 379.
- [66] J.H. Jun, Z. Song, Z. Liu, B.J. Nikolau, E.S. Yeung, Y.J. Lee, *Anal. Chem.*, 2010, **82**, 3255.
- [67] J. Nizioł, T. Ruman, *Anal. Chem.*, 2013, **85**, 12070.
- [68] N. Lauzon, M. Dufresne, V. Chauhan, P. Chaurand, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2015, **26**, 878.

Praca wpłynęła do Redakcji 17 czerwca 2016

