



**УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ**

Ива А. Поповић

**ИСПИТИВАЊЕ ПРИМЕНЕ НЕОРГАНСКИХ СУПСТРАТА
НА БАЗИ НАНОКРИСТАЛА TiO_2 ЗА ДЕТЕКЦИЈУ И
КВАНТИФИКАЦИЈУ МАЛИХ МОЛЕКУЛА SALDI TOF
МАСЕНОМ СПЕКТРОМЕТРИЈОМ**

Докторска дисертација

Крагујевац, 2017

I. Аутор

Име и презиме: **Ива Поповић**

Датум и место рођења: **23.01.1984. год., Београд**

Садашње запослење: **Институт за Нуклеарне Науке „Винча“, Београд**

II. Докторска дисертација

Наслов: **Испитивање примене неорганских супстрата на бази нанокристала TiO_2 за детекцију и квантификацију малих молекула SALDI TOF масеном спектрометријом**

Број страница: **128**

Број слика: **24**

Број библиографских јединица: **189**

Установа и место где је рад израђен: **Институт за Нуклеарне Науке „Винча“, Београд**

Научна област (УКД): **Хемија (54) - Неорганска хемија (546)**

Ментор: **др Маријана Петковић**

III. Оцена и одбрана

Датум пријаве теме: **28.10.2015; 10.11.2015. год.**

Комисија за оцену подобности теме и кандидата:

1. **Др Маријана Петковић, ментор, научни саветник, ИНН „Винча“, Београд**
Ужа научна област: Хемија
2. **Др Живадин Д. Бугарчић, редовни професор, ПМФ, Крагујевац,**
Ужа научна област: Неорганска хемија
3. **Др Биљана Петровић, ванредни професор, ПМФ, Крагујевац,**
Ужа научна област: Неорганска хемија

Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације:

Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације:

1. **Др Живадин Д. Бугарчић, редовни професор, ПМФ, Крагујевац,**
Ужа научна област: Неорганска хемија
2. **Биљана Петровић, ванредни професор, ПМФ, Крагујевац,**
Ужа научна област: Неорганска хемија
3. **Зоран Шапоњић, научни саветник, ИНН „Винча“, Београд,**
Ужа научна област: Наноматеријали

Датум одбране докторске дисертације:

Мојој породици

Ова докторска дисертација је рађена у Институту за нуклеарне науке „Винча“, Универзитета у Београду, под менторским руководством др Маријане Петковић.

Посебну захвалност дугујем својој менторки, др Маријани Петковић што ми је пружила могућност да постанем део њеног истраживачког тима и тиме ми омогућила да започнем своју научну каријеру. На првом месту сам захвална на дивном, пријатељском односу, као и на великом стрпљењу, неизмерној подршци, свом знању које ми је пренела током израде докторске дисертације, али и на осветљавању мог даљег пута којим ћу ићи у наредном поглављу свог истраживачког рада.

Захваљујем се др Зорану Шапоњићу као и сарадницама његове истраживачке групе на свом пруженом знању, саветима, сугестијама, подршци и великој помоћи током израде, писања и прегледа докторске дисертације.

Веома сам захвална и сарадницима мог истраживачког тима који су моја друга породица, Маји Нешић, Марији Нишавић, Јадранки Милетић, Борису Рајчићу, као и нашој колегиници Шини Камчевој на пријатељству и на великој помоћи и подршци коју су ми пружили у току израде докторске дисертације. Захваљујем се и свим осталим колегама из Института за нуклеарне науке „Винча“.

Захваљујем се проф. др Живадину Бугарчићу и проф. др Биљани Петровић на учешћу у комисији за преглед, оцену и одбрану тезе. Такође им се захваљујем и на великој помоћи, као и на саветима током израде и писања докторске тезе. Захваљујем се и сарадницама проф. Бугарчића Јовани, Снежци, Ани и Мири на свој пруженој помоћи.

Неизмерно сам захвална мојим пријатељицама што су веровале у мене, мој труд и рад, што су ме увек подржавале и поносиле се мојим успесима.

Мојим родитељима, баки, сестри и брату дугујем највећу захвалност на безграничној љубави и вери које су ми дале снагу и крила.

Хвала мом Ђолету који је мој ослонац, мотивација и инспирација.

Ива Поповић

Списак радова и саопштења Иве Поповић

1. Научни радови објављени у међународним часописима:

1.1 Iva Popović, Maja Nešić, Marija Nišavić, Mila Vranješ, Tamara Radetić, Zoran Šaponjić, Romana Masnikosa, Marijana Petković,

Suitability of TiO₂ nanoparticles and prolatenanospheroids for laser desorption and ionization mass spectrometric characterization of bipyridine-containing complexes,

Materials letters, 2015, **150**, 84-88.

ISSN/ISBN 0167-577X, DOI:10.1016/j.matlet.2015.03.004

M21

IF 2.437

1.2 Iva Popović, Maja Nešić, Mila Vranješ, Zoran Šaponjić, Marijana Petković,

TiO₂ nanocrystals - Assisted laser desorption and ionization Time-of-Flight mass spectrometric analysis of steroid hormones, amino acids and saccharides, Validation and comparison of methods,

RSC Advances, 2016, **6**, 1027-1036.

ISSN/ISBN 2046-2069, DOI: 10.1039/C5RA20042C

M21

IF 3.289

1.3 Iva Popović, Dubravka Milovanović, Jadranka Miletić, Mila Vranješ, Zoran Šaponjić, Marijana Petković,

Dependence of the quality of SALDI TOF MS analysis on the TiO₂ nanocrystals' size and shape,

Optical and quantum electronics, 2016, **48**, 1-6.

ISSN/ISBN 0306-8919, DOI: 10.1007/s11082-016-0413-5

M22

IF 1.290

1.4 Iva Popović, Maja Nešić, Mila Vranješ, Zoran Šaponjić, Marijana Petković,

SALDI-TOF-MS analyses of small molecules (citric acid, dexasone, vitamins E and A) using TiO₂ nanocrystals as substrates,

Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2016, **26**, 7481-7490.

ISSN/ISBN 1618-2642, DOI: 10.1007/s00216-016-9846-8

M21

IF 3.125

2. Радови саопштени на националним научним конференцијама

2.1 Iva Popović, Maja Nešić, Zoran Šaponjić, Marijana Petković,

Quantitative and qualitative comparison of mass spectra of vitamin E and A acquired with MALDI, SALDI and LDI TOF MS techniques,

53rd Meeting of the Serbian Chemical Society,

Kragujevac, Serbia, June 10-11, 2016, Book of abstracts, page 13.

M64

3. Радови саопштени на међународним научним конференцијама:

3.1 Iva Popović, Maja Nešić, Zoran Šaponjić, Marijana Petković,

The interaction between variously shaped TiO₂ nanoparticles with UV laser determines the quality of the mass spectra of carbohydrates,

Photonica,

Belgrade, Serbia, August 24-28, 2015, Book of abstracts, page 101.

M34

3.2 Iva Popović, Maja Nešić, Zoran Šaponjić, Marijana Petković,

Comparison of the MALDI and TiO₂-assisted SALDI mass spectra of hormones and amino acids,

Journal of Chromatography and Separation Technique, 2015, page 102.

M34

3.3 Iva Popović, Maja Nešić, Marija Nišavić, Marijana Petković,

Testing the best matrix/analyte combination for MALDI TOF mass spectrometric detection of steroid hormones, amino acids, vitamins and carbohydrates,

41st FEBS Congress, Molecular and Systems Biology for a Better Life,

Ephesus/Kuşadasi, Turkey, September 3-8, 2016, The FEBS Journal, page 166.

M34

ИЗВОД

MALDI TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption and Ionization Time-Of-Flight*) масена спектрометрија је мека јонизациона техника која се првенствено користи за анализу биомолекула (протеина и нуклеинских киселина) и омогућава детекцију молекула уз веома низак степен фрагментације. Како би се спречила/ублажила фрагментација изазвана директном ексцитацијом ласером, узорак се меша са матрицама које имају висок апсорпциони коефицијент у области у којој ласер емитује. Примарно су се користиле органске, „традиционалне“ матрице. Поред бројних предности, органске матрице показују и значајне мане које онемогућавају примену MALDI масене спектрометрије за квантитативну анализу молекула и спречавају детекцију молекула малих маса мањих од 1000 Da. Како се у овој групи молекула налазе и различити биолошки значајни молекули (метаболити) постоји потреба за превазилажењем недостатака органских матрица.

Један од најраније примењених начина је замена органских матрица неорганским једињењима и/или наночестицама (супстратима). Користе се различити супстрати на бази угљеничних полимера и сол-гел полимерне структуре на бази силицијум диоксида. Употреба наноструктурних супстрата у методи која је названа SALDI (*Surface Assisted Laser Desorption and Ionization*) у последњој деценији је предмет великог броја публикованих радова. Међутим, наночестице од метала и оксида метала, као што су Au, Pt, Ag, ZnO, Fe и MnO₂/MnO₃, нуде предност у односу на остале материјале - стабилније су у ваздуху и поседују високу проводљивост. Предност наночестица је апсорпција енергије ласера и ефикасан пренос енергије до узорка. Истакле су се наночестице од титан(IV)-оксида због своје доступности, нетоксичности и ниске цене, што је такође предмет многих публикованих радова. Осим наведених особина, титан(IV)-оксид је полупроводник са добром UV апсорпцијом. Генерално, TiO₂ снажно апсорбује UV светлост (има знатну ширину енергетске баријере, 3,2 eV) азотног ласера који се користи у MALDI TOF масеној спектрометрији, али процес припреме наночестица TiO₂ вероватно има снажан утицај на апсорпцију јер она зависи од величине, облика и састава честица. Површина, а посредно и величина и облик кристала утичу на аналитичке перформансе и јонизациону ефикасност у SALDI масеној спектрометрији.

У овој докторској дисертацији коришћени су нанокристали TiO₂ различите величине и облика: колоидне наночестице TiO₂ (TiO₂ НЧ) просечног дијаметра 5 nm, елипсоидне наночестице TiO₂ (TiO₂ ЕНЧ) дужине 40-50 nm, латералне димензије 14-16 nm и

нанотубе TiO_2 (TiO_2 НТ) дужине од 100 до 150 nm и просечног дијаметра од 11 nm. Молекули на којима је била тестирана потенцијална примена нанокристала су биолошки активни молекули малих маса: аминокиселине (L-цистеин, L-аланин, DL-метионин), трипептид глутатион, полни стероидни хормони (естрадиол, тестостерон, прогестерон), угљени хидрати (D-(+)-глукоза, D-(+)-малтоза, рафиноза, арабиноза, β -циклодекстрин), лимунска киселина, дексаметазон (дексазон), витамини (витамин А и витамин Е).

Први корак у провери ефикасности нанокристала TiO_2 за масеноспектрометријску анализу молекула малих маса јесте испитивање њихових квалитативних карактеристика као супстрата. Показано је да толеришу високе концентрације неорганских соли и високе снаге ласера, што пружа могућност за директну масеноспектрометријску анализу биолошких узорака.

Квантитативне карактеристике супстрата нанокристала TiO_2 за масеноспектрометријску анализу су одређене на основу параметара:

- ✚ **Хомогеност дистрибуције испитиваног узорка и супстрата на MALDI плочи.** Показано је да је хомогеност велика за највећи број представника испитиваних група молекула малих маса.
- ✚ **Репродуцибилност мерења током једног дана.** Показано је да се у присуству елипсоидних нанокристала TiO_2 постиже највећа репродуцибилност и прецизност методе, за највећи број испитиваних молекула у поређењу са осталим нанокристалима TiO_2 и свим испитаним органским матрицама.
- ✚ **Репродуцибилност мерења између дана.** Исто као и при одређивању репродуцибилности током једног дана елипсоидни нанокристали TiO_2 су се показали као најбољи избор за постизање највеће прецизности методе у поређењу са осталим нанокристалима TiO_2 и са органским матрицама.

На основу приказаних резултата у овој докторској дисертацији показан је велики потенцијал нанокристала TiO_2 за квантитативну и квалитативну анализу биолошки значајних молекула масе мање од 1000 Da.

SUMMARY

MALDI TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption and Ionization Time-Of-Flight) mass spectrometry is soft ionization technique. Primarily, this technique was used for the analysis of biomolecules such as proteins and nucleic acids with low level of their fragmentation. In order to prevent/reduce fragmentation of analyzed molecules, induced with direct excitation with laser, samples are mixed with matrix molecules. Matrix has high absorption coefficient in the range of the laser emission. In spite of numerous advantages, there are serious drawbacks of the matrices, and because of that they cannot be used for quantitative MALDI mass spectrometric analysis and for the detection of small molecules (molecular mass less than 1000 Da). In this group of molecules (mass less than 1000 Da) there are various biologically active molecules (metabolites), so there is a great need to overcome disadvantages of the application of organic matrices.

Considerable efforts have been made to overcome the above mention problems and several alternative approaches have been developed: an organic-matrix-free approach in which the substrates, usually nanoparticles act as a matrix. Many are in use: graphite, silica gel, carbon powder, activated carbon, graphene, porous silicon, and many more.

The term SALDI (Surface-Assisted Laser Desorption and Ionization) was coined to designate the techniques that use nanostructured substrates. The use of various nanoparticles as substrates in SALDI MS has attracted a lot of attention in the last decade. Nanoparticles absorb the laser energy and then rapidly transfer to analyzed molecule. However, the substrates prepared from materials based on metal-oxides (Au, Pt, Ag, ZnO, Fe and MnO₂/MnO₃) are more stable in the air and have a high conductivity. Titanium(IV)-oxide (TiO₂) is considered to be a good candidate for SALDI substrate since it is readily available, chemically stable, non-toxic and inexpensive material. Titanium(IV)-oxide is a semiconductor with high absorptivity of UV light of nitrogen laser (have a large band gap 3.2 eV) which is used in MALDI TOF mass spectrometry, but the method of synthesis of TiO₂ nanocrystal have a great impact on absorption because this phenomena depends on size, shape and composition of nanoparticles.

In this doctoral thesis, the applicability of TiO₂ nanocrystals of different size and shape was tested. Colloidal TiO₂ nanoparticles (NPs, average diameter ~ 5 nm), TiO₂ prolate nanospheroids (PNSs, length: 40–50 nm, the lateral dimension: 14–16 nm) and TiO₂ nanotubes (NTs, length: 100-150 nm, average diameter 11 nm) were used as substrates for potential SALDI TOF MS quantitative analysis of low mass molecules. The analyzed molecules were biologically active molecules with small molecule mass (Mm less than 1000 Da): amino acids

(L-cysteine, L-alanine, DL-methionine), tripeptide glutathione, sex steroid hormones (estradiol, testosterone, progesterone), carbohydrates (D-(+)-glucose, D-(+)-maltose, raffinose, arabinose, β -cyclodextrin), citric acid, dexamethasone (dexasone), vitamins (vitamin A and vitamin E).

First step to test efficiency of TiO₂ nanocrystal for the mass spectrometry analysis of small molecules was to examine their qualitative characteristics as substrates. It is shown that they have high tolerance to increased concentration on inorganic salts and to high laser intensity.

Qualitative characteristics of TiO₂ nanocrystals substrates for mass spectrometric analysis were analyzed based on following parameters:

- ✚ ***The homogeneity of the distribution*** of analyte over substrate surface in SALDI approach define reproducibility and accuracy of the measurement. The homogeneity of the most analyzed molecules with TiO₂ nanocrystals was high.
- ✚ To compare the accuracy of measurements with respect to signal intensity and potential use of tested systems for quantitative analysis, ***within day precision*** were calculated. With TiO₂ prolate nanospheroids, the high reproducibility and the high precision of method were achieved with the most of the analyzed molecules in comparison to other TiO₂ nanocrystals and all analyzed organic matrices.
- ✚ ***Day-to-day reproducibility***. The results were similar with results obtained for within day precision. TiO₂ prolate nanospheroids was the best choice to achieve the high precision of measurement in compare TiO₂ nanocrystals and all analyzed organic matrices.

Based on all results in this doctoral thesis, the great potential of TiO₂ nanocrystals (especially for the TiO₂ prolate nanospheroids) for the quantitative and qualitative analysis of biologically relevant small molecules (Mm less than 1000 Da) was demonstrated.

Скраћенице и ознаке

| | |
|--|---|
| [PtCl ₄ (bipy)] | тетрахлоридо(бипиридин)платина(IV) |
| [RuCl ₂ (bipy) ₂]Cl | дихлоридо(<i>bis</i> -(бипиридин))рутенијум(III)-хлорид |
| 9-AA | 9-аминоакридин |
| ALT | аланин аминотрансфераза |
| ANOVA | анализа варијансе |
| ATP | аденозин трифосфат |
| CE | капиларна електрофореза |
| CHCA | α-цијано-4-хидроксициметна киселина |
| CID | дисоцијација изазвана сударима |
| DIOS | десорпција/јонизација на силикону |
| DHB | 2,5-дихидроксибензоева киселина |
| DNK | дезоксирибонуклеинска киселина |
| E1 | естрон |
| E2 | естрадиол |
| E3 | естриол |
| Er:YAG | ласер са ербијумом који је допиран са итријумом, алуминијумом и гарнетом (Er:Y ₃ Al ₅ O ₁₂) |
| ESI | Електрон спреј јонизација |
| FEG | <i>field emission gun</i> |
| FTICR | Фуријерова трансформација – јон циклотрон резонанција |
| FT-OT | Фуријерова трансформација – орбитрап |
| GC/MS | гасна хроматографија/масена спектрометрија |
| GCB | оксидовани, графитизовани, угљенични блокови |
| HPLC | течна хроматографија високих перформанси |
| HPTEM | трансмисиона електронска микроскопија са високом резолуцијом |
| IC | инфрацрвени |
| ISD | фрагментације које се одвијају у извору |
| IT | јонска замка |
| IUPAC | међународна унија за чисту и примењену хемију |
| LD | ласерска десорпција |
| LDI | ласерска десорпција и јонизација |
| LOD | граница детекције |

| | |
|--------------------|---|
| m/z | однос масе и наелектрисања |
| MALDI | масена спектрометрија заснована на јонизацији потпомогнутој ласерском десорпцијом из матрикса |
| mRNK | информациона рибонуклеинска киселина |
| MS | масена спектрометрија |
| NALDI | масена спектрометрија заснована на јонизацији потпомогнутој ласерском десорпцијом из наноматеријала |
| Nd:YAG | ласер са неодимијумом који је допиран са итријумом, алуминијумом и гарнетом ($\text{Nd:Y}_3\text{Al}_5\text{O}_{12}$) |
| PSD | фрагментације које се одвијају након процеса убрзавања у масеном спектрометру |
| Q | квадрупол |
| Q_1 | доња квартилна вредност |
| Q_3 | горња квартилна вредност |
| R^2 | кофицијент корелације |
| S/N | однос сигнала и шума |
| SALDI | масена спектрометрија заснована на јонизацији потпомогнутој ласерском десорпцијом из супстрата |
| SERS | површински појачана раманска спектроскопија |
| SIMS | масена спектрометрија са секундарним јонима |
| TEM | трансмисиона електронска микроскопија |
| THAP | 2',4',6'-трихидроксиацетофенон |
| TiO_2 ЕНЧ | титан(IV)-оксид елипсоидне наночестице |
| TiO_2 НТ | титан(IV)-оксид нанотубе |
| TiO_2 НЧ | титан(IV)-оксид наночестице |
| TOF | време прелета |
| UV | ултраљубичаста област спектра светлости |
| PCД | релативна стандардна девијација |
| у.ј. | унутрашња јединица |

САДРЖАЈ:

| | |
|--|----|
| Увод | 1 |
| 1. Општи део | |
| 1.1. MALDI TOF MS..... | 4 |
| 1.1.1. Принципи рада MALDI TOF масеног спектрометра..... | 5 |
| 1.1.1.1. Врсте ласера у MALDI TOF масеном спектрометру..... | 7 |
| 1.1.1.2. Анализатори маса..... | 8 |
| 1.1.1.3. Детектори..... | 10 |
| 1.1.2. Наношење узорка на носач за MALDI анализу..... | 11 |
| 1.2. Матрице за MALDI MS..... | 12 |
| 1.3. Фрагментације..... | 14 |
| 1.4. Примена MALDI TOF масене спектрометрије..... | 16 |
| 1.5. Примена MALDI TOF масене спектрометрије за квантитативну анализу молекула..... | 17 |
| 1.6. Алтернативни приступи у MALDI масеноспектрометријској анализи..... | 18 |
| 1.7. Нанотехнологија у MALDI анализи..... | 19 |
| 1.8. Наночестице од метала и оксида метала као супстрати за масену спектрометрију..... | 20 |
| 1.9. Титан(IV)-оксид (TiO ₂)..... | 22 |
| 1.10. Кристална структура титан(IV)-оксида..... | 23 |
| 1.11. TiO ₂ у SALDI MS анализи..... | 24 |
| 1.12. Биолошки значај молекула малих маса..... | 26 |
| 1.13. Методе за детекцију молекула малих маса..... | 29 |
| Задатак рада | 30 |
| 2. Експериментални део | |
| 2.1. Хемикалије..... | 31 |
| 2.2. Синтеза нанокристала TiO ₂ | 31 |
| 2.2.1. Синтеза наночестица TiO ₂ | 31 |
| 2.2.2. Синтеза нанотуба TiO ₂ | 32 |
| 2.2.3. Синтеза елипсоидних наночестица TiO ₂ | 32 |
| 2.3. Трансмисиона електронска микроскопија (TEM)..... | 32 |
| 2.4. Масена спектрометрија..... | 33 |
| 2.4.1. Припрема узорка за масеноспектрометријску анализу..... | 33 |
| 2.4.1.a Испитивање утицаја соли на квалитет масеног спектра..... | 34 |
| 2.5. Статистичка анализа..... | 35 |
| 2.6. Оптичка профилометрија..... | 36 |

3. Резултати и дискусија резултата

| | | |
|-----------|--|-----|
| 3.1. | Анализа масених спектра молекула малих маса добијених у присуству органских матрица - традиционални приступ..... | 38 |
| 3.1.1. | Масени спектри органских матрица..... | 42 |
| 3.1.2. | Испитивање могућности детекције молекула малих маса у присуству органских матрица..... | 44 |
| 3.1.3. | Хомогеност дистрибуције узорка и матрице на MALDI плочи..... | 51 |
| 3.1.4. | Прецизност методе - Поновљивост и унутрашња прецизност..... | 54 |
| 3.1.5. | <i>Box and Whiskers</i> дијаграми - дескриптивна статистика MALDI анализе..... | 58 |
| 3.2. | Неорганске матрице - супстрати за масеноспектрометријску анализу молекула малих маса..... | 62 |
| 3.2.1. | Квалитативне карактеристике супстрата..... | 62 |
| 3.2.1.a | Претпостављени механизам десорпције/јонизације у присуству TiO ₂ | 62 |
| 3.2.1.1. | Трансмисиона електронска микроскопија наночестица TiO ₂ различитих облика..... | 63 |
| 3.2.1.2. | LDI TOF масена спектрометрија потпомогнута наночестицама TiO ₂ различитих облика..... | 65 |
| 3.2.1.3. | Утицај интензитета ласера на масене спектре нанокристала TiO ₂ различитих облика..... | 66 |
| 3.2.1.4. | Утицај неорганских јона на масене спектре наночестица TiO ₂ и елипсоидних наночестица TiO ₂ | 68 |
| 3.2.1.5. | SALDI TOF масена спектрометрија комплекса [RuCl ₂ (bipy) ₂]Cl у присуству наночестица TiO ₂ и елипсоидних наночестица TiO ₂ | 71 |
| 3.2.1.6. | Утицај интензитета ласера на масене спектре комплекса [RuCl ₂ (bipy) ₂]Cl.. | 72 |
| 3.2.1.7. | Ефекат неорганских соли на SALDI TOF масене спектре комплекса [RuCl ₂ (bipy) ₂]Cl..... | 74 |
| 3.2.1.8. | Комбиновани ефекти неорганских соли и интензитета ласера на SALDI TOF масене спектре комплекса [RuCl ₂ (bipy) ₂]Cl..... | 76 |
| 3.2.1.9. | SALDI TOF масена спектрометрија комплекса [PtCl ₄ (bipy)] у присуству наночестица TiO ₂ и елипсоидних наночестица TiO ₂ | 77 |
| 3.2.1.10. | Ефекти неорганских соли на SALDI TOF масене спектре комплекса [PtCl ₄ (bipy)]..... | 80 |
| 3.2.1.11. | Утицај интензитета ласера на масене спектре комплекса [PtCl ₄ (bipy)]..... | 82 |
| 3.2.1.12. | Комбиновани ефекти неорганских соли и интензитета ласера на SALDI TOF масене спектре комплекса [PtCl ₄ (bipy)]..... | 84 |
| 3.2.2. | Квантитативне карактеристике супстрата..... | 85 |
| 3.2.2.1. | Анализа SALDI TOF масених спектра молекула малих маса..... | 86 |
| 3.2.2.2. | Осетљивост SALDI TOF MS анализе..... | 96 |
| 3.2.2.3. | Хомогеност дистрибуције узорка/супстрата на плочи при SALDI приступу..... | 101 |
| 3.2.2.4. | Прецизност методе; Поновљивост и унутрашња прецизност..... | 106 |
| 3.2.2.5. | <i>Box and Whiskers</i> дијаграми при SALDI приступу..... | 110 |

| | |
|---|-----|
| 3.2.3. Утицај величине и облика нанокристала на SALDI TOF масене спектре... | 113 |
| Закључак | 117 |
| Литература | 119 |
| Биографија | 128 |

УВОД

MALDI TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption and Ionisation Time-Of-Flight*) масена спектрометрија је погодна метода за рутинску примену. Омогућава детекцију и анализу веома малих концентрација, није потребна модификација узорка, метода је брза (спектар се може снимити за неколико секунди) и у односу на друге масеноспектрометријске методе, толерише повишену концентрацију неорганичких соли у узорку, што је од нарочите важности за узорке биолошког порекла.

У теорији, MALDI TOF се може користити за квалитативну и семи-квантитативну масеноспектрометријску анализу било којих молекула, али у пракси ово није случај због низа озбиљних недостатака. Прво, мешање органске матрице са узорком и узастопна ко-кристализација, воде до нехомогене уградње молекула узорка између кристала матрице. Стога се молекули од интереса неједнако распоређују по MALDI плочи. Ово резултира малом репродуцибилношћу методе и онемогућава квантитативну анализу. Друго, органске матрице имају мале молекулске масе и „покривају“ својим сигналимa у масеним спектрима масе мање од 500 Da, али како међусобно граде кластере на нешто већим масама, могу ометати анализу сигнала и до 1000 Da. Из тог разлога, анализа малих (био)молекула (молекула чија је маса мања од 1000 Da) је отежана, чак и немогућа. Треће, органске матрице не толеришу високе концентрације соли, па самим тим најчешће и спречавају директну анализу биолошких узорака.

Молекули малих маса су од великог значаја за разумевање функционисања ћелије и метаболизма уопште, што показује и развој приступа који се назива метаболомика (*engl. metabolomics*). Метаболомика комбинује стратегије за идентификацију и квантификацију ћелијских метаболита помоћу различитих метода уз примену статистичких метода. Метаболити су молекули малих маса (мањих од 1000 Da) који су важни за разне процесе у ћелији укључујући трансдукцију сигнала, контролисање ћелијског раста и диференцијације. Велики напори се улажу за развој аналитичких приступа који би омогућили што једноставнију анализу различитих ћелијских производа, а метаболомика се сматра као важно оруђе за разумевање биологије организама и његових одговора на стимулације из спољашње средине и генетичке промене.

Како су органске матрице због набројаних недостатака неподобне за анализу молекула малих маса, појавила се потреба за новим матрицама или „универзалном“ матрицом помоћу које се могу анализирати и поларна и неполарна једињења малих и

великих молекулских маса, јер механизам десорпције/јонизације стимулисан ласером у масеној анализи није у потпуности расветљен и избор матрице за одређени молекул је још увек емпиријски. Као атрактивно решење, намећу се наночестице различитог састава и облика, а ова метода се у том случају назива SALDI (*Substrate Assisted Laser Desorption and Ionization*).

Наночестице базиране на титан(IV)-оксиду (TiO_2) показују веома велики потенцијал као супстрати за SALDI масену анализу молекула малих маса. TiO_2 је полупроводник који снажно апсорбује у UV области азотног ласера који се користи за јонизацију и десорпцију у SALDI TOF масеном спектрометру, јефтин је и лако доступан, хемијски стабилан и није токсичан. Претпоставља се да наночестице омогућавају хомогену расподелу узорка на SALDI носачу за узорке, бољу репродукцибилност сигнала и да омогућавају квантитативну анализу. Величина и облик нанокристала TiO_2 утичу на аналитички учинак, апсорпцију светлости и јонизациону ефикасност у SALDI масеној анализи молекула малих маса.

У оквиру ове докторске дисертације приказана је детаљна анализа масених спектра молекула малих маса добијених у присуству нанокристала TiO_2 : наночестица, елипсоидних наночестица и нанотуба TiO_2 .

✚ У **Општем делу** описан је преглед до сада публикованих радова из поменуте области, са освртом на значај испитивања. Описана је MALDI масена спектрометрија и матрице које се користе у овој методи. Истакнути су и недостаци MALDI масене спектрометрије у анализи молекула маса мањих од 1000 Da и немогућност квантитативне примене ове методе. Приказан је преглед алтернативних приступа који би потенцијално омогућили превазилажење поменутих недостатака са нарочитим освртом на SALDI масено-спектрометријску анализу. Детаљно је описан значај супстрата на бази титан(IV)-оксида у масеноспектрометријској анализи молекула малих маса. Такође је показан и биолошки значај молекула малих маса који су коришћени као модел системи за SALDI масеноспектрометријску анализу у овој докторској дисертацији.

✚ У **Експерименталном делу** су поред коришћених хемикалија, описане синтезе нанокристала титан(IV)-оксида који су коришћени у SALDI масено-спектрометријској анализи. Детаљно су описане коришћене методе:

трансмисиона електронска микроскопија, M(S)ALDI масена спектрометрија, оптичка профилометрија, као и методологија статистичке обраде података.

✚ У поглављу **Резултати и дискусија резултата** прво је приказана анализа масених спектра молекула малих маса добијених помоћу традиционалних, органских матрица. Приказана је детаљна анализа података, испитана је хомогеност дистрибуције узорка и матрице на MALDI носачу и прецизност методе, док је дескриптивна статистика приказана помоћу *Box and Whiskers* дијаграма. Потом су испитани нанокристали TiO_2 различитих облика и величина као супстрати за SALDI TOF масеноспектрометријску анализу молекула малих маса, кристали су морфолошки окарактерисани трансмисионом електронском микроскопијом. Показане су квалитативне карактеристике спектра нанокристала TiO_2 : детаљно су анализирани њихови LDI TOF масени спектри, показан је утицај интензитета ласера, као и повећане концентрације неорганских соли на масене спектре. Као модел молекули у овим мерењима коришћени су комплекси прелазних метала рутенијума и платине. Затим је приказана анализа квантитативних карактеристика SALDI TOF масеноспектрометријске анализе молекула малих маса у присуству нанокристала TiO_2 : детаљно су анализирани спектри молекула малих маса који су добијени у присуству нанокристала TiO_2 , одређена је осетљивост методе, хомогеност дистрибуције узорка/супстрата на плочи, прецизност методе и поновљивост мерења.

Резултати ове докторске дисертације објављени су у оквиру 4 научна рада у познатим међународним часописима.

1. ОПШТИ ДЕО

1.1. MALDI TOF MS

Скраћеница MALDI TOF MS долази од назива технике *engl. Matrix Assisted Laser Desorption and Ionisation Mass Spectrometry* и односи се на масену спектрометрију засновану на јонизацији потпомогнутој ласерском десорпцијом из матрикса. MALDI методу су 1985. године осмислили *Hillenkamp, Karas* и сарадници.¹ Пронашли су да се аминокиселина аланин лакше јонизује када је помешана са аминокиселином триптофаном и озрачује са пулсним ласером на $\lambda = 266 \text{ nm}$. Триптофан апсорбује енергију ласера и помаже јонизацију неапсорбујућег аланина.² *Tanaka* и сарадници су 1987. године направили помак у анализи великих молекула ласерском десорпцијом, тиме што су за јонизацију азотним ласером $\lambda = 337 \text{ nm}$ користили наночестице кобалта величине 30 nm дисперговане у глицеролу.³ *Tanaka* је 2002. године добио Нобелову награду за хемију јер је показао да протеин може да се јонизује када се примени одговарајућа комбинација ласера одређене таласне дужине и матрице.⁴ У исто време *Hillenkamp* и *Karas* су показали јонизацију албумина, протеина од $66,5 \text{ kDa}$, у присуству никотинске киселине као матрице и ласера који емитује светлост таласне дужине $\lambda = 266 \text{ nm}$.⁵ У каснијим истраживањима коришћене су друге органске киселине као матрице и то: циметна, кофеинска и синапинска киселина у комбинацији са ласером на $\lambda = 355 \text{ nm}$.⁶ Деведесетих година произведени су први комерцијални MALDI уређаји.⁷ Постоји више варијација MALDI технологије, а слични инструменти се данас користе у сасвим различите сврхе, од академских и аналитичких до индустријских.

MALDI масена спектрометрија представља недеструктивну јонизациону технику за анализу биомолекула/биополимера као што су ДНК, протеини, пептиди и шећери, и великих органских молекула (различитих полимера).² Ови молекули имају тенденцију да се фрагментују током јонизације која се користи у конвенционалној масеној спектрометрији. MALDI је метода слична електрон спреј јонизацији (*engl. electron spray ionisation, ESI*) по томе што су код обе технике путеви за добијање јона великих молекула у гасној фази релативно недеструктивни, али се код MALDI методе ствара знатно мање вишеструко наелектрисаних јона. MALDI масена спектрометрија је најчешће повезана са TOF анализатором (*engl. Time Of Flight, TOF*, анализатор маса на бази времена прелета), највише због његовог великог масеног опсега и високе

резолюције. Овај тип анализатора одговара процесу MALDI јонизације јер ласер ради у пулсном режиму.

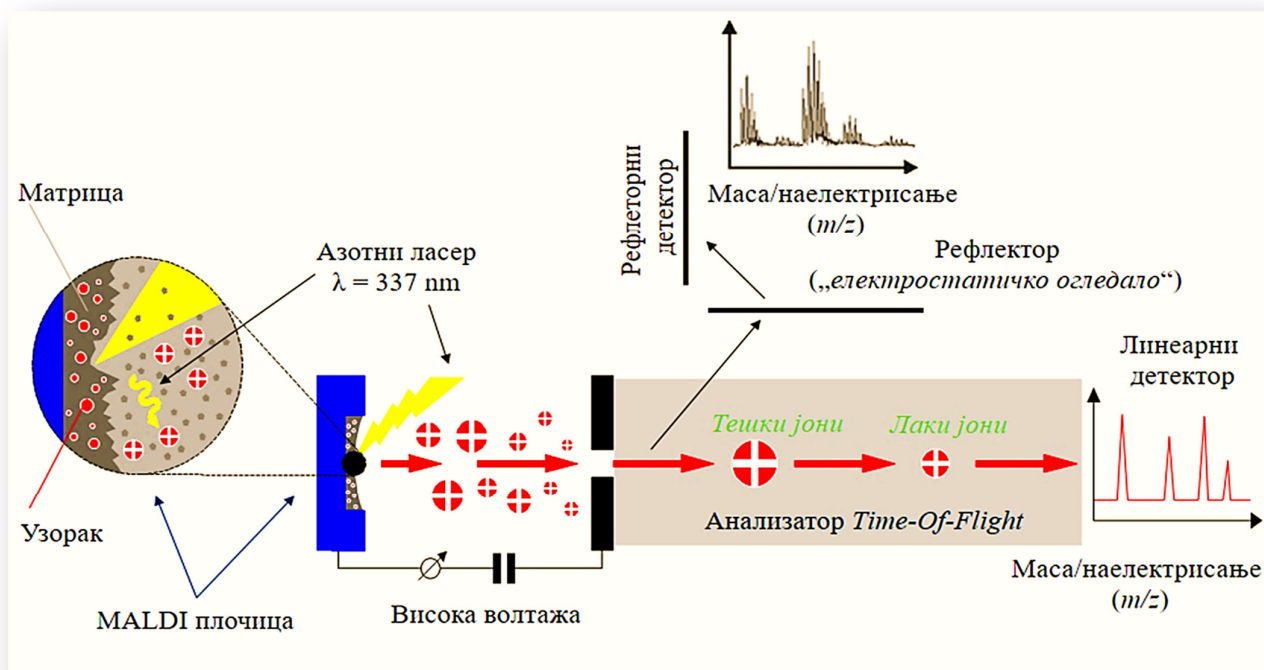
MALDI TOF масена спектрометрија је погодна метода за рутинску примену из разлога што омогућава детекцију и анализу веома ниских концентрација јона, не захтева било какву модификацију узорка и спектри се снимају за неколико секунди.

1.1.1. Принципи рада MALDI TOF масеног спектрометра

MALDI методологија је процес у три корака. Прво, узорак се меша са матрицом у таквом односу да матрице увек има више (500-1000 пута, молски однос) и наноси се на металну плочу, најчешће челичну која може бити пресвучена танким слојем злата. Матрица има улогу у процесима јонизације и десорпције. Неопходно је нагласити да пре увођења узорка у систем под високим вакуумом, растварач мора у потпуности да испари како би се узорак налазио у чврстом стању на плочи. Друго, пулсни ласер озрачује узорак, матрица упија енергију ласера и преноси је на узорак што доводи до десорпције узорка и матрице (прелазак у гасовито стање). И на крају се молекули узорка протонују/јонизују (јонизација је углавном јонима који су присутни у меши) или депротонују у гасној фази, потом се убрзавају и анализирају помоћу анализатора маса.⁸ Подешавањем поларитета на детектору, могу се детектовати позитивни или негативни јони. До јонизације узорка може доћи у било ком тренутку десорпције, а она се највероватније одвија још у чврстој фази трансфером протона (или других катјона, нпр. Na⁺, K⁺) пре десорпције или у гасовитој фази трансфером протона. Принцип MALDI масене спектрометрије је шематски приказан на Слици 1.1.

У гасовитом стању јони стижу до анализатора маса. Иако се MALDI може комбиновати са различитим типовима анализатора, најчешћа је комбинација са TOF анализатором. У овом типу анализатора, јони се прво убрзавају у пољу са високим напонем (око 20 kV) како би добили исту кинетичку енергију и стигли до дела анализатора који се заснива на времену прелета. Како би се повећала резолуција и тачност маса, примењује се такозвани мод одложене екстракције (*delayed extraction mode*), у коме се убрзавајућа волтажа примењује са малим закашњењем након ласерског пулса.

Када јони дођу до детектора, они индукују сигнал који је у директној корелацији са бројем јона у зависности од времена (односно m/z односа) у којем су ти јони стигли до детектора.



Слика 1.1. Шема MALDI TOF масеног спектрометра.

Ласерско зрачење индукује брзо загревање кристала акумулацијом велике количине енергије кроз екситацију молекула матрице. Убрзано загревање изазива локализовану сублимацију кристала матрице, аблацију дела површине кристала и ширење молекула матрице у гасну фазу, молекули узорка се увлаче у облак молекула матрице који се шири.⁹ Реакција јонизације може да се одвија под вакуумом у било ком тренутку током процеса, али порекло јона који су настали током MALDI процеса још увек није у потпуности разјашњено.^{10,11} Између различитих хемијских и физичких путева јонизације за MALDI процес су предложени: гасно-фазна фотојонизација, трансфер протона у ексцитованом стању, реакција јон-молекул, десорпција јона итд. Најшире прихваћени механизми су: формирање јона које укључује трансфер протона у чврсту фазу пре десорпције и трансфер протона у гасној фази у облаку фотојонизованих молекула матрице који се шири. Јони у гасној фази се потом убрзавају у електростатичком пољу пре уласка у анализатор. Потребно је нагласити и да је MALDI јонизациона техника осетљивија од других.

На типичном MALDI спектар се детектују позитивни јони једанпут наелектрисане молекулске врсте који настају протоновањем или негативни јони који настају депротоновањем. Такође се у спектрима могу видети више пута наелектрисани јони.

Једињења која се не могу лако протоновати могу да се катјонизују најчешће додавањем алкил катјона, катјона бакра или сребра у узорак. Карактеристика MALDI спектра је једноставност и самим тим лако их је анализирати.¹²

1.1.1.1. Врсте ласера у MALDI TOF масеном спектрометру

Међу различитим ласерима, UV ласери су најчешће коришћени због једноставности руковања и ниске цене на првом месту. Најчешћи тип ласера који се користи у MALDI јонизацији је UV ласер који емитује на $\lambda = 337 \text{ nm}$, има енергију од 3,68 eV и пулс од 1 ns до неколико ns, а користи се и Nd:YAG ласери ($\lambda = 266$ или 355 nm).

Раније је коришћен инфрацрвени (IC) Yr ласер, али је скоро потпуно истиснут из употребе. Разлог томе може бити већи број матрица погодних за анализу разних врста биомолекула и органских молекула које апсорбују светлост у UV области. IC ласери који су коришћени су Er:YAG ласери ($\lambda = 2,94 \text{ }\mu\text{m}$) или CO₂ ласери ($\lambda = 10,6 \text{ }\mu\text{m}$)

Ипак са појавом нанотехнологије/јонизације потпомогнуте ласерском десорпцијом из наноструктурисане површине, NALDI (*Nanosurface Assisted Laser Desorption And Ionisation*) приступ, IC ласери се поново враћају у употребу, пошто дубље продиру у површину плоче и изазивају мање фрагментације у односу на UV ласере.¹³

Најважнији параметар који омогућава довољну струју јона је тотална енергија пулса ласера на одређеној таласној дужини.¹⁴ Ширина пулса ласера варира од неколико десетина наносекунди до неколико стотина микросекунди. Пречник места које је озрачено на површини узорка варира од 5 до 200 μm . Најважније је одредити доњу границу интензитета ласера која је доваљна да би била могућа десорпција молекула матрице и да би се добио спектар задовољавајућег квалитета. Да би се добиле молекулске врсте пореклом од узорка у спектру потребан је виши интензитет ласера, али он води до појачаних реакција фрагментације и индукује губитак масене резолуције.

Код већине анализираних молекула MALDI спектри добијени UV или IC ласерима се незнатно разликују. Постоје само мале разлике. Када се користи IC ласер мање фрагментације узорка се запажа, али овај ласер доводи до стварања веће дубине након испаравања узорка/матрице и то води до краћег живота узорка, а уочена је и мало мања осетљивост него са UV ласером.

У MALDI техници ласер типично озрачује узорак на предњој страни опалесцентне површине (рефлексиона геометрија). Током снимања спектра ласер озрачује малу

количину узорка од укупне која је нанета на плочу (0,5 – 2 μL). Након анализе могуће је поново користити преостали узорак за друге експерименте.

1.1.1.2. Анализатори маса

Као што је поменуто MALDI може да буде повезан са различитим анализаторима маса. Типови анализатора маса који се најчешће користе у масеној спектрометрији су: квадрупол (*quadrupole*, Q) на основу стабилности путање у осцилујућем електричном пољу раздваја јоне на основу односа m/z , јонска замка (*ion trap*, IT) користи осцилујуће електрично поље да „зароби“ јоне, време прелета (*time-of-flight*, TOF), Фуријерова трансформација – јон циклотрон резонанција (*Fourier transform ion cyclotron resonance*, FTICR) „заробљава“ јоне у кружној путањи у магнетном пољу, Фуријерова трансформација – орбитрап (*Fourier transform orbitrap*, FT-OT). Постоји тренд у масеној спектрометрији да се развијају различите комбинације анализатора да би се омогућила и проширила примена масене анализе за различите узорке.

Концепт TOF анализатора прво је описао *Stephens* 1946. године.¹⁵ *Wiley* и *McLaren* су 1955. године објавили дизајн линеарног TOF масеног спектрометра који је касније постао први комерцијални уређај.¹⁶ Од 1980. године враћа се интерес за ове инструменте, јер TOF анализатори добро одговарају пулсној природи ласерске десорпције и јонизације. Развој MALDI TOF масеног спектрометра омогућава масену анализу не само биомолекула него и синтетичких полимера и полимер/биомолекул коњулата.

Постоје два типа TOF анализатора маса: линеарни и рефлекторни. Линеарни TOF анализатор одваја јоне, након њиховог иницијалног убрзавања у електричном пољу, на основу њихових брзина након што уђу у цев анализатора (*flight tube*). Ови јони се убрзавају кроз цев анализатора помоћу разлике потенцијала која је примењена између електроде и решетке за екстракцију. Пошто јони имају исту кинетичку енергију, а различиту почетну брзину (која зависи од масе), време за које ће јони прећи цев анализатора и доћи до детектора зависи од односа њихове масе и наелектрисања. Када напусте део анализатора у ком су добили убрзање, улазе у део у ком нема утицаја електричног поља и ту се раздвајају према својим почетним брзинама, пре него што дођу до детектора који се налази на другом крају анализаторске цеви. Однос масе и наелектрисања се одређује мерењем времена које је потребно јонима да прођу кроз део анализатора у ком нема утицаја електричног поља, тј. између извора и детектора.

У принципу, нема горње границе детекције TOF инструмента, јер је ова техника посебно погодна за благу јонизацију. На пример, узорци чије су масе биле преко 300 kDa су уочени помоћу MALDI TOF масеноспектрометријске анализе.^{17,18} Друга предност ових инструмената је њихова висока трансмисиона ефикасност која води до високе осетљивости. На пример, детекција 10-15 pmol грамицидина¹⁹ и детекција 100-200 attomol различитих протеина (цитохрома Ц, рибонуклеазе А, лизозима и миоглобина)²⁰ била је могућа помоћу TOF анализатора.

Како је масена резолуција пропорционална времену прелета код TOF анализатора, један од начин да се повећа резолуција ових анализатора је да се повећа дужина анализаторске цеви. Међутим, предуга анализаторска цев смањује перформансе TOF анализатора јер долази до губитака јона услед расипања након судара са молекулима гаса или због угаоне дисперзије зрака јона. Такође је могуће повећати време прелета смањењем напона у анализатору којим се убрзавају јони. Са друге стране, смањењем овог напона смањује се и осетљивост анализе. На основу свега наведеног како би се задржали и висока осетљивост и висока резолуција користи се анализаторска цев дужине од 1 до 2 m за већу резолуцију и волтажа убрзања од најмање 20 kV да би се задржала висока осетљивост.

Осим претходно наведеног, као што је већ било речи, за повећање резолуције се користи тзв. мод одложене екстракције, *deleyed extraction mode*. Јони се прво раздвајају на основу кинетичке енергије у делу у ком нема електричног поља у извору. Код јона који имају исти однос m/z , јони који имају више кинетичке енергије померају се ближе детектору од јона који иницијално добијају мање енергије. Након одређеног задржавања (стотине наносекунди до неколико милисекунди) примењује се пулсни напон који даје више енергије јонима који су дуже време били у извору. На тај начин, јони који су иницијално добили мање енергије сада добијају више кинетичке енергије и спајају се у детектору са јонима који су почетно имали више енергије. Одложена пулсна екстракција коригује дисперзију енергија јона који имају исти m/z однос и тако побољшава резолуцију TOF анализатора.

Овакав начин рада се назива одложена пулсна екстракција да би се направила разлика у односу на континуирану екстракцију која се користи у конвенционалним инструментима. Одложена пулсна екстракција се назива и пулсна јонска екстракција, пулсна екстракција или динамичка екстракција и представља „оживљавање“ временски одложеног фокусирања (*time-lag focusing*) које су осмислили Wiley и McLaren 1950. године.¹⁶ Недостатак временски одложеног фокусирања је тај што компликује

процедуру масене калибрације. Може да буде оптимална само за део масеног опсега током једног мерења и мање је ефикасна на вишим масама. Међутим, на калибрацију, резолуцију и тачност маса и даље утичу услови у извору. На пример, током типичног MALDI TOF експеримента услови за оптимално фокусирање зависе од ширине зрака пулсног ласера, од врсте узорка и матрице, од методе за припрему узорка и локације места на узорку на коју је усмерен ласер.

Још један начин да се побољша резолуција је да се користи електростатички рефлектор, који се назива и рефлектрон. Најједноставнији рефлектрон се састоји најчешће од серије једнако распоређених решеткастих електрода или кружних електрода које су спојене помоћу мреже отпорника. Рефлектрон је постављен насупрот извору јона у делу где нема електричног поља. Детектор је позициониран у извору код јонског огледала и „хвата“ јоне након што се рефлектују. Рефлекторни анализатор поседује додатни електростатички рефлектор, којим се јони скрећу и поново прелазе исти пут, чиме се коригује дисперзија у кинетичкој енергији јона који имају исти однос масе и наелектрисања. Бржи јони проводе више времена у рефлектрону и долазе до детектора у исто време као и спорији јони. Рефлектрон повећава дужину путање без повећавања димензија масеног спектрометра. Овим се повећавају и прецизност мерења и резолуција, па је могуће добити слику изотопске дистрибуције појединих јона, али се на овај начин смањује осетљивост методе и ограничава се масени опсег мерења.

Линеарни детектор се углавном користи за анализу једињења велике молекулске масе, док се рефлекторни детектор (иако се ово не сме прихватити као правило) користи за анализу молекула мање молекулске масе.²¹ Мењањем поларитета на детекторима, могу се мењати и јони који ће се детектовати: позитивно или негативно наелектрисани.

1.1.1.3. Детектори

Када јони прођу кроз анализатор маса тада се детектују и трансформишу у корисне сигнале помоћу детектора. Детектор може да генерише електричну струју која је пропорционална заступљености присутних јона.

Постоји неколико типова детектора. Избор детектора зависи од дизајна инструмента и од аналитичке примене за коју ће се инструмент користити. Постоје различити приступи у детекцији јона. Детекција јона је увек заснована на њиховом наелектрисању, маси и почетној брзини. Неки детектори (Фарадејева шоља) су засновани на мерењу директног наелектрисања струје која се производи када јон удари о површину и

неутралише се. Други детектори (електро-оптички јонски детектори) се заснивају на трансферу кинетичке енергије током судара насталих јона са површином која укључује стварање секундарних електрона, који се даље појачавају и на крају дају електричну струју. У суштини јонски детектори се могу поделити у две класе: на оне детекторе који броје јоне појединачне масе у току времена и тако детектују пристизање свих јона редом у једној тачки. И детекторе, као што су фотографске плоче, који имају могућност да броје вишеструке масе и детектују пристизање свих јона истовремено дуж целе плоче.

1.1.2. Наношење узорка на носач за MALDI анализу

Носачи узорка за MALDI TOF масеноспектрометријску анализу су плоче на које се може нанети велики број узорака. Неки произвођачи MALDI TOF масених спектрометара производе плоче за 100 узорака, док се за новије уређаје праве плоче за 386 узорака. Плоче за традиционалне MALDI TOF масене спектрометре су углавном од челика или челика превученог златом.

Од природе плоче и хомогености ко-кристала матрице и узорка зависи интензитет сигнала и репродукцибилност спектра, тако да је начин наношења узорка и матрице на плочу веома битан. Развијено је неколико приступа како би се повећала хомогеност ко-кристала матрица/узорак да би се повећала репродукцибилност мерења, уколико аутоматско наношење уз помоћ апарата није доступно. Уколико су узорак и матрица растворни у истом растварачу, сама процедура за наношење на плочу не утиче у већој мери на хомогеност ко-кристала. Проблем настаје уколико су узорак и матрица различите поларности, односно да су растворни у растварачима који се не мешају. У тим случајевима може доћи до сегрегације кристала на самој плочи, и до формирања делова који су сиромашни или у кристалима матрице или у кристалима узорка.

Најчешће се примењује тзв. „*dried droplet*“ или премикс метода, при којој се претходно помешају засићени раствор матрице и раствор узорка, а затим се мала запремина нанесе на плочу за узорке. Пре увођења у уређај, неопходно је да сав раствор са плоче испари. Када се ради квантитативна анализа потребно је додати у раствор узорка и унутрашњи стандард, а потом се претходно описана процедура понавља.

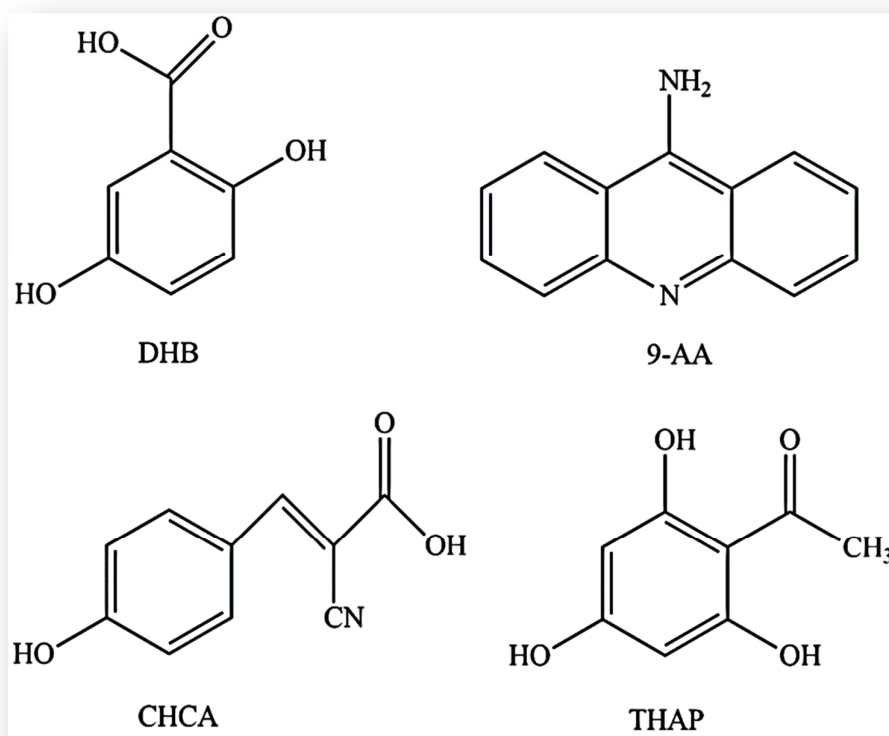
Други начин је „сендвич“ метода, при којој се наноси прво раствор матрице, потом раствор узорка, па опет матрице. Наношење сваког следећег слоја је условљено сушењем претходно нанетог, које може бити убрзано (у посебним коморама, под вакуумом или у струји топлог ваздуха) или се одвијати на собној температури.

Поступак „убрзане ко-кристалације“ који је погодан за анализу молекула малих маса, у случају када се анализирају протеини, не даје хомоген распоред кристала на плочи. По овом поступку прво се на плочу наноси раствор узорка који се суши струјом ваздуха, а потом се преко наноси раствор матрице, који се такође одмах суши у струји топлог ваздуха.

1.2. Матрице за MALDI MS

Матрица је органско једињење мале молекулске масе које апсорбује светлост у области у којој ласер емитује и преноси тако апсорбовану енергију на узорак, чиме се поспешује његово испаравање (десорпција). Како би се спречила/ублажила фрагментација изазвана директним пулсом ласера, и повећала јонизација, узорак се меша са матрицама.

Најчешће органске матрице, а које су коришћене и у овој докторској дисертацији су: 2,5-дихидроксибензоева киселина, ДНВ,²² 9-аминоакридин, 9-АА,²³ α -цијано-4-хидроксициметна киселина, СНСА,²⁴ 2',4',6'-трихидроксиацетофенон, ТНАР.²⁵ На Слици 1.2 приказане су структурне формуле матрица које су коришћене у овом раду, али је број органских матрица које се примењују далеко већи, док се непрестано откривају нове могућности примене различитих органских једињења као матрица за MALDI TOF масену спектрометрију.



Слика 1.2. Структурне формуле органских матрица: 2,5-дихидроксибензоева киселина, DHB, 9-аминоакридин, 9-AA, α-цијано-4-хидроксициметна киселина, CHCA, 2,4,6-трихидроксиацетофенон, THAP.

Матрице су најчешће молекули мале масе (ова особина им омогућава laku испарљивост), али са друге стране та маса је довољно велика да не би испариле током припреме узорка или док стоје у масеном спектрометру (стабилне су у вакууму). Често су у питању органске киселине јер су извор протона који осигурава јонизацију узорка.²⁶ Такође има примера где се базе користе као матрице. Матрице поседују снажну апсорптивност у видљивом или ултраљубичастом делу спектра,²⁷ ефикасно апсорбују енергију зрачења и брзо и лако је преносе до испитиваног узорка. Матрице које поседују коњуговане двоструке везе имају изражене претходно наведене особине.²⁸ Уопштено, структура молекула је веома важан фактор који утиче на ефикасност молекула као матрице. Раствор матрице и узорка, у најбољем случају у истом растварачу, се наноси на MALDI плочу, када растварач испари молекули матрице рекристалишу са молекулима узорка „заробљеним“ између њих. Матрица и узорак тако постају ко-кристали. Ко-кристализација је кључна карактеристика матрице да би се добио квалитетан и репродуцибилан масени спектар испитиваног узорка.

Избор органске матрице за масеноспектрометријску анализу се врши углавном на емпиријски начин, на основу неколико претпоставки. Потребно је нагласити да су избор матрице и оптимизација процедуре за припрему узорка главне ставке које је потребно пажљиво размотрити када се користи MALDI техника и значајно утичу на квалитет спектра. Неопходно је тестирати неколико комбинација и односа концентрација узорка и матрице како би се пронашли услови који највише одговарају MALDI TOF масеноспектрометријској анализи датог једињења. Додатни напори се улажу да би се пронашла одговарајућа матрица за анализу сваког појединачног молекула, а за анализу молекула малих маса ситуација се додатно компликује. Како би се ова метода могла успоставити као рутинска за најразличитије примене, постоји велика потреба за универзалном матрицом, односно оном којом се може снимити спектар већег броја различитих узорака. Органске матрице о којима је претходно било речи, могу бити примењиве за анализу молекула малих маса уколико обезбеђују ефикасну јонизацију и минималну фрагментацију и својим сигнаlima не ометају сигнале узорка.²⁹

1.3. Фрагментације

MALDI процес може водити до фрагментације молекула узорка током процеса јонизације. Постоје три типа фрагментација због којих настају фрагментисани јони у MALDI спектрима. Ове фрагментације се одређују на основу места где се одвијају. Фрагментације које се одвијају у извору називају се *in-source decay* (ISD) фрагментације.³⁰ Прецизније, то су фрагментације на површини узорка пре или током процеса десорпције (на временској скали од неколико пикосекунди до неколико наносекунди). Називају се и моменталне фрагментације.¹²

Фрагментације у извору после процеса десорпције, али пре процеса убрзавања (на временској скали од неколико наносекунди до неколико милисекунди) називају се брзе фрагментације. Фрагментације које се одвијају након процеса убрзавања у масеном спектрометру се називају *post-source decay* (PSD) фрагментације.³¹ Одговарају фрагментацијама метастабилних, прелазних јона, који су стабилни таман толико да напусте извор, али имају довољно енергије у вишку која им омогућава сопствену фрагментацију пре него што дођу у детектор.¹²

Алтернативно, фрагментација може да буде индукована сударима са молекулима инертног гаса (најчешће азота) у колизионој ћелији. Овакав тип фрагментације је означен као *collision induced dissociation* (CID).¹²

Има много механизма који су укључени у активацију производње јона у MALDI методи. Један важан механизам говори о постојању вишеструких судара који се догађају између молекула у извору. Пулс ласера изазива ширење молекула матрице у гасној фази и овај облак молекула матрице носи интактне молекуле узорка. Десорпција ових молекула малих маса индукује формирање веома густог облака неутралних молекула који су лоцирани баш на површини. Убрзавање јона кроз овај облак током фазе екстракције из извора доводи до многих судара који повећавају унутрашњу енергију. Ови судари могу да се контролишу јачином електричног поља које се користи да би се екстраховали јони из извора. Појачавањем електричног поља енергија судара јон/неутрални молекул се повећава, па се повећава и унутрашња енергија јона. Са друге стране, унутрашња енергија јона се мање повећа у слабијем електричном пољу јер се смањује енергија судара у нарастајућем облаку.

In-source decay (ISD) фрагментације, фрагментације у извору воде до стварања јона који су увек присутни у MALDI спектрима, док да би се уочили јони који настају *post-source decay* (PSD) фрагментацијама потребно је подесити одређене параметре у уређају. На пример, ако је MALDI извор повезан са линеарним TOF анализатором могућа је детекција јона фрагмената који су настали у извору јер се сигнали пореклом од ових јона налазе на својој m/z вредности. Насупрот овоме, јони фрагмената који настају после извора не могу се разликовати од јона из којих су настали јер се њихови сигнали налазе на истој вредности односа m/z . Услед овога долази до ширења пика и до смањења масене резолуције и осетљивости методе.¹²

1.4. Примена MALDI TOF масене спектрометрије

MALDI TOF масена спектрометрија је моћна техника која се користи нарочито за анализу великих, неиспарљивих и термолабилних једињења као што су протеини, олигонуклеотиди, синтетички полимери, биополимери и велика неорганска једињења. MALDI је универзалнија техника од других јонизационих техника. Није потребно подешавање таласне дужине која би се уклапала са апсорпционом фреквенцијом сваког анализата зато што је матрица та која апсорбује пулс ласера. MALDI процес је независан од апсорпционих особина и условно од величине једињења које се анализира, па дозвољава десорпцију и јонизацију узорка са веома великим молекулским масама које прелазе 100 000 Da. На пример, MALDI омогућава детекцију femtomola протеина чија је молекулска маса преко 300 000 Da.³²

Веома популарна употреба MALDI технике је и у протеомици. Постоје две дефиниције протеомике. Прва, класична дефиниција ограничава анализу генских продуката на студије које укључују само протеине. Друга, комбинује проучавање протеина са анализом генетичких ишчитавања као што су mRNA анализа и геномика.^{33,34} Добро утврђен и широко коришћен приступ у протеомици је комбинација MALDI TOF масене спектрометрије и гел електрофоретског раздвајања. Овакав приступ има веома високу осетљивост детекције.³⁵

Развој и процена квалитета модерних биофармацеутика, посебно протеинских и пептидних лекова, као и проучавање биоактивности током администрације захтева широк спектар аналитичких техника. Масена спектрометрија је једна од метода и посебно је корисна за одређивање хемијских модификација протеинских и пептидних лекова и интеракција са фармацеутским полимерима.³⁶

MALDI TOF масена спектрометрија се користи и у модерној клиничкој микробиологији, као дијагностички инструмент за идентификацију микроорганизама. У већини клиничких лабораторија ова техника се користи за дијагностификовање бактеријских култура, али се такође изучава и примена ове технике у вирусологији.³⁷ MALDI TOF масена спектрометрија омогућава и тестирање осетљивости на лекове микробиолошких патогена у узорцима урина који су гајени на агару или у крвним културама.³⁸

Интересантна употреба MALDI методе је за имицинг биолошких материјала.^{39,40} Заједно са масеном спектрометријом са секундарним јонима (*Secondary Ion Mass Spectrometry*, SIMS) и ласерском десорпцијом (*Laser Desorption*, LD), MALDI се користи

за мапирање дистрибуције циљаних биомолекула у ткиву. Омогућава проучавање пептида, протеина и других биомолекула директно у исечку ткива. MALDI имицинг масена спектрометрија је молекуларна, аналитичка технологија која омогућава истовремено мерење већег броја узорака директно из интактног, ткивног исечка. Хистолошке карактеристике унутар узорка могу да се доведу у везу са молекулским врстама и нема потребе за циљно-специфичним реагенсима као што су антитела. Неколико студија показује и могућност откривања нових маркера за одређене болести као и могућност прогнозирања одговора на терапију.⁴⁰

1.5. Примена MALDI TOF масене спектрометрије за квантитативну анализу молекула

У теорији, MALDI TOF може да се користи за семи-квантитативну масено-спектрометријску анализу било којих молекула, али у пракси ово није случај због низа озбиљних недостатака. Прво, мешање узорка са органском матрицом и ко-кристализација која следи често резултује у нехомогеној уградњи молекула узорка између кристала молекула матрице. Услед претходно наведеног, молекули узорка нису једнако распоређени на MALDI плочи, па се издвајају (сегрегирају), формирају се региони у којима се матрица налази у великом вишку у односу на узорак (*engl.* „*sweet spots*“ или „*hot spots*“) и места у којима је узорак у великом вишку (*engl.* „*cold spots*“).^{21,41,42} Ни у једном ни у другом случају квалитет спектра није задовољавајући. Ово је главни разлог ниске репродуцибилности MALDI масеноспектрометријске анализе и ограничене употребе методе чак и у семи-квантитативној анализи. Циљ је добити што хомогенију смешу, односно ко-кристале матрица/узорак, како би репродуцибилност снимања била боља. Друго, органске матрице имају мале молекулске масе и велики број сопствених сигнала у масеним спектрима, што се запажа као позадински шум у области ниских молекулских маса (< 500 Da). Ова карактеристика спречава употребу MALDI-ја за анализу (био)молекула малих маса. Као што је речено, матрице су углавном киселине, које дају интензивне сигнале када се снимају спектри негативних јона, па се претпоставља да је велики број интензивних сигнала који потичу од матрице у том случају разлог ниже осетљивости за детекцију негативних јона узорака.^{43,44}

Још један недостатак је тај што органске матрице не толеришу високе концентрације соли. При повишеним концентрацијама неорганских соли, што је карактеристично за

узорке биолошког порекла, формира се велики број сигнала од матрица и често долази до сузбијања сигнала који потичу од узорака, па MALDI анализа не може да се користи за директну анализу појединих супстанци у смеши биолошког порекла.

1.6. Алтернативни приступи у MALDI масеноспектрометријској анализи

Поједина једињења се могу анализирати без помоћи матрице, односно LDI приступом, ово се углавном може применити за анализу молекула масе до 2000 Da. Услов је да једињења апсорбују светлост оне таласне дужине на којој емитује ласер у масеном спектрометру. На пример, могуће је анализирати флавоноиде, за које се зна да апсорбују у UV области.^{45,46} Такође, LDI начин је коришћен у анализи неких минерала и парафинских уља.⁴⁷ Велики недостатак LDI анализе је тај што је фрагментација узорка веома велика, с обзиром на то да нема матрице у вишку, која спречава директну интеракцију између ласера и узорка, чиме се изазива његова фрагментација.¹³

Како су органске матрице због недостатака, набројаних у претходном поглављу Општег дела докторске дисертације, неподобне за анализу молекула малих маса, појавила се потреба за новим матрицама или „универзалном“ матрицом помоћу које се могу анализирати и поларна и неполарна једињења малих и великих молекулских маса. Потешкоћа за проналажење „универзалне“ матрице лежи у томе што механизам десорпције/јонизације у MALDI масеној анализи није у потпуности расветљен, па је избор матрице за одређени молекул још увек емпиријски. Једна од најранијих идеја је замена традиционалних, органских матрица неорганским матрицама – супстратима, о чему ће бити речи у наредном делу.

1.7. Нанотехнологија у MALDI анализи

У скороје време нанотехнологија се примењује за развој нових носача за LDI приступ, што се популарно зове NALDI, јонизација потпомогнута ласерском десорпцијом из наноструктурисане површине. При овим анализама користе се плоче чија је површина модификована тако да апсорбује светлост у области емитовања ласера. *Siuzdak* и сарадници, су синтетисали порозне нанострукуре од силикона (на бази силицијум диоксида) којима су обложили NALDI плочу и такав систем употребили као супстрат за масеноспектрометријску анализу названу DIOS (десорпција/јонизација на силикону). У овом приступу порозни силикон се користи за заробљавање молекула узорка и његово депоновање на површину.⁴⁸ NALDI је већ нашао своју рутинску примену у анализи биомолекула, форензици, анализи полимера, а очекује се да ће са откривањем нових носача примена бити још шира у будућности.

Термин SALDI (јонизација потпомогнута ласерском десорпцијом из супстрата) масена спектрометрија су први пут употребили *Sunner* и сарадници, када су користили графит као замену за матрицу.⁴⁹ Термин указује на технике које користе наноструктурне супстрате уместо органских матрица.

Након ове публикације, различити материјали који апсорбују светлост из ултраљубичастог (UV) дела спектра су коришћени као супстрати за SALDI, као што су угљеник,⁵⁰⁻⁵³ силикон,⁵⁴⁻⁵⁹ наноматеријали базирани на металима и оксидима метала.⁶⁰⁻⁷⁴ Употреба најразличитијих наночестица и површина као супстрата у SALDI масеној спектрометрији је привлачила пажњу бројних научника у последње две деценије. Поред поменутих порозних наноструктура од силикона, направљене су и мезопорозне нанокристалне структуре, танки филмови од титан(IV)-оксида⁶⁰ и различите микроструктуре и наноструктуре од различитих материјала.^{13,42,75-79}

Процес десорпције у SALDI техници се најчешће одвија по термалном механизму, до пораста температуре наноматеријала слабе топлотне проводљивости долази током кратко-пулсног озрачивања.³ Неколико истраживачких група у свету је фокусирано на физичко-хемијске процесе и на расветљавање механизма формирања јона у SALDI техници, механизам формирања јона је другачији и у току SALDI-јонизације, укључени су механизми који изостају приликом примене органских молекула.^{11,80-85} Није познато како хемијске структуре анализираних молекула утичу на принос јона пореклом од молекула у процесу десорпције и јонизације у SALDI масеној спектрометрији.

Резултати досадашњих истраживања упућују на следеће факторе који појачавају сигнале јона пореклом од анализираних молекула у SALDI масеним спектрима: (1) брзи пораст температуре индукован ласером,^{3,86–89} (2) порозне структуре и наножице са великом додирном површином,^{87,88} (3) способност заробљавања молекула растварача,^{90,91} (4) површинске функционалне групе, као што су терминалне -ОН групе на површини или хидрофобне површине,^{51,90,92–97} (5) електропроводна површина,⁶⁴ (6) ласером индукована акустична десорпција⁹⁸ и (7) ласером индуковано топљење/реструктурирање површине.^{52,99,100}

SALDI масена спектрометрија је обећавајућа техника за анализу/детекцију једињења малих маса, без значајног ометања сигнала пореклом од узорка. Овај приступ има бројне предности као што су: једноставна припрема узорака, низак позадински шум у области ниских молекулских маса, висока толеранција на соли, брзо прикупљање података, флексибилност техника наношења узорака, могућност постизања високе селективности, осетљивост и поновљивост анализе услед одговарајуће површинске хемије и морфологије.⁴² Додатна предност SALDI масене анализе над MALDI анализом је и значајно боља репродуктивност мерења услед хомогене дистрибуције узорка на плочи (мањи број *hot spots*). Особине SALDI масеноспектрометријске анализе су значајно унапређене у односу на благу јонизацију потпомогнуту ласером (LDI) у детекцији и поларних и неполарних једињења. У литератури постоје докази који упућују на факторе који појачавају сигнале молекулских јона у SALDI масеним спектрима.⁷⁵ Са друге стране, MALDI процес има предност у односу на SALDI процес која се огледа у нижој ефикасности стварања протонованих молекулских јона.

1.8. Наночестице од метала и оксида метала као супстрати за масену спектрометрију

Супстрати припремљени од материјала који су базирани на металима и оксидима метала нуде додатне предности у односу на оне који су базирани на силицијуму или угљенику. Те честице су хемијски стабилније у ваздуху и поседују високу проводљивост,^{60,75} као што су наночестице базирани на Au, Pt, Ag, ZnO, Fe и MnO₂/MnO₃. Осим тога, резултати показују да је могућа селективна јонизација и анализа појединих супстанци из сложених смеша уз помоћ одређених супстрата. Тако, *Sherrod* и сарадници су описали селективну јонизацију олефинских једињења као што су холестерол и каротеноиди, директно из смеше користећи наночестице сребра.⁶⁸ *Su* и сарадници су

анализирали и квантификовали мале неутралне угљене хидрате у урину у присуству наночестица злата.¹⁰¹ *Lee* и сарадници су пронашли да наночестице TiO_2 које имају пречник мањи од 20 nm интерагују са ендиолним једињењима, што утиче на повећање апсорпције у ултраљубичастом - видљивом делу спектра.¹⁰² SALDI масеном спектрометријом могуће је детектовати микроларне концентрације неколико испитиваних катехина и одредити концентрације (-)-епигалокатехина, (-)-епигалокатехин галата у узорцима чаја. *Chiu* са сарадницима је тестирао узорке урина за одређивање три естрогена хормона – естрона (E1), естрадиола (E2) и естриола (E3) у присуству наночестица сребра величине 34 ± 3 nm.¹⁰³

Анизотропне наночестице су атрактивне матрице за анализу молекула малих маса помоћу SALDI масене спектрометрије. Нпр, *Watanabe* и сарадници су применили наночестице оксида цинка у облику кубног или правоуганог паралелоипеда за детекцију верапамил хидрохлорида, тестостерона, фосфолипида, олигосахарида и синтетичких полимера.⁷³ Полупроводничке наночестице цинк сулфида (ZnS) које су површински модификоване различитим функционалним групама коришћене су за анализу циклодекстрина и малих протеина.⁶⁹ Цистеином површински модификоване наночестице цинк сулфида допиране јонима Mn^{2+} је развијала ова истраживачка група за детекцију мешавине пептида.¹⁰⁴ *Amini* и сарадници су користили честице на бази оксидованих, графитизованих, угљеничних блокова (GCB) за анализу фармацеутских једињења.¹⁰⁵ Предност коришћена GCB материјала у односу на угљеничне нанотубе је њихова нижа цена и већи садржај карбоксилних група на њиховој површини што појачава ефикасност процеса јонизације и десорпције хидрофобних једињења. *Tseng* и сарадници су показали да је хибрид имобилизованог силицијум диоксида и 2,5-дихидроксибензојеве киселине на магнетним, гвожђе оксид наночестицама ефикасан материјал. Овакав материјал обезбеђује супериорно меку јонизацију различитих, нових типова синтетичких материјала, дендримера и гликолипида, термално лабилних структура и структура са слабом тенденцијом за протоновање.¹⁰⁶ *Wen* и сарадници су користили силиконски прах (5-50 nm) за анализу неколико молекула малих маса укључујући дроге, пестициде, пептиде и киселине.¹⁰⁷

1.9. Титан(IV)-оксид (TiO₂)

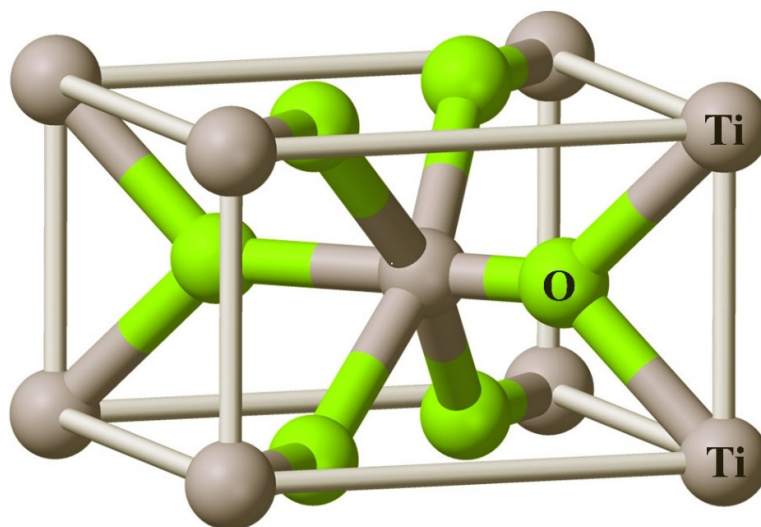
Титан(IV)-оксид, (TiO₂) је индиректан полупроводник n-типа. Полупроводници су чврсте кристалне супстанце које се по својим особинама налазе између проводника (метала) и изолатора. Проводљивост полупроводника има вредности између 10^{-7} Sm^{-1} и 10^4 Sm^{-1} (на 20 °C).¹⁰⁸ Проводљивост TiO₂ је $2,34 \cdot 10^6 \text{ Sm}^{-1}$. Код полупроводника и изолатора енергетски процеп (област забрањених енергетских нивоа) одваја попуњене нивое у валентној зони и непопуњене нивое у проводној зони. Величина енергетског процепа између валентне и проводне зоне, минимална енергија коју је неопходно предати полупроводнику да би електрон прешао из валентне у проводну,¹⁰⁹ је у опсегу од 0,5 до 3,5 eV,¹¹⁰ а код TiO₂ величина енергетског процепа је 3,2 eV.

На апсолутној нули код полупроводника сви енергетски нивои у валентној зони су попуњени, док је проводна зона празна, а електрони не могу да пређу из валентне у проводну зону јер немају потребну енергију да савладају енергетски процеп. Термална енергија електрона се повећава са повећањем температуре, па поједини електрони добијају потребну енергију за савладавање енергетског процепа. Када електрони пређу из валентне у проводну зону, за собом остављају шупљине које су носиоци позитивног наелектрисања. Тако настаје пар електрон-шупљина који је носилац наелектрисања. Ако је пар, под утицајем *Coulomb*-ове силе (електростатичка сила којом једно непокретно наелектрисање малих димензија делује на друго), у везаном стању он се назива ексцитон.¹¹¹ Енергију за прелаз из валентне зоне у проводну зону електрон може да добије термалним побуђивањем, оптичком ексцитацијом или јонизацијом материјала наелектрисаним честицама. Код полупроводника енергија и концентрација проводних електрона повећавају се са порастом температуре.¹⁰⁸

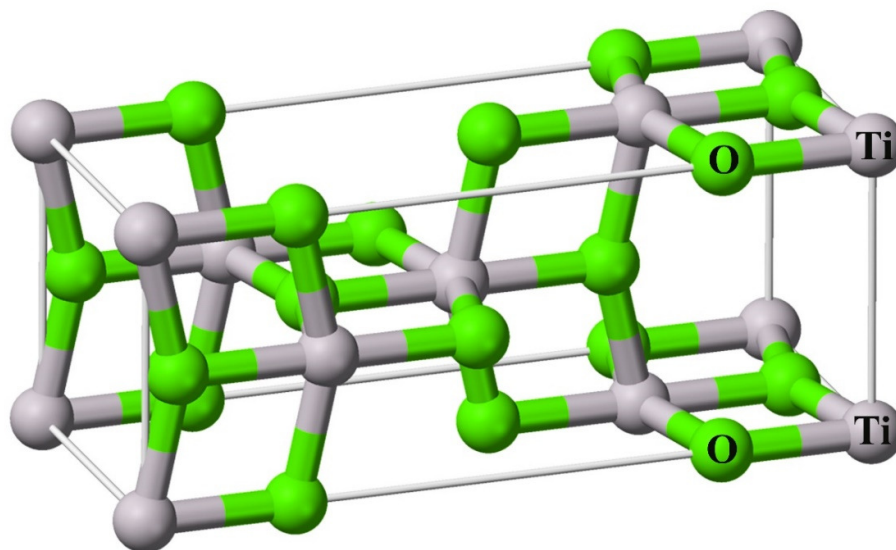
1.10. Кристална структура титан(IV)-оксида

Титан(IV)-оксид кристалише у три различите структуре које се могу наћи у природи: рутил (тетрагонална, D_{4h}^{14} - $P4_2/mnm$, $a = b = 4,584 \text{ \AA}$, $c = 2,953 \text{ \AA}$),¹¹² Слика 1.3, анатас (тетрагонална, D_{4h}^{19} – $I4_1/amd$, $a = b = 3,782 \text{ \AA}$, $c = 9,502 \text{ \AA}$), Слика 1.4 и брукит (орторомбична, D_{2h}^{15} – $Pbca$, $a = 5,436 \text{ \AA}$, $b = 9,166 \text{ \AA}$, $c = 5,135 \text{ \AA}$).¹¹³

Све кристалне структуре TiO_2 изграђене су од TiO_6 октаедра код кога је Ti^{4+} јон окружен са шест O^{2-} јона у октаедарској конфигурацији. Рутил, анатас и брукит кристалне структуре настају слагањем ових октаедара у простору, а ове кристалне форме се разликују по начину слагања ових октаедара и њиховој дисторзији. Познато је за честице мање од 20 nm, да код анатас кристалне форме површински атоми титана уместо октаедарске имају квадратно-пирамидалну координацију.- У овом случају сваки атом титана на површини наночестице је окружен са пет атома кисеоника, при чему је једна Ti-O веза краћа и поседује двоструки карактер.



Слика 1.3. Модел рутил кристалне структуре TiO_2 .



Слика 1.4. Модел анатас кристалне структуре TiO_2 .

Високо чисти каталитички прахови од титан(IV)-оксида (са анатас структуром) се уобичајено добијају од титан тетраоксида.¹¹⁴ Многе додатне технике се користе за синтезу каталитичких прахова, облици кристала варирају у зависности од тога која се процедура користи за припрему.^{115–119} Најчешће се добијају (1 0 1) и (1 0 0)/(0 1 0) површинске равни заједно са понеком (0 0 1).¹²⁰ Неколико теоријских студија предвиђа стабилност различитих анатасних површина са ниским индексом.^{120–122} Термодинамички најстабилнија површина је (1 0 1).^{120,123} Просечна површинска енергија за равнотежни облик анатасних кристала је мања него код рутил кристала^{120,123} што објашњава чињеницу зашто су честице TiO_2 нанометарских димензија мање стабилне у рутил фази.

1.11. TiO_2 у SALDI MS анализи

Због своје доступности, хемијске стабилности, нетоксичности и ниске цене титан(IV)-оксид (TiO_2) се убраја у добре кандидате за SALDI масену спектрометрију. Од када је демонстрирана употреба сол-гел филмова TiO_2 ,⁶⁰ потрага за поузданим супстратима од TiO_2 за SALDI масену анализу померена је на наночестице,¹²⁴ нанотубе¹²⁵ и наножице.¹²⁶ Предност наночестица је апсорпција енергије ласера и ефикасан пренос енергије до узорка. Полупроводници са добром апсорпцијом у UV

области су обећавајући кандидати за SALDI масену спектрометрију. Генерално, TiO_2 ефикасно апсорбује UV светлост (има знатну ширину енергетске баријере, 3,2 eV) азотног ласера који се користи у MALDI TOF масеној спектрометрији, али процес припреме наночестица TiO_2 вероватно има снажан утицај на апсорпцију јер она зависи од величине, облика и састава честица.^{102,127} Величина и облик кристала утичу на аналитичке перформансе и јонизациону ефикасност у SALDI масеној спектрометрији. Из разлога који су наведени приликом приказа органских матрица, и у случају SALDI-ја, избор супстрата за одређени узорак је још увек емпиријски. Другим речима, потребно је пронаћи одговарајући супстрат/матрицу за сваки специфичан узорак.¹²⁸

Поред тога што су супстрати за SALDI анализу инертни (нису хемијски реактивни са узорцима), има извештаја који говоре о склоности наночестица TiO_2 за везивање за одређена једињења, као што су ендиолна једињења, аскорбинска киселина и молекули који садрже фосфатну функционалну групу. Ова особина наночестица TiO_2 омогућава чак и квантитативно одређивање катехина у узорцима чаја помоћу SALDI методе, при чему су *shot-to-shot* варијације биле и мање од 10 % у преко 50 места на плочи и мање од 15 % у три понављања при одређивању узорака ендиол једињења.¹⁰² Забележено је и да, када се користе честице TiO_2 које су модификоване катехинима, у SALDI масеној спектрометрији добијају се мале вредности *shot-to-shot* варијација (све добијене варијације су биле мање од 10 %, за $n = 10$) и *batch-to-batch* (све вредности су биле мање од 15 %, за $n = 7$).¹²⁹

Оскудни подаци су пронађени у литератури о толеранцији коју имају SALDI супстрати на високе концентрације соли у растворима узорака. У једном од ретких радова¹³⁰ је показано да квалитет спектра комплекса прелазних метала који је снимљен у присуству TiO_2 не зависи од концентрације јона натријума и калијума. Уколико се покаже да и остали супстрати могу да толеришу релативно високе концентрације неорганских соли, ова карактеристика би омогућила директну биохемијску анализу молекула малих маса (лекова, метаболита, стероидних хормона) из „сланих“ биолошких узорака као што је урин.

1.12. Биолошки значај молекула малих маса

Молекули малих маса су од великог значаја за разумевање функционисања ћелије и метаболизма уопште, што показује и развој приступа који се назива метаболомика. Метаболомика комбинује стратегије за идентификацију и квантификацију ћелијских метаболита помоћу различитих метода уз примену статистичких метода. Метаболити су молекули малих маса укључени у разне процесе у ћелији као што је трансдукција сигнала, којима се контролишу важни процеси у ћелији, међу којима су ћелијска деоба, раст и диференцијација. Велики напори се улажу за развој аналитичких приступа за што једноставнију анализу различитих ћелијских производа, а метаболомика се сматра као важно оруђе за разумевање биологије организама и његових одговора на стимулације из спољашње средине и генетичке промене.

Стероидни хормони су супстанце од круцијалног значаја за нормално функционисање организма. Они су медијатори различитих физиолошких функција, од тога да могу бити различити анти-инфламаторни агенси до тога да регулишу фазе током трудноће. Тестостерон и његов метаболит дихидротестостерон, прогестерон и естрадиол се класификују као полни хормони и њихов ниво опада са годинама. Полни хормони су укључени и у когнитивне процесе у мозгу одраслих људи.¹³¹ У последње две деценије је показано да се рецептори за естроген, прогестерон и андрогене хормоне експримирају и на нерепродуктивним ткивима/органима (костима, мозгу, кардио-васкуларном систему) и учествују у регулацији њихових функција. Стога, је веома важно проценити утицај полних хормона у патофизиологији појединих болести (остеопороза, Алцхајмерова болест, атеросклероза).¹³²

Амино-киселине које садрже сумпор (цистеин) и пептиди (глутатион) имају важне улоге у биолошким системима.¹³³⁻¹³⁷ Глутатион, цистеин и хомоцистеин у крви су повезани са болестима као што је хиперхомоцистеинија која је фактор ризика за атеросклерозу, кардио-васкуларне и хроничне бубрежне болести.¹³⁸ Тиолне групе су редукујући агенси, физиолошка концентрација у животињској ћелији је око 5 mM. Нормалан ниво цистеина у ћелији је између 9,5-11,5 mM.¹³⁹ Редукована форма глутатиона је најзаступљенији тиол ниске молекулске масе у ћелији, а има улогу у заштити ћелије од токсичних врста.¹⁴⁰

Метионин, неполарна, алифатична аминокиселина, и цистеин су протеиногене аминокиселине, које садрже сумпор, што значи да су оне прекурсори у синтези протеина и уграђују се у протеине током процеса транслације.¹⁴¹ У ретким случајевима

метионин може да има улогу редокс сензора,¹⁴² али његов аминокиселински остатак углавном нема каталитичку улогу. Тиолна група у аминокиселинском остатку цистеина има каталитичку улогу у многим протеинима. Тиостар метионина има структурну улогу код протеина, стабилише ефекат S/π интеракције између сумпорних атома бочних ланаца и ароматичних киселина код једне трећине свих познатих структура.¹⁴³

Аланин једноставно настаје, па је због тога блиско повезан са метаболичким путевима као што су гликолиза, глуконеогенеза и циклус лимунске киселине. Настаје заједно са лактатом и генерише глукозу из протеина кроз циклус аланина. Промене у циклусу аланина подижу ниво аланин аминотрансферазе (ALT) у серуму што је повезано са развијањем дијабетеса типа II.¹⁴⁴

Глукоза је у људском телу кључни извор енергије кроз аеробну респирацију. Преко гликолизе, циклуса лимунске киселине и оксидативне фосфорилације глукоза се оксидује до CO₂ и воде, а као главни производ ових метаболичких путева је енергија углавном у форми аденозин трифосфата (АТФ). Глукоза је најзаступљенија алдохексоза у живим организмима. Могући разлог њене заступљености је тај што има најмању тенденцију у односу на друге алдохексозе да неспецифично реагује са амино групама протеина и тиме наруши њихову функцију.¹⁴⁵ Њена слабија, неспецифична реактивност се приписује стабилнијој цикличној форми (има хидроксилну групу у екваторијалном положају) у поређењу са другим алдохексозама, краће време је у реактивној форми отвореног ланца. Метаболички поремећај код ког организам не може да регулише ниво глукозе у крви је дијабетес. Проблем у регулацији може бити последица недостатка инсулина у организму или ћелије немају одговарајући одговор на инсулин. Инсулин је хормон који регулише ниво глукозе, омогућава организму да скупља и користи глукозу. Дугорочне компликације дијабетеса (слепило, пропадање бубрега, неуродегенеративни поремећаји) су последица гликозилације протеина или липида. За разлику од претходно наведеног гликозилација је ензимски регулисано додавање шећерне групе на протеине и која је есенцијална за нормално функционисање многих протеина.¹⁴⁶

Малтоза је дисахарид формиран од две јединице глукозе које су спојене α(1→4) гликозидном везом. Малтоза је важан интермедијер у разградњи скроба. Малтоза се даље у организму разграђује до глукозе. Показано је да интравенозно уношење глукозе има сличне метаболичке ефекте као глукоза и да се сва малтоза метаболише. Раствор малтозе даје двоструко већу масу шећера и калорија по милилитру као еквимоларан раствор глукозе.¹⁴⁷

У анималним ћелијама лимунска киселина настаје у првој реакцији у Кребсовом циклусу (Циклус лимунске киселине) помоћу ензима цитрат синтазе који катализује реакцију кондензације ацетил-коензима А са оксалоацетатом. Кребсов циклус у аеробним организмима спаја путеве катаболизма (разградње) угљених хидрата, липида и протеина до CO_2 и воде уз ослобађање хемијске енергије. Кребсов циклус је и анаболички циклус јер учествује у синтези протеина као извор прекурсора аминокиселина (ацетил коензим А, α -кетоглутарат, сукцинил коензим А, сукцинат, фумарат, оксалоацетат).

Витамин Е је важан нутријент који има и антиоксидативне и не-антиоксидативне функције, такође има доказа да штити кардио-васкуларни систем.¹⁴⁸ За нормално функционисање организма важно је одржавање оптималног нивоа витамина Е. Остале улоге које витамин Е има поред антиоксидативне су: модулација функције моноцита, инхибиција агрегације крвних плочица, инхибиција пролиферације глатких мишићних ћелија и модулација генске експресије.¹⁴⁹ Мерење нивоа витамина Е у плазми је неадекватан начин одређивања статуса витамина Е, због тога што се овај витамин јако везује за липиде (липофилан је).

Још једна веома важна и разнолика група биолошки важних молекула малих маса јесу лекови. Квалитативна и квантитативна анализа лекова (посебно њихова дистрибуција *in vivo*) је есенцијална при откривању лекова, праћењу дејства и разумевању њиховог механизма дејства и фармаколошких и токсиколошких ефеката.^{150,151} Ауторадиографија је стандардна техника за испитивање дистрибуције лекова у фармацеутској индустрији јер омогућава квантификацију и визуелизацију дистрибуције у ткивним исечцима. Ова метода има техничка ограничења јер је заснована на детекцији радиоактивности, а синтеза радиоактивно обележених лекова је скуп и дуготрајан процес. Комплекси прелазних метала као антитуморски агенси последњих деценија су предмет изучавања бројних истраживачких група,¹⁵²⁻¹⁵⁶ тако да проналажење методе за њихову брзу детекцију, карактеризацију и квантификацију добијају на значају.

1.13. Методе за детекцију молекула малих маса

Услед веома важне улоге коју имају молекули малих маса за функционисање читавог организма и лекови (који такође имају мале масе) у биолошким системима велика пажња научника је посвећена проналажењу адекватних начина за брзу детекцију молекула малих маса. Одређивање ових молекула могуће је са различитим аналитичким техникама као што су: течна хроматографија високих перформанси (*High-Performance Liquid Chromatography*, HPLC),^{157,158} капиларна електрофореза (*Capillary Electrophoresis*, CE),^{159,160} гасна хроматографија/масена спектрометрија (*Gas Chromatography/Mass Spectrometry*, GC/MS),¹⁶¹ површински појачана раманска спектроскопија (*Surface Enhanced Raman Spectroscopy*, SERS)¹⁶² и флуоресцентна мерења.¹⁶³ Међутим, већина ових техника захтева време и додатне методе за дериватизацију узорака који се анализирају, као и неопходне припреме узорака у зависности од технике. Неке технике имају и додатне недостатке као што су ниска осетљивост и селективност за одређивање молекула малих маса у биолошким узорцима. Осим дериватизације и неопходне припреме узорка за анализу (која је често веома захтевна и временски), код ових техника су потребне и додатне хемикалије (растварачи) за саму анализу. Велика предност MALDI масене спектрометрије у односу на наведене технике је једноставност, брзина методе и нижа цена анализе, као и велика флексибилност саме методе. Веома је лако (и за кратко време) прилагодити анализу за испитивање било које врсте молекула без обзира на њихову поларност, растворљивост и друге физичко-хемијске особине. Такође, могуће је и истовремено испитивање различитих молекула у смеши без претходне обраде и припреме узорка.

ЗАДАТАК РАДА

Задатак ове докторске дисертације јесте испитивање могућности примене нанокристала различитих облика и димензија, на бази титан(IV)-оксида у SALDI TOF масено-спектрометријској анализи различитих класа молекула малих маса до 1000 Da.

У оквиру тога неопходно је:

- идентификовати и детаљно анализирати сигнале LDI TOF масених спектра који потичу од самог супстрата (нанокристала TiO_2)
- проверити могућност детекције молекула малих маса у присуству нанокристала TiO_2
- упоредити квалитет спектра појединих класа молекула малих маса добијених са органским матрицама и са неорганским матрицама
- испитати утицај соли и интензитета ласера на квалитет спектра добијених у присуству нанокристала TiO_2 и да ли повећање концентрације соли које су присутне у растворима и варирање снаге ласера утичу на примену супстрата TiO_2 за анализу молекула малих маса
- испитати репродуцибилност методе да би се утврдило да ли је квантитативна масеноспектрометријска анализа молекула малих маса могућа уз коришћење супстрата на бази нанокристала TiO_2
- утврдити у којој мери димензије и облик супстрата утичу на квалитет спектра.

Резултати добијени у овој докторској дисертацији би требало да допринесу целокупном знању о универзалној матрици у SALDI TOF масеноспектрометријској анализи молекула малих маса и дају одговор на питање да ли је и уз помоћ које неорганске матрице јесте могућа квантитативна анализа.

2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛИ ДЕО

2.1. Хемикалије

Комплекси прелазних метала: дихлоридо(*bis*-(бипиридин))рутенијум(III)-хлорид, $[\text{RuCl}_2(\text{bipy})_2]\text{Cl}$ и тетрахлоридо(бипиридин)платина(IV), $[\text{PtCl}_4(\text{bipy})]$ су синтетисани од стране сарадника групе професора др Живадина Бугарчића, на Природно-математичком факултету Универзитета у Крагујевцу, где је и испитана њихова чистоћа и где су и окарактерисани.

Хемикалије коришћене у синтези наночестица TiO_2 (TiO_2 НЧ), елипсоидних наночестица TiO_2 (TiO_2 ЕНЧ) и нанотуба TiO_2 (TiO_2 НТ): титан тетрахлорид (TiCl_4) и комерцијални прах TiO_2 су купљени од *Sigma-Aldrich*, Тауфкирхен, Немачка и коришћени су без даљег пречишћавања.

Све тестиране хемикалије – β -циклодекстрин, D-(+)-глукоза, D-(+)-малтоза, арабиноза, рафиноза, L-аланин, L-цистеин, DL-метионин, глутатион, тестостерон, прогестерон, естрадиол, лимунска киселина, дексаметазон (дексазон), витамин Е (δ -токоферол), витамин А (ацетатна форма), као и органске матрице које су коришћене за масену спектрометрију, 2,5-дихидроксибензова киселина, ДНВ, 9-аминоакридин, 9-АА, α -цијано-4-хидроксициметна киселина, СНСА, 2',4',6'-трихидроксиацетофенон, ТНАР су купљене од *Sigma-Aldrich*, Тауфкирхен, Немачка и коришћени су без даљег пречишћавања.

2.2. Синтеза нанокристала TiO_2

2.2.1. Синтеза наночестица TiO_2

Дисперзија TiO_2 НЧ-а је припремљена по процедури коју су описали Радоичић и сарадници.¹⁶⁴ Раствор TiCl_4 (охлађен до $-20\text{ }^\circ\text{C}$) додаје се у охлађену дестиловану воду (на $4\text{ }^\circ\text{C}$) кап по кап уз снажно мешање и остави се на овој температури током 30 минута. рН раствора је између 0 и 1, у зависности од концентрације TiCl_4 . Спори раст честица се постиже дијализом колоидне дисперзије TiO_2 наспрам раствора ($4\text{ }^\circ\text{C}$) док се не постигне рН вредност од 3,5, помоћу мембране за дијализу Spectra/Por, MWCO: 3.500 (Spectrum Laboratories, Inc., Rancho Dominguez, CA, USA). Концентрација TiO_2 у колоидном раствору је одређена према концентрацији пероксидног комплекса који се добија након

растварања честица у концентрованој сумпорној киселини, по процедури коју су описали *Thompson* и сарадници.¹⁶⁵

2.2.2. Синтеза нанотуба TiO₂

Нанотубе титан(IV)-оксида су синтетисане хидротермалним третманом (48 h/120 °C, тефлонска посуда *Parr acid digestion bomb* коначна запремина 125 mL) комерцијалног праха TiO₂ (2 g/50 mL) у јако алкалном воденом раствору 10 mol/dm³ NaOH, без мућкања, према модификованој процедури *Kasuga* и сарадника.^{166,167} Након аутоклавирања у тефлонском суду, добијени прах је одвојен од раствора центрифугирањем. Прах је испиран са воденим раствором хлороводоничне киселине концентрације 1 mol/dm³ током два сата и потом неколико пута испиран чистом водом. Испирање водом је понављано док суспензија није достигла рН вредност 7. Прах се одваја од раствора за испирање центрифугирањем. Синтетисане нанотубе се суше на 70 °C док се не постигне константна тежина.

2.2.3. Синтеза елипсоидних наночестица TiO₂

Елипсоидне наночестице TiO₂ су синтетисане хидротермалним третманом (90 min/250 °C у тефлонској посуди *Parr acid digestion bomb* коначне запремине 25 mL) водене дисперзије 3 x 10⁻² M (25 mg/10 mL) нанотуба TiO₂ на рН ~ 5-6 без мућкања, према модификованој процедури *Врањеш* и сарадници.¹⁶⁸ Добијени прах се одваја од раствора за испирање центрифугирањем. Синтетисане елипсоидне наночестице се суше на 70 °C док се не постигне константна тежина.

2.3. Трансмисиона електронска микроскопија (ТЕМ)

Величина наночестица TiO₂ је одређена помоћу трансмисионе електронске микроскопије (ТЕМ) на JEOL JEM-2100 инструменту са извором електрона лантан хексаборидом (LaB₆), на 200 kV. Величина и облик елипсоидних наночестица TiO₂ је одређена помоћу трансмисионе електронске микроскопије са високом резолуцијом (HRTEM) на инструменту Philips CM-200 са *field emission gun* (FEG), на 200 kV.

2.4. Масена спектрометрија

MALDI TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption and Ionisation Time-Of-Flight*) масеноспектрометријска анализа узорака је рађена на моделу масеног спектрометра: Voyager Biospectrometry DE Pro Workstation (PerSeptive Biosystems, Framingham, MA, USA), који је опремљен са пулсним (20 Hz) азотним ласером који емитује светлост на $\lambda = 337 \text{ nm}$. Убрзавајући напон је био подешен на $\pm 20 \text{ kV}$, а у зависности од тога да ли је напон позитиван или негативан детектовани су катјони или ањјони. Анализатор TOF је био подешен да ради у рефлекторном режиму. Добијање јона ласерском десорпцијом је енергетски стабилисано под условима одложене екстракције од 150 ns. Спектри су снимљени без ограничавања доње границе детекције (*low mass gate*). Да би се постигла добра резолуција и висок однос сигнала и шума снап ласера је подешен да има вредности које су незнатно више од доњег прага. За супстрате TiO_2 НЧ, TiO_2 ЕНЧ и TiO_2 НТ интензитет ласера је био 2400 у.ј, 1950у.ј. и 2000 у.ј., редом. Интензитет ласера за ДНВ је био 1655 у.ј, за 9-АА 1655 у.ј, за СНСА 1100у.ј. и за ТНАР 1500 у.ј.

Сваки спектар представља просек од најмање 400 појединачних озрачивања ласером. Интензитети сигнала и однос сигнала и шума одређује софтвер инструмента (Data Explorer, Version 4.9, Applied Biosystems).

Узорци: D-(+)-глюкоза, D-(+)-малтоза, арабиноза, рафиноза, L-аланин, L-цистеин, DL-метионин, глутатион, тестостерон, прогестерон, естрадиол, лимунска киселина, дексаметазон, витамин Е и витамин А су озрачивани азотним ласером фреквенције 20 Hz на 337 nm, у опсегу m/z од 1 до 1000, осим β -циклодекстрина где је опсег m/z био од 500 до 2000.

2.4.1. Припрема узорака за масеноспектрометријску анализу

Мала запремина раствора узорака (0,5 μL), а затим иста запремина раствора матрице/суспензије нанокристала TiO_2 (супстрата) се наноси на MALDI плочу.

MALDI плоча која је коришћена у свим експериментима је челична плоча превучена златом.

Матрице који су коришћене за масеноспектрометријску анализу биле су растворене у метанолу при концентрацији од 10 mg/mL.

За снимање спектра нанокристала TiO_2 коришћене су водене суспензије наночестица TiO_2 , елипсоидних наночестица TiO_2 и нанотуба TiO_2 концентрације од $0,12 \text{ mol/dm}^3$ до 2 mol/dm^3 и $\text{pH} \sim 3,5$.

Концентрација нанокристала TiO_2 и анализираних молекула би требало да буде у одговарајућем односу. Могуће је да, када се повећа концентрација супстрата, број нанокристала око анализираних молекула се такође увећава, као и могућност побољшане детекције.¹⁶⁹ Нежељени ефекат повећане концентрације супстрата је велики позадински шум и углавном се смањује осетљивост анализе. Тако је концентрација нанокристала TiO_2 ограничена како би се добио задовољавајући, нижи позадински сигнал.

2.4.1.a Испитивање утицаја соли на квалитет масеног спектра

При одређивању утицаја соли на супстрате, нанокристале TiO_2 , коришћене су водене дисперзије нанокристала (TiO_2 НЧ и TiO_2 ЕНЧ) које су, свака појединачно, помешане са раствором NaCl -а или KCl -а тако да је финална концентрација соли износила $0,0325 \text{ mol/dm}^3$.

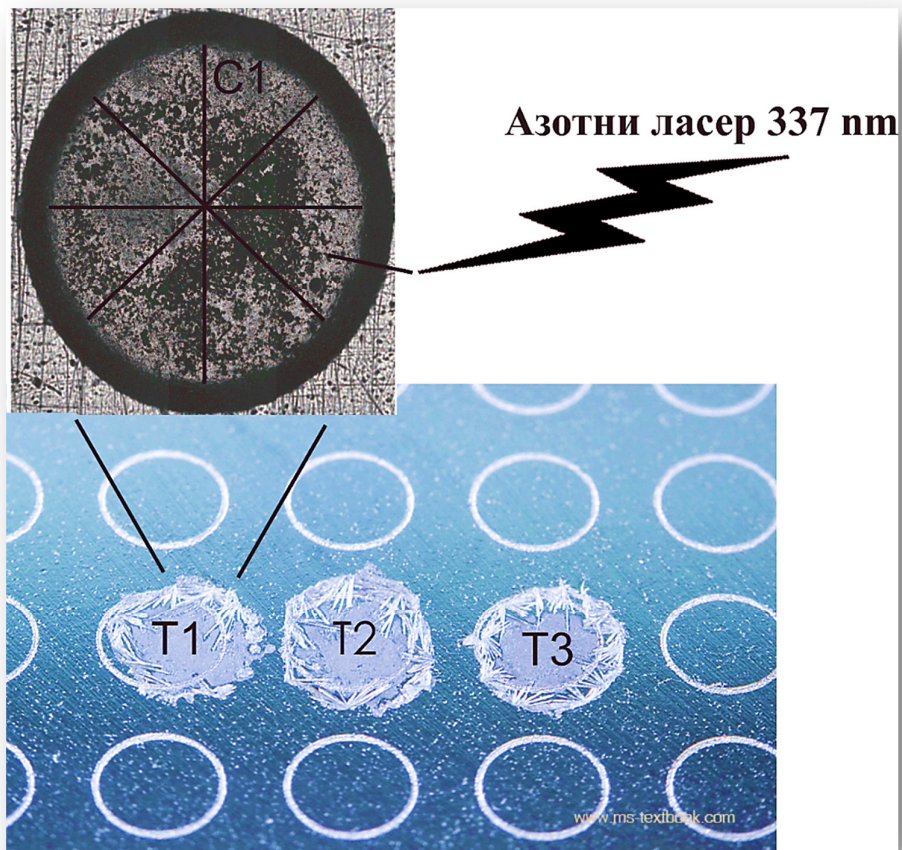
Комплекси прелазних метала: $[\text{RuCl}_2(\text{bipy})_2]\text{Cl}$ и $[\text{PtCl}_4(\text{bipy})]$ су растварани у метанолу до финалне концентрације од 10^{-2} или од 10^{-3} mol/dm^3 , редом, у зависности од њихове растворљивости.

У засебном сету експеримената $5 \mu\text{L}$ дисперзије супстрата је помешано са једнаком запремином раствора комплекса прелазних метала, што је праћено са мешањем раствора пре наношења на MALDI плочу (нането је $0,5 \mu\text{L}$ дисперзије на једно место на плочи). Након наношења раствора на MALDI плочу узорак је остављен да кристалише на собној температури.

У другој фази експеримента, водена суспензија наночестица TiO_2 (и елипсоидних наночестица TiO_2) се меша са раствором соли NaCl -а или KCl -а, након чега се ова дисперзија меша са раствором комплекса прелазних метала. У засебном експерименту, неколико раствора соли растуће концентрације NaCl -а или KCl -а, концентрације од $0,008$ до $0,13 \text{ mol/dm}^3$, се додаје већ припремљеној смеси Ru -комплекса и супстрата TiO_2 (TiO_2 НЧ и TiO_2 ЕНЧ).

2.5. Статистичка анализа

Како би се бројчано приказала хомогеност дистрибуције ко-кристала матрица (супстрат)/узорак и репродуцибилност методе, рађена је обимна статистичка анализа и то на следећи начин: једно место на MALDI плочи је визуелно подељено на осам сектора, а сваки сектор на који је претходно нанет испитивани узорак је ексцитован 120 пута ласером (960 пута по једном месту на MALDI плочи). Дизајн експеримента приказан је на Слици 2.1. На основу средњих вредности односа сигнала и шума (S/N) добијених у одређеном сету експеримената израчуната је хомогеност за сваки пар узорак/матрица (или одређени нанокристали TiO_2 – TiO_2 НЧ, TiO_2 ЕНЧ и TiO_2 НТ). За израчунавање репродуцибилности унутар једног дана процедура је поновљена три пута. Иста процедура је поновљена током три дана за израчунавање репродуцибилности између дана. Репродуцибилност унутар једног дана као и између дана анализирана је помоћу статистичких тестова (Excel tools, ANOVA). Мерења током једног дана сва три сета од по осам мерења (сваки сет је сума 960 појединачних мерења) су груписана приликом израчунавања хомогености и репродуцибилности.



Слика 2.1. Илустрација експеримента за тестирање репродуцибилности и хомогености система. Једно место на MALDI плочи подељено је на осам сектора (C1-C8). Након наношења испитиваних узорака сваки сектор је ексцитован 120 пута ласером (укупно је једно место на плочи ексцитовано 960 пута) и свака комбинација узорка/матрице (или супстрата TiO_2) је мерена три пута (T1, T2, T3). Иста процедура је понављана три дана.

2.6. Оптичка профилометрија

Микрографије места на MALDI плочи која су била испуњена различитим узорцима су добијене помоћу неконтактнoг тродимензионалног оптичког профилера, Zygo New View 7100. Овај неконтактни профилометар користи скенирајућу интерферометрију беле светлости за снимање и мерење микроструктуре и топографије различитих површина (прозирне, непрозирне, обложене, необложене).

Информација о површини структуре је добијена на основу шеме интерференције мерених фронтова таласа (који се рефлектују са тестиране површине) и референтног

фронта таласа (који се рефлектује са унутрашње референтне површине). Резултати су прорачунати, а микрографије сакупљене помоћу софтвера Zygo MetroPro. Места на MALDI плочи су скенирана на увећању $\times 10$ помоћу камере са ултрависоком резолуцијом, која има $0,95 \mu\text{m}$ оптичку резолуцију.

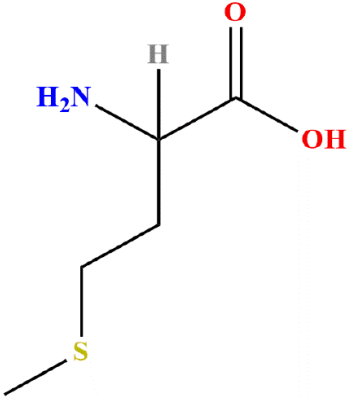
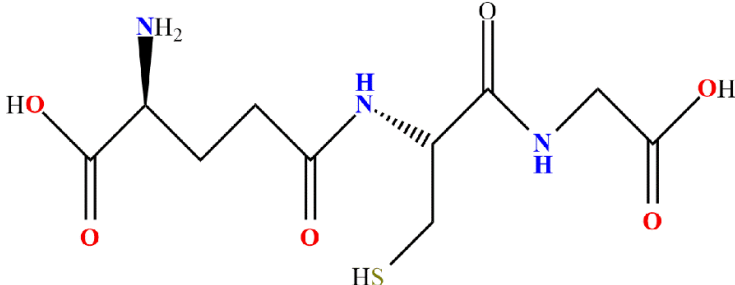
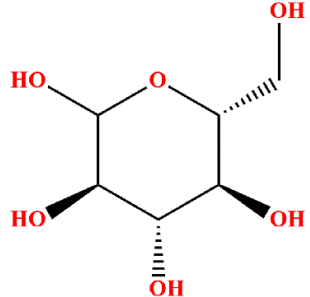
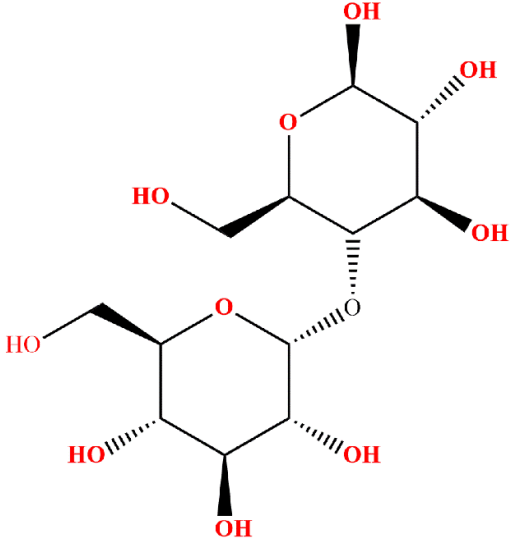
3. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА РЕЗУЛТАТА

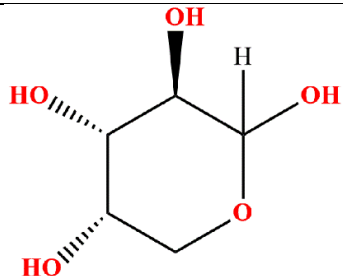
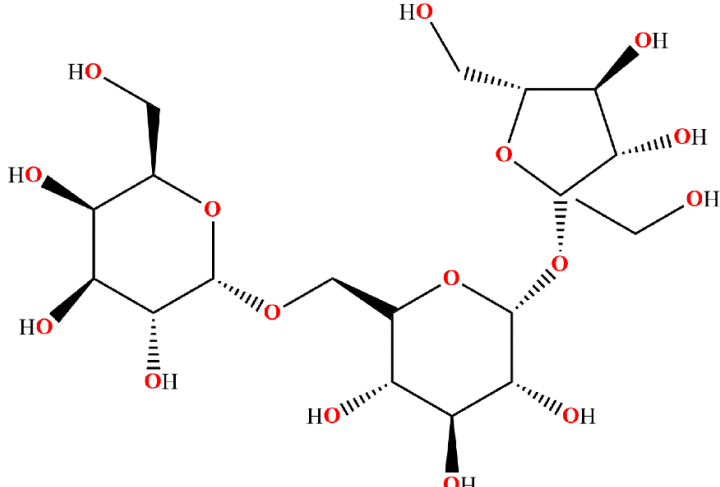
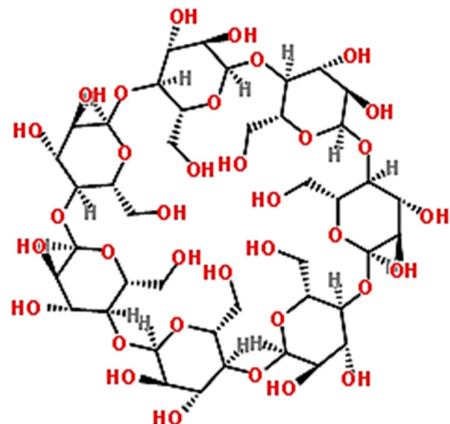
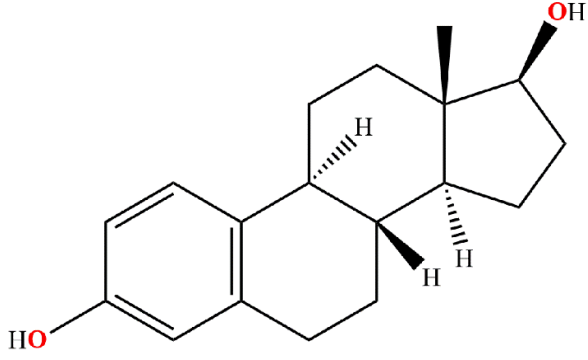
3.1. Анализа масених спектра молекула малих маса добијених у присуству органских матрица - традиционални приступ

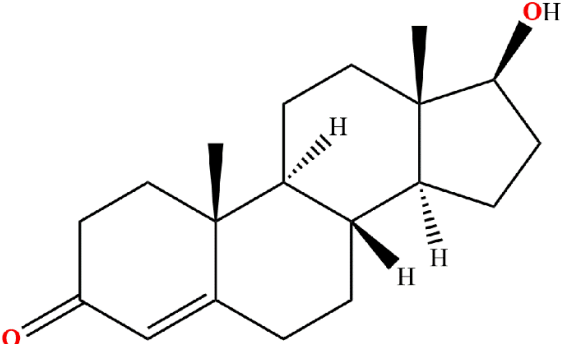
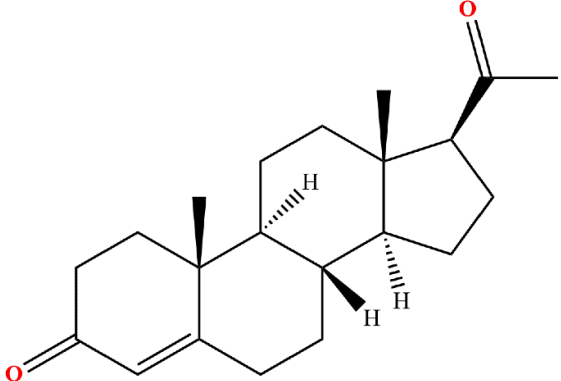
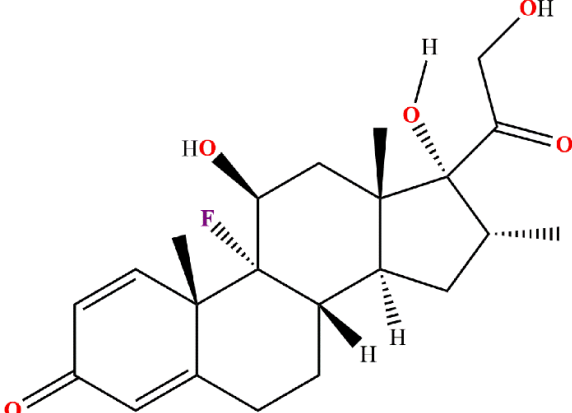
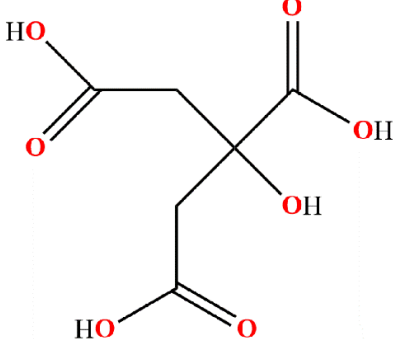
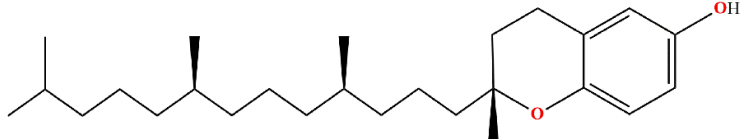
Већина молекула малих маса (β -циклодекстрин, D-(+)-глукоза, D-(+)-малтоза, арабиноза, рафиноза, L-аланин, L-цистеин, DL-метионин, глутатион, тестостерон, прогестерон, естрадиол, лимунска киселина, дексазон, витамин Е, витамин А) који су коришћени у истраживању изабрани су према свом клиничком значају и према потреби за њиховом брзом детекцијом и квантификацијом. Угљени хидрати су изузетак и изабрани су због тога што не постоји брза и поуздана метода за њихову анализу. Структурне формуле и IUPAC-ови називи свих молекула који су анализирани у докторској дисертацији приказани су у Табели 3.1.

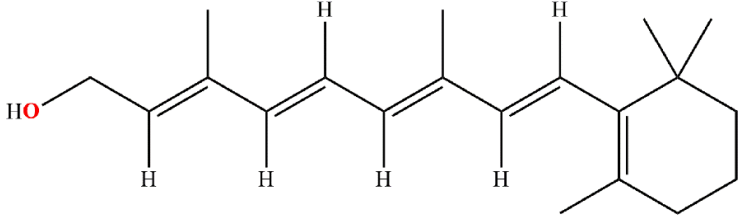
Табела 3.1. Биолошки значајни молекули који су анализирани у докторској дисертацији. Дати су њихови називи према IUPAC-у и приказ структурних формула.

| Молекул | Назив према IUPAC-у | Структурна формула |
|-----------|---|--------------------|
| L-аланин | (2S)-2-aminopropanska kiselina | |
| L-цистеин | (2R)-2-amino-3-sulfanylpropanska kiselina | |

| | | |
|-----------------------------|--|--|
| <p>DL-метионин</p> | <p>2-amino-4-metilsulfanilbutanska kiselina</p> |  |
| <p>Глутатион</p> | <p>(2S)-2-amino-5-[[[(2R)-1-(karboksimetilamino)-1-okso-3-sulfanilpropan-2-yl]amino]-5-okso-pentanska kiselina</p> |  |
| <p>D-(+)-глюкоза</p> | <p>(3R,4S,5S,6R)-6-(hidroksimetil)oksane-2,3,4,5-tetrol</p> |  |
| <p>D-(+)-малтоза</p> | <p>(2R,3S,4S,5R,6R)-2-(hidroksimetil)-6-[(2R,3S,4R,5R,6R)-4,5,6-trihidroksi-2-(hidroksimetil)oksan-3-il]oksioksane-3,4,5-triol</p> |  |

| | | |
|-------------------------------|--|--|
| <p>Арабиноза</p> | <p>(3R,4S,5S)-oksane-2,3,4,5-tetrol</p> |  |
| <p>Рафиноза</p> | <p>(2S,3R,4S,5R,6R)-2-[[[(2R,3S,4S,5R,6R)-6-[(2S,3S,4S,5R)-3,4-dihidroksi-2,5-bis(hidroksimetil)oksolan-2-il]oksi-3,4,5-trihidroksioksan-2-il]metoksi]-6-(hidroksimetil)oksane-3,4,5-triol</p> |  |
| <p>β-циклодекстрин</p> | <p>(1S,3R,5R,6S,8R,10R,11S,13R,15R,16S,18R,20R,21S,23R,25R,26S,28R,30R,31S,33R,35R,36R,37R,38R,39R,40R,41R,42R,43R,44R,45R,46R,47R,48R,49R)-5,10,15,20,25,30,35-Heptakis(hidroksimetil)-2,4,7,9,12,14,17,19,22,24,27,29,32,34-tetradekaoksaotaciklo[31.2.2.23.6.28,11.213,16.218,21.223,26.228,31]nonatetrakontan-36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49-tetradekol</p> |  |
| <p>Естрадиол</p> | <p>(8R,9S,13S,14S,17S)-13-metill-6,7,8,9,11,12,14,15,16,17-dekahidrociklopenta[a]fenantrene-3,17-diol</p> |  |

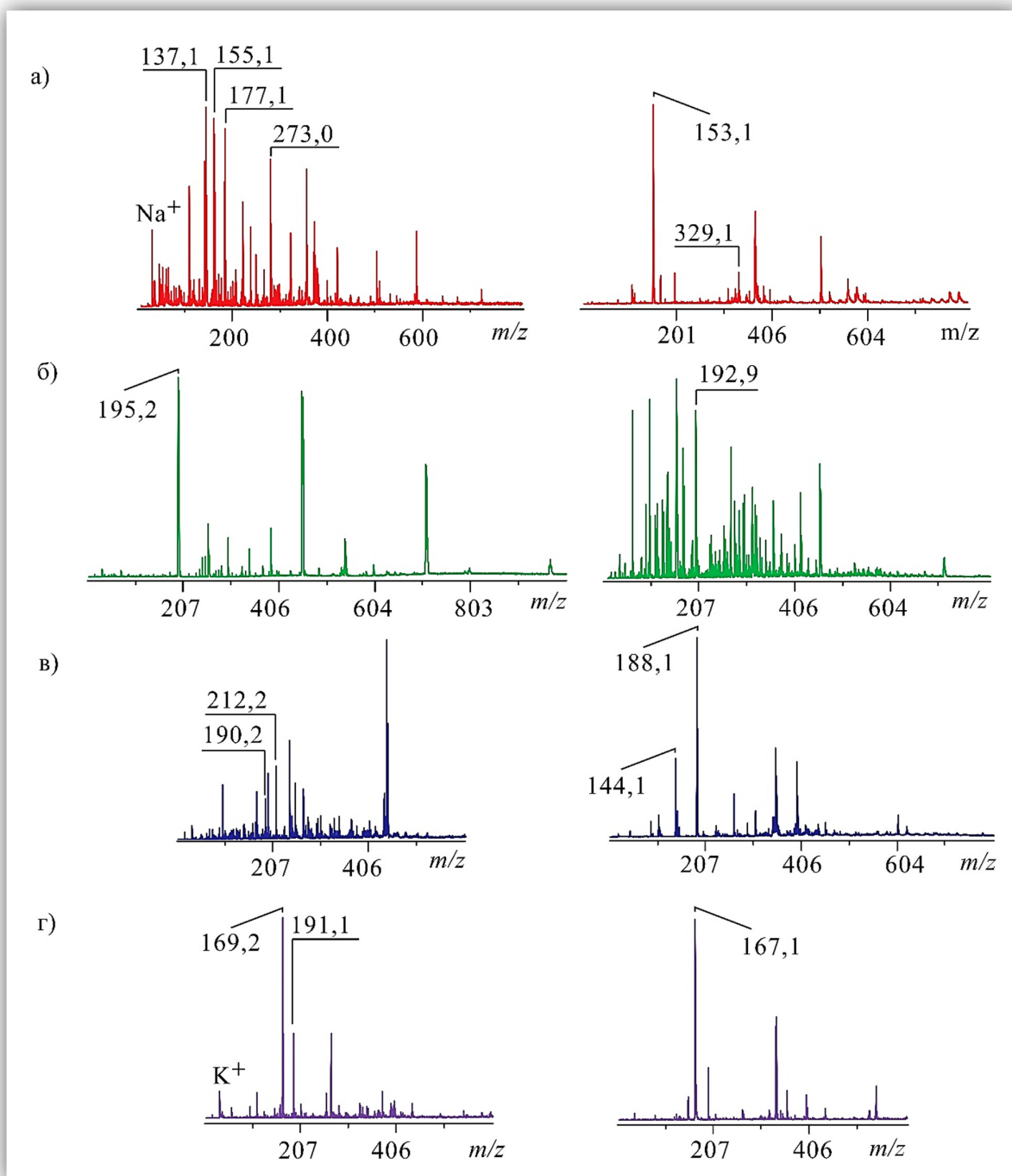
| | | |
|---------------------------------|--|--|
| <p>Тестостерон</p> | <p>(8R,9S,10R,13S,14S,17S)-17-hidroksi-10,13-dimetil-1,2,6,7,8,9,11,12,14,15,16,17-dodekahidrociklopenta[a]fenanthren-3-on</p> |  |
| <p>Прогестерон</p> | <p>(8S,9S,10R,13S,14S,17S)-17-acetil-10,13-dimetil-1,2,6,7,8,9,11,12,14,15,16,17-dodekahidrociklopenta[a]fenanthren-3-on</p> |  |
| <p>Дексаметазон</p> | <p>(8S,9R,10S,11S,13S,14S,16R,17R)-9-fluoro-11,17-dihidroksi-17-(2-hidroksiacetil)-10,13,16-trimetil-6,7,8,11,12,14,15,16-octahidrociklopenta[a]fenantren-3-on</p> |  |
| <p>Лимунска киселина</p> | <p>2-hidroksipropan-1,2,3-trikarboksilna kiselina</p> |  |
| <p>Витамин Е</p> | <p>(2R)-2,8-dimetil-2-[(4R,8R)-4,8,12-trimetiltridecil]-3,4-dihidrohromen-6-ol</p> |  |

| | | |
|------------------|---|--|
| Витамин А | (2E,4E,6E,8E)-3,7-dimetil-9-(2,6,6-trimetilcikloheksen-1-il)nona-2,4,6,8-tetraen-1-ol |  |
|------------------|---|--|

Пре него што се приступи масеноспектрометријској анализи молекула малих маса потребна је детаљна анализа масених спектра органских матрица које ће бити коришћене у даљем раду за анализу молекула малих маса.

3.1.1. Масени спектри органских матрица

Масени спектри позитивних и негативних јона органских матрица: 2,5-дихидроксибензојеве киселине, ДНВ, 9-аминоакридина, 9-АА, α-цијано-4-хидроксициметне киселине, СНСА, 2',4',6'-трихидроксиацетофенона, ТНАР, су снимани методом ласерске десорпције и јонизације (*eng. Laser Desorption and ionization, LDI*) и приказани су на слици 3.1. Спектри су детаљно анализирани и идентификовани су сигнали пореклом од молекула матрица (Табела 3.2).



Слика 3.1. Масени спектри који приказују позитивне јоне (спектри са леве стране) и спектри који приказују негативне јоне (спектри са десне стране): а) DHB - 2,6-дихидроксибензоева киселина, б) 9-AA - 9-аминоакридин, в) CHCA - α -цијано-4-хидроксициметна киселина, г) THAP - 2',4',6'-трихидроксиацетофенон.

Табела 3.2. Приказ детектованих сигнала позитивних и негативних јона у масеним спектрима добијеним методом ласерске десорпције и јонизације (LDI) матрица које су коришћене у даљем раду: DHB - 2,6-дихидроксибензоева киселина, 9-AA - 9-аминоакридин, CHCA - α -цијано-4-хидроксициметна киселина, THAP - 2',4',6'-трихидроксиацетофенон. Однос масе и наелектрисања су означени као m/z .

| DHB | M_m 154,1 | 9-AA | M_m 194,2 | CHCA | M_m 189,2 | THAP | M_m 168,1 |
|-------|---|-------|-------------------------|-------|--|-------|--------------------------|
| m/z | Идентитет | m/z | Идентитет | m/z | Идентитет | m/z | Идентитет |
| 153,1 | [DHB - H] ⁻ | 192,9 | [9-AA - H] ⁻ | 144,1 | [CHCA - H - CO ₂] ⁻ | 167,1 | [THAP - H] ⁻ |
| 329,1 | [DHB ₂ - 2H + Na] ⁻ | 195,2 | [9-AA + H] ⁺ | 188,1 | [CHCA - H] ⁻ | 169,2 | [THAP + H] ⁺ |
| 137,1 | [DHB - H ₂ O + H] ⁺ | | | 190,2 | [CHCA + H] ⁺ | 191,1 | [THAP + Na] ⁺ |
| 155,1 | [DHB + H] ⁺ | | | 212,2 | [CHCA + Na] ⁺ | | |
| 177,1 | [DHB + Na] ⁺ | | | | | | |
| 273,0 | [DHB ₂ + H - 2H ₂ O] ⁺ | | | | | | |

Неопходно је било идентификовати сигнале који су пореклом од матрица и прецизно их дефинисати како би сигнали пореклом од анализираних молекула били идентификовани са сигурношћу. Идентификовани су само сигнали који су од значаја и који се најчешће појављују при анализи спектра испитиваних молекула. Сви сигнали матрица се не запажају на спектрима анализираних молекула јер може да дође до сузбијања појединих сигнала када је присутан узорак. Спектри матрица су увећани, што је допринело истицању позадинских сигнала, што се нарочито запажа у случају матрице DHB детектоване као позитиван јон и матрице 9-AA детектоване као негативан јон (Слика 3.1). Интензитети позадинских сигнала се могу мењати варирањем параметара на инструменту током мерења.

3.1.2. Испитивање могућности детекције молекула малих маса у присуству органских матрица

Први корак у анализи молекула је била провера могућности детекције испитиваних молекула малих маса са традиционалним, органским матрицама као позитивних и негативних јона, а резултати су приказани табеларно. У Табели 3.3 су приказане и вредности сигнала (однос масе и наелектрисања, m/z) из добијених спектра који одговарају испитиваним молекулима. Матрице са којима је испитивана могућност детекције су наведене у претходном поглављу: DHB, 9-AA, CHCA и THAP.

Табела 3.3. Могућност детекције молекула са органским матрицама: DHB, 9-AA, CHCA и THAP. Табела садржи све сигнале који могу да се детектују са набројаним матрицама и односе масе и наелектрисања (m/z) који потичу од узорка.

| Молекул | Могућност детекције Позитивни јони | | | | Могућност детекције Негативни јони | | | |
|--|---------------------------------------|------------------|----------------|-------------------------|---------------------------------------|---------------|---------------|---------------|
| | DHB m/z | 9-AA m/z | CHCA m/z | THAP m/z | DHB m/z | 9-AA m/z | CHCA m/z | THAP m/z |
| L-аланин | 90,1 112,1* 128,2 | — | 90,1 | 90,1 | — | 88,1 | — | — |
| L-цистеин | 122,2 144,2* | — | 122,2 | — | — | — | — | — |
| DL-метионин | — | — | 150,2 172,2 | 150,2 172,2* | — | 148,2 | — | — |
| Глутатион | 308,3 330,3 346,4 | — | 308,3 | 308,3 | 306,3 | 306,3 | — | 306,3 |
| D-(+)-глукоза | — | — | — | 203,2 219,3 | — | — | — | — |
| D-(+)-малтоза | — | — | — | 365,3 | — | — | — | — |
| Арабиноза | — | — | — | — | — | 149,1 | — | — |
| Рафиноза | 365,3* 384,3* 527,4 543,5 | — | — | 527,4 543,5 | — | 503,4 | — | 503,4 |
| β -циклодекстрин | 1158,0 1174,1 | 1158,0 1174,1 | — | 1158,0 1174,1 | — | 1134,0 | — | 1134,0 |
| Естрадиол | 407,6* | — | — | 407,6 423,6 | — | — | — | — |
| Тестостерон | — | — | 401,6 423,6 | 401,6 423,6 | — | — | — | — |
| Прогестерон | 315,5 337,5 | — | 315,5 337,5 | 315,5 337,5 | 313,5 | — | — | — |
| Лимунска киселина | — | — | — | — | — | — | 191,1 | 191,1 |
| Витамин Е | 402,7 | 402,7 | 402,7 | 402,7 | — | — | — | — |
| Витамин А | 269,5 285,4 328,5 | — | — | 269,5 285,4 328,5 | 283,4 | — | — | — |
| * Молекули могу да се детектују, али су S/N вредности ниже од 50, што је доња граница детекције емпиријски одређена. | | | | | | | | |
| — Јони пореклом од молекула не могу да се детектују. | | | | | | | | |

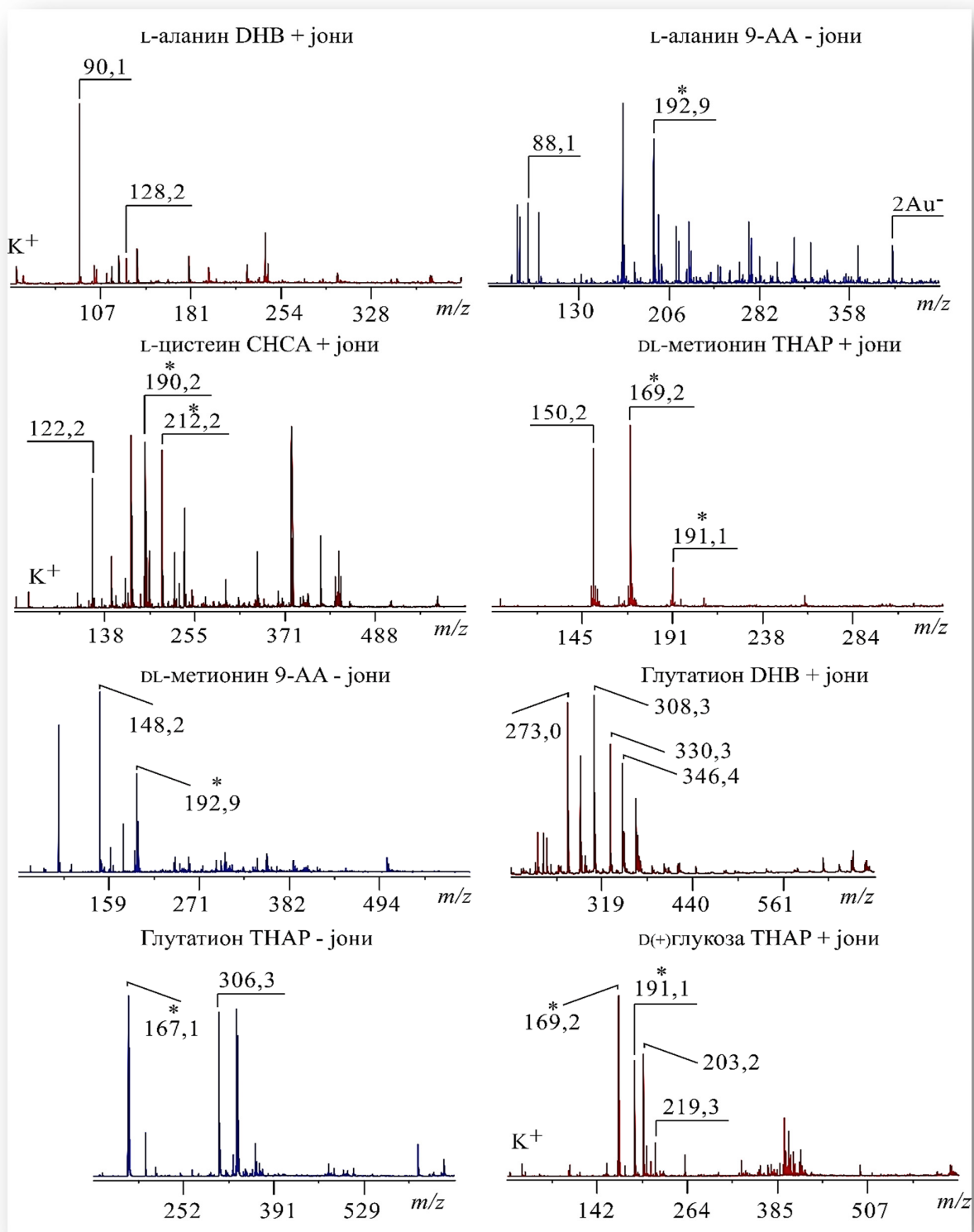
Испитивана је и могућност детекције молекула без матрице (LDI). Као што је и очекивано, показано је да се већина молекула не детектује када матрица није присутна, јер не поседују потребне особине. Матрице снажно апсорбују у UV делу спектра и брзо и ефикасно преносе енергију ласера до испитиваног молекула. При овим

експерименталним условима (снимање спектра без матрице) детектују се једино молекули витамина А и витамина Е јер су ова два молекула богата двоструким везама, па јако апсорбују светлост у UV делу спектра, Табела 3.4.

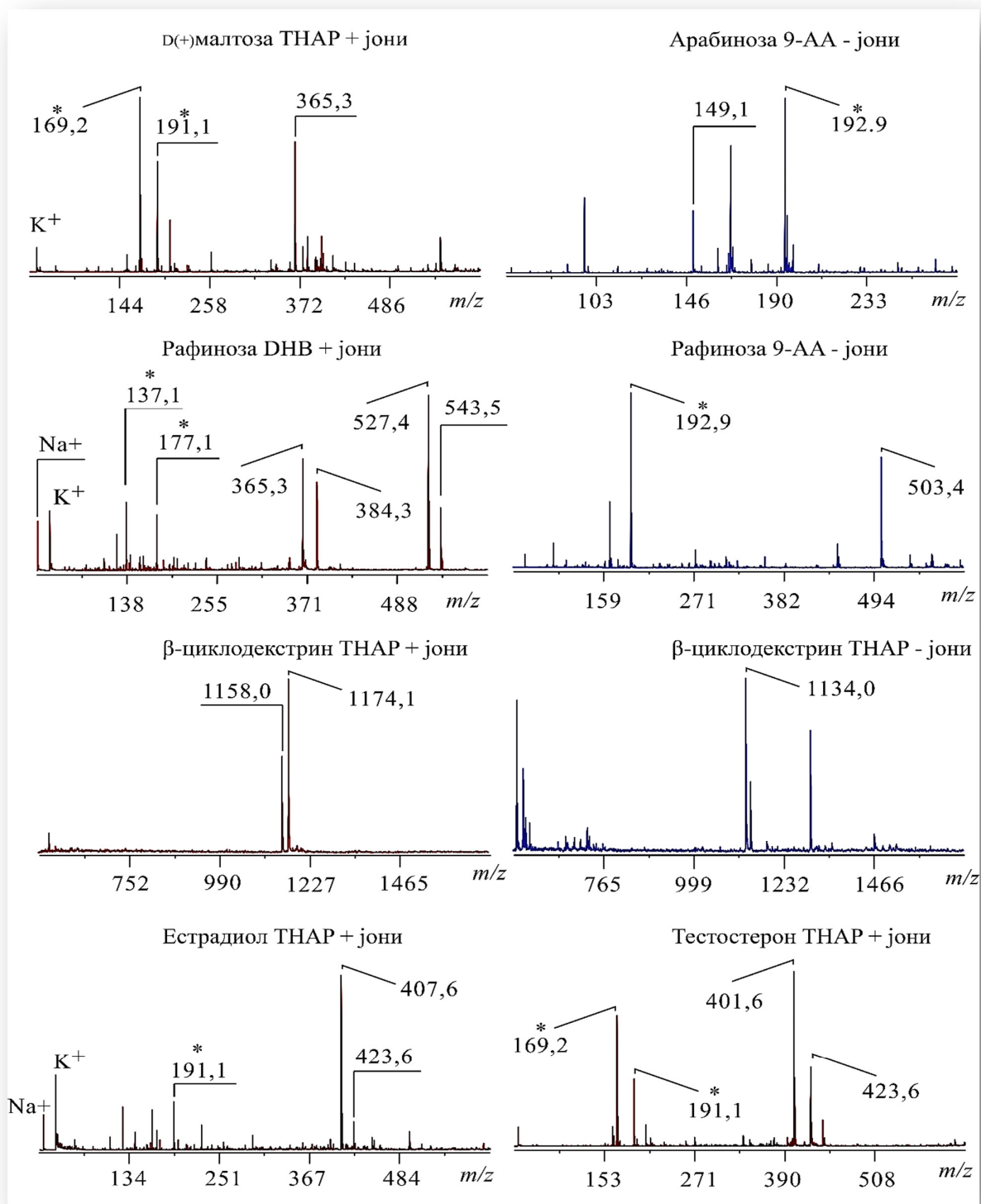
Табела 3.4. *Могућност детекције витамина Е и витамина А без присуства матрице методом ласерске десорпције и јонизације (LDI). Табела садржи све сигнале који могу да се детектују и њихове односе масе и наелектрисања (m/z) који потичу од узорка.*

| Молекул | LDI | |
|----------------------------------|------------------------------|----------------|
| | m/z вредност | |
| | Позитивни јони | Негативни јони |
| Витамин Е | + 402,7 | + 401,6 |
| Витамин А | + 269,5 285,4 328,5 | + 283,4 |
| + Молекули могу да се детектују. | | |

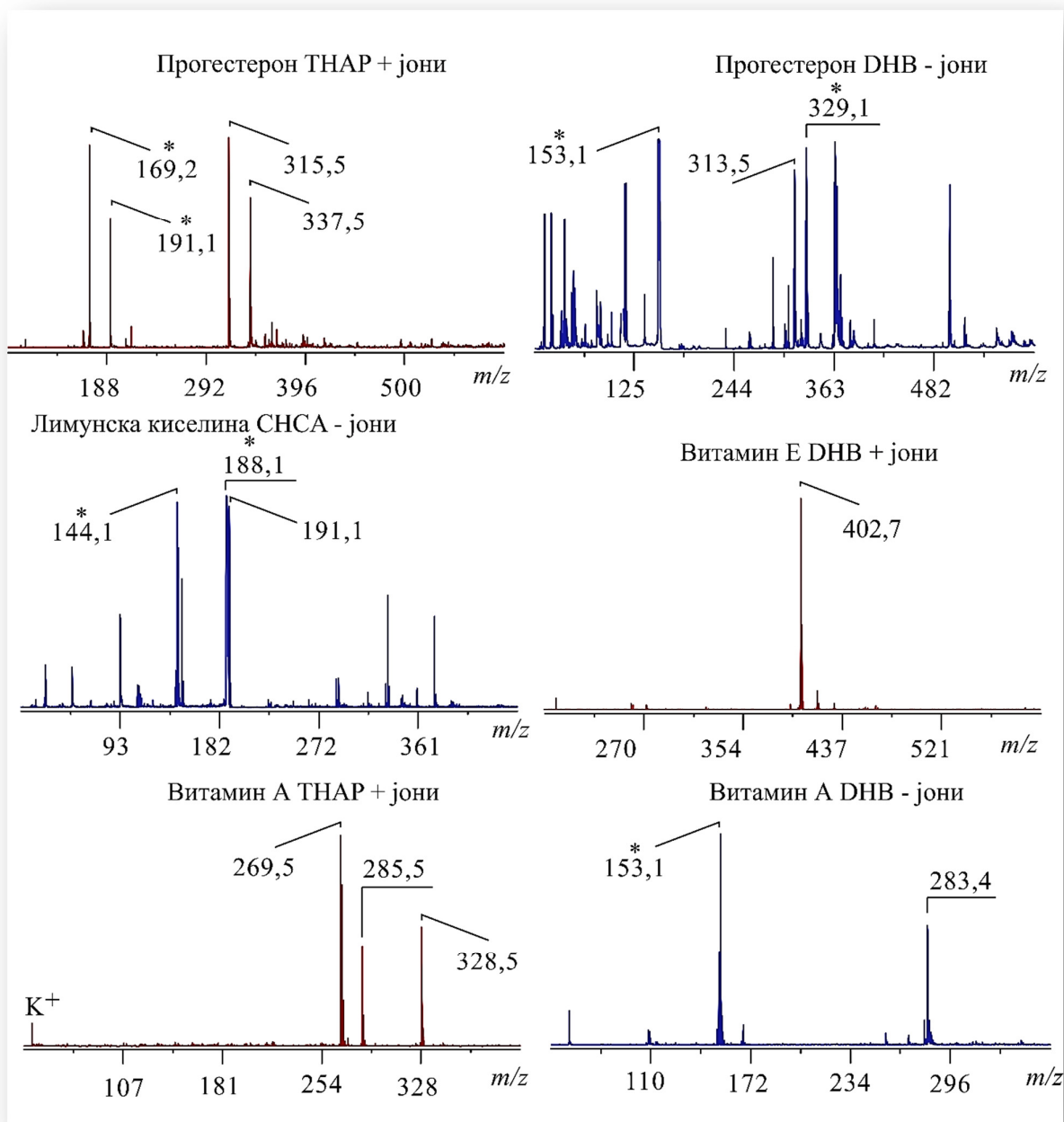
На Слици 3.2 су приказани спектри свих молекула са по једном, одабраном матрицом на којима су приказани сигнали пореклом и од позитивних и од негативних јона. Спектри су изабрани тако да приказују све сигнале који су пореклом од испитиваних молекула, сигнале који су детаљно статистички анализирани у даљем раду.



Слика 3.2.



Слика 3.2.



Слика 3.2. MALDI TOF масени спектри позитивних јона следећих парова матрица молекула: аланин ДНВ, цистеин СНСА, метионин ТНАР, глутатион ДНВ, глукоза ТНАР, малтоза ТНАР, рафиноза ДНВ, β -циклодекстрин ТНАР, естрадиол ТНАР, тестостерон ТНАР, прогестерон ТНАР, витамин Е ДНВ и витамин А ТНАР. MALDI TOF масени спектри негативних јона следећих парова матрица молекула: аланин 9-АА, метионин 9-АА, глутатион ТНАР, арабиноза 9-АА, рафиноза 9-АА, β -циклодекстрин ТНАР, прогестерон ДНВ, лимунска киселина СНСА и витамин А ДНВ.

У Табели 3.5 су приказани идентификовани сигнали испитиваних молекула који су детектовани са матрицама.

Табела 3.5. Идентификовани сигнали испитиваних молекула из MALDI TOF масених спектра молекула са органским матрицама DHB, 9-AA, CHC и THAP.

| Молекул Mm (g/mol) | Позитивни јони m/z Идентитет | Негативни јони m/z Идентитет |
|--|---|------------------------------------|
| L-аланин 89,1 | 90,1 [M + H] ⁺ 112,1 [M + Na] ⁺ 128,2 [M + K] ⁺ | 88,1 [M - H] ⁻ |
| L-цистеин 121,2 | 122,2 [M + H] ⁺ 144,2 [M + Na] ⁺ | — |
| DL-метионин 149,2 | 150,2 [M + H] ⁺ 172,2 [M + Na] ⁺ | 148,2 [M - H] ⁻ |
| Глутатион 307,3 | 308,3 [M + H] ⁺ 330,3 [M + Na] ⁺ 346,4 [M + K] ⁺ | 306,3 [M - H] ⁻ |
| D-(+)-глукоза 180,2 | 203,2 [M + Na] ⁺ 219,3 [M + K] ⁺ | — |
| D-(+)-малтоза, 342,3 | 365,3 [M + Na] ⁺ | — |
| Арабиноза, 150,1 | — | 149,1 [M - H] ⁻ |
| Рафиноза 504,4 | 365,3 [малтозна j-на + Na] ⁺ 384,3 [M - глукозна j-на - 2H + Na + K] ⁺ 527,4 [M + Na] ⁺ 543,5 [M + K] ⁺ | 503,4 [M - H] ⁻ |
| β-циклодекстрин 1135,0 | 1158,0 [M + Na] ⁺ 1174,1 [M + K] ⁺ | 1134,0 [M - H] ⁻ |
| Естрадиол 272,4 | 407,6 [M + C ₁₀ H ₁₇ O - H ₂ O] ⁺ 423,6 [M + C ₈ H ₁₈ O - H ₂ O + Na] ⁺ | — |
| Тестостерон 288,4 | 401,6 [M + C ₈ H ₁₈ O - H ₂ O + H] ⁺ 423,6 [M + C ₈ H ₁₈ O - H ₂ O + Na] ⁺ | — |
| Прогестерон 314,5 | 315,5 [M + H] ⁺ 337,5 [M + Na] ⁺ | 313,5 [M - H] ⁻ |
| Лимунска киселина, 192,1 | — | 191,1 [M - H] ⁻ |
| Витамин Е, 402,7 | 402,7 [M + H] ⁺⁺ | 401,6 [M - H] ⁻ |
| Витамин А 328,5 | 269,5 [M - CH ₃ COO] ⁻ 285,4 [ретинал + H] ⁺ 328,5 [M + H] ⁺⁺ | 283,4 [ретинал - H] ⁻ |
| M – испитивани молекул. | | |
| — Јони пореклом од молекула не могу да се детектују. | | |

Велики број позитивних јона анализираних молекула се добија додавањем протона, јона алкалних метала, натријума или калијума као што је случај код аланина, цистеина, метионина, глутатиона, глукозе, малтозе, β-циклодекстрина, прогестерона и витамина Е. Међутим, у појединим случајевима јони могу изгубити молекул воде, угљен диоксида

или неки већи фрагмент као што је ацетатни јон код витамина А. Негативни јони настају отпуштањем протона у случају свих испитиваних молекула.

3.1.3. Хомогеност дистрибуције узорка и матрице на MALDI плочи

Једна од честих појава до које долази приликом припреме и наношења узорка за MALDI масеноспектрометријску анализу јесте нехомогена ко-кристализација молекула матрице и анализираних молекула на MALDI плочи. Услед нехомогене ко-кристализације долази до неједнаке расподеле молекула матрице и узорка на MALDI плочи, до настанка места на којима је у великом вишку или узорак или матрица (*hot spots, sweet spots*), а као последица овога је ограничена употреба MALDI масене анализе као квантитативне методе.

У следећем сету експеримената одређивана је хомогеност ко-кристала испитиваних парова молекула/матрице на MALDI плочи. За израчунавање и представљање хомогености коришћена је средња вредност коефицијента варијације (релативна стандардна девијација, – РСД, изражена у процентима) - осам вредности односа сигнала и шума (S/N) са девет понављања током три дана (укупно 72 понављања) за сваки пар молекула/матрица за који је показана могућност детекције као негативних и/или позитивних јона. Другачије речено, ове вредности су мера хомогености за различите парове молекула/матрица.

У Табели 3.6 су приказане израчунате вредности хомогености за парове молекула/матрица када су детектовани као позитивни јони, а у Табели 3.7 су приказане вредности добијене када су детектовани негативни јони.

Табела 3.6. Хомогеност ко-кристала молекула/матрице на MALDI плочи приликом детекције позитивних јона. Хомогеност на плочи је представљена помоћу релативне стандардне девијације (РСД) која је изражена у процентима.

| Молекул | m/z | РСД, % | | | |
|--|--------|-----------|------------|-----------|-----------|
| | | DHB | 9-AA | CHCA | THAP |
| L-аланин | 90,1 | 25,5-60,9 | — | 17,9-46,7 | 9,1-34,3 |
| | 128,2 | 31,8-65,2 | — | — | — |
| L-цистеин | 122,2 | 5,6-8,3 | — | 12,1-29,5 | — |
| DL-метионин | 150,2 | — | — | 8,2-17,2 | 10,4-45,4 |
| | 172,2 | — | — | 6,2-15,6 | — |
| Глутатион | 308,2 | 5,1-15,8 | — | 6,1-20,5 | 10,4-21,0 |
| | 330,3 | 4,0-13,8 | — | — | — |
| | 346,4 | 9,8-16,2 | — | — | — |
| D-(+)-глукоза | 203,2 | — | — | — | 8,9-36,4 |
| | 219,3 | — | — | — | 18,0-47,1 |
| D-(+)-малтоза | 365,3 | — | — | — | 8,7-19,2 |
| Рафиноза | 527,4 | 25,9-48,0 | — | — | 12,3-43,1 |
| | 543,5 | 27,2-75,8 | — | — | 15,9-34,4 |
| β-циклодекстрин | 1158,0 | 30,4-53,2 | 29,8-66,6 | — | 16,9-36,5 |
| | 1174,1 | 31,5-87,4 | 50,5-149,2 | — | 21,4-61,4 |
| Естрадиол | 407,6 | — | — | — | 12,1-40,6 |
| | 423,6 | — | — | — | 14,4-70,3 |
| Тестостерон | 401,6 | — | — | 15,0-29,1 | 17,8-47,5 |
| | 423,6 | — | — | 7,3-40,1 | 25,4-52,4 |
| Прогестерон | 315,5 | 5,1-16,3 | — | 5,2-16,9 | 13,4-41,9 |
| | 337,5 | 14,3-42,4 | — | 16,4-25,6 | 11,8-46,9 |
| Витамин Е | 402,7 | 18,8-49,3 | 37,2-67,8 | 17,8-34,6 | 50,5-62,2 |
| Витамин А | 269,5 | 21,2-49,0 | — | — | 18,2-55,7 |
| | 285,4 | 28,7-59,1 | — | — | 31,6-69,2 |
| | 328,5 | 21,1-57,0 | — | — | 33,7-54,1 |
| — Јони пореклом од молекула не могу да се детектују. | | | | | |

Табела 3.7. Хомогеност ко-кристала молекула/матрице на MALDI плочи приликом детекције негативних јона. Хомогеност на плочи је представљена помоћу релативне стандардне девијације (РСД) која је изражена у процентима.

| Молекул | m/z | РСД, % | | | |
|--|--------|------------|-----------|----------|-----------|
| | | DHB | 9-AA | CHCA | THAP |
| L-аланин | 88,1 | — | 10,6-48,3 | — | — |
| DL-метионин | 148,2 | — | 7,3-17,7 | — | — |
| Глутатион | 306,3 | 7,8-24,8 | 6,0-16,5 | — | 3,2-10,6 |
| Арабиноза | 148,2 | — | 21,3-38,5 | — | — |
| Рафиноза | 503,4 | — | 12,8-29,0 | — | 17,4-38,6 |
| β-циклодекстрин | 1134,0 | — | 15,6-37,4 | — | 19,2-34,8 |
| Прогестерон | 313,5 | 16,2-35,2 | — | — | — |
| Лимунска киселина | 191,1 | — | — | 8,6-19,0 | 16,1-26,2 |
| Витамин А | 283,4 | 17,7-104,6 | — | — | — |
| — Јони пореклом од молекула не могу да се детектују. | | | | | |

Такође, одређена је и хомогеност на MALDI плочи оних молекула које је било могуће детектовати без матрице, витамина Е и витамина А. У Табели 3.8 је приказана вредност релативне стандардне девијације позитивних и негативних јона.

Табела 3.8. Хомогеност молекула детектованих без матрице на MALDI плочи (LDI) као позитивни и као негативни јони. Хомогеност на плочи је представљена помоћу релативне стандардне девијације (РСД) која је изражена у процентима.

| Молекул | Позитивни јони <i>m/z</i> | РСД, % LDI | Негативни јони <i>m/z</i> | РСД, % LDI |
|-----------|------------------------------|-------------------------------------|------------------------------|---------------|
| Витамин Е | 402,7 | 40,3-58,6 | 400,4 | 23,2-52,5 |
| Витамин А | 269,5 285,4 328,5 | 25,0-69,4 29,7-64,7 22,5-66,3 | 283,4 | 27,7-80,1 |

На основу вредности релативне стандардне девијације, детектованих позитивних јона (Табела 3.6), која је слика хомогености узорка на MALDI плочи може се закључити да је L-аланин имао најхомогенију дистрибуцију ко-кристала са ТНАР-ом као и DL-метионин, а L-цистеин и глутатион са ДНВ-ом. У свим наведеним случајевима доња вредност РСД-е је била мања од 10 %, што је висока вредност за хомогеност.

Глукоза и малтоза се једино детектују са ТНАР-ом као позитивни јони, али у оба случаја хомогеност је била задовољавајућа. Рафиноза и β-циклодекстрин, такође са ТНАР-ом имају најниже вредности хомогености која је за ова два молекула нешто виша од претходних вредности за глукозу и малтозу, али и даље у прихватљивим границама. Естрадиол и прогестерон са ДНВ-ом имају веома ниску вредност РСД-е 2,3 % и 5,1 %, редом. Витамини Е и А дају прилично високе вредности РСД-е, што указује и на приличну хетерогеност површине ко-кристала који граде са матрицама. У Табели 3.8 дате су вредности РСД-е витамина када су снимљени без матрице, и као што се може видети веома су сличне вредностима које имају са матрицама.

Резултати РСД-е који су добијени од сигнала детектованих негативних јона, (Табела 3.7) показују да су скоро сви анализирани парови молекул/матрица имали ниске вредности РСД-е што упућује на високу хомогеност. Нарочито добра хомогеност добијена је за парове метионин/ДНВ, РСД 7,3 %, глутатион/ТНАР, РСД 3,2 %, лимунска киселина/СНСА, РСД 8,6 %. За витамин А, када се детектује као негативан јон, боља хомогеност се постиже у присуству матрице него када се молекул снима без матрице, доње вредности РСД-е су 17,7 % и 27,7 %, редом.

3.1.4. Прецизност методе - поновљивост и унутрашња прецизност

Прецизност методе је одређена на основу прецизности мерења у једном дану и поновљивости мерења током три дана. Одређивање прецизности даје оцену поузданости методе, што омогућава процену да ли једна метода има потенцијалну примену као рутинска квантитативна анализа. У Табелама 3.9 и 3.10 приказане су вредности варијабилности (изражене у %) добијене анализом варијанси (ANOVA) за све парове матрица/молекула који су могли да се детектују као позитивни и као негативни јони. У табелама су приказане и одговарајуће вредности параметра F, такође одређеног анализом варијанси. Тако добијена вредност параметра F се пореди са F критичном вредности која се одређује на основу броја података из стандардних статистичких таблица које показују горње критичне вредности F расподеле за једнострану F тест са степеном прецизности 95 %, $\alpha = 0,05$.

Табела 3.9. Вредности варијабилности између дана (*Day-to-day variability*) и унутар једног дана (*Within Day variability*) израчунатих помоћу анализе варијанси (*ANOVA*) за све парове молекула/матрица који су могли да се детектују као позитивни јони.

| Молекул | <i>m/z</i> | ANOVA <i>Day-to-day, %</i> | | | | ANOVA <i>Within Day, %</i> | | | | F <i>F_{crit} 5,143</i> | | | |
|-----------------|-------------------------|-------------------------------|---------------|----------------|----------------------|-------------------------------|--------------|----------------|----------------------|------------------------------------|-------------|---------------|---------------------|
| | | DHB | 9-AA | CHCA | THAP | DHB | 9-AA | CHCA | THAP | DHB | 9-AA | CHCA | THAP |
| | | L-аланин | 90,1 128,2 | 35,8 9,8 | — — | 55,4 — | 62,9 — | 37,0 21,2 | — — | 24,6 — | 29,3 — | 3,8 0,4 | — — |
| L-цистеин | 122,2 | 10,8 | — | 12,1 | — | 9,5 | — | 27,5 | — | 4,9 | — | 0,4 | — |
| DL-метионин | 150,2 172,2 | — — | — — | 5,5 25,1 | 30,4 — | — — | — — | 19,2 16,6 | 12,7 — | — — | — — | 1,3 7,8 | 18,3 — |
| Глутатион | 308,2 330,3 346,4 | 22,6 2,0 38,6 | — — — | 15,0 — — | 25,4 — — | 9,5 9,6 25,1 | — — — | 10,2 — — | 18,4 — — | 17,8 0,9 8,1 | — — — | 7,5 — — | 6,7 — — |
| D-(+)-глукоза | 203,2 219,3 | — — | — — | — — | 26,5 24,0 | — — | — — | — — | 8,8 29,8 | — — | — — | — — | 28,1 2,9 |
| D-(+)-малтоза | 365,3 | — | — | — | 7,7 | — | — | — | 25,9 | — | — | — | 0,7 |
| Рафиноза | 527,4 543,5 | 26,9 59,7 | — — | — — | 26,3 31,4 | 51,5 32,9 | — — | — — | 60,2 50,4 | 1,8 10,9 | — — | — — | 0,4 2,2 |
| β-циклодекстрин | 1158,0 1174,1 | 13,8 24,0 | 8,7 11,8 | — — | 28,4 43,1 | 63,6 98,9 | 49,4 58,7 | — — | 22,4 98,6 | 0,8 1,2 | 0,9 0,9 | — — | 5,8 1,6 |
| Естрадиол | 407,6 423,6 | — — | — — | — — | 7,1 14,2 | — — | — — | — — | 26,0 27,0 | — — | — — | — — | 0,8 1,8 |
| Тестостерон | 401,6 423,6 | — — | — — | 18,5 36,5 | 67,8 13,3 | — — | — — | 19,7 55,5 | 23,9 24,8 | — — | — — | 3,7 2,3 | 5,1 0,1 |
| Прогестерон | 315,5 337,5 | 15,1 49,0 | — — | 3,1 21,5 | 22,5 39,1 | 7,0 26,7 | — — | 9,0 38,9 | 44,0 70,4 | 15,1 11,1 | — — | 0,6 0,1 | 0,2 1,9 |
| Витамин Е | 402,7 | 16,8 | 31,3 | 19,4 | 38,3 | 33,6 | 22,8 | 29,9 | 13,5 | 0,2 | 6,6 | 2,3 | 25,1 |
| Витамин А | 269,5 285,4 328,5 | 50,9 62,3 57,1 | — — — | — — — | 85,8 61,1 65,4 | 38,7 42,5 39,3 | — — — | — — — | 34,0 36,7 35,3 | 6,2 7,4 7,3 | — — — | — — — | 20,1 9,3 11,3 |

— Јони пореклом од молекула не могу да се детектују.

Табела 3.10. Вредности варијабилности између дана (*Day-to-day variability*) и унутар једног дана (*Within Day variability*) израчунатих помоћу анализе варијанси (ANOVA) за све парове молекула/матрица који су могли да се детектују као негативни јони.

| Молекул | m/z | ANOVA Day-to-day, % | | | | ANOVA Within Day, % | | | | F F _{crit} 5,143 | | | |
|-------------------|--------|------------------------|------|------|------|------------------------|------|------|------|------------------------------|------|------|------|
| | | DHB | 9-AA | CHCA | THAP | DHB | 9-AA | CHCA | THAP | DHB | 9-AA | CHCA | THAP |
| L-аланин | 88,1 | — | 54,7 | — | — | — | 27,4 | — | — | — | 12,9 | — | — |
| DL-метионин | 148,2 | — | 9,5 | — | — | — | 24,5 | — | — | — | 0,5 | — | — |
| Глутатион | 306,3 | 27,0 | 14,4 | — | 18,4 | 12,7 | 6,1 | — | 16,9 | 14,6 | 17,5 | — | 4,5 |
| Арабиноза | 148,2 | — | 9,6 | — | — | — | 47,9 | — | — | — | 1,1 | — | — |
| Рафиноза | 503,4 | — | 25,5 | — | 49,6 | — | 42,8 | — | 32,0 | — | 2,1 | — | 8,2 |
| β-циклодекстрин | 1134,0 | — | 59,2 | — | 26,5 | — | 18,5 | — | 18,3 | — | 31,7 | — | 7,3 |
| Прогестерон | 313,5 | 34,2 | — | — | — | 19,4 | — | — | — | 10,4 | — | — | — |
| Лимунска киселина | 191,1 | — | — | 15,6 | 27,1 | — | — | 21,4 | 27,8 | — | — | 2,6 | 3,8 |
| Витамин А | 283,4 | 106,4 | — | — | — | 32,2 | — | — | — | 33,7 | — | — | — |

— Јони пореклом од молекула не могу да се детектују.

Израчуната је и прецизност методе за молекуле који су могли да се детектују без присуства матрице. Вредности варијабилности сигнала позитивних и негативних јона витамина А и витамина Е приказане су у Табелама 3.11 и 3.12.

Табела 3.11. Вредности варијабилности између дана (*Day-to-day variability*) и унутар једног дана (*Within Day variability*) за молекуле који могу да се детектују као позитивни јони без присуства матрице израчунате помоћу анализе варијанси (ANOVA).

| Молекул | m/z | ANOVA Day-to-day, % | ANOVA Within Day, % | F F _{crit} 5,143 |
|-----------|-------|------------------------|------------------------|------------------------------|
| | | LDI | LDI | LDI |
| Витамин Е | 402,7 | 18,0 | 16,2 | 1,7 |
| Витамин А | 269,5 | 70,6 | 35,3 | 13,0 |
| | 285,4 | 36,1 | 41,8 | 3,2 |
| | 328,5 | 40,0 | 36,4 | 4,6 |

Табела 3.12. Вредности варијабилности између дана (*Day-to-day variability*) и унутар једног дана (*Within Day variability*) за молекуле који могу да се детектују као негативни јони без присуства матрице израчунате помоћу анализе варијанси (ANOVA).

| Молекул | m/z | ANOVA Day-to-day, % | ANOVA Within Day, % | F F _{crit} 5,143 |
|-----------|-------|------------------------|------------------------|------------------------------|
| | | LDI | LDI | LDI |
| Витамин Е | 401,6 | 22,8 | 18,3 | 5,6 |
| Витамин А | 283,4 | 61,6 | 38,5 | 8,7 |

Израчуната вредност параметра F (која се израчунава помоћу ANOVA теста) може да буде већа од F критичне вредности¹ и у том случају вредности варијације између дана су веће од вредности варијација унутар једног дана. За позитивне јоне ово је случај код нпр: L-аланина ($m/z = 90,1$) и DL-метионина ($m/z = 152,2$), глутатиона ($m/z = 308,2$), витамина Е ($m/z = 402,7$) и витамина А ($m/z = 269,5; 285,4; 328,5$). За молекуле витамина када су снимљени без присуства матрице као позитивни јони, за сваки сигнал, F вредност је виша од вредности F_{crit} .

Парови негативних јона молекула/матрица код којих израчуната F вредност премашује F критичну вредност су: L-аланин ($m/z = 88,1$), глутатион ($m/z = 306,3$) и β -циклодекстрин ($m/z = 1134,0$) са 9-AA-ом, глутатион ($m/z = 306,3$), прогестерон ($m/z = 313,5$) и витамин А ($m/z = 283,4$) са ДНВ-ом, рафиноза ($m/z = 503,4$) и β -циклодекстрин ($m/z = 1134,0$) са ТНАР-ом.

Већина комбинација позитивних јона аминокиселина и глутатиона са матрицама имају високе вредности варијација мерења између дана и унутар једног дана, варијације су више од 20 %. Изузетак за варијације мерења између дана су парови: L-аланин ($m/z = 128,2$)/ДНВ, L-цистеин ($m/z = 122,2$) са ДНВ-ом и са СНСА-ом, DL-метионин ($m/z = 150,2$)/СНСА и глутатион ($m/z = 330,3$)/ДНВ где су варијације мање од 15 %, за последњи пар су варијације 2,0 %. За варијације унутар једног дана изузеци су парови: L-цистеин ($m/z = 122,2$)/ДНВ, DL-метионин ($m/z = 150,2$)/ТНАР и глутатион у већини комбинација. И у овим примерима варијације су ниже од 15 %.

Шећери када се детектују као позитивни јони такође дају високе вредности варијација мерења унутар једног дана и између дана за већи број комбинација са матрицама. Изузеци где су варијације између дана ниже од 15 % су парови: малтоза ($m/z = 365,3$)/ТНАР и β -циклодекстрин ($m/z = 1158,0; 1174,1$)/9-AA. Изузетак за варијације унутар једног дана је једино пар глукоза ($m/z = 203,2$)/ТНАР где је вредност варијације 8,8 %.

Позитивни јони естрадиола са свим матрицама имају варијације између дана ниже од 15 %, док су варијације унутар дана при истим условима више од 15 %. За тестостерон варијације између дана и унутар дана у свим случајевима су више од 15 %, једини изузетак је пар тестостерон ($m/z = 423,6$)/ТНАР где је вредност варијације између дана 13,3 %. Витамини Е и А са сви матрицама као и без матрице имају високе вредности

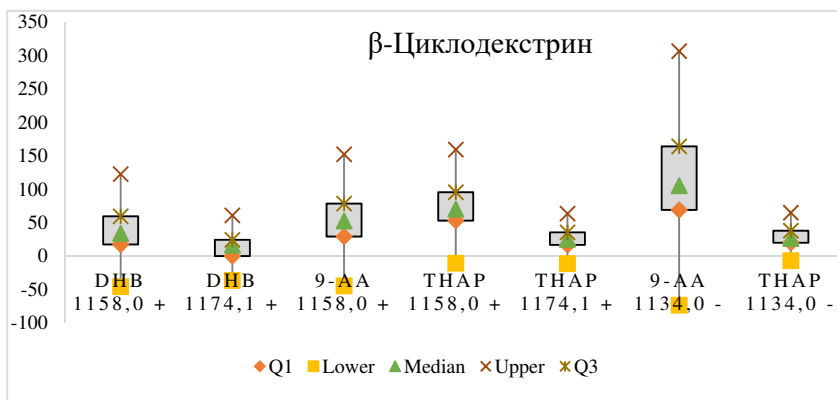
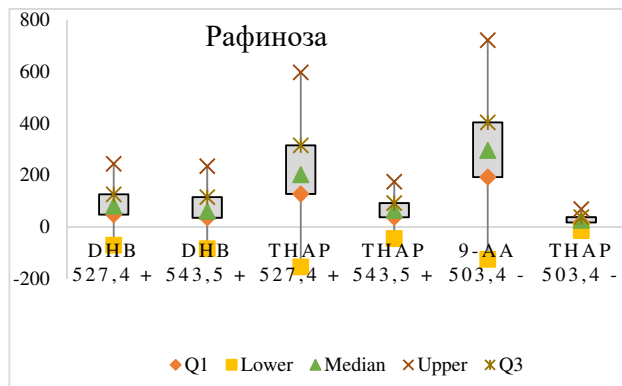
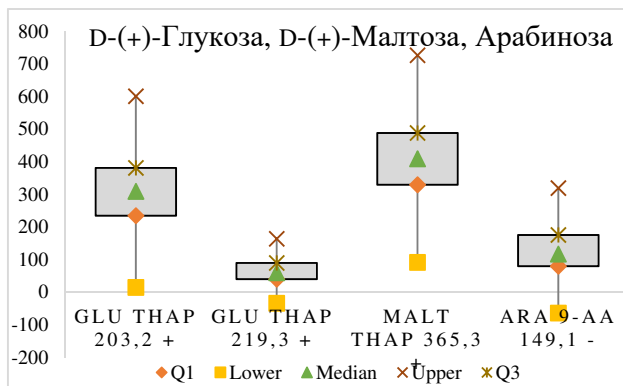
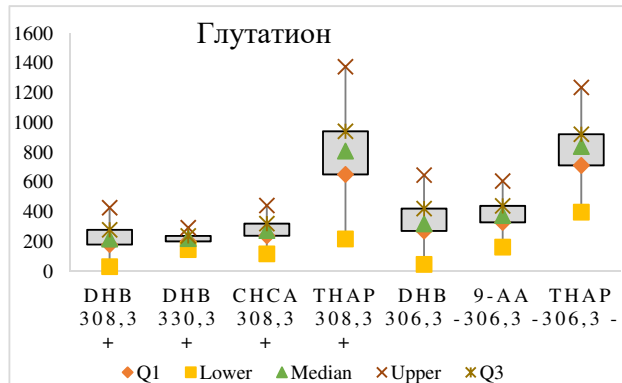
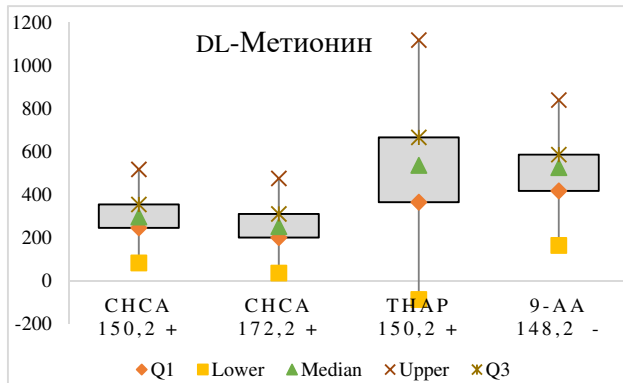
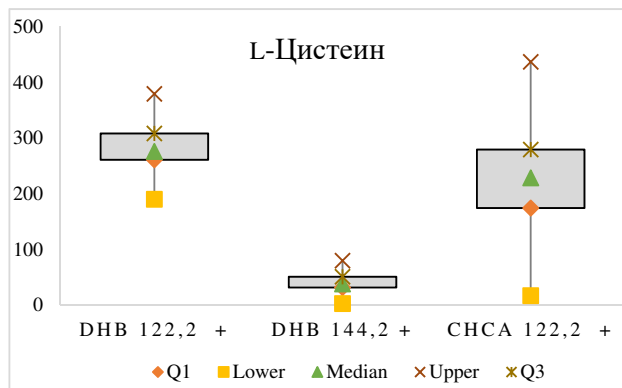
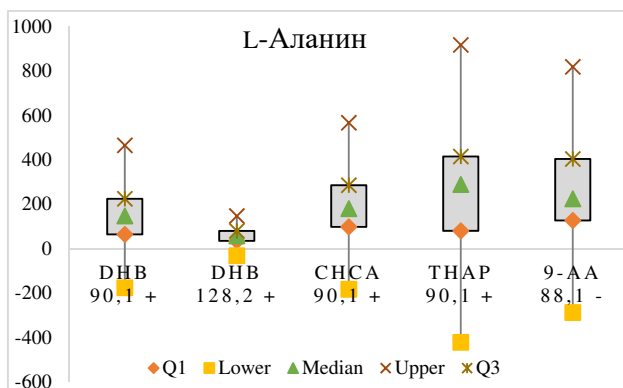
¹ F критична вредност се одређује на основу броја података из стандардних статистичких таблица које показују горње критичне вредности F расподеле за једнострану F тест са степеном прецизности 95 %, $\alpha = 0,05$, $F_{crit} = 5,143$.

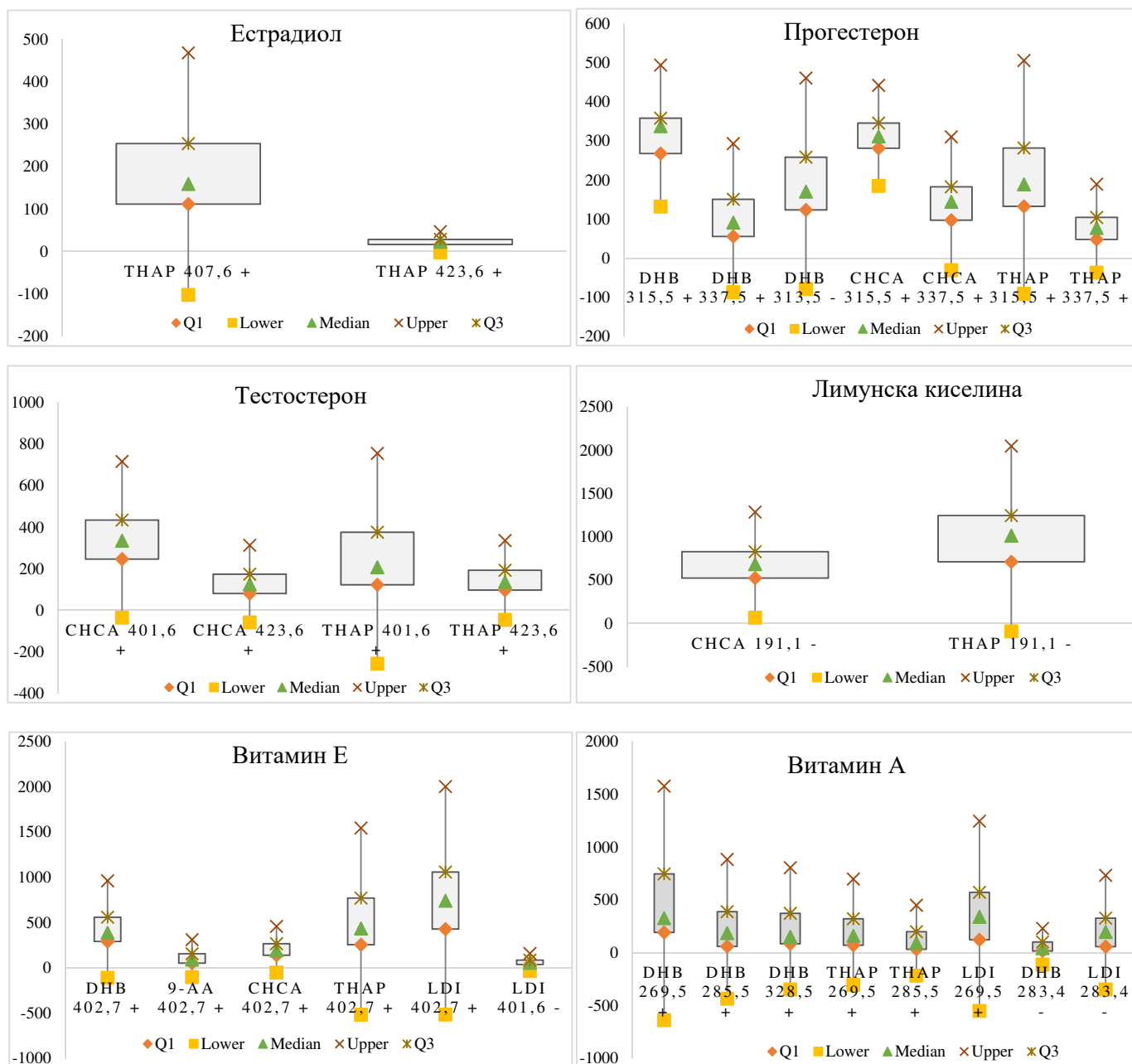
варијација и између дана и унутар једног дана, једини изузетак је витамин Е ($m/z = 402,7$) са ТНАР-ом где је варијација унутар једног дана 13,5 %.

Парови негативних јона молекул/матрица код којих су варијације између дана мање од 15 % су: DL-метионин ($m/z = 148,2$)/9-АА, глутатион ($m/z = 306,3$)/9-АА и арабиноза ($m/z = 148,2$)/9-АА, где су вредности варијација 9,5 %, 14,4 % и 9,6 %, редом. Варијације унутар дана су мање од 15 % једино у случају глутатиона ($m/z = 306,3$) са матрицама ДНВ-ом и 9-АА-ом, и тада су варијације 12,7 % и 6,1 %.

3.1.5. *Box and Whiskers* дијаграми - дескриптивна статистика MALDI анализе

На *Box and Whiskers* дијаграмима су приказани најзначајнији детаљи дескриптивне статистике која омогућава да се на основу једног графика одреди матрица за један молекул која задовољава одређене, жељене критеријуме. Од циља анализе зависи који параметри су важни: да ли је битна само детекција појединих молекула, да ли је важна осетљивост методе или је циљ анализе прецизност. На дијаграмима је приказана кутија (*Box*) код које су врх и дно дефинисани горњом и доњом квартилном вредношћу. Ширина кутије нама никаквог значаја. Горња квартилна вредност (Q_3) дели горњу половину расподеле вредности у два једнака дела, а доња квартилна вредност (Q_1) дели доњу половину расподеле вредности у два једнака дела. Крајње горње и доње вредности се сматрају грубим грешкама (спољашњим резултатима). На Слици 3.3 су приказани *Box and Whiskers* дијаграми за молекуле који су детектују са најмање две матрице.





Слика 3.3. Box and Whiskers дијаграми за све комбинације молекула и матрица, са изузетком витамина А и Е који су приказани и без матрице. Приказани су сви детектовани сигнали позитивних и негативних јона, обележени су са „+“ и са „-“, редом. Кутија (Box) садржи податке добијене на основу S/N вредности (сумарно 72 податка по једној комбинацији молекула са једном матрицом).

На основу анализе добијених дијаграма може се видети да, када се за детекцију позитивног јона аланина ($m/z = 90,1$) користе матрице DHB или CHCA добијају се сличне, задовољавајуће вредности односа интензитета сигнала и шума (S/N), али када се користи THAP као матрица добијају се више вредности S/N, али и знатно више

вредности девијације мерења. Слично као ТНАР, када се користи 9-АА за детекцију негативног јона аланина ($m/z = 88,1$) добијају се високе вредности интензитета, али и висока девијација. За детекцију позитивног јона цистеина ($m/z = 122,2$) на основу дијаграма запажа се да је најбоља матрица ДНВ јер се добијају високе вредности S/N и релативно ниске вредности девијације. За детекцију метионина (позитивни јони $m/z = 150,2$ и $m/z = 172,2$) и глутатиона (позитиван јон $m/z = 308,3$ и негативан јон $m/z = 306,3$) као најбоља матрица показао се ТНАР, јер се без обзира на више девијације добијају и знатно више вредности S/N.

За детекцију позитивних јона испитиваних угљених хидрата глукозе ($m/z = 203,2$), малтозе ($m/z = 365,3$), рафинозе ($m/z = 527,4$) и β -цилодекстрина ($m/z = 1158,0$) најбоља матрица је ТНАР јер се добијају знатно више вредности односа S/N у поређењу са другим коришћеним матрицама. За детекцију негативног јона рафинозе ($m/z = 503,4$) и β -циклодекстрина ($m/z = 1134,0$) најбоља матрица је 9-АА.

За детекцију позитивног јона прогестерона ($m/z = 315,5$) добијају се сличне вредности S/N и девијације са обе матрице СНСА и ДНВ, али се са ДНВ-ом добијају мало више вредности S/N и девијације. За детекцију позитивних јона тестостерона ($m/z = 401,6$ и $m/z = 423,6$) матрица СНСА се показала као незнатно боља од матрице ТНАР, јер има незнатно ниже вредности девијације.

Када се негативан јон лимунске киселине ($m/z = 191,1$) детектује са матрицом ТНАР добијају се више вредности S/N, али и доста веће девијације него са матрицом СНСА.

Најбоља детекција позитивног јона витамина Е ($m/z = 402,7$) добија се са матрицом ДНВ, добијају се високе вредности S/N, али и веома високе вредности девијације. За детекцију витамина Е свака матрица се показала као бољи избор у односу на LDI метод.

Све матрице које су коришћене за детекцију витамина А показале су се у већој или мањој мери сличне, са прилично сличним вредностима S/N и сличним и високим вредностима девијација. Највише вредности S/N су добијене са ДНВ-ом, али и вредности девијација су биле веома високе.

3.2. Неорганске матрице - супстрати за масеноспектрометријску анализу молекула малих маса

3.2.1. Квалитативне карактеристике супстрата

Да би се превазишле мане традиционалних органских матрица прибегло се неорганским супстратима нарочито за анализу молекула малих маса. Као посебно добар избор показали су се неоргански супстрати на бази метала и оксида метала. Од супстрата на бази оксида метала највише је коришћен титан(IV)-оксид (TiO_2). TiO_2 је полупроводник са знатном ширином енергетског процепа (3,2 eV), због чега поседује фотоактивност само при осветљавању ултраљубичатим зрацима, а има висок апсорпциони коефицијент у UV области.¹⁰² Такође, има и висок топлотни капацитет и топлотну проводљивост што води до брзог пораста температуре на површини током процеса десорпције/јонизације ласером.¹⁷⁰ Други процес који води до јонизације узорка је трансфер наелектрисања (електрони и шупљине који се формирају ексцитацијом под дејством ласера) до узорка.¹⁷⁰ Комбинација ова два ефекта која се одвија на површини наночестица доприноси процесу јонизације и десорпције молекула узорка са минималним процентом њиховог распадања.⁷⁵

3.2.1.a. Претпостављени механизам десорпције/јонизације у присуству TiO_2

Тачан начин како нанокристали TiO_2 омогућавају масеноспектрометријску детекцију молекула као и процес који се одвија на површини супстрата под зрачењем ласером још увек нису у потпуности расветљени. Неки аутори претпостављају да термални ефекти имају важну улогу.^{75,171} Брз пораст температуре индукован ласером током јонизације потпомогнуте ласерском десорпцијом са супстрата се приписује термалној десорпцији испитиваног молекула без термалне декомпозиције у SALDI масеној спектрометрији.^{3,86-89} У таквим случајевима, температурни максимум је функција оптичког апсорпционог коефицијента, топлотног капацитета и топлотне проводљивости супстрата. Висок оптички апсорпциони коефицијент супстрата појачава брз пораст температуре током јонизације потпомогнуте ласерском десорпцијом, а овај ефекат помаже ефикасном преносу енергије са површине супстрата до испитиваног молекула. Такође постоје они који наглашавају трансфер електрона/наелектрисања и/или фотокаталитичке процесе на површини нанокристала TiO_2 .^{170,172} Међутим,

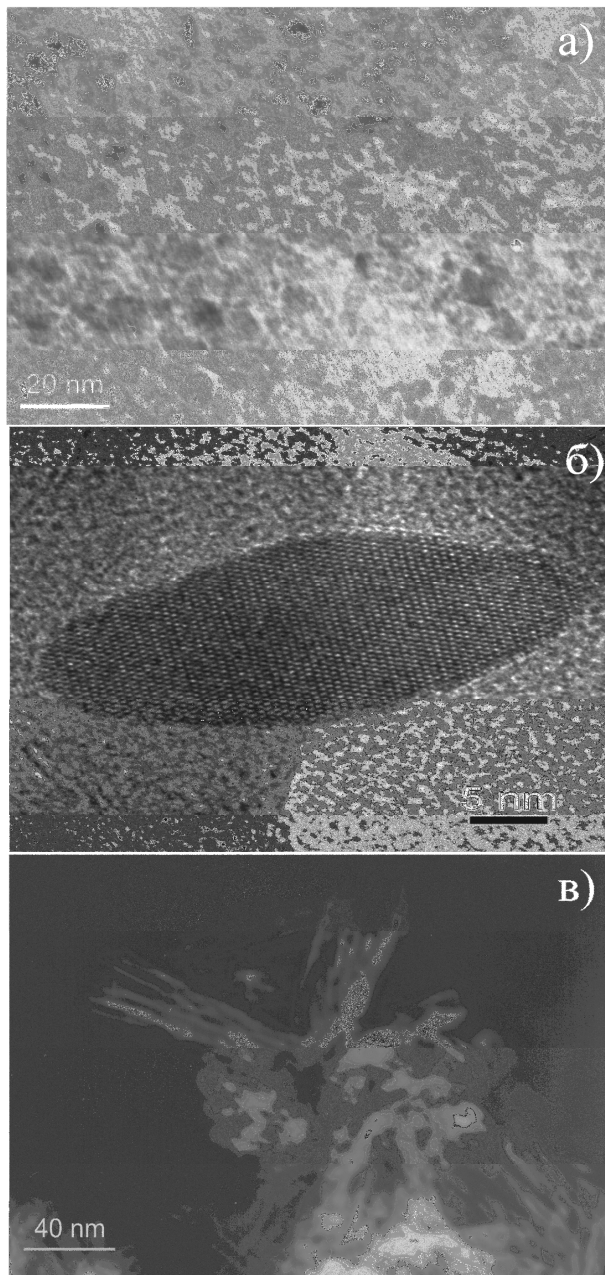
поједини аутори истичу да фотохемијски процеси које индукује светлости из UV области нису од значаја у UV-S(M)ALDI анализи.^{173,174}

Због сложености процеса који се дешавају на површини честица и у гасној фази након процеса десорпције и јонизације, није могуће извести коначан закључак о томе који је тачан механизам. Могуће је да је механизам различит за различите врсте молекула који се анализирају у присуству истог супстрата. Претпоставља се да, у ствари, комбинација различитих феномена (електрични, термални, фотохемијски) на површини супстрата доприноси ефикасној јонизацији и десорпцији.

3.2.1.1. Трансмисиона електронска микроскопија наночестица TiO₂ различитих облика

У процесу интеракције наночестица са светлошћу било које таласне дужине, површина честица, посредно и њихов облик и величина имају важну улогу. Према томе први задатак је одређивање величине и облика нанокристала који су коришћени у даљем раду, нанокристала за које се претпоставља да могу помоћи у превазилажењу недостатака MALDI масеноспектрометријске анализе који су приказани у претходном поглављу. Величина и облик наночестица су окарактерисани трансмисионом електронском микроскопијом (ТЕМ), што је приказано на Слици 3.4.

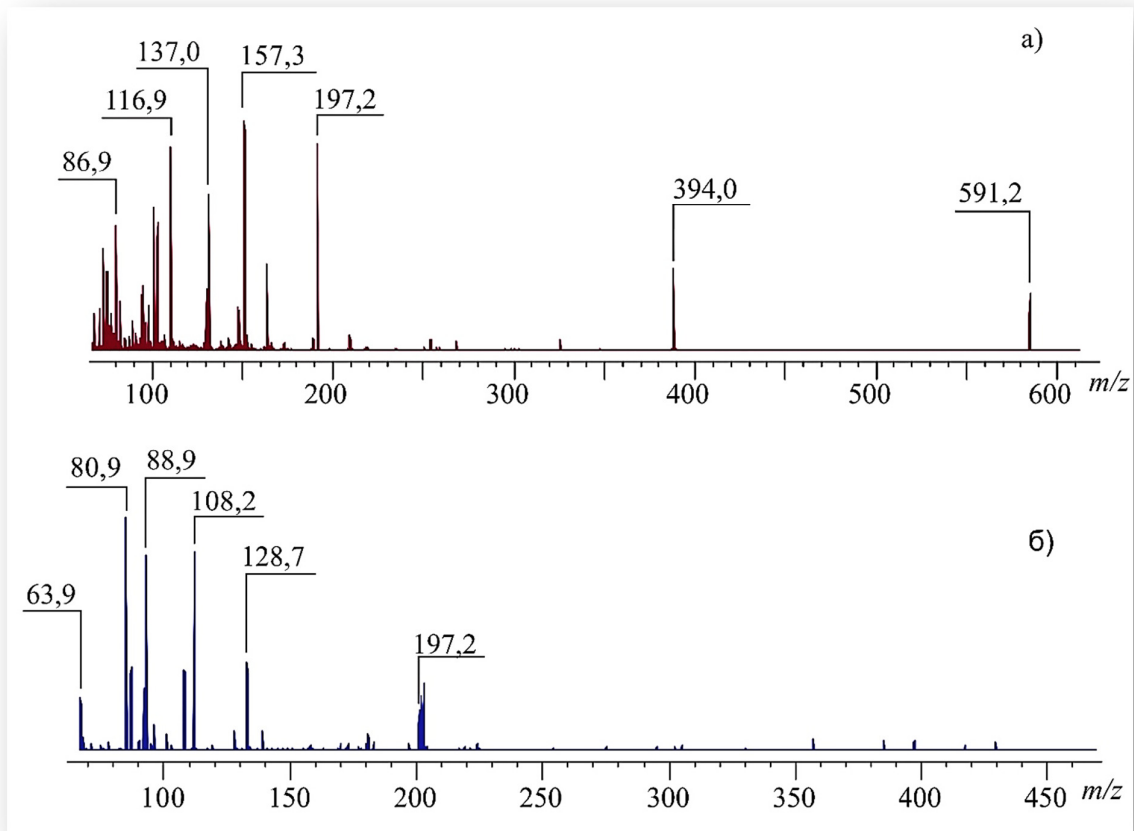
Просечна величина наночестица (TiO₂ НЧ) је била 5 nm (Слика 3.4.а). Просечна дужина елипсоидних наночестица TiO₂ је била у опсегу од 40 до 50 nm, док је латерална димензија била у опсегу од 14 до 16 nm (Слика 3.4.б). Дужина нанотуба TiO₂ је била у опсегу од 100 до 150 nm, а просечна величина пречника је 11 nm. Структура наночестица је потврђена и анатас кристална структура оваквих наночестица TiO₂ је позната из литературе за наночестице¹⁶⁴, елипсоидне наночестице¹⁶⁸ и нанотубе¹⁶⁷.



Слика 3.4. Репрезентативне трансмисионе електронске микрографије нанокристала TiO₂ а) сфероидних наночестица TiO₂ б) елипсоидних наночестица TiO₂ и в) нанотуба TiO₂.

3.2.1.2. LDI TOF масена спектрометрија потпомогнута наночестицама TiO_2 различитих облика

За SALDI TOF масену спектрометрију код које се користе нанокристали TiO_2 као супстрати било је потребно одредити m/z вредности и идентитет свих сигнала који су пореклом од супстрата. Масени спектри TiO_2 НЧ-а и TiO_2 ЕНЧ-а у којима су детектовани позитивни јони су приказани на Слици 3.5. У Табели 3.13 дат је преглед m/z вредности и идентитета сигнала нанокристала TiO_2 . Сви сигнали који су детектовани у масеним спектрима супстрата TiO_2 су дефинисани и налазе се у области m/z нижој од 200. Два изузетка су сигнали на m/z 394,0 и m/z 591,2 у масеном спектру TiO_2 НЧ-а на Слици 3.5.а, који су пореклом од кластера $[\text{Ti}_3\text{O}_6 + 3\text{Cl} + 2\text{Na} + 2\text{H}]^+$ и $[\text{Ti}_6\text{O}_{12} + 2\text{Cl} + \text{K} + 2\text{H}]^+$, редом.



Слика 3.5. Масени спектри (а) наночестица TiO_2 и (б) елипсоидних наночестица TiO_2 у којима су детектовани позитивни јони.

Табела 3.13. Преглед детектованих сигнала позитивних јона у масеним спектрима добијених методом ласерске десорпције и јонизације (LDI) нанокристала TiO_2 : наночестица TiO_2 и елипсоидних наночестица TiO_2 . Неидентификовани сигнал - *n.a.*

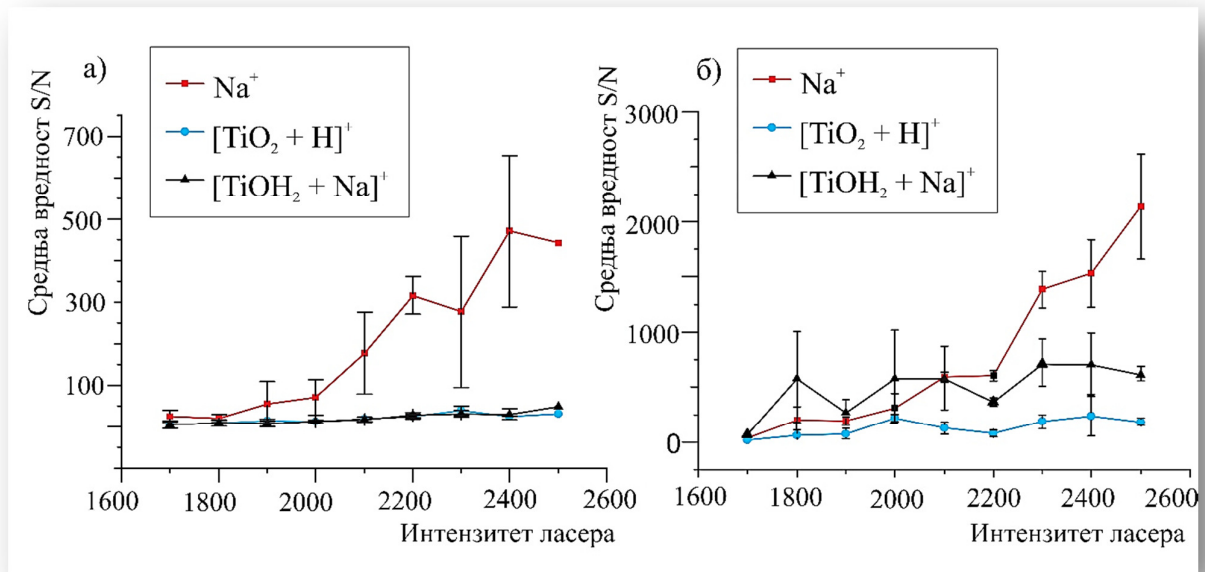
| Позиција сигнала (m/z) | Идентитет сигнала | Позиција сигнала (m/z) | Идентитет сигнала |
|----------------------------|---|----------------------------|---|
| 63,9 | $[\text{TiO}]^+$ | 139,3 | $[\text{TiO}_2 + \text{Cl} + \text{Na} + \text{H}]^+$ |
| 80,9 | $[\text{TiO}_2 + \text{H}]^+$ | 157,3 | $[\text{TiO}_2 + \text{Cl} + \text{Na} + \text{H} + \text{H}_2\text{O}]^+$ |
| 86,9 | $[\text{TiO} + \text{Na}]^+$ | 186,9 | $[\text{Ti}_2\text{O}_2\text{H}_2 + \text{K} + \text{H}_2\text{O}]^+$ |
| 88,9 | $[\text{TiOH}_2 + \text{Na}]^+$ | 191,9 | $[\text{TiO}_2 + \text{K} + 2\text{Cl} + 2\text{H}]^+$ |
| 97,9 | $[\text{TiO}_2 + \text{H}_2\text{O}]^+$ | 197,2 | $[\text{Ti}_2\text{O}_4 + \text{Cl} + 2\text{H}]^+$ |
| 98,9 | $[\text{TiO}_2 + \text{H} + \text{H}_2\text{O}]^+$ | 262,7 | $[\text{Ti}_3\text{O}_5 + \text{K}]^+$ |
| 108,2 | <i>n.a.</i> | 353,5 | $[\text{Ti}_3\text{O}_6 + 2\text{Cl} + \text{Na} + 2\text{H} + \text{H}_2\text{O}]^+$ |
| 113,7 | $[2\text{K} + \text{Cl}]^+$ | 369,3 | <i>n.a.</i> |
| 116,9 | $[\text{TiO}_2 + \text{H} + 2\text{H}_2\text{O}]^+$ | 381,4 | <i>n.a.</i> |
| 128,7 | $[\text{Ti}_2\text{O}_2 + \text{H}]^+$ | 394,0 | $[\text{Ti}_3\text{O}_6 + 3\text{Cl} + 2\text{Na} + 2\text{H}]^+$ |
| 137,0 | $[\text{TiO}_2 + \text{K} + \text{H}_2\text{O}]^+$ | 591,2 | $[\text{Ti}_6\text{O}_{12} + 2\text{Cl} + \text{K} + 2\text{H}]^+$ |

Детектовани сигнали приказани у Табели 3.15 позитивних јона нанокристала TiO_2 : наночестица TiO_2 и елипсоидних наночестица TiO_2 , потичу и од јона који су били присутни у растворима који су коришћени током синтеза нанокристала. С обзиром на високу осетљивост уређаја, није изненађујуће да се и најмање концентрације супстанци малих маса детектују.

3.2.1.3. Утицај интензитета ласера на масене спектре нанокристала TiO_2 различитих облика

Повишена снага ласера се често употребљава у M(S)ALDI TOF масеној спектрометрији да би се омогућило добијање спектра високог квалитета и задовољавајућих интензитета сигнала. За неке молекуле потребна је висока снага ласера да би уопште дошло до десорпције и јонизације. Под утицајем високе снаге ласера често долази до фрагментације молекула који се анализирају, што онемогућава анализу и добијање жељених резултата чак и у кратком временском периоду, до 100 ps након процеса десорпције. Међутим, треба истаћи да степен фрагментације у већој мери зависи од одабране матрице и хемијске структуре самог молекула, а у мањој мери од снаге ласера.¹⁷⁵ Из тог разлога било је потребно испитати какве ефекте има повећање снаге ласера на интензитета сигнала у масеним спектрима који долазе од наночестица TiO_2 и елипсоидних наночестица TiO_2 , као и стабилност супстрата. График зависности средње

вредности односа сигнала и шума (S/N) од интензитета ласера за оба супстрата приказан је на Слици 3.6. Сигнали који су изабрани за анализу су: натријумов сигнал $m/z = 23,0$, сигнал $[\text{TiO}_2 + \text{H}]^+ m/z = 80,9$ и сигнал $[\text{TiOH}_2 + \text{Na}]^+ m/z = 88,9$.



Слика 3.6. Средња вредност односа сигнала и шума (S/N) за детектоване сигнале позитивних јона наночестица TiO_2 (а) и елипсоидних наночестица TiO_2 (б) у функцији од примењених интензитета ласера (од 1700 до 2500 у.ј.).

Интензитет сигнала који долази од натријумовог јона се повећава са повећањем снаге ласера, али у мерном опсегу који је разматран, није уочено да је постигнут максимум. Интензитети сигнала пореклом од $[\text{TiO}_2 + \text{H}]^+$ и $[\text{TiOH}_2 + \text{Na}]^+$ се не мењају са повећањем снаге ласера, са једним изузетком. Када је примењена јачина ласера изнад 2000 у.ј. интензитет сигнала пореклом од $[\text{TiOH}_2 + \text{Na}]^+$ се повећава, али само у случају када су примењене TiO_2 ЕНЧ (Слика 3.6.б). Овакав профил натријумовог адукта титан(IV)-оксида је последица вишег садржаја натријума у суспензији TiO_2 ЕНЧ-а који је заостао након синтезе истих, што може да утиче на појачану јонизацију, како врста које потичу од самог супстрата, тако и врста које потичу од анализираног узорка, што може имати позитивне ефекте у смислу могућности детекције.

На основу ових експеримената показано је да су TiO_2 НЧ и TiO_2 ЕНЧ добар избор као супстрати за SALDI TOF масену спектрометрију и за анализу молекула којима је потребна виша снага ласера за процесе јонизације и/или десорпције. MALDI TOF масена спектрометрија уз употребу органских матрица није метода од избора за овакве

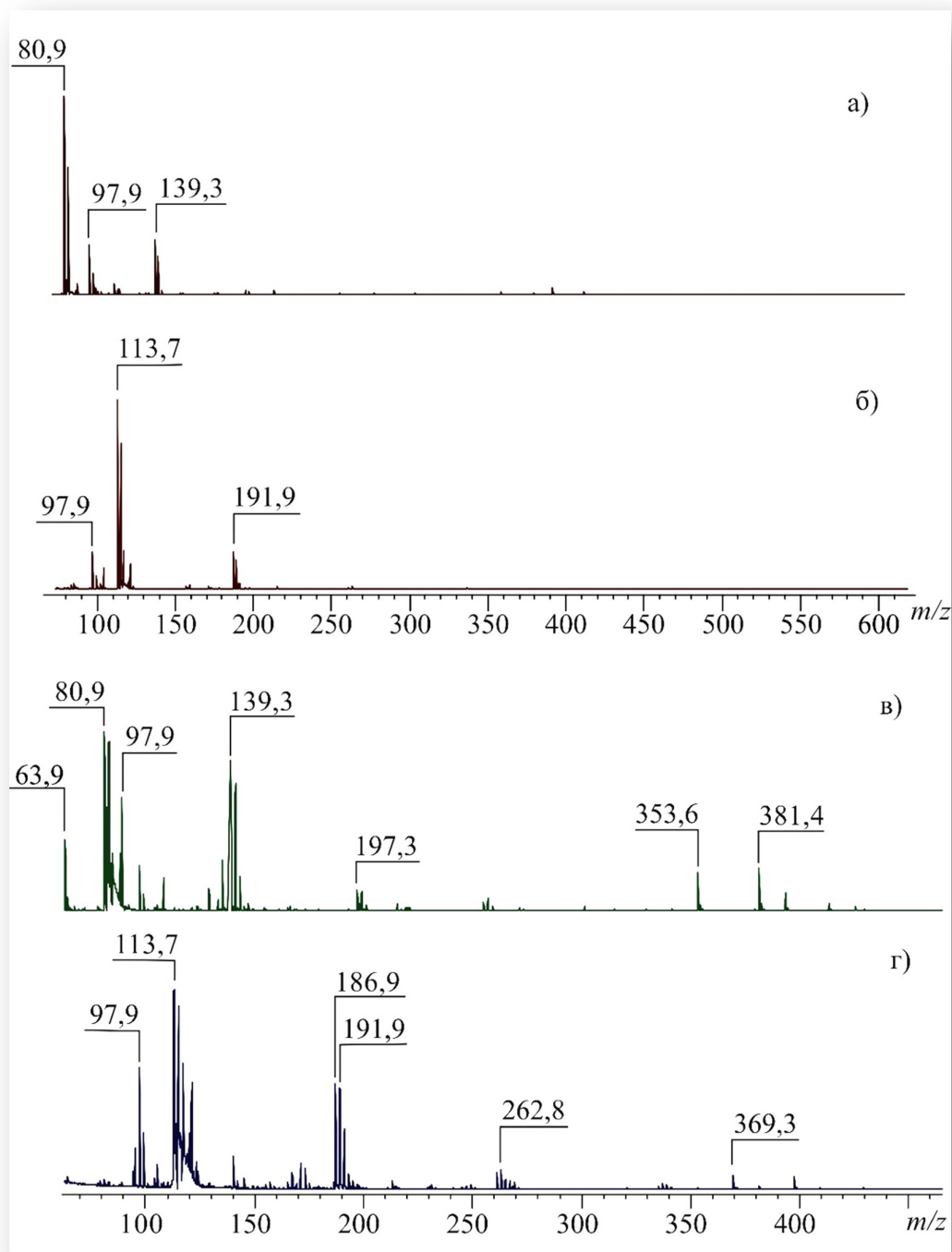
молекуле, али и молекуле малих маса, јер органске матрице генеришу јаче сигнале када се повећа снага ласера и додатно покривају сигнале молекула и онемогућавају интерпретацију сигнала пореклом од узорка.

3.2.1.4. Утицај неорганских јона на масене спектре наночестица TiO_2 и елипсоидних наночестица TiO_2

У досадашњим истраживањима показано је да наночестице као супстрати за SALDI TOF масену спектрометрију толеришу високе концентрације соли,¹⁷⁶ односно да јони које генеришу супстрати у присуству неорганских јона не сузбијају јоне који потичу од анализираног узорка. Поред малог броја сигнала у области малих маса, ова особина супстрата је једна од главних предности у односу на традиционалне органске матрице.⁷⁵ Високе концентрације соли су присутне у свим физиолошким узорцима, па превазилажењем проблема нетолеранције органских матрица на повишене концентрације соли значајно се проширују могућности анализе различитих узорака помоћу масене спектрометрије употребом супстрата.

Следећи сет експеримената је била провера да ли су супстрати TiO_2 НЧ и TiO_2 ЕНЧ отпорни на повишене концентрације соли. Нанокристали су изложени повишеним концентрацијама NaCl -а и KCl -а јер су ове две соли свеprisутне у биолошким флуидима, као и у биолошким пуферима и радним растворима. Соли су растворене у води и финална концентрација раствора је била у опсегу од 0,008 до 0,13 mol/dm³.

Масени спектри наночестица TiO_2 помешаних са растворима NaCl -а и KCl -а (0,0325 mol/dm³) у којима су детектовани позитивни јони, су приказани на Слици 3.7.а и 3.7.б, редом, а масени спектри елипсоидних наночестица TiO_2 снимљених у истим условима су приказани на Слици 3.7.в и 3.7.г, редом. Идентитети свих сигнала приказани су у Табели 3.13.



Слика 3.7. LDI TOF масени спектри детектованих позитивних јона: а) наночестица TiO_2 помешаних са NaCl -ом, б) TiO_2 НЧ-а са KCl -ом, в) елипсоидних наночестица TiO_2 са NaCl -ом, г) TiO_2 ЕНЧ-а помешаних са KCl -ом.

Најинтензивнији сигнал у масеном спектру TiO_2 НЧ-а са NaCl -ом је сигнал на $m/z = 80,9$, који одговара протонованом адукту TiO_2 (Слика 3.7.а, Табела 3.13). Најинтензивнији сигнал у масеном спектру TiO_2 НЧ-а са KCl -ом је сигнал на $m/z = 139,3$,

који одговара $[2K + Cl]^+$ (Слика 3.7.б), Табела 3.13). Ако се ови спектри упореде са спектром приказаним на Слици 3.5.а може се запазити да већина сигнала присутна у овом спектру нестаје са додатком соли. Сигнали који су пореклом од нанокристала TiO_2 нестају кад су соли присутне, али постоји и могућност да висока концентрација соли снижава осетљивост детектора. Поређењем масених спектра TiO_2 НЧ-а помешаних са солима, и спектра чистих TiO_2 НЧ-а јасно је да се ни један од три најинтензивнија сигнала у спектрима сниманих без додатка соли TiO_2 НЧ-ама ($m/z = 116,9$, $m/z = 157,3$ и $m/z = 197,2$, Табела 3.13) не детектује у присуству соли. Такође, сигнали који су пореклом од кластера TiO_2 се не детектују у присуству соли (сигнали на $m/z = 197,2$, $m/z = 394,0$ и $m/z = 591,2$, Табела 3.13).

За разлику од спектра са Сlike 3.7.а и 3.7.б, спектри на Слици 3.7.в и 3.7.г имају много већи број сигнала. Масени спектри TiO_2 ЕНЧ-а имају више сигнала од масених спектра TiO_2 НЧ-а. Најинтензивнији сигнали на масеном спектру TiO_2 ЕНЧ-а са NaCl-ом су: $[TiO_2 + H]^+$ на $m/z = 80,9$, $[TiO_2 + H_2O]^+$ на $m/z = 97,9$ и $[TiO_2 + Cl + Na + H]^+$ на $m/z = 139,3$ (Слика 3.7.в, Табела 3.13). Најинтензивнији сигнали на спектру TiO_2 ЕНЧ-а са KCl-ом су: $[TiO_2 + H_2O]^+$ на $m/z = 97,9$, $[2K + Cl]^+$ на $m/z = 113,7$, $[Ti_2O_2H_2 + K + H_2O]^+$ на $m/z = 186,9$ и $[TiO_2 + K + 2Cl + 2H]^+$ на $m/z = 191,9$ (Слика 3.7.г, Табела 3.13).

Када се упореде спектри приказани на Слици 3.7.в и 3.7.г са спектром TiO_2 ЕНЧ-а сниманих без додатка соли (Слика 3.5.б) може се приметити неколико разлика. Прво, интензиван сигнал на $m/z = 139,3$ се не уочава на спектру чистих TiO_2 ЕНЧ-а. Друго, интензитети сигнала на $m/z = 353,6$ и на $m/z = 381,4$, који се готово не детектују на спектрима чистих TiO_2 ЕНЧ-а, повећавају се при додатку NaCl-а (Слика 3.7.в и Табела 3.13). На спектру TiO_2 ЕНЧ-а помешаних са KCl-ом (Слика 3.7.г) такође се појављују нови сигнали: сигнал од $[Ti_2O_2H_2 + K + H_2O]^+$ на $m/z = 186,9$, сигнал од $[TiO_2 + K + 2Cl + 2H]^+$ на $m/z = 191,9$, сигнал од $[Ti_3O_5 + K]^+$ на $m/z = 262,8$ и неидентификован сигнал на $m/z = 396,3$ (Табела 3.13).

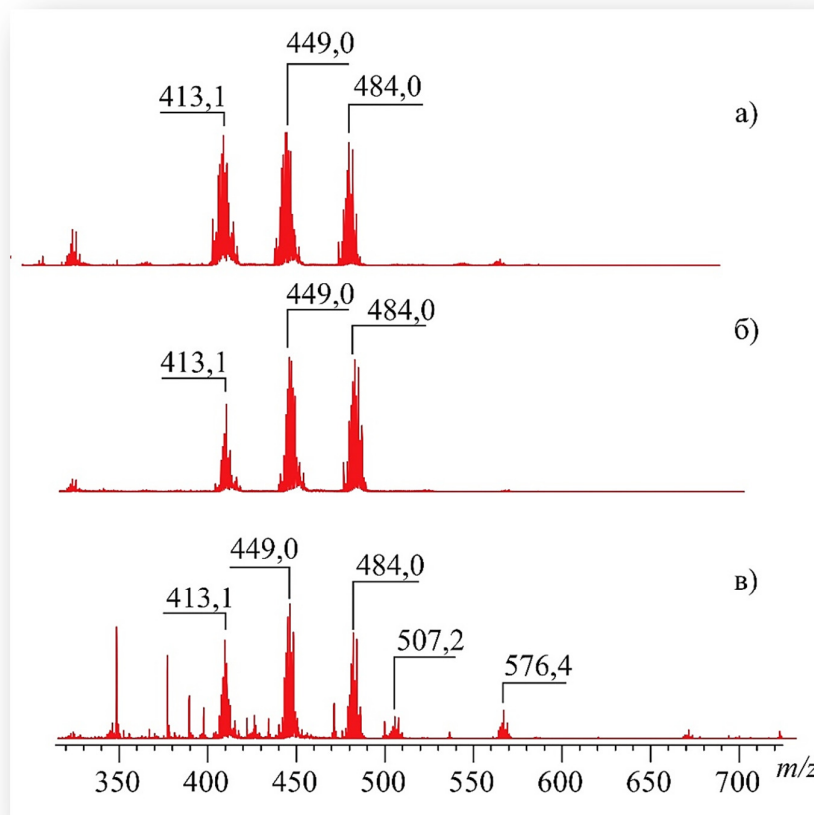
Извршена су и додатна испитивања утицаја неорганских соли на масене спектре TiO_2 НЧ-а и TiO_2 ЕНЧ-а. Различите концентрације раствора соли NaCl-а и KCl-а додате су у суспензије супстрата. Циљ експеримента је био да се одреди како различите концентрације утичу на интензитете сигнала. Изабрани су различити сигнали и израчунати су односи сигнала и шума (S/N) за сваку примењену концентрацију обе соли. Конструисани су графици зависности S/N од концентрације обе соли која је била у опсегу од 0,008 до 0,13 mol/dm³ за обе соли. Међутим, како интензитети сигнала нису корелирали на било који начин са концентрацијама соли (резултати нису приказани),

могло се закључити да концентрације неорганских соли присутних у анализираној смеши немају великог утицаја на интензитет сигнала, уколико се користе неоргански супстрати.

3.2.1.5. SALDI TOF масена спектрометрија комплекса $[\text{RuCl}_2(\text{bipy})_2]\text{Cl}$ у присуству наночестица TiO_2 и елипсоидних наночестица TiO_2

У претходном делу овог доктората показано је да се TiO_2 НЧ могу користити као супстрати за детекцију комплекса прелазних метала.¹²⁴ Циљ даљег истраживања је био тестирање TiO_2 ЕНЧ-а као супстрата за SALDI TOF масену спектрометрију бипиридинског комплекса рутенијума, као представника комплекса прелазних метала, потенцијалних анти-туморских агенаса.

Снимљени су масени спектри $[\text{RuCl}_2(\text{bipy})_2]\text{Cl}$ без присуства супстрата (LDI) и са супстратима, са TiO_2 НЧ и са TiO_2 ЕНЧ, који су приказани на Слици 3.8.



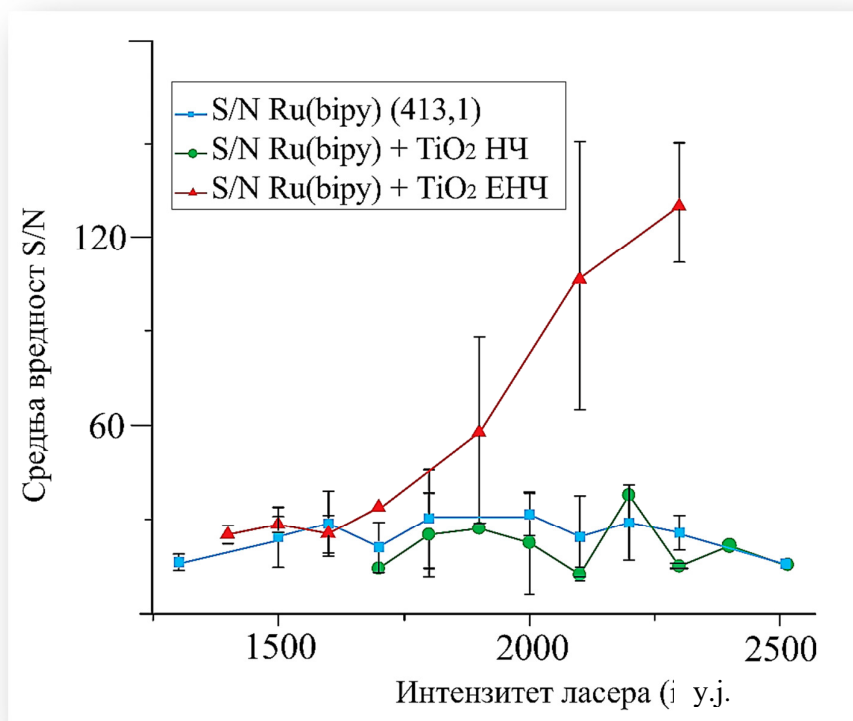
Слика 3.8. (SA)LDI TOF масени спектри детектованих позитивних јона: а) $[\text{RuCl}_2(\text{bipy})_2]\text{Cl}$ без супстрата, б) $[\text{RuCl}_2(\text{bipy})_2]\text{Cl}$ са TiO_2 НЧ-ама као супстратом и в) $[\text{RuCl}_2(\text{bipy})_2]\text{Cl}$ са TiO_2 ЕНЧ-ама као супстратом.

У масеном спектру $[\text{RuCl}_2(\text{bipy})_2]\text{Cl}$ снимљеном без супстрата, приказаном на Слици 3.8.а, могу се уочити три доминантна сигнала: сигнал од $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{bipy})_2 - \text{H}]^+$ на $m/z = 413,1$, сигнал од $[\text{Ru}^{\text{III}}\text{Cl}(\text{bipy})_2 - \text{H}]^+$ на $m/z = 449,0$ и сигнал од $[\text{Ru}^{\text{III}}\text{Cl}_2(\text{bipy})_2]^+$ на $m/z = 484,0$. Масени спектри $[\text{RuCl}_2(\text{bipy})_2]\text{Cl}$ комплекса који је успешно снимљен помоћу супстрата TiO_2 НЧ и TiO_2 ЕНЧ приказани су на Слици 3.8.б и Слици 3.8.в, редом. Може се запазити да у спектру $[\text{RuCl}_2(\text{bipy})_2]\text{Cl}$ који је снимљен у присуству TiO_2 НЧ-а доминирају иста три, добро дефинисана сигнала, као и на спектру чистог комплекса. Међутим, на спектру $[\text{RuCl}_2(\text{bipy})_2]\text{Cl}$ који је снимљен у присуству TiO_2 ЕНЧ-а, осим горе поменута три сигнала, запажају се и додатни сигнали. Сигнал на $m/z = 507,2$ који је пореклом од натријумовог адукта $[\text{Ru}^{\text{III}}(\text{bipy})_2\text{Cl}_2]^+$ и сигнал на $m/z = 576,6$ који није идентификован.

На основу ових запажања може се закључити да је осетљивост SALDI TOF методе за анализу $[\text{RuCl}_2(\text{bipy})_2]\text{Cl}$ већа када се користе TiO_2 ЕНЧ. Међутим, када се користе TiO_2 НЧ на спектрима се запажа мање позадинског шума.

3.2.1.6. Утицај интензитета ласера на масене спектре комплекса $[\text{RuCl}_2(\text{bipy})_2]\text{Cl}$

Испитиван је утицај интензитета ласера на интензитет сигнала масених спектра комплекса $[\text{RuCl}_2(\text{bipy})_2]\text{Cl}$ снимљених без матрице и масених спектра $[\text{RuCl}_2(\text{bipy})_2]\text{Cl}$ снимљених у присуству супстрата TiO_2 НЧ и TiO_2 ЕНЧ. Средња вредност односа сигнала и шума (S/N) за сигнал пореклом од $[\text{Ru}(\text{bipy})_2 - \text{H}]^+$, на $m/z = 413,1$, израчуната је за све примењене интензитета ласера. Зависност средње вредности S/N од интензитета ласера приказана је на Слици 3.9.

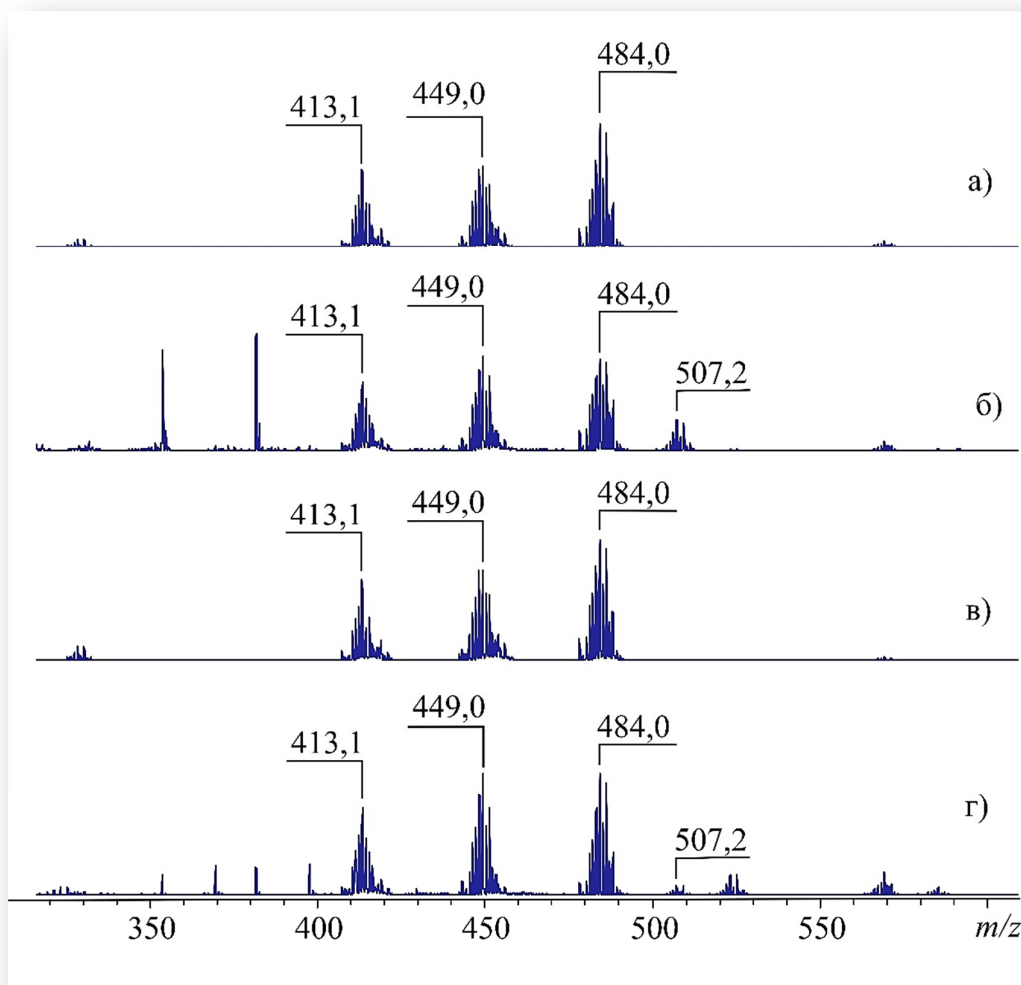


Слика 3.9. График зависности средње вредности S/N (однос сигнала и шума) од примењеног интензитета ласера који је био у распону од 1300 у.ј. до 2500 у.ј. за спектре $[RuCl_2(bipy)_2]Cl$ снимљене без матрице и спектре $[RuCl_2(bipy)_2]Cl$ снимљене у присуству супстрата TiO_2 НЧ и TiO_2 ЕНЧ.

Интензитет сигнала на $m/z = 413,1$ се није променио са повећањем снаге ласера на масеним спектрима чистог комплекса и комплекса снимљеног са TiO_2 НЧ-ама, али када су TiO_2 ЕНЧ примењене као супстрат сигнал на $m/z = 413,1$ се повећавао са повећањем снаге ласера (Слика 3.9). Чини се да, TiO_2 ЕНЧ побољшавају хомогену дистрибуцију узорка на MALDI плочи, олакшавају трансфер енергије ласера са површине супстрата на молекул испитиваног једињења, па олакшавају десорпцију/јонизацију комплекса и/или спречавају фрагментацију Ru-комплекса. Овакво понашање није јединствено, слични резултати су добијени и у ранијим радовима приликом испитивања осетљивости детекције гвожђе(III)-хлорида са и без матрице,¹⁷⁷ у којем је показано да присуство матрице снижава границу детекције гвожђа. Због свега претходно наведеног би TiO_2 ЕНЧ могле да буду добар кандидат за SALDI MS анализу Ru-комплекса, можда чак и за његову квантитативну анализу.

3.2.1.7. Ефекат неорганских соли на SALDI TOF масене спектре комплекса [RuCl₂(bipy)₂]Cl

Већ је напоменуто да наночестице у SALDI TOF анализи толеришу високе концентрације соли. Показано је да високе концентрације соли NaCl-а и KCl-а утичу на изглед/квалитет масених спектра супстрата TiO₂, што је приказано на Слици 3.7. Да би се испитало да ли долази до промена на масеним спектрима [RuCl₂(bipy)₂]Cl са супстратима, под истим условима, додате су соли NaCl-а и KCl-а, тако да је финална концентрација била 0,0325 mol/dm³. Снимљени су SALDI TOF масени спектри комплекса [RuCl₂(bipy)₂]Cl у коме су детектовани позитивни јони, у следећим комбинацијама: Ru-комплекс помешан са TiO₂ НЧ-ама и са NaCl-ом, (Слика 3.10.а), Ru-комплекс помешан са TiO₂ ЕНЧ-ама и са NaCl-ом (Слика 3.10.б), Ru-комплекс помешан са TiO₂ НЧ-ама и са KCl-ом (Слика 3.10.в) и Ru-комплекс помешан са TiO₂ ЕНЧ-ама и са KCl-ом (Слика 3.10.г). Ова четири спектра изгледају веома слично, без обзира који је супстрат или која је со коришћена. Запажају се три главна сигнала који су пореклом од комплекса: на $m/z = 413,1$, на $m/z = 449,0$ и на $m/z = 484,0$. Иста три сигнала доминирају на спектру Ru-комплекса који је снимљен без присуства соли (Слика 3.8). У присуству соли NaCl-а или KCl-а сигнал на $m/z = 507,2$ се појављује у масеном спектру [RuCl₂(bipy)₂]Cl са TiO₂ ЕНЧ-ама (Слика 3.10.б и 3.10. г). Овај сигнал је интензивнији када су присутне соли NaCl-а, јер овај сигнал одговара адукту натријума [Ru^{III}Cl₂(bipy)₂]⁺. Са TiO₂ ЕНЧ-ама се повећава број добијених сигнала, али се такође на тим спектрима може приметити више позадинског шума.



Слика 3.10. SALDI TOF масени спектри $[RuCl_2(bipy)_2]Cl$ позитивних јона: а) Ru-комплекс помешан са TiO_2 НЧ-ама и са NaCl-ом, б) Ru-комплекс помешан са TiO_2 ЕНЧ-ама и са NaCl-ом, в) Ru-комплекс помешан са TiO_2 НЧ-ама и са KCl-ом и г) Ru-комплекс помешан са TiO_2 ЕНЧ-ама и са KCl-ом.

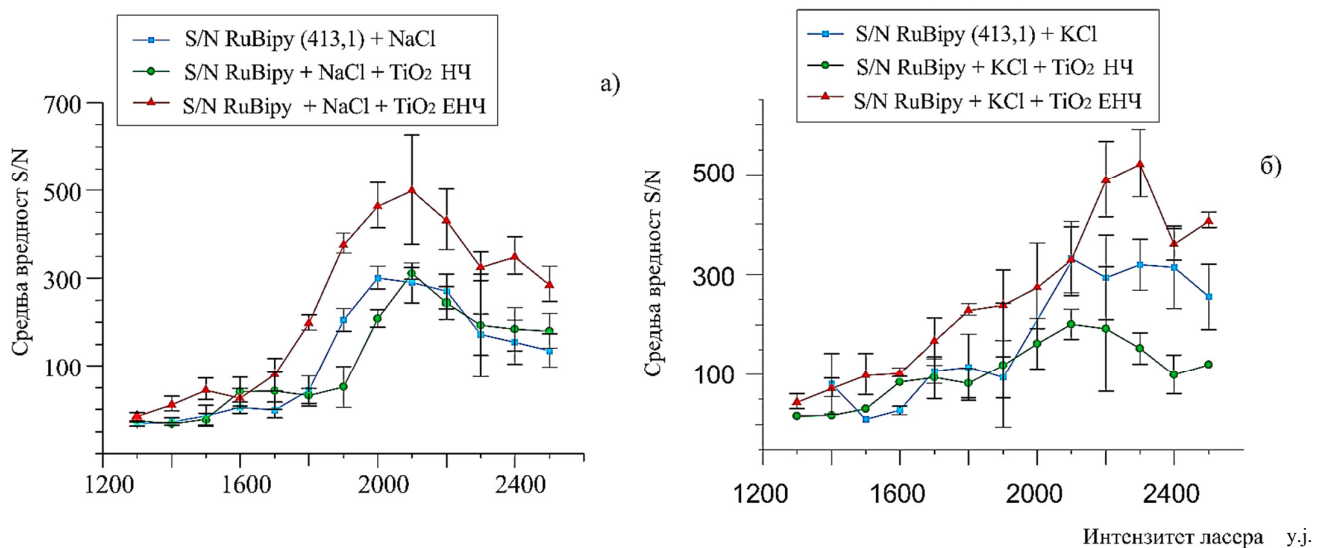
Може се рећи да соли немају никаквог утицаја на број, интензитет сигнала и укупан изглед масеног спектра Ru-комплекса без обзира који је супстрат употребљен.

Такође је испитано да ли интензитети сигнала масеног спектра $[RuCl_2(bipy)_2]Cl$ зависе од концентрације додате соли. Спектри комплекса су снимани при растућим концентрацијама соли NaCl-а и KCl-а. Концентрација NaCl-а и KCl-а су биле у опсегу од 0,008 до 0,13 mol/dm³, примењен је исти опсег концентрација соли као и при тестирању супстрата TiO_2 . Израчуната је средња вредност односа S/N за сигнал на $m/z = 449,0$ за сваку примењену концентрацију NaCl-а и KCl-а. Иако средња вредност S/N варира на различитим концентрација соли, не може се запазити никаква правилност у

овим променама. Стандардна девијација је била релативно висока у свим случајевима. Није јасно да ли интензитети сигнала масених спектра $[\text{RuCl}_2(\text{bipy})_2]\text{Cl}$ зависе од концентрације соли. Заједно гледајући, не мењају се ни специфичан образац спектра комплекса $[\text{RuCl}_2(\text{bipy})_2]\text{Cl}$ ни квалитет спектра додатком неорганских соли.

3.2.1.8. Комбиновани ефекти неорганских соли и интензитета ласера на SALDI TOF масене спектре комплекса $[\text{RuCl}_2(\text{bipy})_2]\text{Cl}$

За проналажење оптималних услова за снимање SALDI TOF масених спектра комплекса $[\text{RuCl}_2(\text{bipy})_2]\text{Cl}$ проучавани су комбиновани ефекти неорганских соли и интензитета ласера на масене спектре. Било је потребно снимити спектре позитивних јона следећих комбинација: Ru-комплекса са NaCl-ом, Ru-комплекса са TiO_2 НЧ-ама и са NaCl-ом, Ru-комплекса са TiO_2 ЕНЧ-ама и са NaCl-ом, Ru-комплекса са KCl-ом, Ru-комплекса са TiO_2 НЧ-ама и са KCl-ом и Ru-комплекса са TiO_2 ЕНЧ-ама и са KCl-ом. Сваки спектар је снимљен под променљивим (постепено растућим) интензитетима ласера. Одређена је зависност средње вредности односа S/N за сигнал на $m/z = 413,1$ ($[\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{-H}^+]^+$) од интензитета ласера. Резултати су приказани на Слици 3.11.



Слика 3.11. Средња вредност односа S/N за сигнал на $m/z = 413,1$ из масеног спектра позитивних јона комплекса $[\text{RuCl}_2(\text{bipy})_2]\text{Cl}$ у функцији од интензитета ласера који је био у опсегу од 1300 у.ј. до 2500 у.ј. а) Средње вредности S/N из спектра Ru-комплекса са NaCl-ом; са NaCl-ом и са TiO_2 НЧ-ама; са NaCl-ом и са TiO_2 ЕНЧ-ама. б) Средње вредности S/N из спектра Ru-комплекса са KCl-ом; са KCl-ом и са TiO_2 НЧ-ама; са KCl-ом и са TiO_2 ЕНЧ-ама.

Уколико се упореде масени спектри у присуству NaCl-а (Слика 3.11.а) највиша средња вредност S/N се добија у присуству супстрата TiO₂ ЕНЧ-а. На све три криве са Сlike 3.11.а се види да се максимална вредност S/N постиже када је интензитет ласера подешен на око 2100 у.ј. Минимална вредност интензитета ласера која је потребна да би се добили спектри са прихватљивом вредношћу односа S/N (да вредности не буду ниже од 50) разликује се између супстрата. Сигнали добијени са TiO₂ ЕНЧ-ама имају нижу доњу вредност ласера (1600 у.ј.) него што је случај са TiO₂ НЧ-ама (1900 у.ј.) и са спектрима добијеним без присуства супстрата (1800 у.ј.). Када се анализирају спектри Ru-комплекса који су снимљени у присуству соли KCl-а (Слика 3.11.б) највиша средња вредност S/N се као и у претходном случају постиже са TiO₂ ЕНЧ-ама. С друге стране, ове криве показују знатно мање правилности и веће стандардне девијације него у претходном случају.

На основу горе наведеног, може се рећи да се оба супстрата TiO₂ НЧ и TiO₂ ЕНЧ могу користити као супстрати за SALDI TOF масеноспектрометријску анализу комплекса [RuCl₂(bipy)₂]Cl. Ова два супстрата су високо толерантна на присуство неорганских јона: Na⁺, K⁺ и Cl⁻.

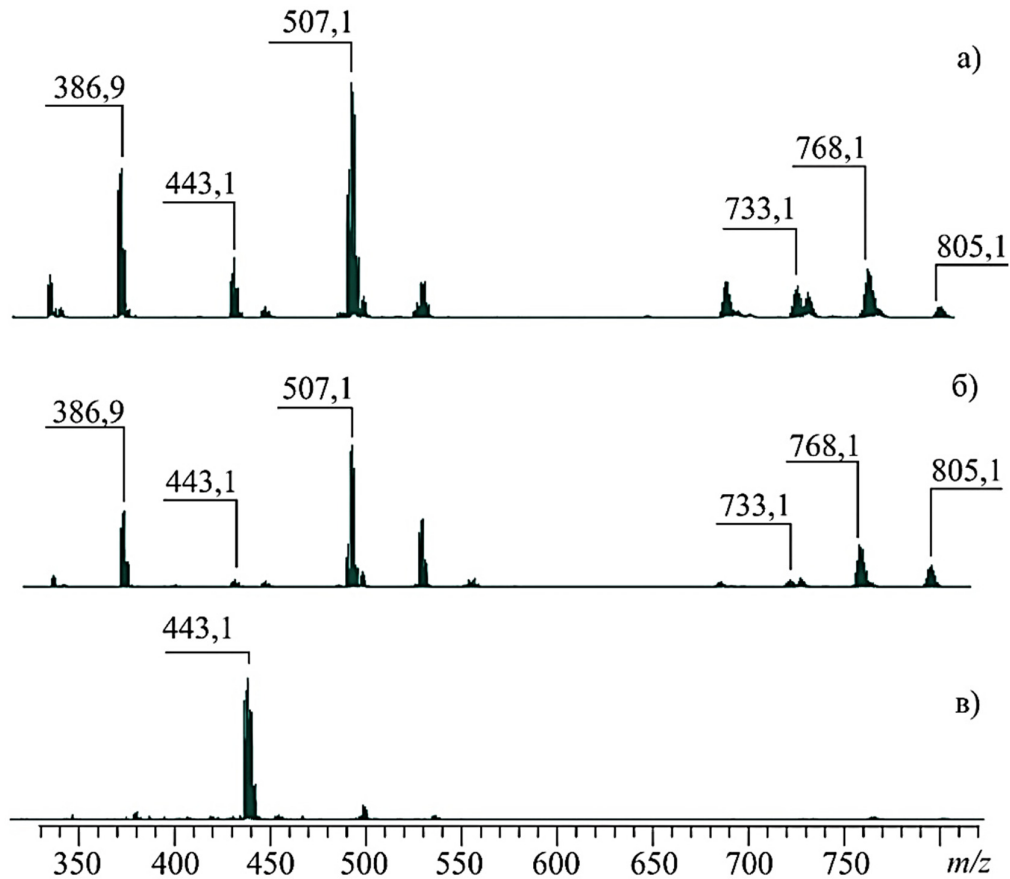
TiO₂ ЕНЧ су се показале као ефикаснији супстрати од TiO₂ НЧ-а у процесима десорпције/јонизације комплекса. Претходно наведено може да буде последица разлике у површинама између наночестица и елипсоидних наночестица, а посредно и облика и величине и стерних ефеката са становишта анализираних молекула. Како су сигнали пореклом од анализираних супстрата углавном у области малих молекулских маса, не ометају масену анализу Ru-комплекса, такође, осетљивост детекције је већа у поређењу са другим честицама.

3.2.1.9. SALDI TOF масена спектрометрија комплекса [PtCl₄(bipy)] у присуству наночестица TiO₂ и елипсоидних наночестица TiO₂

Комплекси прелазних метала имају важну улогу у медицинској биохемији, па је у овој докторској дисертацији анализирана могућност примене супстрата на бази нанокристала TiO₂ за анализу још једног комплекса прелазних метала, који има потенцијал за примену као анти-туморски агенс. Научници су показали значајан напредак при коришћењу комплекса прелазних метала у лечењу обољења код људи као што су различити карциноми, лимфоми, дијабетес, неуролошки поремећаји и као анти-инфламаторни агенси.^{178–182} С обзиром на велики значај комплекса прелазних метала

јавља се потреба за њиховим даљим унапређењем, њиховом карактеризацијом и развијањем брзих метода за њихову детекцију нарочито у биолошким флуидима. Масена спектрометрија за карактеризацију и детекцију би могла бити метода од избора. При претраживању литературе запажено је да нису у довољној мери заступљени радови на тему (M)SALDI масене анализе ових комплекса. MALDI масена анализа, као што је већ истакнуто у претходним поглављима, има недостатак услед коришћења матрица које имају молекулске масе које покривају област маса до 1000 Da у којима се налази и већина комплекса прелазних метала.

Према литературним подацима, TiO_2 НЧ као супстрати нису најбољи избор за SALDI MS анализу комплекса $[\text{PtCl}_4(\text{bipy})]$ због слабе осетљивости.¹²⁴ У следећим експериментима проверено је да ли супстрат TiO_2 ЕНЧ има предност над супстратом TiO_2 НЧ у SALDI MS анализи Pt-комплекса. Снимљени су спектри $[\text{PtCl}_4(\text{bipy})]$ без присуства матрице (Слика 3.12.а) и спектри комплекса $[\text{PtCl}_4(\text{bipy})]$ са супстратима TiO_2 НЧ (Слика 3.12.б) и TiO_2 ЕНЧ (Слика 3.12.в). У спектру Pt-комплекса без супстрата запажају се три главна сигнала: сигнал од $\text{Pt}^{\text{II}}(\text{bipy})\text{Cl}]^+$ на $m/z = 386,9$, сигнал од $[\text{Pt}^{\text{II}}(\text{bipy})\text{Cl}_2\text{Na}]^+$ на $m/z = 443,1$ и сигнал од $[\text{Pt}^{\text{II}}(\text{bipy})_2\text{-H}]^+$ на $m/z = 507,1$ (Слика 3.12.а). У јонима који су детектовани као сигнали на $m/z = 386,9$ и $m/z = 507,1$, Pt је редукована од Pt(IV) до Pt(II), и до овога долази услед ласерске екситације, највероватније као последица фотохемијске редукције у гасној фази. Редукција прелазних метала у MALDI TOF масеној спектрометрији није неуобичајен процес. $[\text{Pt}^{\text{II}}(\text{bipy})_2\text{-H}]^+$ катјон ($m/z = 507,1$) се генерише када адукт који садржи два бипиридинска лиганда изгуби један протон.¹⁸³ Депротоновани катјони се такође стварају током снимања масених спектра не само бипиридинских комплекса са рутенијумом него и са бипиридинским комплексима других прелазних метала, што је описано у литератури.¹⁸⁴⁻¹⁸⁶



Слика 3.12. SALDI TOF масени спектри позитивних јона: а) $[PtCl_4(bipy)]$ без присуства матрице, б) $[PtCl_4(bipy)]$ са TiO_2 НЧ-ама и в) $[PtCl_4(bipy)]$ са TiO_2 ЕНЧ-ама.

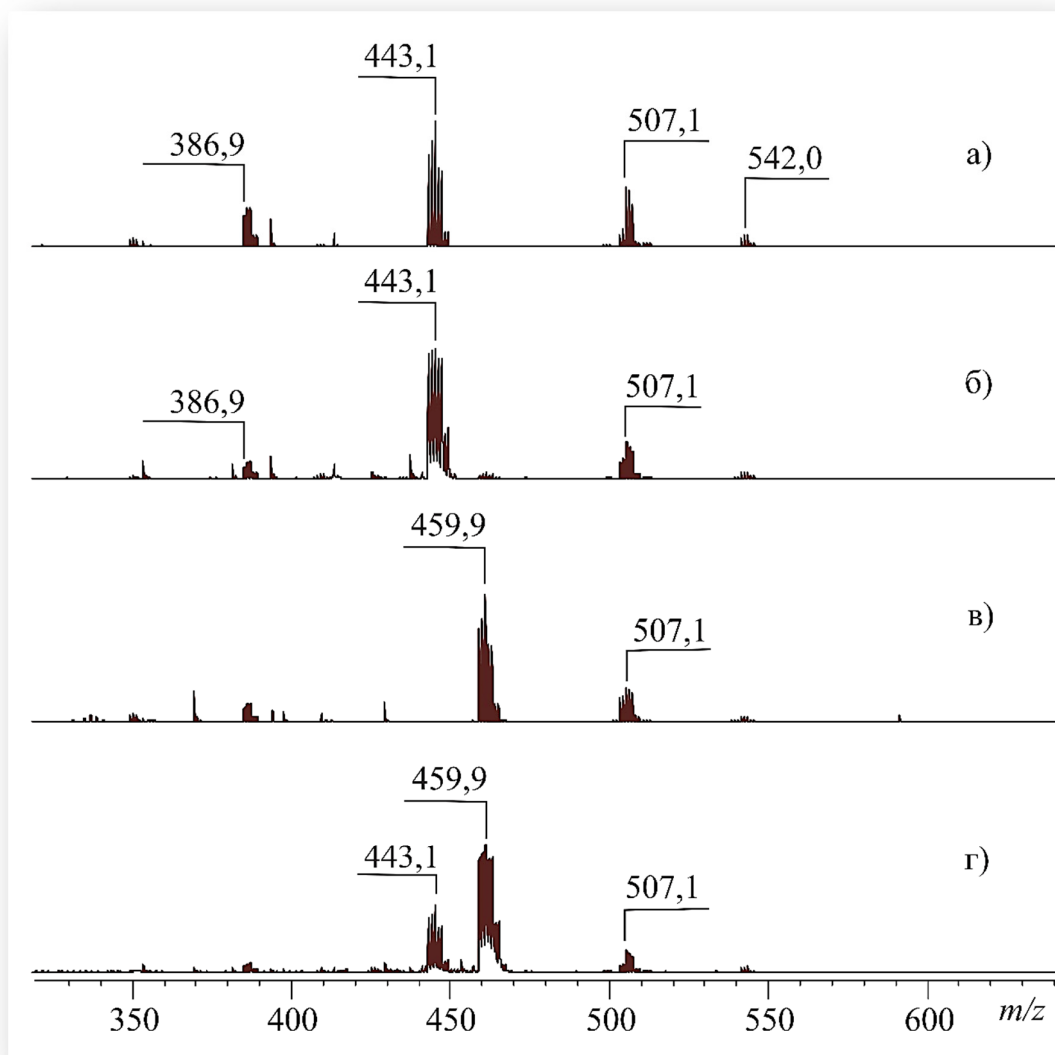
Сигнал детектован на $m/z = 443,1$ ($[Pt^{II}(bipy)Cl_2Na]^+$) је пореклом од Na^+ адукта Pt-бипиридинског комплекса. Занимљиво је да је овај сигнал ниског интензитета и на масеном спектру без супстрата (Слика 3.12.а) и на спектру комплекса у присуству TiO_2 НЧ-а (Слика 3.12.б), али је доминантан у спектру комплекса снимљеног са TiO_2 ЕНЧ-ама (Слика 3.12.в), где су сви остали сигнали супримирани.

Три сигнала пореклом од Pt-комплекса који садрже три бипиридинска лиганда су такође детектована у вишим масеним регионима спектра на: $m/z = 733,1$ ($[Pt^{II}(bipy)_3Cl_2]^+$), $m/z = 768,1$ ($[Pt^{IV}(bipy)_3Cl_3]^+$) и $m/z = 805,1$ ($[Pt^{IV}(bipy)_3Cl_4]^+$) (Слика 3.12.а и 3.12.б).

Резултати овог експеримента показују да се осетљивост SALDI MS анализе не повећава када се користе TiO_2 ЕНЧ као супстрат уместо TiO_2 НЧ.

3.2.1.10. Ефекти неорганских соли на SALDI TOF масене спектре комплекса [PtCl₄(bipy)]

Да би се испитало како неорганске соли утичу на SALDI TOF масене спектре [PtCl₄(bipy)], раствори NaCl-а и KCl-а су додати у раствор комплекса. Финална концентрација соли која је додата је иста као концентрација која је додата у Ru-бипиридински комплакс, износила је 0,0325 mol/dm³ за обе соли. SALDI TOF масени спектри позитивних јона комплекса [PtCl₄(bipy)] су снимљени у следећим комбинацијама: Pt-комплекс са TiO₂ НЧ-ама и са NaCl-ом (Слика 3.13.а), Pt-комплекс са TiO₂ ЕНЧ-ама и NaCl-ом (Слика 3.13.б), Pt-комплекс са TiO₂ НЧ-ама и са KCl-ом (Слика 3.13.в) и Pt-комплекс са TiO₂ ЕНЧ-ама и са KCl-ом (Слика 3.13.г). Спектри на Слици 3.13.а и 3.13.б су веома слични, без обзира на то који је супстрат употребљен. Сигнал на $m/z = 443,1$ ([Pt^{II}(bipy)Cl₂Na]⁺) доминира на оба спектра где је у раствору био присутан NaCl. Када су масени спектри Pt-комплекса снимљени у присуству KCl-а, нови, јак сигнал се појављује на $m/z = 459,9$ који је пореклом од K⁺-адукта Pt-бипиридинског комплекса [Pt^{II}(bipy)Cl₂K]⁺ (Слика 3.13.б и 3.13.г). Занимљиво је да се Na⁺-адукт Pt-комплекса ($m/z = 443,1$) појављује на масеном спектру који је снимљен са TiO₂ ЕНЧ-ама и са KCl-ом, али нижег интензитета од K⁺-адукта (Слика 3.13.г).



Слика 3.13. SALDI TOF масени спектри позитивних јона комплекса $[PtCl_4(bipy)]$ снимљени су у присуству соли: а) Pt-комплекс са TiO_2 НЧ-ама и са NaCl-ом, б) Pt-комплекс са TiO_2 ЕНЧ-ама и NaCl-ом, в) Pt-комплекс са TiO_2 НЧ-ама и са KCl-ом и г) Pt-комплекс са TiO_2 ЕНЧ-ама и са KCl-ом.

SALDI масени спектри Pt-комплекса снимљени у присуству TiO_2 НЧ-а не подлежу утицају додате соли, односно, не појављују се нови сигнали у присуству неорганских јона који се додају. Али, када је употребљен супстрат TiO_2 ЕНЧ, присуство соли побољшава осетљивост масеноспектрометријске анализе Pt-комплекса. Разлог повећане осетљивости Pt-комплекса може да буде смањење интензитета сигнала који потичу од супстрата, што омогућава олакшану детекцију сигнала који потичу од узорка. Друга

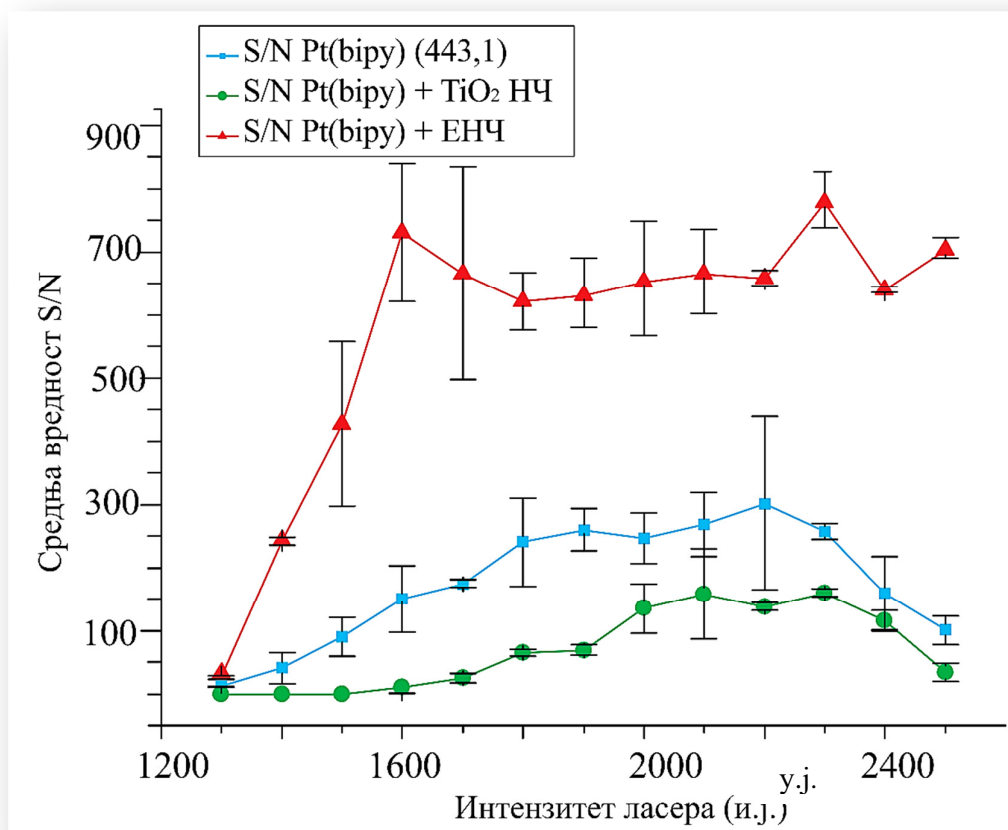
могућност је да се олакшава јонизација узорка, па су самим тим и сигнали који потичу од јона који потичу од узорка интензивнији и лакше се детектују.

Претпоставке: када су присутни неоргански јони може да дође до смањења сигнала који потичу од супстрата што омогућава лакшу детекцију сигнала који потичу од узорка. Још једна предност при детекцији узорка када су присутни неоргански јони је и што се не повећава број и интензитет позадинских сигнала који могу да настану од адуката супстрата и алкалних метала, оваква појава се догађа када се органским матрицама додају раствори соли. Тада је повећан позадински шум који је последица сигнала од адуката молекула матрица са јонима Na^+ и K^+ .

3.2.1.11. Утицај интензитета ласера на масене спектре комплекса $[\text{PtCl}_4(\text{bipy})]$

Број молекула који се јонизују зависи од енергије ласера која се користи и, углавном, расте како расте снага ласера. Након одређене вредности снаге ласера, број јона на одређеној позицији, који се детектује почиње да се смањује. Разлог за ову појаву је највероватније повећана фрагментација испитиваног узорка, до које долази када снага ласера пређе одређену вредност. Из тог разлога, може се рећи да је снага ласера један од главних фактора који утиче на квалитет масених спектра, па је неопходно утврдити снагу при којој су сигнали највећег интензитета, а при којима је степен фрагментације мањи.

У овом делу дисертације, испитиван је утицај интензитета ласера на интензитет сигнала масених спектра комплекса $[\text{PtCl}_4(\text{bipy})]$ снимљених без матрице и комплекса $[\text{PtCl}_4(\text{bipy})]$ снимљеног у присуству супстрата TiO_2 НЧ и TiO_2 ЕНЧ. За Pt-комплекс и Pt-комплекс са супстратима снимљен је већи број спектра под утицајем различитих интензитета ласера. Средња вредност односа сигнала и шума (S/N) за сигнал пореклом од $[\text{Pt}^{\text{II}}(\text{bipy})\text{Cl}_2\text{Na}]^+$, на $m/z = 443,1$, израчуната је за све примењене интензитета ласера у опсегу од 1300 до 2500 у.ј. Зависност средње вредности S/N од интензитета ласера приказана је на Слици 3.14.

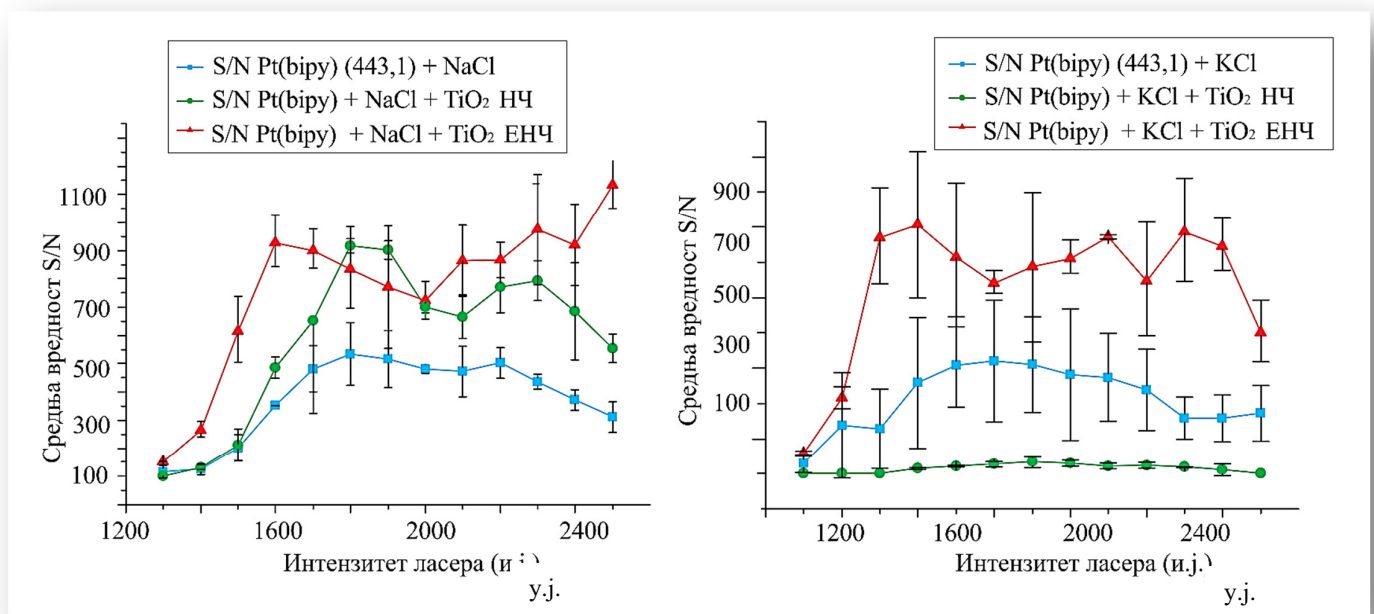


Слика 3.14. График зависности средње вредности S/N (однос сигнала и шума) од примењеног интензитета ласера који је био у распону од 1300 до 2500 у.ј. за спектре комплекса $[PtCl_4(bipy)]$ снимљених без матрице и комплекса $[PtCl_4(bipy)]$ снимљеног у присуству супстрата TiO_2 НЧ и TiO_2 ЕНЧ.

Слично Ru-комплексу (Слика 3.9), интензитет сигнала на $m/z = 443,1$ ($[Pt^{II}(bipy)Cl_2Na]^+$) се није значајно променио са повећањем снаге ласера на масеним спектрима чистог комплекса и комплекса снимљеног са TiO_2 НЧ-ама, али када су TiO_2 ЕНЧ примењене као супстрат, сигнал на $m/z = 443,1$ се повећавао са повећањем снаге ласера (Слика 3.14). Још једном се потврђује да је супстрат TiO_2 ЕНЧ добар кандидат за SALDI MS анализу не само Ru-комплекса него и Pt-комплекса, пошто је трансфер енергије ласера ефикаснији и огледа се у повећању приноса јона узорка који се анализира.

3.2.1.12. Комбиновани ефекти неорганских соли и интензитета ласера на SALDI TOF масене спектре комплекса [PtCl₄(bipy)]

Као и код Ru-комплекса, за проналажење оптималних услова за снимање SALDI TOF масених спектра комплекса [PtCl₄(bipy)] проучавани су комбиновани ефекти неорганских соли и интензитета ласера на масене спектре. Снимљени су спектри позитивних јона следећих комбинација: Pt-комплекс са NaCl-ом, Pt -комплекс са TiO₂ НЧ-ама и са NaCl-ом, Pt -комплекс са TiO₂ ЕНЧ-ама и са NaCl-ом, Pt -комплекс са KCl-ом, Pt -комплекса са TiO₂ НЧ-ама и са KCl-ом и Pt-комплекс са TiO₂ ЕНЧ-ама и са KCl-ом. Свака комбинација је снимљена при постепено растућем интензитету ласера у распону од 1300 до 2500 у.ј. Одређена је зависност средње вредности односа S/N за сигнал на $m/z = 443,1$ [Pt^{II}(bipy)Cl₂Na]⁺ од интензитета ласера. Резултати су приказани на Слици 3.15.



Слика 3.15. Средња вредност односа S/N за сигнал на $m/z = 443,1$ из масеног спектра [PtCl₄(bipy)] у ком су детектовани позитивни јони у функцији од интензитета ласера који је био у опсегу од 1300 до 2500 у.ј. а) Средње вредности S/N из спектра Pt-комплекса са: NaCl-ом; NaCl-ом и TiO₂ НЧ-ама; NaCl-ом и TiO₂ ЕНЧ-ама. б) Средње вредности S/N из спектра Pt-комплекса са: KCl-ом; KCl-ом и TiO₂ НЧ-ама; KCl-ом и TiO₂ ЕНЧ-ама.

Поређењем кривих са Сликe 3.15.а може се запазити да се више средње вредности S/N добијају у присуству оба супстрата TiO₂ НЧ и TiO₂ ЕНЧ у односу на S/N вредности

чистог комплекса без супстрата, што може бити последица повишене фрагментације молекула и, самим тим ниског приноса јона који се детектују. Са TiO_2 ЕНЧ-ама се добијају највише вредности, а од вредности интензитета ласера 1600 у.ј. се добијају растуће вредности S/N , али пораст вредности није правилан. Највише вредности S/N у присуству TiO_2 НЧ-а као супстрата, добијају се на 1800 и 1900 у.ј. Минимална вредност интензитета ласера која је потребна да би се добили спектри са вредностима S/N које нису ниже од 50, разликује се између супстрата. За сигнале добијене са TiO_2 ЕНЧ-ама била је потребна нижа доња вредност интензитета ласера (1300 у.ј.) него што је случај са TiO_2 НЧ-ама и са сигнаlima добијеним без присуства супстрата (1400 у.ј.), што говори у прилог већ разматраној већој ефикасности трансфера енергије коју су супстрати апсорбовали од ласера.

Када се анализирају спектри Ru-комплекса који су снимљени у присуству соли KCl -а (Слика 3.11.б) највиша средња вредност S/N се као и у претходном случају постиже са TiO_2 ЕНЧ-ама. Најниже вредности S/N се постижу у присуству супстрата TiO_2 НЧ.

3.2.2. Квантитативне карактеристике супстрата

MALDI масена спектрометрија је метода чији је недостатак тај што не постоји директна зависност између количине узорка који се анализира и одговора инструмента, односно апсолутног интензитета сигнала у масеним спектрима који су пореклом од узорка.¹⁸⁷ Разлози су нехомогена ко-кристалација узорка и матрице на MALDI плочи, што доводи до ниске репродуцибилности мерења.^{42,102} С обзиром на друге, велике предности, улаже се велики труд да би метода могла да има квантитативну примену.

Следећи корак је било испитивање могућности употребе кристала титан(IV)-оксида као супстрата за SALDI TOF MS квантитативну анализу. За истраживање коришћени су нанокристали TiO_2 различите величине и облика: колоидне наночестице просечног дијаметра 5 nm, елипсоидне наночестице дужине 40-50 nm, латералне димензије 14-16 nm и нанотубе дужине од 100 до 150 nm и просечног дијаметра од 11 nm. Молекули на којима је била тестирана потенцијална примена нанокристала су биолошки активни молекули малих маса: аминокиселине (L-цистеин, L-аланин, DL-метионин), трипептид глутатион, полни стероидни хормони (естрадиол, тестостерон, прогестерон), угљени хидрати (D-(+)-глукоза, D-(+)-малтоза, рафиноза, арабиноза, β -циклодекстрин), лимунска киселина, дексаметазон (дексазон), витамини (витамин А и витамин Е).

Већина молекула малих маса који су коришћени у истраживању изабрани су према свом клиничком значају, као што је већ истакнуто у уводном делу, и према потреби за брзом и поузданом методом за њихову детекцију и квантификацију.

3.2.2.1. Анализа SALDI TOF масених спектра молекула малих маса

У масеноспектрометријској анализи изабраних молекула малих маса без матрице (методом ласерске десорпције и јонизације, LDI), ни један од узорка није могао бити детектован, са изузетком витамина А и витамина Е, највероватније због недовољне протон донирајуће активности и апсорптивности узорка у опсегу таласне дужине зрачења ласера. Из тог разлога, присуство асистирајућег агенса на плочи је неопходно како би се добио одговарајући масени спектар.

У првом сету експеримената испитано је да ли су нанокристали TiO_2 одговарајући за детекцију изабраних молекула. За даљу статистичку анализу разматрани су само они сигнали који нису били присутни у LDI спектрима супстрата (Слика 3.5, Табела 3.13) и који се нису преклапали са сигнаlima који потичу од супстрата.

Концентрација аминокиселина, глутатиона, угљених хидрата, стероидних хормона, лимунске киселине и дексазона је била у опсегу од 1 до 11 mM, у зависности од моларне масе (тако да су сви молекули имали масу од 1 mg/mL), а витамина Е и витамина А 200 и 300 mM, редом.

У Табелама 3.14 и 3.15 приказана је могућност детекције испитиваних молекула, као и листа сигнала који су детектовани у масеним спектрима. Такође су истакнути и случајеви у којима се јони узорка могу детектовати искључиво при повишеним концентрацијама анализираних молекула.

Табела 3.14. Могућност детекције молекула: L-аланин, L-цистеин, DL-метионин, глутатион, D-(+)-глукоза, D-(+)-малтоза, β-циклодекстрин, рафиноза, арабиноза са супстратима, нанокристалима TiO₂. Табела садржи све сигнале (m/z вредности) који су пореклом од анализираних молекула са појединачним супстратима.

| Молекул | TiO ₂ | Могућност детекције | | m/z вредност | | Могућност детекције на вишим концентрацијама | |
|-----------------|------------------|---------------------|-----------|-----------------------------------|----------------|--|----------------|
| | | Поз. Јони | Нег. Јони | Позитивни Јони | Негативни Јони | Позитивни Јони | Негативни Јони |
| L-аланин | НЧ | + | + | 90,1; 112,1; 128,2 | 88,1 | 112,1 | 88,1 |
| | ЕНЧ | - | + | — | 88,1* | | |
| | НТ | + | + | 112,1; 128,2 | 88,1 | | |
| L-цистеин | НЧ | + | - | 121,2; 144,2* | — | 144,2 | 120,2 |
| | ЕНЧ | - | - | — | — | 144,2 | 120,2 |
| | НТ | + | + | 144,2; 166,1 | 120,2 | | |
| DL-метионин | НЧ | + | - | 172,2* | — | 150,2; 172,2; 188,2 | 148,2 |
| | ЕНЧ | + | + | 172,2; 194,2 | 148,2 | | |
| | НТ | + | + | 172,2; 188,3; 194,2 | 148,2 | | |
| Глутатион | НЧ | + | - | 330,3* | — | 308,3; 330,3; 346,4 | 306,3 |
| | ЕНЧ | + | - | 308,3; 330,3; 346,4* | — | | 306,3 |
| | НТ | + | + | 330,3; 346,4 | 306,3 | | |
| D-(+)-глукоза | НЧ | - | - | — | — | 203,2; 219,3 | 179,2 |
| | ЕНЧ | + | - | 203,2 | — | | * |
| | НТ | + | + | 203,2; 219,3 | 179,2 | | 179,2 |
| D-(+)-малтоза | НЧ | - | - | — | — | 365,3 | 222,0 |
| | ЕНЧ | + | - | 365,3 | — | | 222,0 |
| | НТ | + | + | 365,3 | 222,0 | | |
| β-циклодекстрин | НЧ | - | - | — | — | 1158,0; 1174,1 | |
| | ЕНЧ | + | - | 1158,0 | — | | |
| | НТ | + | + | 1158,0; 1174,1 | 1134,0 | | |
| Рафиноза | НЧ | + | - | 203,2; 365,3; 527,4; 543,5 | — | 185,1*; 203,2*; 543,5 | 222,0 |
| | ЕНЧ | + | + | 185,1; 203,2; 365,3; 384,3; 527,4 | 222,0; 503,4 | | |
| | НТ | + | + | 185,1; 203,2; 365,3; 527,4; 543,5 | 222,0; 503,4 | | |
| Арабиноза | НЧ | - | + | — | 149,1* | 173,1; 189,2 | 149,1 |
| | ЕНЧ | - | + | — | 149,1* | 173,1; 189,2* | 149,1 |
| | НТ | + | + | 173,1; 189,2 | 149,1 | | |

* Молекули могу да се детектују, али су S/N вредности ниже од 50, што је доња граница детекције емпиријски одређена.

+ Молекули могу да се детектују.

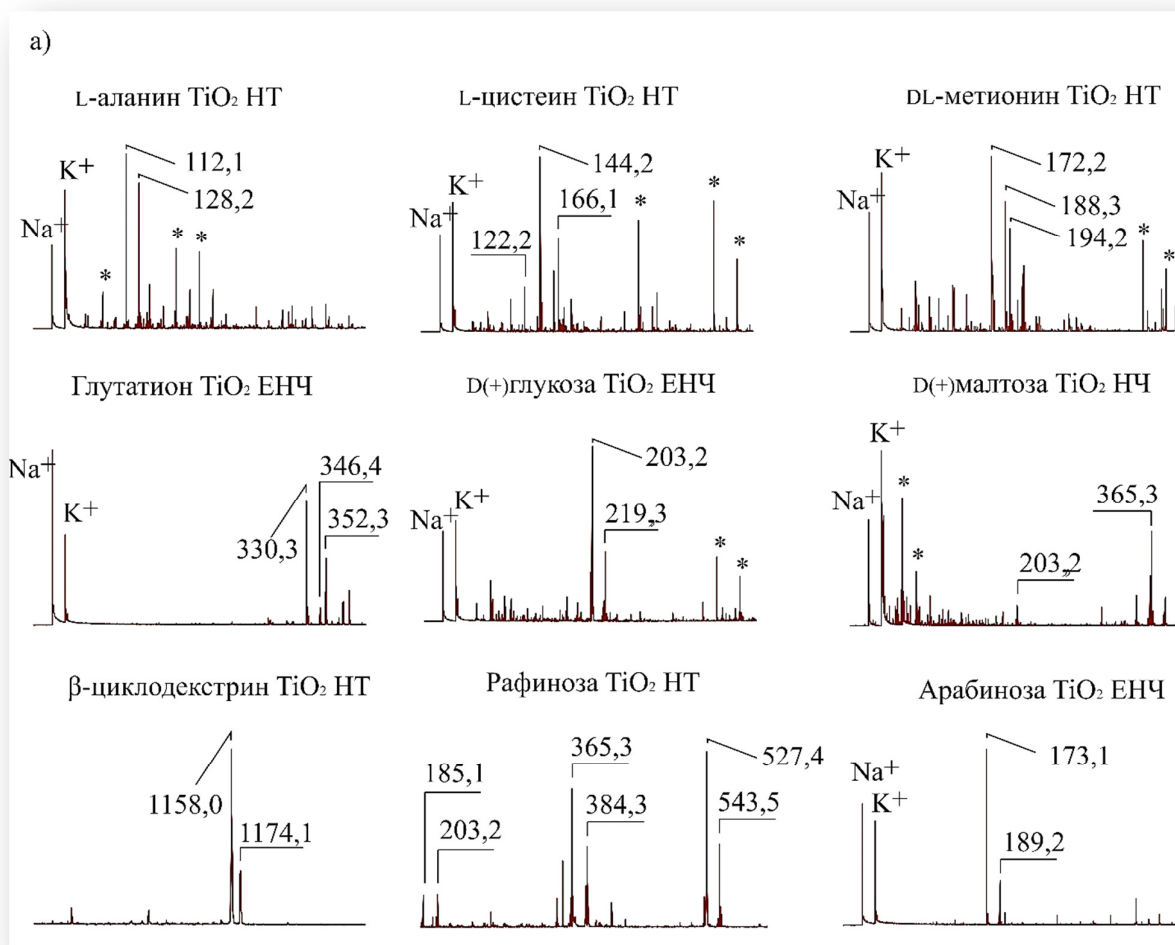
— Јони пореклом од молекула не могу да се детектују.

Табела 3.15. Могућност детекције молекула: естрадиол, тестостерон, прогестерон, лимунска киселина, дексазон, витамин Е и витамин А са супстратима, нанокристалима TiO₂. Табела садржи све сигнале (*m/z* вредности) који су пореклом од анализираних молекула са појединачним супстратима.

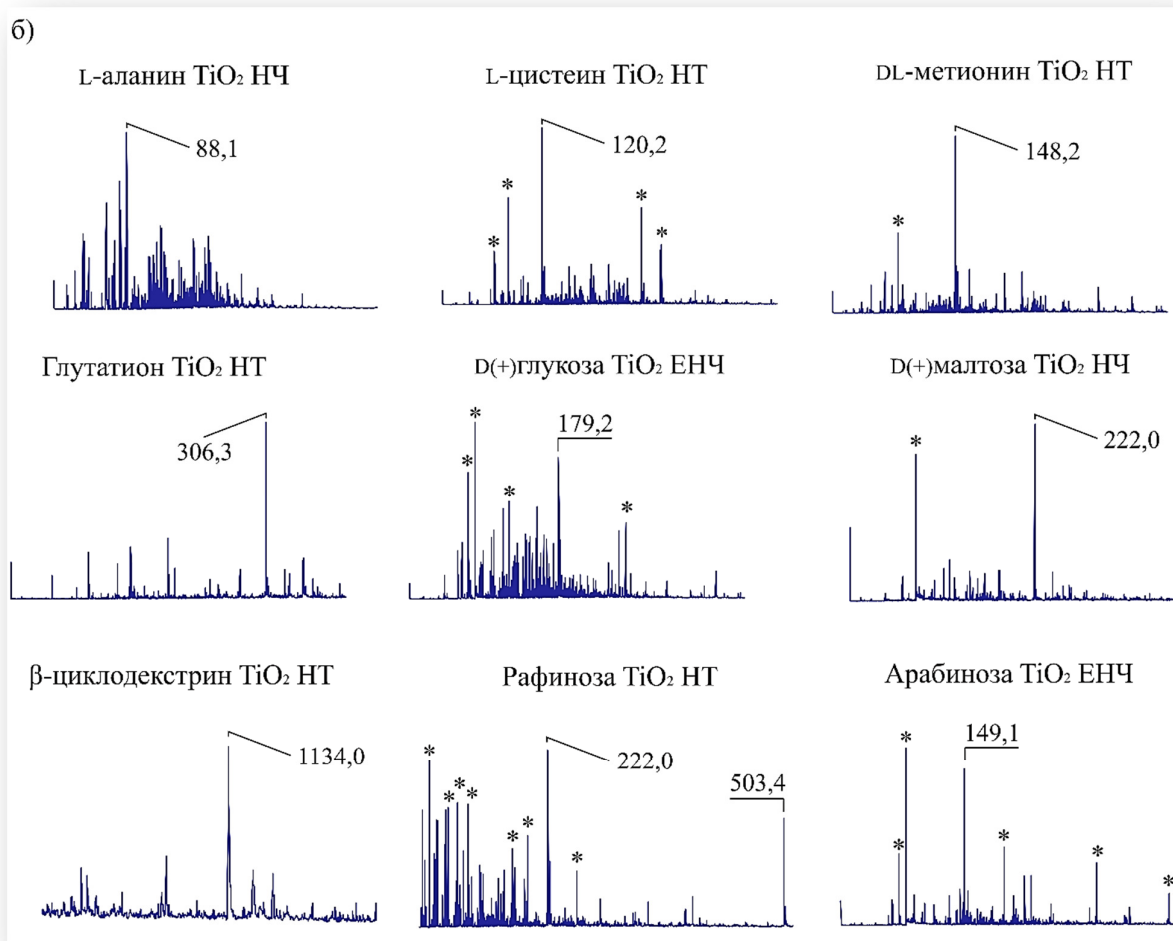
| Молекул | TiO ₂ | Детектабилност | | <i>m/z</i> вредност | | Детектабилност на вишим концентрацијама | |
|-------------------|------------------|----------------|------|---------------------|-----------|---|-----------|
| | | Поз. | Нег. | Позитиван | Негативан | Позитиван | Негативан |
| | | Јони | | Јони | | Јони | |
| Естрадиол | НЧ | - | - | — | — | 407,6; 423,6; 439,7 | — |
| | ЕНЧ | + | + | 407,6; 423,6* | 328,9 | 439,7* | |
| | НТ | + | - | 407,6; 423,6; 439,7 | 328,9 | | |
| Тестостерон | НЧ | + | - | 401,6; 423,6 | — | | 399,6 |
| | ЕНЧ | + | - | 423,6 | — | | 399,6 |
| | НТ | + | + | 401,6; 423,6 | 399,6 | 401,6* | |
| Прогестерон | НЧ | + | - | 315,5; 337,5 | — | | 313,5 |
| | ЕНЧ | + | - | 337,5 | — | | 313,5 |
| | НТ | + | + | 337,5 | 313,5 | 315,5* | |
| Лимунска киселина | НЧ | - | - | — | — | 133,1; 193,1; 215,1; 237,1 | 191,1 |
| | ЕНЧ | + | + | 133,1; 215,1; 237,1 | 191,1 | 133,1; 237,1 | |
| | НТ | + | + | 215,1 | 191,1 | | |
| Дексазон | НЧ | + | - | 399,5 | — | 355,4 | |
| | ЕНЧ | + | - | 355,4; 399,5 | — | | |
| | НТ | - | - | — | — | | |
| Витамин Е | НЧ | + | - | 402,7 | — | | 401,6 |
| | ЕНЧ | + | + | 402,7 | 401,6 | | |
| | НТ | + | + | 402,7 | 401,6 | | |
| | LDI | + | + | 402,7 | 401,6 | | |
| Витамин А | НЧ | + | + | 269,5 | 283,4 | | |
| | ЕНЧ | + | + | 269,5; 328,5 | 283,4 | | |
| | НТ | + | + | 269,5; 328,5 | 283,4 | | |
| | LDI | + | + | 269,5; 328,5 | 283,4 | | |

* Молекули могу да се детектују, али су S/N вредности ниже од 50, што је доња граница детекције емпиријски одређена.
+ Молекули могу да се детектују.
— Јони пореклом од молекула не могу да се детектују.

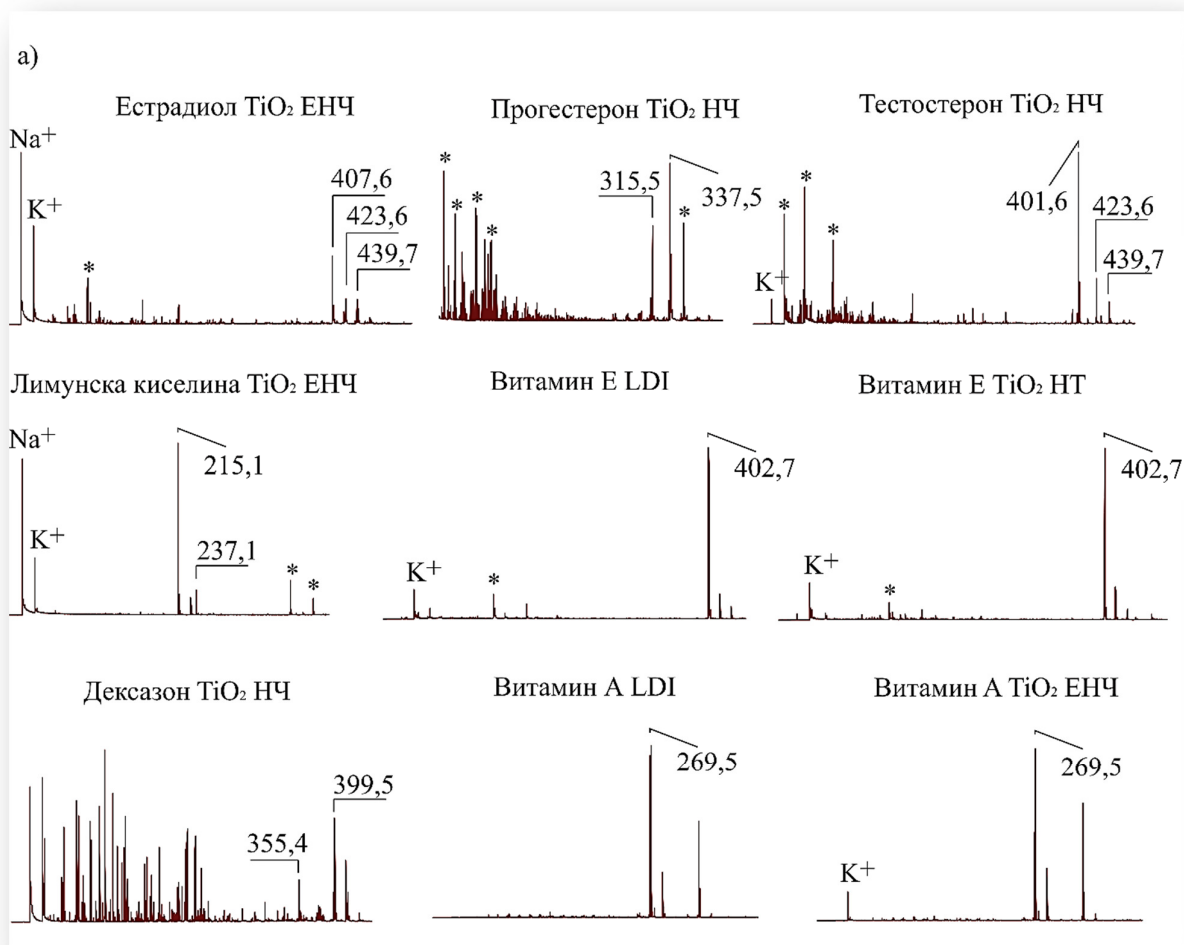
Репрезентативни SALDI TOF масени спектри молекула: L-аланин, L-цистеин, DL-метионин, глутатион, D-(+)-глукоза, D-(+)-малтоза, β-циклодекстрин, рафиноза и арабиноза су дати на Слици 3.16.а за позитивне јоне и 3.16.б за негативне јоне, а за молекуле: естрадиол, тестостерон, прогестерон, лимунска киселина, дексазон, витамин Е и витамин А су дати на Слици 3.17.а за позитивне јоне и Слици 3.17.б за негативне јоне, са изузетком дексазона јер није била могућа детекција негативних јона дексазона ни са једним супстратом. Сигнали чије су S/N вредности коришћене за даље статистичке прорачуне на спектрима су обележени са припадајућим *m/z* вредностима.



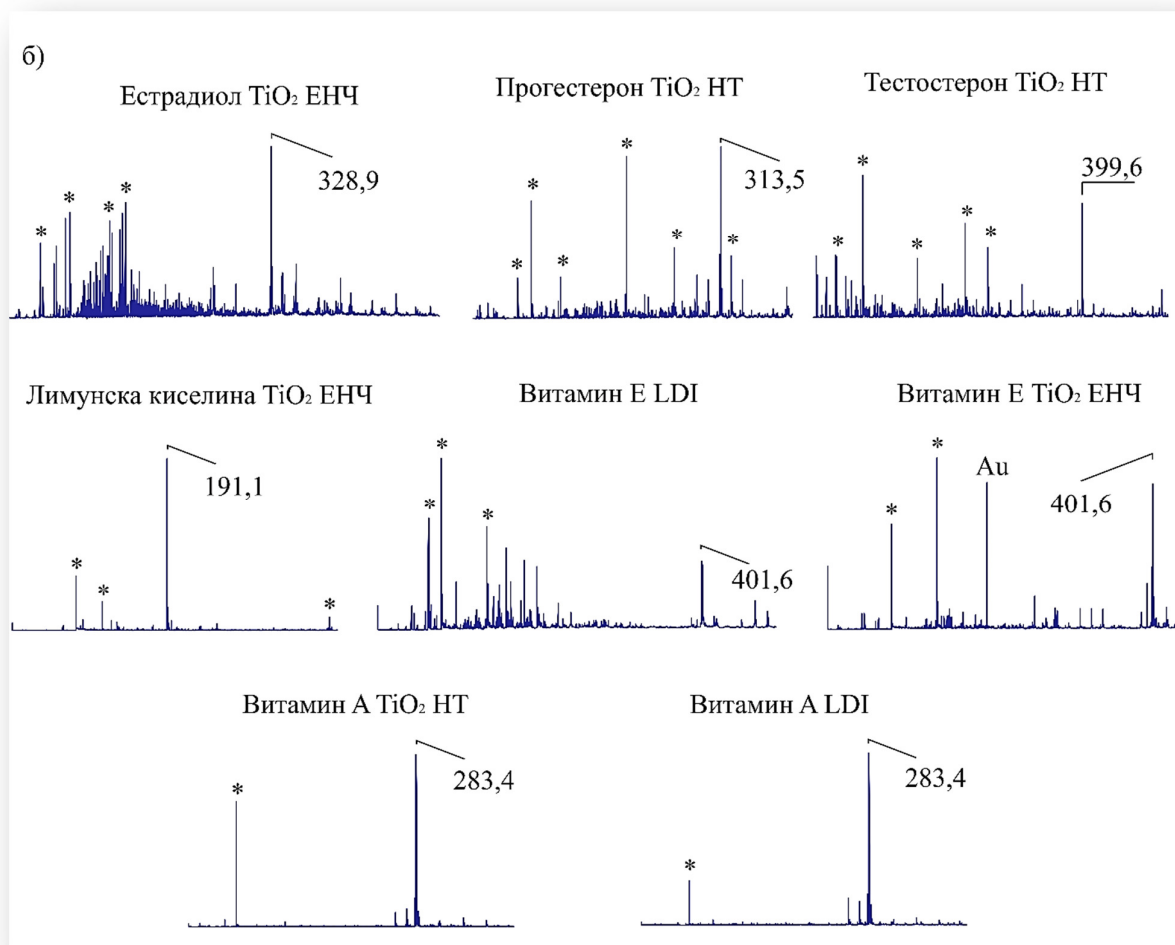
Слика 3.16. a) SALDI TOF масени спектри детектованих позитивних јона молекула: L-аланин, L-цистеин, DL-метионин, глутатион, D-(+)-глюкоза, D-(+)-малтоза, β -циклодекстрин, рафиноза и арабиноза са једним од нанокристала TiO_2 са којим даје највећи број сигнала чије су S/N вредности анализирани у даљем раду.



Слика 3.16. б) SALDI TOF масени спектри детектованих негативних јона молекула: L-аланин, L-цистеин, DL-метионин, глутатион, D-(+)-глюкоза, D-(+)-малтоза, β -циклодекстрин, рафиноза и арабиноза са једним од нанокристала TiO_2 са којим даје највећи број сигнала чије су S/N вредности анализирани у даљем раду.



Слика 3.17. а) SALDI TOF масени спектри детектованих позитивних јона следећих молекула: естрадиол, тестостерон, прогестерон, лимунска киселина, дексазон, витамин Е и витамин А са једним од нанокристала TiO_2 са којим даје највећи број сигнала чије су S/N вредности анализиране у даљем раду. За витамине су дати и спектри снимљени без матрице ради поређења, на слици су означени као „Витамин Е LDI“ и „Витамин А LDI“.



Слика 3.17. б) SALDI TOF масени спектри детектованих негативних јона следећих молекула: естрадиол, тестостерон, прогестерон, лимунска киселина, витамин Е и витамин А са једним од нанокристала TiO₂ са којим даје највећи број сигнала чије су S/N вредности анализиране у даљем раду. За витамине су дати и спектри снимљени без матрице ради поређења, на слици су означени као „Витамин Е LDI“ и „Витамин А LDI“.

Идентитети сигнала чији су односи m/z означени на спектрима на Сликама 3.16 и 3.17 дати су у Табелама 3.16 и 3.17.

Табела 3.16. Идентификовани сигнали детектованих молекула у SALDI TOF масеним спектрима: L-аланин, L-цистеин, DL-метионин, глутатион, D-(+)-глукоза, D-(+)-малтоза, β-циклодекстрин, рафиноза, арабиноза са нанокристалима TiO₂.

| Молекул Mm (g/mol) | Детектовани позитивни јони | | Детектовани негативни јони | |
|---------------------------|--|--|----------------------------|--|
| | m/z | Идентитет | m/z | Идентитет |
| L-аланин 89,1 | 90,1 112,1 128,2 | [M + H] ⁺ [M + Na] ⁺ [M + K] ⁺ | 88,1 | [M - H] ⁻ |
| L-цистеин 121,2 | 121,2 122,2 144,2 166,1 | [M] ⁺⁺ [M + H] ⁺ [M + Na] ⁺ [M - H + 2Na] ⁺ | 120,2 | [M - H] ⁻ |
| DL-метионин 149,2 | 150,2 172,2 188,3 194,2 | [M + H] ⁺ [M + Na] ⁺ [M + K] ⁺ [M - H + 2Na] ⁺ | 148,2 | [M - H] ⁻ |
| Глутатион 307,3 | 308,3 330,3 346,4 352,3 | [M + H] ⁺ [M + Na] ⁺ [M + K] ⁺ [M - H + 2Na] ⁺ | 306,3 | [M - H] ⁻ |
| D-(+)-глукоза 180,2 | 203,2 219,3 | [M + Na] ⁺ [M + K] ⁺ | 179,2 | [M - H] ⁻ |
| D-(+)-малтоза 342,3 | 365,3 | [M + Na] ⁺ | 222,0 | [глукозна j-на - CHO + 2Cl] ⁻ |
| β-циклодекстрин 1135,0 | 1158,0 1174,1 | [M + Na] ⁺ [M + K] ⁺ | 1134,0 | [M - H] ⁻ |
| Рафиноза 504,4 | 185,1 203,2 365,3 384,3 527,4 543,5 | [M - H ₂ O + Na] ⁺ [глукозна j-на + Na] ⁺ [малтозна j-на + Na] ⁺ [M - глукозна/фруктозна j-на - 2H + Na + K] ⁺⁺ [M + Na] ⁺ [M + K] ⁺ | 222,0 503,4 | [глукозна j-на - CHO + 2Cl] ⁻ [M - H] ⁻ |
| Ара, 150.1 | 173,1 189,2 | [M + K] ⁺ [M + K] ⁺ | 149,1 | [M - H] ⁻ |
| M – испитивани молекули. | | | | |

Табела 3.17. Идентитети детектованих сигнала на SALDI TOF масеним спектрима молекула: естрадиол, тестостерон, прогестерон, лимунска киселина, дексазон, витамин Е и витамин А са нанокристалима TiO_2 .

| Молекул Mm (g/mol) | Детектовани позитивни јони | | Детектовани негативни јони | |
|--|----------------------------------|---|----------------------------|---|
| | Израчуната маса (g/mol) | | Израчуната маса (g/mol) | |
| Естрадиол 272,4 | 407,6 423,6 439,7 | $[M + \text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{O} - \text{H}_2\text{O}]^{+*}$ $[M + \text{C}_9\text{H}_{22}\text{O} - \text{H}_2\text{O} + \text{Na}]^+$ $[M + \text{C}_9\text{H}_{22}\text{O} - \text{H}_2\text{O} + \text{K}]^+$ | 328,9 | $[M + \text{H}_2\text{O} + \text{K} + \text{Cl}]^*$ |
| Тестостерон 288,4 | 401,6 423,6 | $[M + \text{C}_8\text{H}_{18}\text{O} - \text{H}_2\text{O} + \text{H}]^+$ $[M + \text{C}_8\text{H}_{18}\text{O} - \text{H}_2\text{O} + \text{Na}]^+$ | 399,6 | $[M + \text{C}_8\text{H}_{18}\text{O} - \text{H}_2\text{O} - \text{H}]^-$ |
| Прогестерон 314,5 | 315,5 337,5 | $[M + \text{H}]^+$ $[M + \text{Na}]^+$ | 313,5 | $[M - \text{H}]^-$ |
| Лимунска киселина 192,1 | 133,1 193,1 215,1 237,1 | $[M + \text{H}^+ - \text{CH}_2\text{C}(\text{OH})_2]^+$ $[M + \text{H}]^+$ $[M + \text{Na}]^+$ $[M - \text{H} + 2\text{Na}]^+$ | 191,1 | $[M - \text{H}]^-$ |
| Дексазон 392,5 | 355,4 (355,5 399,5 | $[M - \text{COCH}_2\text{OH} - \text{H} + \text{Na}]^+$ $[M - \text{H}_2\text{O} - \text{F}]^-$ $[M - \text{OH} + \text{H} + \text{Na}]^+$ | — | |
| Витамин Е 402,7 | 402,7 | $[M]^{+*}$ | 401,6 | $[M - \text{H}]^-$ |
| Витамин А 328,5 | 269,5 328,5 | $[M - \text{CH}_3\text{COO}]^-$ $[M]^{+*}$ | 283,4 | $[\text{retinal} - \text{H}]^-$ |
| <i>M</i> – испитивани молекул. — Јони пореклом од молекула не могу да се детектују. | | | | |

L-цистеин и L-аланин није било могуће детектовати као позитивне јоне са супстратом TiO_2 ЕНЧ, али је могуће детектовати молекулски јон L-цистеина са TiO_2 НЧ-ама. Јони који се детектују углавном настају додатком протона, неорганских јона (натријума или калијума). Међутим, нарочито кад се користе супстрати/матрице које добро апсорбују у UV области спектра светлости постоји могућност детекције радикала - молекулских јона који настају као позитивни јони губитком електрона. Када се као супстрат користе TiO_2 НТ, као позитивни јони се детектују адукти аминокиселина са алкалним јонима, а као негативни јони се детектују депротонирани молекули аминокиселина (Табела 3.16). За детекцију негативних јона L-аланина сва три супстрата су погодна за коришћење. Ако се посматрају вредности односа S/N сигнала L-аланина са сва три супстрата, следећи поредак се може поставити идући од најнижег ка највишем интензитету сигнала: TiO_2 НЧ < TiO_2 ЕНЧ < TiO_2 НТ.

Натријумов адукт редукованог глутатиона се лако детектује са супстратима TiO_2 ЕНЧ и TiO_2 НТ, али није могуће детектовати сигнал када се као супстрат користи TiO_2 НЧ.

У литератури се истиче да је доминантан механизам јонизације у SALDI MS анализи аминокиселина катјонизација натријумовим катјоном, док се негативан јон добија одвајањем једног протона.¹⁸⁸ Претходно наведено је предност коришћене методе услед чињенице да су спектри знатно једноставнији за тумачење јер се не ствара производ између испитиваног молекула и матрице (супстрата). Генерално, веома је повољно уколико се, у гасној фази, у току јонизације не стварају кластери између молекула супстрата. У тим случајевима, спектри су једноставнији за анализу и идентификација сигнала је поузданија.

Јони који су пореклом од свих пет анализираних угљених хидрата се детектују са TiO_2 НТ-ама и као позитивни и као негативни јони. Арабиноза се детектује само са овим супстратом (TiO_2 НТ), док са другим супстратима није било сигнала. Супстрат TiO_2 НЧ је једино погодан за детекцију позитивних јона рафинозе. Укратко, сви анализирани угљени хидрати када се детектују као позитивни јони, детектују се као јони алкалних метала, $[\text{M} + \text{Na}]^+$ и $[\text{M} + \text{K}]^+$, а спектри негативних јона угљених хидрата су много једноставнији за тумачење и супстрат TiO_2 НТ је одличан избор. За већину угљених хидрата детектује се по један доминантан сигнал негативних јона. У масеним спектрима глукозе, β -циклодекстрина, рафинозе, арабинозе детектује се сигнал који настаје кад молекул изгуби један протон. Једини изузетак је сигнал негативног јона β -циклодекстрина, који је нешто слабијег интензитета у односу на сигнале негативних јона осталих анализираних угљених хидрата.

Хормони који су испитивани детектовани су као позитивни јони са супстратима TiO_2 ЕНЧ и TiO_2 НТ. Естрадиол, при тестираном концентрацији, није могао да се детектује са TiO_2 НЧ-ама. Слично томе, тестостерон и прогестерон се са TiO_2 НЧ-ама детектују са веома ниским интензитетима. Супротно томе, са TiO_2 НТ-ама као супстратом добијају се спектри негативних јона хормона високог квалитета (Слика 3.16.б). Са сва три супстрата TiO_2 детектују се само адукти естрадиола или тестостерона, њихови одговарајући фрагменти и адукти алкалних јона (Na^+ или K^+), док се прогестерон детектује као протонски или натријумов адукт.

Лимунска киселина се детектује са TiO_2 ЕНЧ-ама и TiO_2 НТ-ама, док са TiO_2 НЧ-ама нема сигнала. Доминантан сигнал лимунске киселине је натријумов адукт, било да су TiO_2 ЕНЧ коришћене као супстрат било да су коришћене TiO_2 НТ. При вишим концентрацијама лимунска киселина може да се детектује са TiO_2 НЧ-ама и у том случају могућа је детекција и протонског адукта.

Дексазон је детектован само као позитиван јон са TiO_2 НЧ-ама и TiO_2 ЕНЧ-ама и оба детектована сигнала су Na^+ адукти, сигнал на $m/z = 355,4$ и $399,5$ (погледати у Табели 3.16).

За разлику од свих осталих тестираних молекула витамини се детектују и методом ласерске десорпције и јонизације (LDI) и као позитивни и као негативни јони са сва три супстрата. Једини изузетак је детекција негативних јона са TiO_2 НЧ-ама, када није детектован ни један сигнал који се може идентификовати као јон пореклом од испитиваних витамина.

У поређењу са MALDI масеним спектрима испитиваних биолошких молекула, SALDI масени спектри са супстратима TiO_2 при детекцији негативних јона показују већу осетљивост. Позадински шум, који свакако настаје при детекцији позитивних јона са TiO_2 НТ-ама је веома ниског интензитета (Слика 3.16.а и 3.17.а), док се при детекцији негативних јона појављује јачи шум (Слика 3.16.б и 3.17.б).

Као што добијени подаци приказују, тестостерон, прогестерон, L-аланин, L-цистеин и рафиноза могу да се детектују са нанокристалима TiO_2 са задовољавајућим квалитетом детекције. Сигнали који су пореклом од узорка се јасно уочавају, S/N вредност сигнала је већи од 50 (то је вредност која је емпиријски одређена). Такође, на спектрима није изражен позадински шум.

3.2.2.2. Осетљивост SALDI TOF MS анализе

Осетљивост детекције се мери кроз минималну концентрацију сваког појединачног пара узорак/супстрат, која може да се детектује (граница детекције, *eng. limit of the detection* - LOD). Тако је за сваку комбинацију узорак/супстрат израчуната граница детекције. Калибрациона крива зависности S/N вредности за све анализиране молекуле у функцији од концентрације која је била у опсегу од 0,0002 до 112,0 mM. Вредности границе детекције и вредности линеарних опсега који се добијају при детекцији позитивних јона молекула: L-аланин, L-цистеин, DL-метионин, глутатион, D-(+)-глукоза, D-(+)-малтоза, β -циклодекстрин, рафиноза и арабиноза дати су у Табели 3.18, а за молекуле: естрадиол, тестостерон, прогестерон, лимунска киселина, дексазон, витамин Е и витамин А у Табели 3.19. У Табели 3.20 дате су вредности границе детекције и вредности линеарних опсега који се добијају при детекцији негативних јона за све анализиране молекуле. Коефицијент корелације (R^2) у линеарном опсегу је имао вредности од 0,636 до 0,999 при детекцији позитивних јона, а вредности од 0,759 до

0,999 при детекцији негативних јона. Већина вредности за коефицијент корелације је око 0,9, али је у појединим случајевима та вредност нижа. За већину молекула најбоље вредности за R^2 се постижу са супстратом TiO_2 ЕНЧ.

У Табели 3.21 су приказане вредности границе детекције и вредности линеарних опсега за позитивне и за негативне јоне за молекуле који су детектовани без присуства супстрата (матрице) LDI методом, за витамин Е и витамин А.

Табела 3.18. Граница детекције, линеарни опсези и коефицијенти корелације (R^2) за позитивне јоне са нанокристалима TiO_2 за: L-аланин, L-цистеин, DL-метионин, глутатион, D-(+)-глукоза, D-(+)-малтоза, β -циклодекстрин, рафиноза и арабиноза.

| Молекул | m/z | Граница детекције, mM | | | Линеарни опсег, mM | | | R ² | | |
|------------------------|--------|-----------------------|-------|-------|--------------------|-----------|-----------|----------------|-------|-------|
| | | НЧ | ЕНЧ | НТ | НЧ | ЕНЧ | НТ | НЧ | ЕНЧ | НТ |
| L-аланин | 90,1 | 2,81 | — | — | 0,6-56,1 | — | — | 0,993 | — | — |
| | 112,1 | 8,98 | 2,28 | 0,06 | 2,2-56,1 | 0,6-11,2 | 0,6-2,2 | 0,962 | 0,918 | 0,999 |
| | 128,2 | 11,02 | — | 0,55 | 0,6-56,1 | — | 0,6-2,2 | 0,899 | — | 0,917 |
| L-цистеин | 122,2 | 16,05 | — | 35,22 | 4,1-82,5 | — | 4,1-123,8 | 0,925 | — | 0,839 |
| | 144,2 | 4,22 | 26,62 | 0,69 | 4,1-41,3 | 8,3-123,8 | 4,1-16,5 | 0,981 | 0,908 | 0,997 |
| | 166,1 | — | — | 5,12 | — | — | 4,1-16,5 | — | — | 0,872 |
| DL-метионин | 150,2 | 1,39 | — | 0,10 | 6,7-33,5 | — | 0,3-3,4 | 0,998 | — | 0,998 |
| | 172,2 | 3,46 | 1,07 | 0,96 | 6,7-33,5 | 0,3-13,4 | 0,3-3,4 | 0,987 | 0,984 | 0,869 |
| | 188,3 | 1,61 | — | 0,78 | 6,7-33,5 | — | 0,3-3,4 | 0,997 | — | 0,910 |
| | 194,2 | — | 0,64 | 0,87 | — | 0,3-3,4 | 0,3-3,4 | — | 0,938 | 0,890 |
| Глутатион | 308,3 | 3,55 | — | 3,74 | 6,5-32,5 | — | 0,7-16,3 | 0,984 | — | 0,896 |
| | 330,3 | 5,43 | 0,09 | 0,32 | 3,3-32,5 | 3,3-16,3 | 0,2-1,6 | 0,952 | 0,999 | 0,937 |
| | 346,4 | 2,19 | 7,94 | 0,56 | 6,5-32,5 | 6,5-32,5 | 0,3-3,2 | 0,994 | 0,925 | 0,950 |
| D-(+)-глукоза | 203,1 | 4,85 | 0,42 | 0,57 | 5,6-55,5 | 0,3-2,8 | 0,3-5,6 | 0,986 | 0,960 | 0,978 |
| | 219,3 | 3,73 | 0,12 | 1,04 | 5,6-55,5 | 0,3-2,8 | 0,3-5,6 | 0,992 | 0,997 | 0,929 |
| D-(+)-малтоза | 365,3 | 7,75 | 0,08 | 0,84 | 5,6-27,8 | 0,1-2,8 | 0,1-2,8 | 0,935 | 0,968 | 0,881 |
| β -циклодекстрин | 1158,0 | 0,83 | — | 0,17 | 0,9-8,8 | — | * | 0,984 | — | * |
| | 1174,1 | 2,29 | — | 0,03 | 0,9-8,8 | — | * | 0,891 | — | * |
| Рафиноза | 185,1 | 3,34 | 0,04 | 0,03 | 1,0-9,9 | 0,1-0,4 | 0,1-0,4 | 0,908 | 0,988 | 0,994 |
| | 203,1 | 2,67 | 0,09 | 0,02 | 1,0-9,9 | 0,1-1,0 | 0,1-0,4 | 0,883 | 0,931 | 0,997 |
| | 365,3 | 17,73 | 0,22 | 0,70 | 9,9-39,7 | 0,1-1,0 | 0,1-0,4 | 0,637 | 0,921 | 0,957 |
| | 384,3 | — | 0,18 | 0,60 | — | 0,1-1,0 | 0,4-2,0 | — | 0,943 | 0,999 |
| | 527,4 | 10,97 | 0,24 | 0,70 | 9,9-39,7 | 0,1-1,0 | 0,1-0,4 | 0,821 | 0,907 | 0,962 |
| | 543,5 | 1,28 | 0,02 | 0,10 | * | 0,2-1,0 | 0,1-0,4 | * | 0,999 | 0,910 |
| Арабиноза | 173,1 | 4,9 | 0,70 | 0,57 | 0,3-33,3 | 0,3-6,7 | 0,3-3,3 | 0,941 | 0,977 | 0,960 |
| | 189,2 | 3,66 | 1,38 | 0,50 | 0,3-33,3 | 0,3-6,7 | 0,3-3,3 | 0,966 | 0,916 | 0,949 |

— Јони пореклом од молекула не могу да се детектују.
* Не може се израчунати на основи графика.

Табела 3.19. Граница детекције, линеарни опсези и коефицијенти корелације (R^2) за позитивне јоне детектоване са нанокристалима TiO_2 : естрадиол, тестостерон, прогестерон, лимунска киселина, дексазон, витамин Е и витамин А.

| Молекул | m/z | Граница детекције, mM | | | Линеарни опсег, mM | | | R^2 | | |
|-------------------|-------|-----------------------|--------|------|--------------------|--------------|-------------|-------|-------|-------|
| | | НЧ | ЕНЧ | НТ | НЧ | ЕНЧ | НТ | НЧ | ЕНЧ | НТ |
| Естрадиол | 407,6 | 3,11 | 6,12 | 0,45 | * | 0,3-41,0 | 0,3-1,6 | * | 0,955 | 0,866 |
| | 423,5 | 2,71 | 1,15 | 0,29 | * | 0,3-4,1 | 0,3-1,6 | * | 0,849 | 0,938 |
| | 439,7 | 3,05 | 1,48 | 0,30 | * | 0,3-8,2 | 0,3-1,6 | * | 0,925 | 0,936 |
| Тестостерон | 401,6 | 0,47 | — | 5,11 | * | — | 0,1-20,0 | * | — | 0,816 |
| | 423,6 | 5,28 | 0,31 | 2,35 | 0,5-50,0 | 0,04-2,0 | 2,0-20,0 | 0,974 | 0,927 | 0,987 |
| Прогестерон | 315,5 | 3,33 | 0,23 | 0,46 | 1,0-10,0 | * | 0,5-10,0 | 0,833 | * | 0,985 |
| | 337,5 | 2,80 | 2,15 | 0,46 | 0,5-10,0 | 0,5-10,0 | 0,5-10,0 | 0,837 | 0,910 | 0,985 |
| Лимунска киселина | 133,1 | 0,61 | 0,35 | 0,06 | 0,26-1,04 | 0,52-2,6 | 0,26-1,04 | 0,883 | 0,994 | 0,999 |
| | 192,1 | 0,04 | — | — | 0,26-1,04 | — | * | 0,999 | — | * |
| | 215,1 | 7,51 | 2,51 | 7,73 | 5,20-52,05 | 2,6-26,02 | 1,04-10,41 | 0,991 | 0,996 | 0,869 |
| | 238,1 | 0,33 | 41,03 | 5,48 | 0,26-1,04 | 5,20-52,05 | 0,26-10,41 | 0,962 | 0,780 | 0,884 |
| Дексазон | 355,4 | 0,18 | * | — | 1,02-5,10 | * | — | 0,999 | * | — |
| | 399,5 | 1,80 | * | — | 1,02-5,10 | * | — | 0,962 | * | — |
| Витамин Е | 402,7 | 0,2 | 0,0006 | 0,01 | 0,0002-0,005 | 0,0002-0,001 | 0,0002-0,05 | 0,903 | 0,877 | 0,898 |
| Витамин А | 269,5 | 0,02 | 0,06 | 0,14 | 0,06-0,30 | 0,01-0,61 | 0,06-0,61 | 0,999 | 0,993 | 0,976 |
| | 328,5 | — | 0,06 | 0,13 | — | 0,01-0,61 | 0,06-0,61 | — | 0,993 | 0,978 |

— Јони пореклом од молекула не могу да се детектују. * Не може се израчунати на основу графика.

Табела 3.20. Граница детекције, линеарни опсези и коефицијенти корелације (R^2) за све анализиране молекуле који су могли да се детектују са нанокристалима TiO_2 као негативни јони.

| Молекул | m/z | Граница детекције, mM | | | Линеарни опсег, mM | | | R^2 | | |
|-------------------|-------|-----------------------|-------|-------|--------------------|--------------|--------------|-------|-------|-------|
| | | НЧ | ЕНЧ | НТ | НЧ | ЕНЧ | НТ | НЧ | ЕНЧ | НТ |
| L-аланин | 88,1 | 0,55 | 1,88 | 0,26 | 0,6-5,6 | 0,6-5,6 | 0,6-2,2 | 0,983 | 0,829 | 0,981 |
| L-цистеин | 120,1 | 10,00 | 16,83 | 7,54 | 4,1-123,8 | 8,3-82,5 | 4,1-16,5 | 0,989 | 0,930 | 0,759 |
| DL-метионин | 148,2 | 3,12 | 0,36 | 0,23 | 6,7-33,5 | 0,3-3,4 | 0,3-1,3 | 0,997 | 0,979 | 0,958 |
| Глутатион | 306,3 | 6,10 | 1,02 | 0,02 | 6,5-48,8 | 3,3-16,3 | 0,2-1,6 | 0,969 | 0,995 | 0,999 |
| D-(+)-глукоза | 179,2 | 23,00 | 0,89 | 0,54 | 5,6-55,5 | 0,3-5,6 | 0,3-5,6 | 0,763 | 0,948 | 0,980 |
| D-(+)-малтоза | 222,0 | 12,95 | 0,45 | 0,11 | 2,8-41,6 | 0,1-2,8 | 0,1-2,8 | 0,826 | 0,962 | 0,998 |
| Рафиноза | 222,0 | 3,97 | 0,22 | 0,21 | 1,0-9,9 | 0,4-2,0 | 0,1-1,0 | 0,972 | 0,983 | 0,927 |
| | 503,4 | — | 0,08 | 0,73 | — | 0,4-2,0 | 0,4-2,0 | — | 0,998 | 0,842 |
| Арабиноза | 149,1 | 8,41 | 1,12 | 1,61 | 0,3-66,6 | 0,3-6,7 | 0,3-13,3 | 0,974 | 0,943 | 0,965 |
| Естрадиол | 328,9 | — | 6,64 | 0,36 | — | 0,3-41,0 | 0,3-1,6 | — | 0,921 | 0,909 |
| Тестостерон | 399,6 | — | 3,24 | 1,45 | — | 0,5-10,0 | 1,0-5,0 | — | 0,815 | 0,902 |
| Прогестерон | 313,5 | 0,82 | 0,77 | 0,20 | 1,0-5,0 | 0,5-20,0 | 0,5-5,0 | 0,967 | 0,987 | 0,997 |
| Лимунска киселина | 191,1 | 13,58 | 4,19 | 1,92 | 0,26-52,05 | 1,04-26,02 | 0,26-10,41 | 0,949 | 0,918 | 0,979 |
| Витамин Е | 401,6 | 0,4 | 0,001 | 0,003 | 0,001-0,23 | 0,0002-0,004 | 0,0002-0,007 | 0,891 | 0,961 | 0,889 |
| Витамин А | 283,4 | 0,2 | 0,01 | 0,005 | 0,15-1,51 | 0,01-0,15 | 0,01-0,03 | 0,997 | 0,996 | 0,985 |

— Јони пореклом од молекула не могу да се детектују.

Табела 3.21. Граница детекције, линеарни опсеги и коефицијенти корелације (R^2) за позитивне и негативне јоне витамина Е и витамина А који су снимљени без присуства матрице методом ласерске десорпције и јонизације (LDI).

| Молекул | Јони | m/z | Граница детекције mM | Линеарни опсег mM | R^2 |
|--|------|-------|----------------------|-------------------|-------|
| Витамин Е | + | 402,7 | 0,17 | 0,06-0,03 | 0,840 |
| | - | 401,6 | * | * | * |
| Витамин А | + | 269,5 | 0,17 | 0,06-0,3 | 0,839 |
| | | 328,5 | 0,74 | 0,15-0,6 | 0,636 |
| | - | 283,4 | 0,1 | 0,01-0,61 | 0,981 |
| * Не може се израчунати на основу графика. | | | | | |

За детектоване позитивне јоне (Табеле 3.18 и 3.19) минималне вредности за границу детекције за L-аланин, арабинозу, β -циклодекстрин, L-цистеин, естародиол, глутатион, DL-метионин, прогестерон и рафинозу се постижу са TiO_2 НТ-ама у опсегу концентрација од 0,02 до 0,69 mM. TiO_2 ЕНЧ дају минималне вредности границе детекције са глукозом, глутатионом, метионином, прогестероном и рафинозом у опсегу од 0,02 до 0,64 mM. Осетљивост детекције ових молекула може се повећати са модификованим нанокристалима, као што су катехином модификоване наночестице TiO_2 , што је већ раније рађено.¹²⁹ Међутим, модификација знатно повећава цену супстрата који се користи, а самим тим и анализе, а свакако је један од циљева што јефтинија метода.

Због слабије јонизационе ефикасности цистеина и хомоцистеина у односу на глутатион и већег позадинског шума у областима мањих молекулских маса ($m/z < 200$), цистеин има више вредности границе детекције од глутатиона, као што је показано у раду,¹⁶⁹ овакав податак је потврђен и у овој докторској дисертацији са свим коришћеним нанокристалима TiO_2 .

TiO_2 НЧ су најпогоднији супстрат за детекцију прогестерона и L-аланина, вредности границе детекције су 0,82 и 0,55 mM, редом.

Најнижа вредност концентрације за детекцију лимунске киселине добијена је када је коришћен супстрат TiO_2 НТ за масеноспектрометријску детекцију (граница детекције је 0,06 mM). Код детекције дексазона једино TiO_2 НЧ као супстрат дају линеарну калибрациону криву у опсегу од 1,02 до 5,10 mM где је доња граница детекције 0,18 mM, са осталим супстратима калибрационе криве нису линеарне.

Витамици су једини молекули, од свих испитиваних, који се детектују без присуства матрице (LDI методом), али су вредности доње границе детекције неколико пута ниже

када се користе нанокристали TiO_2 као супстрати (у SALDI методи), што нас упућује на појачавајући ефекат супстрата TiO_2 . Витамин Е са TiO_2 ЕНЧ-ама има вредност границе детекције 0,0006 mM, а витамин А са TiO_2 НЧ-ама има вредност границе детекције 0,02 mM. Повећана осетљивост детекције витамина са нанокристалима TiO_2 може да буде резултат ниског броја сигнала који потичу од супстрата у области маса у којој се налази анализирани молекули. Такође, на интензитет сигнала утиче и појачана јонизација узорка уз помоћ супстрата. Процес јонизације може бити олакшан процесом трансфера електрона са супстрата на узорак. То може бити разлог због ког се анализирани молекули лако детектују као негативни јони. Сличне појаве су већ описане у литератури, што је показано на примеру MALDI TOF анализе лизофосфолипида различитих липида као што су фосфатидилхолин, фосфатидилетаноламин, фосфатидилсерин, фосфатидна киселина и фосфатидилинитол, као и анализе њихове смеше која је лизирана са фосфолипазом A_2 .⁴³

Већина анализираних молекула се детектује као негативни јони (Слика 3.18) са супстратима TiO_2 ЕНЧ и TiO_2 НТ и тада се добијају најниже вредности границе детекције. Најниже вредности се добијају са TiO_2 НТ-ама у опсегу од 0,003 mM (за витамин Е) до 7,54 mM (за L-цистеин).

3.2.2.3. Хомогеност дистрибуције узорка/супстрата на плочи при SALDI приступу

У литератури је већ истакнуто да се између MALDI масених спектра истог узорка примећују знатне варијације у погледу нивоа позадинског шума, базне линије и интензитета сигнала. Да би се варијације свеле на минимум научници прибегавају снимању великог броја спектра и то са различитих места на MALDI плочи. Спектри се затим усредњавају да би се добио репрезентативнији спектар, као што је рађено при анализи стероидних хормона кортизона, хидрокортизона, прогестерона и тестостерона, SALDI масеном спектрометријом у присуству наночестица TiO_2 које су биле модификоване катехином. Упросечавањем спектра у овом раду постигнута је добра репродукцибилност мерења.¹²⁹ Хомогеност ко-кристала узорка/матрице при MALDI приступу и дистрибуција узорка на површини супстрата у SALDI приступу, дефинишу репродукцибилност и прецизност мерења.^{21,42} Значајна варирања интензитета MALDI сигнала при поновљеној анализи истог узорка могу бити последица и нехомогеног наношења узорка на плочу и хетерогености циљане површине. Други разлог

произилази из инструментације, као што је промена интензитета ласера заједно са флукуацијама одговора детектора.

У следећем сету експеримената тестирана је хомогеност система за потенцијалну квантитативну примену. Једно место на SALDI плочи на ком се налазила одређена комбинација узорка/супстрата је подељено на осам делова (сектора - S), као што је илустровано на слици (Слика 2.1. Експериментални део). Сваки сектор је ексцитован 120 пута ласером (укупно 960 по једном месту на SALDI плочи на ком се налазила одређена комбинација узорка/супстрата), а свака комбинација узорка/супстрата је мерена три пута. Исти поступак је понављан током три дана. Средња вредност коефицијента варијације (релативна стандардна девијација – РСД, изражена у %) је израчуната из осам вредности S/N са девет понављања током три дана и тако за сваку комбинацију узорка/супстрата и при детекцији позитивних и при детекцији негативних јона. Ове вредности осликавају меру хомогености за различите комбинације узорка/супстрата и приказане су за позитиване јоне молекула: L-аланин, L-цистеин, DL-метионин, глутатион, D-(+)-глукоза, D-(+)-малтоза, β-циклодекстрин, рафиноза, арабиноза у Табели 3.22, а за молекуле: естрадиол, тестостерон, прогестерон, лимунска киселина, дексазон, витамин Е и витамин А у Табели 3.23 . У Табели 3.24 дате су вредности за све анализиране молекуле када су детектовани као негативни јони.

У Табели 3.25 су приказане вредности за хомогеност узорака позитивних и негативних јона молекула који су детектовани без присуства супстрата (матрице), LDI методом, за витамин Е и витамин А.

Табела 3.22. Хомогеност узорка: L-аланин, L-цистеин, DL-метионин, глутатион, D-(+)-глукоза, D-(+)-малтоза, β-циклодекстрин, рафиноза, арабиноза са нанокристалима TiO₂ на SALDI плочи за позитивне јоне.

| Молекул | m/z | РСД, % | | |
|-----------------|--------|-----------|-----------|------------|
| | | НЧ | ЕНЧ | НТ |
| L-аланин | 90,1 | 10,6-24,2 | — | — |
| | 112,1 | 9,5-17,1 | — | 5,5- 17,5 |
| | 128,2 | 10,9-17,1 | — | 14,0- 25,2 |
| L-цистеин | 121,2 | 9,7-38,8 | — | — |
| | 144,2 | 5,7-27,3 | — | 31,8- 21,7 |
| | 166,1 | — | — | 11,3- 34,0 |
| DL-метионин | 172,2 | — | 6,6- 14,7 | 5,9- 38,9 |
| | 188,3 | — | / | 5,4- 27,9 |
| | 194,2 | — | 6,4-18,6 | 7,1- 48,5 |
| Глутатион | 308,3 | — | 7,2-38,8 | — |
| | 330,3 | — | 11,5-78,4 | 6,2-17,6 |
| | 346,4 | — | — | 8,2-31,01 |
| D-(+)-глукоза | 203,2 | — | 3,3-20,9 | 14,4-45,3 |
| | 219,3 | — | — | 11,1-56,7 |
| D-(+)-малтоза | 365,3 | — | 6,0-17,4 | 9,8-28,1 |
| β-циклодекстрин | 1158,0 | — | 9,1- 17,8 | 17,8-48,1 |
| | 1174,1 | — | — | 11,3-54,5 |
| Рафиноза | 185,1 | — | 5,4- 23,1 | 16,1-65,5 |
| | 203,2 | 21,3-57,2 | 6,4- 25,1 | 23,9-65,2 |
| | 365,3 | 32,3-74,8 | 5,4- 12,6 | 5,3-29,4 |
| | 384,3 | — | 4,4- 18,2 | — |
| | 527,4 | 32,3-62,8 | 7,7- 14,8 | 9,8-30,7 |
| Арабиноза | 543,5 | 29,6-58,2 | — | 18,8-49,9 |
| | 173,1 | — | — | 8,2- 26,4 |
| | 189,2 | — | — | 18,4- 39,3 |

— Јони пореклом од молекула не могу да се детектују.

Табела 3.23. Мера хомогености узорка: естрадиол, тестостерон, прогестерон, лимунска киселина, дексазон, витамин Е и витамин А са нанокристалима TiO_2 на SALDI плочи за позитивне јоне.

| Молекул | m/z | РСД, % | | |
|--|-------|------------|-----------|------------|
| | | НЧ | ЕНЧ | НТ |
| Естрадиол | 407,6 | — | 9,1-21,3 | 10,4-18,7 |
| Тестостерон | 401,6 | 20,3-61,3 | — | 27,3- 45,8 |
| | 423,6 | 22,1-56,5 | 6,0- 16,3 | 13,2-27,8 |
| Прогестерон | 315,5 | 59,6-107,0 | — | — |
| | 337,5 | 65,0-94,0 | 7,9- 21,9 | 11,3-24,2 |
| Лимунска киселина | 133,1 | — | 5,4-14,8 | — |
| | 215,1 | — | 8,8-33,7 | 16,4-39,1 |
| | 238,1 | — | 8,8-43,6 | — |
| Дексазон | 355,4 | — | 9,4-19,8 | — |
| | 399,5 | 22,0-38,8 | 5,5-19,9 | — |
| Витамин Е | 402,7 | 14,1-41,0 | 25,6-69,9 | 28,3-56,5 |
| Витамин А | 269,5 | 14,2-39,3 | 12,5-35,0 | 8,1-23,9 |
| | 328,5 | — | 9,5-49,3 | 15,2-43,8 |
| — Јони пореклом од молекула не могу да се детектују. | | | | |

Табела 3.24. Мера хомогености узорка за негативне јоне свих анализираних молекула на SALDI плочи који су могли да се детектују са нанокристалима TiO_2 .

| Молекул | m/z | РСД, % | | |
|--|-------|----------|-----------|------------|
| | | НЧ | ЕНЧ | НТ |
| L-аланин | 88,1 | 3,8-13,5 | — | 5,0-27,3 |
| L-цистеин | 120,2 | — | — | 6,5-19,8 |
| DL-метионин | 148,2 | — | 8,9-17,2 | 11,0-29,3 |
| Глутатион | 306,3 | — | — | 16,5-27,8 |
| D-(+)-глукоза | 179,2 | — | — | 14,2-25,1 |
| D-(+)-малтоза | 222,0 | — | — | 6,3-37,1 |
| Рафиноза | 222,0 | — | 6,3-14,6 | 14,4-32,7 |
| | 503,4 | — | 12,6-33,2 | 26,8-63,0 |
| Арабиноза | 149,1 | — | — | 16,8-41,8 |
| Естрадиол | 328,9 | — | 5,3-27,3 | 11,0-30,8 |
| Тестостерон | 399,6 | — | — | 16,5-34,0 |
| Прогестерон | 313,5 | — | — | 18,6- 36,1 |
| Лимунска киселина | 191,1 | — | 3,4-17,5 | 8,3-25,5 |
| Витамин Е | 401,6 | — | 22,7-68,2 | 25,6-67,6 |
| Витамин А | 283,4 | 9,5-29,9 | 5,6-48,1 | 9,1-28,5 |
| — Јони пореклом од молекула не могу да се детектују. | | | | |

Табела 3.25. Мера хомогености узорка на SALDI плочи за позитивне и негативне јоне витамина Е и витамина А који су снимљени без присуства супстрата.

| Молекул | Јони | m/z | РСД, % |
|-----------|------|-------|-----------|
| Витамин Е | + | 402,7 | 40,3-58,6 |
| | - | 401,6 | 23,2-52,5 |
| Витамин А | + | 269,5 | 25,0-69,4 |
| | - | 328,5 | 22,5-66,3 |
| | - | 283,4 | 27,7-80,0 |

Најбоља хомогеност детектованих позитивних јона се постиже са супстратом TiO_2 ЕНЧ, већина вредности релативних стандардних девијација (РСД) је била око 20 %. Најниже вредности РСД-е, па тако и најбоља хомогеност, са TiO_2 ЕНЧ-ама су постигнуте са нпр. D-(+)-гукозом ($m/z = 203,2$), рафинозом ($m/z = 384,3$), лимунском киселином ($m/z = 133,1$) и дексазоном ($m/z = 399,5$), где су вредности биле у опсегу од 3,3 до 20,9 %, 4,4 до 18,2 %, 5,4 до 14,8 % и од 5,5 до 19,9 %, редом. За глутатион најбоља вредност РСД-е се добија када се користе TiO_2 НТ као супстрат, у опсегу су од 6,2 до 17,6 %. Супстрат TiO_2 НЧ дају најлошије вредности РСД-е, па самим тим и најлошију хомогеност, али се показало да постоје изузеци: L-аланин ($m/z = 112,1$) и L-цистеин ($m/z = 144,2$) где су вредности РСД-е у опсегу од 9,5 до 17,1 % и 5,7 до 27,3 %, редом.

Највећи број молекула могу да се детектују као негативни јони са супстратом TiO_2 НТ, (Табела 3.24) о чему је већ било речи. Међутим, шест молекула који могу да се детектују са TiO_2 ЕНЧ-ама, имају бољу хомогеност него са друга два нанокристала: DL-метионин ($m/z = 148,2$, РСД 8,9-17,2 %), рафиноза ($m/z = 222,0$, РСД 6,3-14,6 %), естрадиол ($m/z = 328,9$, РСД 5,3-27,3 %), лимунска киселина ($m/z = 191,1$, РСД 3,4-17,5 %), витамин Е ($m/z = 401,6$, РСД 22,7-68,2 %) и витамин А ($m/z = 283,4$, РСД 5,6-48,1 %). Са супстратом TiO_2 НЧ су детектовани само L-аланин и витамин Е, и у том случају L-аланин ($m/z = 88,1$) има најбољу хомогеност (3,8-13,5%).

Детекција негативних јона у MALDI TOF масеној спектрометрији је много мање осетљива него што је код SALDI TOF масене спектрометрије. Органска матрица сама по себи када се детектују негативни јони даје велики број сигнала, па је детекција молекула малих маса знатно отежана.⁴³

Спектри позитивних јона витамина Е показују слабу хомогеност и репродукцибилност сигнала са свим анализираним супстратима, али овако добијене вредности показују ниже варијације од вредности које су добијене LDI методом. При LDI методи вредности РСД-е су у опсегу од 40,3 до 58,6 %, а са супстратом TiO_2 НЧ

репродуцибилност мерења је значајно унапређена, вредности РСД-е су у опсегу од 14,1 до 41,0 %. За разлику од витамина Е, витамин А показује веома добру хомогеност са сва три супстрата и када се користи LDI метод. Јасно побољшање хомогености се постиже са сва три супстрата у поређењу са LDI методом. Вредности РСД-е добијене LDI методом су у опсегу од 25,0 до 69,4 %, а са TiO₂ НТ-ама су у опсегу од 8,1 до 23,9 %.

За негативне јоне витамина Е не постоји значајна разлика када се спектри снимају без присуства супстрата и са супстратима. У сваком случају вредности РСД-е су готово исте, доња граница је око 20 %, а горња граница око 60 %. За негативне јоне витамина А најбоља хомогеност се добија са TiO₂ НЧ-ама и TiO₂ ЕНЧ-ама: од 9,5 до 29,2% и од 5,6 до 48,1%, редом. Хомогеност је значајно унапређена у односу на LDI метод где су вредности РСД-а у опсегу од 27,2 до 80,0 %.

3.2.2.4. Прецизност методе; Поновљивост и унутрашња прецизност

Како би се испитао потенцијал система за квантитативну, рутинску анализу, у наредном делу доктората поређене су прецизности мерења. Да би се доказало претходно наведено израчуната је прецизност унутар једног дана и поновљивост мерења између дана, као и одговарајуће F-вредности које се израчунавају помоћу анализе варијанси. Тако добијене вредности параметра F се пореде са F критичном вредности која се одређује на основу броја података из стандардних статистичких таблица које показују горње критичне вредности F расподеле за једнострани F тест са степеном прецизности 95 %, $\alpha = 0,05$. Резултати су приказани у Табелама 3.26. и 3.27 за позитивне јоне, у Табели 3.28 за негативне јоне и у Табели 3.29 за мерења у којима није коришћена матрица ни супстрата.

Табела 3.26. Прецизност унутар једног дана (*Within Day variability*) и поновљивост мерења између дана (*Day-to-day variability*) и одговарајуће *F*-вредности позитивних јона: *L*-аланин, *L*-цистеин, *DL*-метионин, глутатион, *D*-(+)-глукоза, *D*-(+)-малтоза, β -циклодекстрин, рафиноза, арабиноза са нанокристалима TiO_2 .

| Молекул | <i>m/z</i> | ANOVA <i>Day-to-day</i> , % | | | ANOVA <i>Within Day</i> , % | | | F <i>F</i> _{crit 5,143} | | |
|------------------------|------------|--------------------------------|------|------|--------------------------------|------|------|-------------------------------------|------|------|
| | | НЧ | ЕНЧ | НТ | НЧ | ЕНЧ | НТ | НЧ | ЕНЧ | НТ |
| L-аланин | 90,1 | 4,1 | — | — | 28,0 | — | — | 0,9 | — | — |
| | 112,1 | 9,7 | — | 2,4 | 26,2 | — | 7,5 | 0,6 | — | 1,3 |
| | 128,2 | 11,7 | — | 27,3 | 27,2 | — | 7,0 | 0,4 | — | 46,5 |
| L-цистеин | 121,2 | 14,2 | — | — | 34,6 | — | — | 1,5 | — | — |
| | 144,2 | 16,2 | — | 4,5 | 32,6 | — | 20,1 | 0,3 | — | 0,9 |
| | 166,1 | — | — | 7,3 | — | — | 20,8 | — | — | 0,6 |
| DL-метионин | 172,2 | — | 13,4 | 9,4 | — | 13,8 | 12,6 | — | 3,9 | 2,7 |
| | 188,3 | — | — | 16,3 | — | — | 13,5 | — | — | 5,4 |
| | 194,2 | — | 30,2 | 21,1 | — | 5,3 | 13,2 | — | 98,1 | 8,6 |
| Глутатион | 308,3 | — | 33,1 | — | — | 27,6 | — | — | 5,1 | — |
| | 330,3 | — | 45,4 | 6,4 | — | 62,0 | 12,2 | — | 2,6 | 0,2 |
| | 346,4 | — | — | 29,0 | — | — | 20,7 | — | — | 6,9 |
| D-(+)-глукоза | 203,2 | — | 5,7 | 18,2 | — | 10,2 | 25,9 | — | 0,0 | 2,5 |
| | 219,3 | — | — | 8,0 | — | — | 23,9 | — | — | 1,3 |
| D-(+)-малтоза | 365,3 | — | 4,9 | 18,3 | — | 9,9 | 13,0 | — | 0,3 | 7,0 |
| β -циклодекстрин | 1158,0 | — | 12,3 | 16,5 | — | 22,0 | 32,2 | — | 1,3 | 0,2 |
| | 1174,1 | — | — | 35,9 | — | — | 29,6 | — | — | 5,4 |
| Рафиноза | 185,1 | — | 18,9 | 18,7 | — | 16,3 | 38,6 | — | 5,0 | 0,3 |
| | 203,2 | 39,0 | 14,0 | 19,4 | 43,9 | 11,5 | 34,7 | 3,4 | 5,4 | 0,1 |
| | 365,3 | 22,5 | 14,1 | 5,8 | 53,5 | 2,7 | 16,6 | 1,5 | 81,3 | 0,6 |
| | 384,3 | — | 13,5 | — | — | 9,0 | — | — | 7,7 | — |
| | 527,4 | 25,5 | 11,0 | 6,6 | 57,8 | 7,7 | 16,2 | 1,6 | 7,0 | 0,5 |
| Арабиноза | 543,5 | 24,7 | — | 24,3 | 36,6 | — | 31,3 | 2,4 | — | 2,8 |
| | 173,1 | — | — | 16,7 | — | — | 8,9 | — | — | 11,5 |
| | 189,2 | — | — | 18,6 | — | — | 26,3 | — | — | 2,5 |

— Јони пореклом од молекула не могу да се детектују.

Табела 3.27. Прецизност унутар једног дана (*Within Day variability*) и поновљивост мерења између дана (*Day-to-day variability*) и одговарајуће *F*-вредности позитивних јона: естрадиол, тестостерон, прогестерон, лимунска киселина, дексазон, витамин Е и витамин А са нанокристалима TiO_2 .

| Молекул | <i>m/z</i> | ANOVA <i>Day-to-day, %</i> | | | ANOVA <i>Within Day, %</i> | | | F <i>F_{crit} 5,143</i> | | |
|----------------------|------------|-------------------------------|------|------|-------------------------------|------|------|------------------------------------|-------|------|
| | | НЧ | ЕНЧ | НТ | НЧ | ЕНЧ | НТ | НЧ | ЕНЧ | НТ |
| Естрадиол | 407,6 | — | 7,4 | 8,1 | — | 13,3 | 14,5 | — | 1,9 | 0,1 |
| Тестостерон | 401,6 | 26,4 | — | 33,5 | 53,5 | — | 13,9 | 0,3 | — | 18,5 |
| | 423,6 | 17,3 | 12,9 | 10,1 | 33,0 | 2,1 | 7,0 | 0,2 | 115,6 | 7,3 |
| Прогестерон | 315,5 | 19,6 | — | — | 36,6 | — | — | 1,9 | — | — |
| | 337,5 | 58,4 | 20,5 | 8,8 | 101,3 | 9,7 | 11,4 | 0,0 | 14,5 | 2,8 |
| Лимунска киселина | 133,1 | — | 5,0 | — | — | 9,6 | — | — | 0,18 | — |
| | 215,1 | — | 20,5 | 45,0 | — | 10,9 | 21,7 | — | 11,7 | 13,9 |
| | 238,1 | — | 19,5 | — | — | 18,4 | — | — | 4,4 | — |
| Дексазон | 355,4 | — | 30,0 | — | — | 7,8 | — | — | 44,8 | — |
| | 399,5 | 7,4 | 41,2 | — | 21,4 | 8,8 | — | 0,6 | 66,2 | — |
| Витамин Е | 402,7 | 12,9 | 17,8 | 20,5 | 20,2 | 32,7 | 30,3 | 2,2 | 1,9 | 2,4 |
| Витамин А | 269,5 | 18,0 | 3,8 | 11,3 | 14,4 | 26,9 | 24,8 | 5,7 | 0,9 | 0,4 |
| | 328,5 | — | 86,3 | 31,1 | — | 48,1 | 56,2 | — | 10,7 | 0,08 |

— Јони пореклом од молекула не могу да се детектују.

Табела 3.28. Прецизност унутар једног дана (*Within Day variability*) и поновљивост мерења између дана (*Day-to-day variability*) и одговарајуће *F*-вредности негативних јона свих анализираних молекула који су могли да се детектују са нанокристалима TiO_2 .

| Молекул | <i>m/z</i> | ANOVA <i>Day-to-day, %</i> | | | ANOVA <i>Within Day, %</i> | | | F <i>F_{crit} 5,143</i> | | |
|-------------------|------------|-------------------------------|------|------|-------------------------------|------|------|------------------------------------|------|------|
| | | НЧ | ЕНЧ | НТ | НЧ | ЕНЧ | НТ | НЧ | ЕНЧ | НТ |
| L-аланин | 88,1 | 3,7 | — | 10,0 | 2,9 | — | 7,3 | 6,0 | — | 6,7 |
| L-цистеин | 120,2 | — | — | 7,9 | — | — | 9,7 | — | — | 3,0 |
| DL-метионин | 148,2 | — | 15,9 | 9,8 | — | 9,1 | 11,3 | — | 10,2 | 3,2 |
| Глутатион | 306,3 | — | — | 5,7 | — | — | 21,5 | — | — | 1,2 |
| D-(+)-глукоза | 179,2 | — | — | 21,6 | — | — | 14,1 | — | — | 8,0 |
| D-(+)-малтоза | 222,0 | — | — | 26,3 | — | — | 25,3 | — | — | 4,3 |
| Рафиноза | 222,0 | — | 7,8 | 6,0 | — | 5,2 | 10,4 | — | 7,7 | 0,0 |
| | 503,4 | — | 3,7 | 16,7 | — | 10,5 | 30,3 | — | 1,4 | 0,1 |
| Арабиноза | 149,1 | — | — | 5,9 | — | — | 30,0 | — | — | 1,1 |
| Естрадиол | 328,9 | — | 14,7 | 28,0 | — | 7,2 | 15,2 | — | 13,6 | 11,2 |
| Тестостерон | 399,6 | — | — | 35,8 | — | — | 18,3 | — | — | 12,5 |
| Прогестерон | 313,45 | — | — | 20,0 | — | — | 16,1 | — | — | 5,6 |
| Лимунска кеселина | 191,1 | — | 18,5 | 22,2 | — | 4,5 | 15,6 | — | 46,4 | 7,1 |
| Витамин Е | 401,6 | — | 45,9 | 29,2 | — | 26,1 | 22,6 | — | 10,3 | 6,0 |
| Витамин А | 283,4 | 41,6 | 37,8 | 15,2 | 7,6 | 6,9 | 14,2 | 89,7 | 91,4 | 4,5 |

— Јони пореклом од молекула не могу да се детектују.

Табела 3.29. Прецизност унутар једног дана (*Within Day variability*) и поновљивост мерења између дана (*Day-to-day variability*) и одговарајуће *F*-вредности детектованих позитивних и негативних јона витамина Е и витамина А који су снимљени без присуства супстрата TiO_2 .

| Молекул | Јони | <i>m/z</i> | ANOVA | ANOVA | F |
|-----------|------|------------|----------------------|----------------------|-------------------------------|
| | | | <i>Day-to-day, %</i> | <i>Within Day, %</i> | <i>F_{crit} 5,143</i> |
| Витамин Е | + | 402,7 | 8,0 | 16,2 | 1,7 |
| | - | 401,6 | 22,8 | 18,3 | 5,6 |
| Витамин А | + | 269,5 | 70,6 | 35,3 | 13,0 |
| | - | 328,5 | 40,0 | 36,4 | 4,6 |
| | - | 283,4 | 70,3 | 45,6 | 8,1 |

У случајевима у којима је израчуната *F* вредност већа од *F* критичне вредности ($F_{crit} = 5,143$) варијације између дана су веће од варијација унутар једног дана. Ово је случај код нпр. детектованих позитивних јона: L-аланина ($m/z = 128,2$) и арабинозе ($m/z = 173,1$) са TiO_2 НТ-ама, DL-метионина ($m/z = 194,2$), лимунске киселне ($m/z = 215,1$) и тестостерона ($m/z = 423,6$) са супстратима TiO_2 НТ и TiO_2 ЕНЧ, дексазона ($m/z = 355,4$ и $m/z = 399,5$) са TiO_2 ЕНЧ-ама и витамина А ($m/z = 269,5$) код LDI методе и са TiO_2 НЧ-ама. Парови код којих је израчуната *F* вредност већа од *F* критичне вредност за негативне јоне су нпр: L-аланин ($m/z = 88,1$) и глукоза ($m/z = 179,2$) са TiO_2 НТ-ама, DL-метионин ($m/z = 148,2$) и рафиноза ($m/z = 222,0$) са TiO_2 ЕНЧ-ама.

Под примењеним експерименталним условима варијације унутар једног дана за већину анализираних парова узорак/супстрат су биле веома задовољавајуће (мање од 10 %), што је упоредива вредност са литературним подацима.^{102,129,169} Најбоља прецизност, судећи по вредностима варијација, унутар једног дана добијена је при детекцији позитивних јона: тестостерон ($m/z = 423,6$)/ TiO_2 ЕНЧ и рафиноза ($m/z = 365,3$)/ TiO_2 ЕНЧ, где су вредности РСД-е 2,1 % и 2,7 %, редом. Може се рећи да су за детекцију позитивних јона најниже вредности за варијације унутар једног дана, за највећи број парова узорак/супстрат, постигнуте са TiO_2 ЕНЧ-ама. За витамине Е и А најниже вредности су постигнуте са TiO_2 НЧ-ама, али витамин Е има најнижу вредност варијације унутар једног дана када је снимљен без супстрата, тада је вредност РСД-е износила 16,2 %.

Најниже вредности варијације унутар дана добијене су при детекцији негативних јона L-аланин ($m/z = 88,1$) са TiO_2 НЧ, вредност РСД-е је 2,9%.

Најниже вредности варијације између дана детектованих позитивних јона за већину парова узорак/супстрат су постигнуте, као и у случају варијација унутар једног дана, са супстратом TiO_2 ЕНЧ, где су већина вредности РСД-е ниже од 25 %, пример су лимунска

киселина и витамин А где су РСД-е вредности биле 5,0 % и 3,8 %, редом. Оваква поновљивост је одлична и такође је у сагласности са подацима у литератури, као што је пример детекције стероидних хормона са наночестицама TiO_2 које су претходно модификоване са катехином где су варијације биле мање од 15 %, $n = 7$.¹²⁹ TiO_2 НТ као потенцијални супстрат за квантитативну анализу позитивних јона молекула даје минималне вредности варијација између дана, али само за поједине молекуле. Варијације за неке од анализираних молекула са TiO_2 НТ-ама су биле ниже од 10 % нпр: рафиноза ($m/z = 365,3$), L-аланин ($m/z = 112,1$) су имале вредности РСД-е 5,8 % и 2,4 %, редом, а за остале молекуле вредности РСД-е су биле око 20 %. Сличне вредности су приказане и у литератури где су варијације унутар дана биле ниже од 10 %, док су варијације између дана биле мање од 15 % за три серије (у свакој по 50 понављања - тачака које су ексцитоване ласером).¹⁰² Резултати показују и да је супстрат TiO_2 НТ потенцијално веома користан супстрат за детекцију и одређивање аминокиселина.

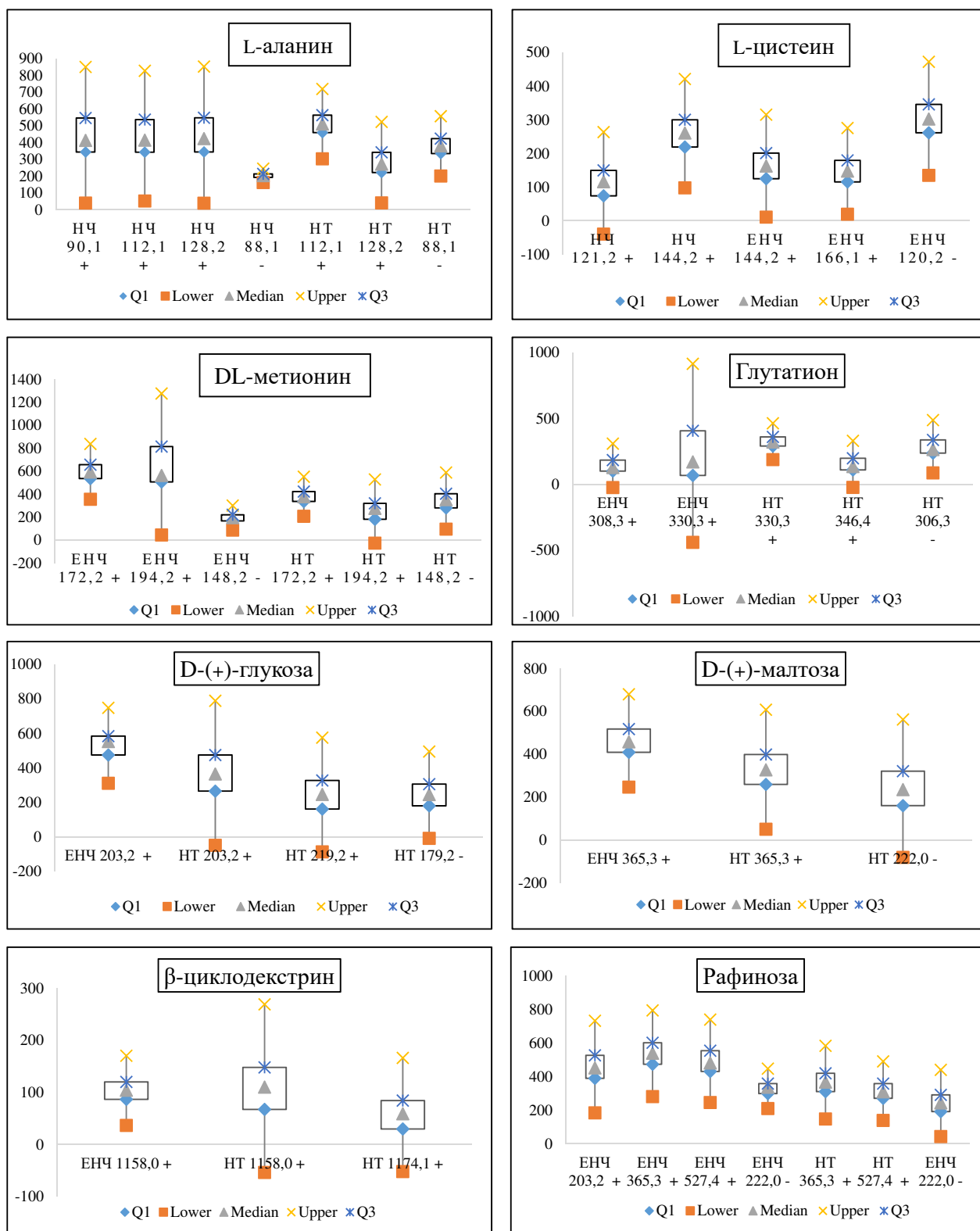
Најниже вредности варијација између дана за детектоване негативне јоне су постигнуте са TiO_2 НТ-ама са молекулима: глутатион ($m/z = 306,3$) - РСД 5,7%, арабиноза ($m/z = 149,1$) - РСД 5,9% и рафиноза ($m/z = 222,0$) - РСД 6,0%. L-аланин, поред витамина А, је једини детектован негативан јон са TiO_2 НЧ-ама и има изузетно ниску вредност варијација између дана, РСД је 3,7 %.

3.2.2.5. *Box and Whiskers* дијаграми при SALDI приступу

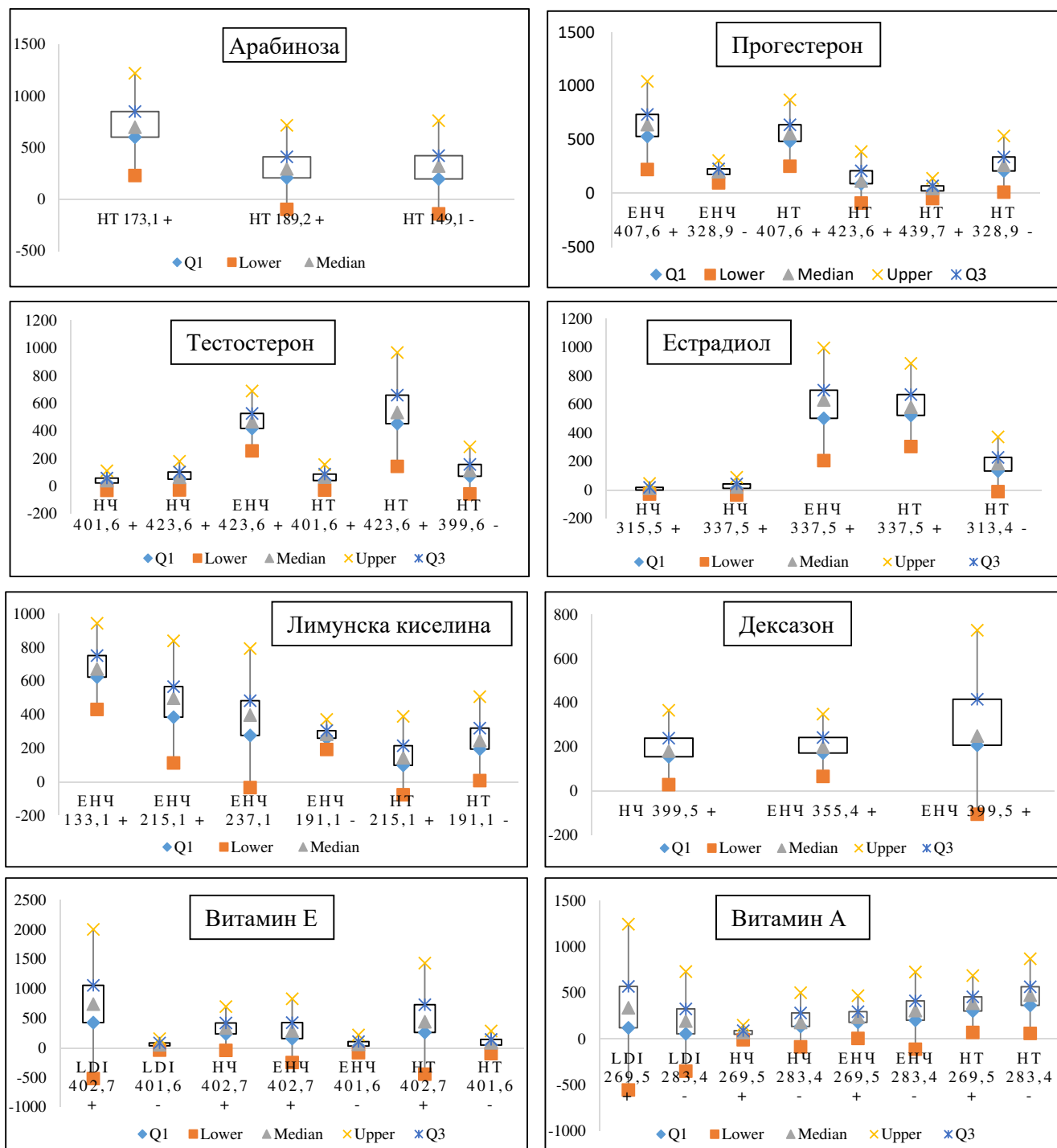
На основу *Box and Whiskers* дијаграма могу се видети утицаји различитих супстрата (TiO_2 НЧ, TiO_2 ЕНЧ и TiO_2 НТ) на однос сигнала и шума (S/N), односно на интензитете сигнала за све анализираних молекула аминокиселине (L-цистеин, L-аланин, DL-метионин), трипептид (глутатион), хормоне (естрадиол, тестостерон, прогестерон), угљене хидрате (D-(+)-глукоза, D-(+)-малтоза, рафиноза, арабиноза, β -циклодекстрин), лимунску киселину, дексазон и витамине Е и А. Такође, на овај начин може да се испита потенцијал супстрата за квантитативну анализу молекула малих маса.

Преглед добијених резултата статистичке анализе приказан је на Слици 3.18 и представљен је помоћу *Box and Whiskers* дијаграма. Кутија (*Box*) садржи податке добијене на основу S/N вредности (сумарно 72 податка по једној комбинацији молекула са једним нанокристалом TiO_2). Линије које се протежу вертикално од кутије (*Whiskers*) указују на варијабилност изван горње и доње квартиле. *Box and Whiskers* дијаграми су веома корисни за дескриптивно поређење могућности детекције и прецизности мерења

молекула са супстратима и омогућава визуелно поређење и избор парова молекула/супстрата у зависности од циља који је потребно постићи.



Слика 3.18.



Слика 3.18. „Box and Whiskers“ дијаграми за све парове молекула и нанокристала TiO_2 . Приказани су сви детектовани сигнали позитивних и негативних јона означених са „+“ и „-“, редом.

На основу анализе добијених дијаграма може се закључити да се за естрадиол са супстратима TiO_2 ЕНЧ и НТ добијају слични резултати, док код детекције прогестерона TiO_2 ЕНЧ дају незнатно веће S/N вредности и девијације него супстрат TiO_2 НТ за сигнал

$m/z = 407,6$. Тестостерон са супстратом TiO_2 НТ има највише S/N вредности, али и највише девијације, са TiO_2 НЧ-ама веома ниске S/N вредности, а са TiO_2 ЕНЧ-ама има оптималне параметре, довољно високе S/N вредности са значајно мањим вредностима девијације.

TiO_2 НТ су се показале као супстрат од избора за детекцију прогестерона ($m/z = 337,5$), L-аланина ($m/z = 112,1$), глутатиона ($m/z = 330,3$), и арабинозе ($m/z = 173,1$) са високим вредностима за S/N и са ниским девијацијама. За позитиван јон L-цистеин ($m/z = 144,2$) најбољи супстрат за детекцију су TiO_2 НЧ, а за негативан јон ($m/z = 120,2$) су TiO_2 ЕНЧ. DL-метионин је имао највише вредности S/N и ниске девијације са TiO_2 ЕНЧ-ама за сигнал $m/z = 172,2$. TiO_2 ЕНЧ су биле добар супстрат и за анализу D-глукозе, D-малтозе, β -циклодекстрина и рафинозе кад се посматрају сигнали на m/z 203,2, 365,3, 1158,0 и 365,3, редом.

Најбољи резултати, највише вредности S/N и најниже девијације за позитиван и негативан јон лимунске киселине постижу се са TiO_2 ЕНЧ-ама за сигнале m/z 133,1 и 191,1, редом. Дексазон (m/z 399,5) са TiO_2 ЕНЧ-ама даје највише вредности S/N, али и највише девијације. Генерално, бољи резултати се добијају са TiO_2 НЧ-ама и дексазоном за сигнал на $m/z = 399,5$ и са TiO_2 ЕНЧ-ама за сигнал m/z 355,4. LDI методом витамини Е и А имају највише вредности S/N, али су и девијације веома високе. Са свим нанокристалима TiO_2 за детекцију витамина добијају се слични резултати, али са значајно нижим вредностима девијације него што је код LDI методе. TiO_2 НТ са витамином Е дају највише вредности S/N у односу на остале супстрате, али су девијације биле веће.

3.2.3. Утицај величине и облика нанокристала на SALDI TOF масене спектре

Да би се показао утицај величине и облика нанокристала на квалитет SALDI TOF масених спектра коришћени су елипсоидне наночестице TiO_2 (TiO_2 ЕНЧ дужине од 40 до 50 nm и латералне димензије од 14 до 16 nm) и нанотубе TiO_2 (TiO_2 NTs дужине од 100 до 150 nm и просечног пречника 11 nm) за детекцију угљених хидрата: D-(+)-глукозе, D-(+)-малтозе и β -циклодекстрина.

Претходно је показана могућност детекције позитивних и негативних јона угљених хидрата са нанокристалима TiO_2 (Табела 3.14). Интензитет ласера је подешен на минималну јачину са којом је била могућа детекција анализираних молекула, да би се спречила фрагментација молекула. Интензитети ласера који су довољни за процесе

десорпције и јонизације у присуству TiO_2 ЕНЧ-а и TiO_2 НТ-а је била скоро иста, 1950 и 2000, редом. Детекција позитивних јона свих анализираних угљених хидрата је била могућа са оба супстрата, али детекција негативних јона је могућа само са супстратом TiO_2 НТ. Интензитети сигнала позитивних јона за молекуле глукозе и малтозе су највиши кад се користе TiO_2 ЕНЧ, док је интензитет сигнала за β -циклодекстрин виши кад се користе TiO_2 НТ, резултати су приказани у Табели 3.30.

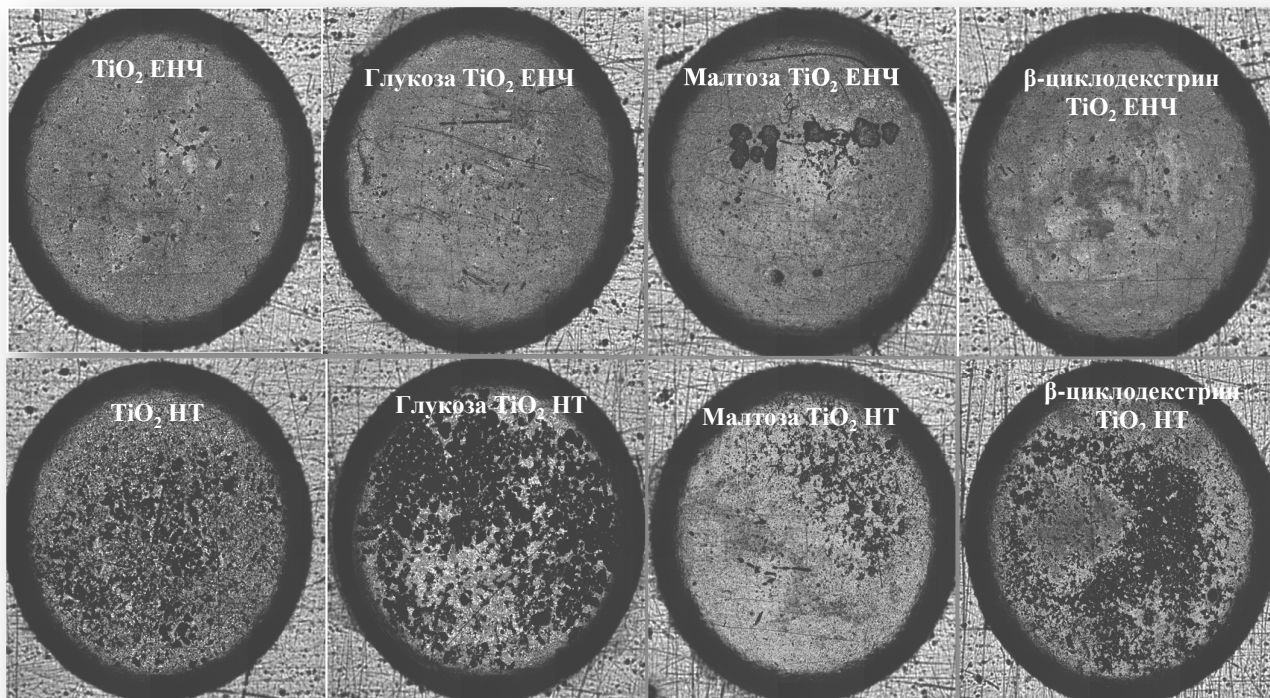
Табела 3.30. Интензитети детектованих сигнала позитивних и негативних јона у SALDI TOF масеним спектрима D-(+)-глукозе, D-(+)-малтозе, β -циклодекстрина са нанокристалима TiO_2 .

| | | Позитивни јони | | Негативни јони | |
|--|-------------------------|----------------|---------------------|----------------|---------------------|
| Молекул | Супстрат TiO_2 | m/z | Интензитети сигнала | m/z | Интензитети сигнала |
| D-(+)-глукоза | ЕНЧ | 203,2 | 522,78 ± 92,85 | — | — |
| | НТ | 203,2 | 375,63 ± 157,81 | 179,2 | 243,13 ± 77,65 |
| D-(+)-малтоза | ЕНЧ | 365,3 | 450,92 ± 74,91 | — | — |
| | НТ | 365,3 | 335,81 ± 103,75 | 222,0 | 234,19 ± 95,11 |
| β -циклодекстрин | ЕНЧ | 1158,0 | 99,86 ± 27,36 | | |
| | НТ | 1158,0 | 130,81 ± 66,00 | | |
| — Јони пореклом од молекула не могу да се детектују. | | | | | |

Ласером индукована јонизација на површини наноструктура омогућава алтернативни пут јонизације преко формирања Na^+ и K^+ адуката који настају у значајном приносу.¹⁸⁹ Сви детектовани сигнали пореклом од позитивних јона узорка су Na^+ или K^+ адукати, док су негативни јони који су детектовани настали отпуштањем једног протона са молекула.

Масеноспектрометријска анализа молекула са традиционалним, органским матрицама има велику ману јер не пружа могућност квантитативне анализе. Ова мана је последица нехомогене дистрибуције анализираних молекула између молекула матрице. Да би се проверила хомогеност паковања анализираних молекула и нанокристала TiO_2 у следећем сету експеримената проверена је површина „спакованих“ TiO_2 ЕНЧ-а и TiO_2 НТ-а са и без угљених хидрата након nanoшења узорка на MALDI плочу.

Профилометријске микрографије (Слика 3.19) показују разлике у мешању анализираних молекула са нанокристалима TiO_2 . Сви угљени хидрати са нанокристалима TiO_2 ЕНЧ-ама дају глаткије и униформније површине него што је случај са нанокристалима TiO_2 НТ-ама.



Слика 3.19. Снимци површинске дистрибуције нанокристала TiO_2 и угљених хидрата снимљени помоћу тродимензионалног оптичког профилера (Zygo NewView 7100, USA). Површина је снимљена помоћи објектива са $\times 10$ увеличањем и камером са ултра-високом резолуцијом.

Да би се проверили квалитативни резултати добијени на основу профилометријских микрографија коришћене су средње вредности релативне стандардне девијације (РСД %). На основу средње вредности РСД-е одређена је хомогеност за сваки пар узорак/супстрат. Вредности РСД-е за позитивне јоне су приказане у Табели 3.22, а за вредности РСД-е за негативне јоне у Табели 3.24.

Јасно је да су за све угљене хидрате који су детектовани као позитивни јони, израчунате вредности хомогености (РСД %) биле ниже са TiO_2 ЕНЧ-ама него вредности добијене са TiO_2 НТ-ама, што упућује на то да се боља хомогеност постиже када се користе TiO_2 ЕНЧ као супстрат. Као додаток на нижу вредност РСД-е је и виша вредност интензитета сигнала добијена са TiO_2 ЕНЧ-ама него што се добија са TiO_2 НТ-ама. Последње указује на виши принос јона са TiO_2 ЕНЧ-ама, па самим тим и ефикаснији процес јонизације/десорпције. Сви резултати се у потпуности поклапају са добијеном профилометријским микрографијама.

На основу претходно наведеног може се закључити, посматрајући SALDI TOF масеноспектрометријску анализу као модел систем, да површина структуре супстрата на бази наночестица има круцијални утицај на репродуцибилност масених спектра и на ефикасност процеса десорпције и јонизације са наноструктурама TiO_2 .

ЗАКЉУЧАК

На основу добијених резултата у оквиру ове докторске дисертације могу се извести следећи закључци:

- ✚ Супстрати на бази нанокристала TiO_2 различитих облика и величина - наночестице TiO_2 , елипсоидне наночестице TiO_2 и нанотубе TiO_2 - су бољи избор за масеноспектрометријску анализу молекула малих маса (до 1000 Da) у односу на органске матрице. Уз њихову помоћ, могуће је анализирати већи број различитих једињења, за разлику од матрица чија примена резултује у спектрима доброг квалитета само са појединачним групама молекула. Показано је да је могућа детекција највећег броја испитиваних врста молекула са свим тестираним супстратима TiO_2 .
- ✚ Неоргански супстрати на бази нанокристала TiO_2 омогућавају масеноспектрометријску анализу молекула малих маса (до 1000 Da). Сигнали у LDI TOF масеним спектрима који потичу од самог супстрата (нанокристала TiO_2) су идентификовати и детаљно анализирати и налазе се у области молекулских маса до 200 Da.
- ✚ TiO_2 НЧ и TiO_2 ЕНЧ су добар избор као супстрати за SALDI TOF масену спектрометрију и за анализу молекула којима је потребна виша снага ласера за процесе јонизације и/или десорпције и у том случају умањују ниво фрагментације молекула.
- ✚ Снимање негативних јона који потичу од скоро свих тестираних молекула је било могуће уз помоћ нанотуба TiO_2 , а добијени спектри су били једноставни за анализу (имали су мали број сигнала и занемарљиве производе фрагментације). Изузетак су спектри дексазона и естрадиола.
- ✚ Са нанотубама TiO_2 се детектују и сви позитивни јони испитиваних молекула, једини изузетак је дексазон.
- ✚ Како интензитети сигнала молекула малих маса на масеним спектрима добијеним у присуству нанокристала TiO_2 нису корелирали на било који начин са концентрацијама соли, закључује се да концентрације неорганских соли које су присутне у анализираној смеси немају велики утицај на интензитет сигнала, уколико се користе неоргански супстрати. Такође, проучавањем ефекта неорганских соли на SALDI TOF масене спектре комплекса

[RuCl₂(bipy)₂]Cl може се рећи да соли немају никаквог утицаја на број, интензитет сигнала и укупан изглед масеног спектра Ru-комплекса без обзира који је супстрат употребљен.

- ✚ Елипсоидне наночестице TiO₂ су се показале као ефикаснији супстрат од наночестица TiO₂ у процесима десорпције и јонизације бипиридинских комплекса рутенијма и платине: дихлоридо(*bis*-(бипиридин))рутенијум(III)-хлорид и тетраклоридо(бипиридин)платина(IV).
- ✚ На основу резултата детаљне статистичке анализе показана је могућност нанокристала титан(IV)-оксида за квантитативну анализу испитиваних класа молекула. Елипсоидне наночестице TiO₂ показују нарочити потенцијал за квантитативну анализу, јер са највећим бројем представника испитиваних класа молекула добијени статистички параметри указују на хомогеност дистрибуције узорка/супстрата на носачу за узорке и високу прецизност мерења. Нанотубе TiO₂ су такође потенцијални супстрати за квантитативну анализу, али само у случају појединих испитиваних молекула, као што су позитивни јони рафинозе, аланина и негативни јони рафинозе, глутатиона, арабинозе, аланина и витамина А.

ЛИТЕРАТУРА

1. M. Karas, D. Bachmann and F. Hillenkamp, *Anal. Chem.*, 1985, **57**, 2935–2939.
2. M. Karas, D. Bachmann, U. Bahr and F. Hillenkamp, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process.*, 1987, **78**, 53–68.
3. K. Tanaka, H. Waki, Y. Ido, S. Akita, Y. Yoshida, T. Yoshida and T. Matsuo, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 1988, **2**, 151–153.
4. https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2002/advanced-chemistryprize2002.pdf
5. M. Karas and F. Hillenkamp, *Anal. Chem.*, 1988, **60**, 2299–2301.
6. R. C. Beavis and B. T. Chait, *Rapid Commun. Mass Spectrom. RCM*, 1989, **3**, 436–439.
7. M. Karas and U. Bahr, *TrAC Trends Anal. Chem.*, 1990, **9**, 321–325.
8. M. Karas and R. Krüger, *Chem. Rev.*, 2003, **103**, 427–440.
9. K. Dreisewerd, *Chem. Rev.*, 2003, **103**, 395–426.
10. R. Zenobi and R. Knochenmuss, *Mass Spectrom. Rev.*, 1998, **17**, 337–366.
11. R. Knochenmuss and R. Zenobi, *Chem. Rev.*, 2003, **103**, 441–452.
12. E. de Hoffmann, V. Stroobant, *Wiley: Mass Spectrometry: Principles and Applications, 3rd Edition*. Available: <http://eu.wiley.com/WileyCDA/WileyTitle/productCd-047003310X.html>. Accessed: Apr. 2016.
13. D. S. Peterson, *Mass Spectrom. Rev.*, 2007, **26**, 19–34.
14. P. Demirev, A. Westman, C. T. Reimann, P. Håkansson, D. Barofsky, B. U. R. Sundqvist, Y. D. Cheng, W. Seibt and K. Siegbahn, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 1992, **6**, 187–191.
15. M. M. Wolff and W. E. Stephens, *Rev. Sci. Instrum.*, 1953, **24**, 616–617.
16. W. C. Wiley and I. H. McLaren, *Rev. Sci. Instrum.*, 1955, **26**, 1150–1157.
17. D. C. Imrie, J. M. Pentney and J. S. Cottrell, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 1995, **9**, 1293–1296.
18. M. Moniatte, F. G. van der Goot, J. T. Buckley, F. Pattus and A. van Dorsselaer, *FEBS Lett.*, 1996, **384**, 269–272.
19. W. Lange, D. Greifendorf, D. van Leyen, E. Niehuis and A. Benninghoven, in *Ion Formation from Organic Solids (IFOS III)*, ed. P. D. A. Benninghoven, Springer Berlin Heidelberg, 1986, pp. 67–73.
20. P. Onnerfjord, J. Nilsson, L. Wallman, T. Laurell and G. Marko-Varga, *Anal. Chem.*, 1998, **70**, 4755–4760.

21. L. Cohen, E. P. Go and G. Siuzdak, in *MALDI MS*, eds. F. Hillenkamp and J. Peter-Katalinić, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2007, pp. 299–337.
22. K. Strupat, M. Karas and F. Hillenkamp, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process.*, 1991, **111**, 89–102.
23. S. R. Fagerer, S. Nielsen, A. Ibáñez and R. Zenobi, *Eur. J. Mass Spectrom. Chichester Engl.*, 2013, **19**, 39–47.
24. T. W. Jaskolla, D. G. Papisotiriou and M. Karas, *J. Proteome Res.*, 2009, **8**, 3588–3597.
25. L. P. Oehlers, A. N. Perez and R. B. Walter, *Rapid Commun. Mass Spectrom. RCM*, 2005, **19**, 752–758.
26. R. C. Beavis and B. T. Chait, *Rapid Commun. Mass Spectrom. RCM*, 1989, **3**, 432–435.
27. R. C. Beavis, T. Chaudhary and B. T. Chait, *Org. Mass Spectrom.*, 1992, **27**, 156–158.
28. J. K. Lewis, J. Wei and G. Siuzdak, in *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, John Wiley & Sons, Ltd, 2006.
29. L. H. Cohen and A. I. Gusev, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2002, **373**, 571–586.
30. M. Takayama, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2001, **12**, 420–427.
31. B. Spengler, *J. Mass Spectrom.*, 1997, **32**, 1019–1036.
32. B. Spengler and R. J. Cotter, *Anal. Chem.*, 1990, **62**, 793–796.
33. P. R. Graves and T. A. J. Haystead, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2002, **66**, 39–63.
34. A. Pandey and M. Mann, *Nature*, 2000, **405**, 837–846.
35. I. Susnea, B. Bernevic, M. Wicke, L. Ma, S. Liu, K. Schellander and M. Przybylski, *Top. Curr. Chem.*, 2013, **331**, 37–54.
36. A. P. Kafka, T. Kleffmann, T. Rades and A. McDowell, *Int. J. Pharm.*, 2011, **417**, 70–82.
37. F. Cobo, *Open Virol. J.*, 2013, **7**, 84–90.
38. P.-E. Fournier, M. Drancourt, P. Colson, J.-M. Rolain, B. L. Scola and D. Raoult, *Nat. Rev. Microbiol.*, 2013, **11**, 574–585.
39. M. Stoeckli, P. Chaurand, D. E. Hallahan and R. M. Caprioli, *Nat. Med.*, 2001, **7**, 493–496.
40. K. Schwamborn and R. M. Caprioli, *Mol. Oncol.*, 2010, **4**, 529–538.
41. A. Tholey, M. Zabet-Moghaddam and E. Heinzle, *Anal. Chem.*, 2006, **78**, 291–297.
42. P. A. Kuzema, *J. Anal. Chem.*, 2011, **66**, 1227–1242.
43. M. Petković, J. Schiller, M. Müller, S. Benard, S. Reichl, K. Arnold and J. Arnhold, *Anal. Biochem.*, 2001, **289**, 202–216.
44. M. Petković, J. Schiller, J. Müller, M. Müller, K. Arnold and J. Arnhold, *The Analyst*, 2001, **126**, 1042–1050.
45. T. Jaskolla, B. Fuchs, M. Karas and J. Schiller, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2009, **20**, 867–874.

46. M. Petković, A. Vujčić, J. Schiller, Z. Bugarcic, J. Savić and V. Vasić, *Rapid Commun. Mass Spectrom. RCM*, 2009, **23**, 1467–1475.
47. J. K. Prunsa, C. Rapp, U. Hintze, K.-P. Wittern and W. A. König, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 2003, **105**, 275–280.
48. J. Wei, J. M. Buriak and G. Siuzdak, *Nature*, 1999, **399**, 243–246.
49. J. Sunner, E. Dratz and Y. C. Chen, *Anal. Chem.*, 1995, **67**, 4335–4342.
50. S. Xu, Y. Li, H. Zou, J. Qiu, Z. Guo and B. Guo, *Anal. Chem.*, 2003, **75**, 6191–6195.
51. H. Kawasaki, N. Takahashi, H. Fujimori, K. Okumura, T. Watanabe, C. Matsumura, S. Takemine, T. Nakano and R. Arakawa, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2009, **23**, 3323–3332.
52. H.-W. Tang, K.-M. Ng, W. Lu and C.-M. Che, *Anal. Chem.*, 2009, **81**, 4720–4729.
53. X. Dong, J. Cheng, J. Li and Y. Wang, *Anal. Chem.*, 2010, **82**, 6208–6214.
54. T. Seino, H. Sato, A. Yamamoto, A. Nemoto, M. Torimura and H. Tao, *Anal. Chem.*, 2007, **79**, 4827–4832.
55. T. R. Northen, O. Yanes, M. T. Northen, D. Marrinucci, W. Uritboonthai, J. Apon, S. L. Golledge, A. Nordström and G. Siuzdak, *Nature*, 2007, **449**, 1033–1036.
56. L. Hu, S. Xu, C. Pan, H. Zou and G. Jiang, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2007, **21**, 1277–1281.
57. E. Guénin, M. Lecouvey and J. Hardouin, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2009, **23**, 1395–1400.
58. H. Matter, O. Biomolecules and A. Vertes, *Tailored Silicon Nanopost Arrays for Resonant Nanophotonic Ion Production*, 2010.
59. Y.-C. Cheng, K.-H. Chen, J.-S. Wang, W.-L. Hsu, C.-C. Chien, W.-Y. Chen and C.-W. Tsao, *The Analyst*, 2012, **137**, 654–661.
60. C.-T. Chen and Y.-C. Chen, *Rapid Commun. Mass Spectrom. RCM*, 2004, **18**, 1956–1964.
61. J. A. McLean, K. A. Stumpo and D. H. Russell, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 5304–5305.
62. C.-T. Chen and Y.-C. Chen, *Anal. Chem.*, 2005, **77**, 5912–5919.
63. W.-Y. Chen and Y.-C. Chen, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2006, **386**, 699–704.
64. S. Okuno, R. Arakawa, K. Okamoto, Y. Matsui, S. Seki, T. Kozawa, S. Tagawa and Y. Wada, *Anal. Chem.*, 2005, **77**, 5364–5369.
65. Y.-F. Huang and H.-T. Chang, *Anal. Chem.*, 2006, **78**, 1485–1493.
66. H.-P. Wu, C.-L. Su, H.-C. Chang and W.-L. Tseng, *Anal. Chem.*, 2007, **79**, 6215–6221.
67. H. Kawasaki, T. Sugitani, T. Watanabe, T. Yonezawa, H. Moriwaki and R. Arakawa, *Anal. Chem.*, 2008, **80**, 7524–7533.
68. S. D. Sherrod, A. J. Diaz, W. K. Russell, P. S. Cremer and D. H. Russell, *Anal. Chem.*, 2008, **80**, 6796–6799.
69. S. K. Kailasa, K. Kiran and H.-F. Wu, *Anal. Chem.*, 2008, **80**, 9681–9688.

70. Z. Chen, Z. Geng, D. Shao, Y. Mei and Z. Wang, *Anal. Chem.*, 2009, **81**, 7625–7631.
71. C.-K. Chiang, Z. Yang, Y.-W. Lin, W.-T. Chen, H.-J. Lin and H.-T. Chang, *Anal. Chem.*, 2010, **82**, 4543–4550.
72. H. Kawasaki, T. Yonezawa, T. Watanabe, and R. Arakawa, *J. Phys. Chem. C*, 2007, **111**, 16278–16283.
73. T. Watanabe, H. Kawasaki, T. Yonezawa and R. Arakawa, *J. Mass Spectrom.*, 2008, **43**, 1063–1071.
74. C.-K. Chiang, N.-C. Chiang, Z.-H. Lin, G.-Y. Lan, Y.-W. Lin and H.-T. Chang, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2010, **21**, 1204–1207.
75. R. Arakawa and H. Kawasaki, *Anal. Sci. Int. J. Jpn. Soc. Anal. Chem.*, 2010, **26**, 1229–1240.
76. K. P. Law and J. R. Larkin, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2010, **399**, 2597–2622.
77. R. Pilolli, F. Palmisano and N. Cioffi, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2011, **402**, 601–623.
78. C.-K. Chiang, W.-T. Chen and H.-T. Chang, *Chem. Soc. Rev.*, 2011, **40**, 1269–1281.
79. M. P. Greving, G. J. Patti and G. Siuzdak, *Anal. Chem.*, 2011, **83**, 2–7.
80. M.-L. Valero, E. Giralt and D. Andreu, *Lett. Pept. Sci.*, **6**, 109–115.
81. S. Baumgart, Y. Lindner, R. Kühne, A. Oberemm, H. Wenschuh and E. Krause, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2004, **18**, 863–868.
82. T. Nishikaze and M. Takayama, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2006, **20**, 376–382.
83. T. Nishikaze and M. Takayama, *Int. J. Mass Spectrom.*, 2007, **268**, 47–59.
84. R. Knochenmuss, *Analyst*, 2006, **131**, 966–986.
85. M. Tsuge and K. Hoshina, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 2010, **83**, 1188–1192.
86. M. Schürenberg, K. Dreisewerd and F. Hillenkamp, *Anal. Chem.*, 1999, **71**, 221–229.
87. S. Alimpiev, S. Nikiforov, V. Karavanskii, T. Minton and J. Sunner, *J. Chem. Phys.*, 2001, **115**, 1891–1901.
88. R. A. Kruse, X. Li, P. W. Bohn and J. V. Sweedler, *Anal. Chem.*, 2001, **73**, 3639–3645.
89. T. Yonezawa, H. Kawasaki, A. Tarui, T. Watanabe, R. Arakawa, T. Shimada and F. Mafuné, *Anal. Sci. Int. J. Jpn. Soc. Anal. Chem.*, 2009, **25**, 339–346.
90. Y. Chen, H. Chen, A. Aleksandrov and T. M. Orlando, *J. Phys. Chem. C*, 2008, **112**, 6953–6960.
91. Y. Xiao, S. T. Retterer, D. K. Thomas, J.-Y. Tao and L. He, *J. Phys. Chem. C*, 2009, **113**, 3076–3083.
92. S. A. Trauger, E. P. Go, Z. Shen, J. V. Apon, B. J. Compton, E. S. P. Bouvier, M. G. Finn and G. Siuzdak, *Anal. Chem.*, 2004, **76**, 4484–4489.
93. G. Piret, H. Drobecq, Y. Coffinier, O. Melnyk and R. Boukherroub, *Langmuir ACS J. Surf. Colloids*, 2010, **26**, 1354–1361.

94. G. Luo, Y. Chen, G. Siuzdak and A. Vertes, *J. Phys. Chem. B*, 2005, **109**, 24450–24456.
95. S. Alimpiev, A. Grechnikov, J. Sunner, V. Karavanskii, Y. Simanovsky, S. Zhabin and S. Nikiforov, *J. Chem. Phys.*, 2008, **128**, 14711.
96. E. T. Castellana and D. H. Russell, *Nano Lett.*, 2007, **7**, 3023–3025.
97. S. Dagan, Y. Hua, D. J. Boday, A. Somogyi, R. J. Wysocki and V. H. Wysocki, *Int. J. Mass Spectrom.*, 2009, **283**, 200–205.
98. N.-Y. Hsu, S. Y. Tseng, C.-Y. Wu, C.-T. Ren, Y.-C. Lee, C.-H. Wong and C.-H. Chen, *Anal. Chem.*, 2008, **80**, 5203–5210.
99. T. R. Northen, H.-K. Woo, M. T. Northen, A. Nordström, W. Uritboonthail, K. L. Turner and G. Siuzdak, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2007, **18**, 1945–1949.
100. Y. Wada, T. Yanagishita and H. Masuda, *Anal. Chem.*, 2007, **79**, 9122–9127.
101. C.-L. Su and W.-L. Tseng, *Anal. Chem.*, 2007, **79**, 1626–1633.
102. K.-H. Lee, C.-K. Chiang, Z.-H. Lin and H.-T. Chang, *Rapid Commun. Mass Spectrom. RCM*, 2007, **21**, 2023–2030.
103. T.-C. Chiu, L.-C. Chang, C.-K. Chiang and H.-T. Chang, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2011, **19**, 1343–1346.
104. S. K. Kailasa and H.-F. Wu, *Analyst*, 2010, **135**, 1115–1123.
105. N. Amini, M. Shariatgorji and G. Thorsén, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2009, **20**, 1207–1213.
106. M.-C. Tseng, R. Obena, Y.-W. Lu, P.-C. Lin, P.-Y. Lin, Y.-S. Yen, J.-T. Lin, L.-D. Huang, K.-L. Lu, L.-L. Lai, C.-C. Lin and Y.-J. Chen, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2010, **21**, 1930–1939.
107. X. Wen, S. Dagan and V. H. Wysocki, *Anal. Chem.*, 2007, **79**, 434–444.
108. S. Božin, *Elektromagnetizam i optika, Prirodno matematički fakultet u Beogradu*, Beograd, 1984.
109. R.A. Smith, *Semiconductors*, Cambridge University, Press Cambridge, 1979.
110. R. W. Kelsall, I. W. Hamley and M. Geoghegan, „Nanoscale Science and Technology“, John Wiley & Sons, Ltd, 2005.
111. P. Y. Yu and M. Cardona, *Fundamentals of Semiconductors*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2010.
112. F. A. GRANT, *Rev. Mod. Phys.*, 1959, **31**, 646–674.
113. G. V. Samsonov, *The Oxide handbook*, IFI/Plenum, New York, 2d ed., 1982.
114. C. N. Satterfield, *Heterogeneous catalysis in industrial practice*, Krieger, Malabar (Fla.), 1996.
115. L. Kavan, M. Grätzel, S. E. Gilbert, C. Klemenz and H. J. Scheel, *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, **118**, 6716–6723.
116. J. M. G. Amores, V. S. Escribano and G. Busca, *J. Mater. Chem.*, 1995, **5**, 1245–1249.
117. C. Byun, J. W. Jang, I. T. Kim, K. S. Hong and B.-W. Lee, *Mater. Res. Bull.*, 1997, **32**, 431–440.

118. P. Arnal, R. J. P. Corriu, D. Leclercq, P. H. Mutin and A. Vioux, *J. Mater. Chem.*, 1996, **6**, 1925–1932.
119. T. Oyama, T. Ishii, Y. Iimura and K. Takeuchi, *J. Mater. Sci. Lett.*, **15**, 594–596.
120. M. Lazzeri, A. Vittadini and A. Selloni, *Phys. Rev. B*, 2001, **63**, 155409.
121. A. Fahmi and C. Minot, *Surf. Sci.*, 1994, **304**, 343–359.
122. T. Bredow and K. Jug, *Surf. Sci.*, 1995, **327**, 398–408.
123. M. Lazzeri, A. Vittadini and A. Selloni, *Phys. Rev. B*, 2002, **65**, 119901.
124. M. Radisavljević, T. Kamčeva, I. Vukićević, M. Radoičić, Z. Šaponjić and M. Petković, *Rapid Commun. Mass Spectrom. RCM*, 2012, **26**, 2041–2050.
125. C.-Y. Lo, J.-Y. Lin, W.-Y. Chen, C.-T. Chen and Y.-C. Chen, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2008, **19**, 1014–1020.
126. J.-I. Kim, J.-M. Park, S.-J. Hwang, M.-J. Kang and J.-C. Pyun, *Anal. Chim. Acta*, 2014, **836**, 53–60.
127. H. Wang, D. W. Brandl, F. Le, P. Nordlander and N. J. Halas, *Nano Lett.*, 2006, **6**, 827–832.
128. A. K. Buryak and T. M. Serdyuk, *Prot. Met. Phys. Chem. Surf.*, 2011, **47**, 911–920.
129. T.-C. Chiu, *Talanta*, 2011, **86**, 415–420.
130. I. Popović, M. Nešić, M. Nišavić, M. Vranješ, T. Radetić, Z. Šaponjić, R. Masnikosa and M. Petković, *Mater. Lett.*, 2015, **150**, 84–88.
131. E. B. Drake, V. W. Henderson, F. Z. Stanczyk, C. A. McCleary, W. S. Brown, C. A. Smith, A. A. Rizzo, G. A. Murdock and J. G. Buckwalter, *Neurology*, 2000, **54**, 599–599.
132. B. C. J. M. Fauser, J. S. E. Laven, B. C. Tarlatzis, K. H. Moley, H. O. D. Critchley, R. N. Taylor, S. L. Berga, P. G. Mermelstein, P. Devroey, L. Gianaroli, T. D’Hooghe, P. Vercellini, L. Hummelshoj, S. Rubin, A. J. Goverde, V. D. Leo and F. Petraglia, *Reprod. Sci.*, 2011, **18**, 702–712.
133. M. A. Mansoor, A. M. Svardal and P. M. Ueland, *Anal. Biochem.*, 1992, **200**, 218–229.
134. Z. A. Wood, E. Schröder, J. Robin Harris and L. B. Poole, *Trends Biochem. Sci.*, 2003, **28**, 32–40.
135. J. Selhub, *Annu. Rev. Nutr.*, 1999, **19**, 217–246.
136. N. S. Kosower and E. M. Kosower, *Int. Rev. Cytol.*, 1978, **54**, 109–160.
137. G. Wu, Y.-Z. Fang, S. Yang, J. R. Lupton and N. D. Turner, *J. Nutr.*, 2004, **134**, 489–492.
138. B. J. Mills, M. M. Weiss, C. A. Lang, M. C. Liu and C. Ziegler, *J. Lab. Clin. Med.*, 2000, **135**, 396–401.
139. C. Carru, A. Zinellu, S. Sotgia, R. Serra, M. F. Usai, G. F. Pintus, G. M. Pes and L. Deiana, *Biomed. Chromatogr.*, 2004, **18**, 360–366.

140. P. Ghezzi, B. Romines, M. Fratelli, I. Eberini, E. Gianazza, S. Casagrande, T. Laragione, M. Mengozzi, L. A. Herzenberg and L. A. Herzenberg, *Mol. Immunol.*, 2002, **38**, 773–780.
141. A. Lehninger, D. Nelson, M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry* (3rd ed.), *Worth Publishers*, 2000.
142. D. J. Bigelow and T. C. Squier, *Biochim. Biophys. Acta*, 2005, **1703**, 121–134.
143. M. P. Ferla and W. M. Patrick, *Microbiol. Read. Engl.*, 2014, **160**, 1571–1584.
144. N. Sattar, O. Scherbakova, I. Ford, D. S. J. O'Reilly, A. Stanley, E. Forrest, P. W. Macfarlane, C. J. Packard, S. M. Cobbe, J. Shepherd and west of Scotland coronary prevention study, *Diabetes*, 2004, **53**, 2855–2860.
145. H. F. Bunn and P. J. Higgins, *Science*, 1981, **213**, 222–224.
146. A. Varki, R. D. Cummings, J. D. Esko, H. H. Freeze, P. Stanley, C. R. Bertozzi, G. W. Hart and M. E. Etzler, Eds., *Essentials of Glycobiology*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (NY), 2nd edn., 2009.
147. J. M. Young and E. Weser, *J. Clin. Invest.*, 1971, **50**, 986–991.
148. J. K. Lodge, *Biochem. Soc. Trans.*, 2008, **36**, 1066–1070.
149. J.-M. Zingg and A. Azzi, *Curr. Med. Chem.*, 2004, **11**, 1113–1133.
150. A. M. Monro, *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.*, 1994, **22**, 341–342.
151. K. Mizojiri, H. Shindo and Y. Ohno, *J. Toxicol. Sci.*, 1996, **21**, 523–527.
152. S. van Zutphen and J. Reedijk, *Coord. Chem. Rev.*, 2005, **249**, 2845–2853.
153. M. D. Hall, H. R. Mellor, R. Callaghan and T. W. Hambley, *J. Med. Chem.*, 2007, **50**, 3403–3411.
154. W. H. Ang, I. Khalaila, C. S. Allardyce, L. Juillerat-Jeanerret and P. J. Dyson, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 1382–1383.
155. W. H. Ang and P. J. Dyson, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2006, **2006**, 3993–3993.
156. Y. K. Yan, M. Melchart, A. Habtemariam and P. J. Sadler, *Chem. Commun. Camb. Engl.*, 2005, 4764–4776.
157. M. Rafii, R. Elango, G. Courtney-Martin, J. D. House, L. Fisher and P. B. Pencharz, *Anal. Biochem.*, 2007, **371**, 71–81.
158. A. Araki and Y. Sako, *J. Chromatogr.*, 1987, **422**, 43–52.
159. C. Bayle, C. Issac, R. Salvayre, F. Couderc and E. Caussé, *J. Chromatogr. A*, 2002, **979**, 255–260.
160. E. Caussé, C. Issac, P. Malatray, C. Bayle, P. Valdiguié, R. Salvayre and F. Couderc, *J. Chromatogr. A*, 2000, **895**, 173–178.
161. M. Larsson and J. Lindgren, *J. Raman Spectrosc.*, 2005, **36**, 394–399.

162. J. Pietzsch, U. Julius and M. Hanefeld, *Clin. Chem.*, 1997, **43**, 2001–2004.
163. B. Lin Ling, W. R. G. Baeyens and C. Dewaele, *Anal. Chim. Acta*, 1991, **255**, 283–288.
164. M. B. Radoičić, I. A. Janković, V. N. Despotović, D. V. Šojić, T. D. Savić, Z. V. Šaponjić, B. F. Abramović and M. I. Čomor, *Appl. Catal. B Environ.*, 2013, **138–139**, 122–127.
165. R. C. Thompson, *Inorg. Chem.*, 1984, **23**, 1794–1798.
166. T. Kasuga, M. Hiramatsu, A. Hoson, T. Sekino and K. Niihara, *Adv. Mater.*, 1999, **11**, 1307–1311.
167. M. Vranješ, Z. V. Šaponjić, L. S. Živković, V. N. Despotović, D. V. Šojić, B. F. Abramović and M. I. Čomor, *Appl. Catal. B Environ.*, 2014, **160–161**, 589–596.
168. M. Vranješ, J. Kuljanin-Jakovljević, T. Radetić, M. Stoiljković, M. Mitrić, Z. V. Šaponjić and J. Nedeljković, *Ceram. Int.*, 2012, **38**, 5629–5636.
169. N.-C. Chiang, C.-K. Chiang, Z.-H. Lin, T.-C. Chiu and H.-T. Chang, *Rapid Commun. Mass Spectrom. RCM*, 2009, **23**, 3063–3068.
170. A. L. Linsebigler, G. Lu and J. T. Yates, *Chem. Rev.*, 1995, **95**, 735–758.
171. R. A. Kruse, S. S. Rubakhin, E. V. Romanova, P. W. Bohn and J. V. Sweedler, *J. Mass Spectrom.*, 2001, **36**, 1317–1322.
172. T. Watanabe, K. Okumura, H. Kawasaki and R. Arakawa, *J. Mass Spectrom. JMS*, 2009, **44**, 1443–1451.
173. X. Chen, J. A. Carroll and R. C. Beavis, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 1998, **9**, 885–891.
174. S. Niu, W. Zhang and B. T. Chait, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 1998, **9**, 1–7.
175. M. Karas, M. Glückmann and J. Schäfer, *J. Mass Spectrom. JMS*, 2000, **35**, 1–12.
176. H.-P. Wu, C.-J. Yu, C.-Y. Lin, Y.-H. Lin and W.-L. Tseng, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2009, **20**, 875–882.
177. M. Radisavljević, T. Kamceva, I. Vukićević, M. Nisavić, M. Milovanović and M. Petković, *Eur. J. Mass Spectrom. Chichester Engl.*, 2013, **19**, 77–89.
178. K. B. Garbutcheon-Singh, M. P. Grant, B. W. Harper, A. M. Krause-Heuer, M. Manohar, N. Orkey and J. R. Aldrich-Wright, *Curr. Top. Med. Chem.*, 2011, **11**, 521–542.
179. P. Köpf-Maier, *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 1994, **47**, 1–16.
180. A. Hille, T. Wolf, P. Schumacher, I. Ott, R. Gust and B. Kircher, *Arch. Pharm. (Weinheim)*, 2011, **344**, 217–223.
181. S. Maanvizhi, T. Boppana, C. Krishnan and G. Arumugam, *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*, 2014, **6**, 40–44.
182. D. O. Harrison, R. Thomas, A. E. Underhill, J. K. Fletcher, P. S. Gomm and F. Hallway, *Polyhedron*, 1985, **4**, 681–685.

- 183.** P. J. A. Ruttink, J. K. Terlouw, T. M. Luider and P. C. Burgers, *J. Mass Spectrom. JMS*, 2011, **46**, 223–229.
- 184.** K. Balasanmugam, R. J. Day and D. M. Hercules, *Inorg. Chem.*, 1985, **24**, 4477–4483.
- 185.** H. Hori, J. Ishihara, K. Koike, K. Takeuchi, T. Ibusuki, J. Tanabe and O. Ishitani, *Anal. Sci.*, 1998, **14**, 287–292.
- 186.** M. Petković, B. Petrović, J. Savić, Ž. Bugarčić, J. Dimitrić-Marković, T. Momić and V. Vasić, *Int. J. Mass Spectrom.*, 2010, **290**, 39-46.
- 187.** M. W. Duncan, H. Roder and S. W. Hunsucker, *Brief. Funct. Genomic. Proteomic.*, 2008, **7**, 355–370.
- 188.** S. Nitta, H. Kawasaki, T. Suganuma, Y. Shigeri and R. Arakawa, *J. Phys. Chem. C*, 2013, **117**, 238–245.
- 189.** J. A. Stolee, B. N. Walker, V. Zorba, R. E. Russo and A. Vertes, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2012, **14**, 8453–8471.

БИОГРАФИЈА



Ива Поповић рођена је 23. јануара 1984. године у Београду, Република Србија. Основну школу и природно-математички смер Земунске гимназије завршила је у Београду. Школске 2003/2004. год. уписала је Хемијски факултет Универзитета у Београду. Дипломирала је у децембру 2010. године са просечном оценом 8.53 и оценом 10 на дипломском испиту.

Докторске студије на Природно-математичком факултету Универзитета у Крагујевцу, смер Доктор хемијских наука, Неорганска хемија, уписала је школске 2011/2012. године. Од јануара 2011. године запослена је у Институту за нуклеарне науке „Винча“, где ради у групи др. Маријане Петковић, научног саветника Лабораторије за физичку хемију. Ива Поповић је свој научно-истраживачки рад започела 1. јануара 2011. године ангажовањем у оквиру пројекта „Испитивање механизма реакција комплекса јона прелазних метала са биолошким значајним молекулима“ (бр. 172011) чији је руководилац професор Живадин Бугарчић (Природно-математички факултет Универзитета у Крагујевцу)

Ива Поповић је била учесник у COST акцији (BM 1104) под називом „*Mass Spectrometry Imaging: New Tools for Healthcare Reserch*“ која је покренута 2010-2015. године под руководством др. Лијама МекДонела, *Leiden University Medical Center*, Лајден, Холандија и у акцији BM1403 (*Native Mass Spectrometry and Related Methods for Structural Biology*), под руководством професора Франка Собота, *University of Antwerp, VAMS Antwerpen*, Белгија. У оквиру билатералног пројекта „Структурни и функционални ефекти анти-туморских лекова на бази металних комплекса на полиморфонуклеарне леукоците“ боравила је месец дана у Немачкој (*Institute for Medical Physics and Biophysics*, Лајпциг).

Поред редовних истраживачких активности, Ива Поповић је активно учествовала у манифестацији „Отворена врата Института Винча“ у периоду од 2011-2016. године и била је координатор радионице у оквиру пројекта „Винчине научионице“ 2013, 2014. и 2015. године.

Πριλογ



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Materials Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/matlet

Suitability of TiO₂ nanoparticles and prolate nanospheroids for laser desorption/ionization mass spectrometric characterization of bipyridine-containing complexes



Iva Popović^a, Maja Nešić^a, Marija Nišavić^a, Mila Vranješ^a, Tamara Radetić^b, Zoran Šaponjić^a, Romana Masnikosa^a, Marijana Petković^{a,*}

^a Vinča Institute of Nuclear Sciences, University of Belgrade, PO Box 522, 11000 Belgrade, Serbia

^b Faculty of Technology and Metallurgy, University of Belgrade, Karnegijeva 4, 11120 Belgrade, Serbia

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 December 2014

Accepted 1 March 2015

Available online 10 March 2015

Keywords:

Titania nanoparticles
Prolate nanospheroids
SALDI-TOF MS
Bipyridine complexes
Salt tolerance

ABSTRACT

Nanostructured materials as substrates for surface-assisted laser desorption and ionization time-of-flight mass spectrometry have two main advantages such as small number of signals in the low mass range and salt tolerance. We have also previously observed decreased extent of undesired fragmentation of bipyridine-containing transition metal complexes in the presence of TiO₂ nanoparticles (NPs). In this work, we extended our previous study and tested whether both TiO₂ NPs and TiO₂ prolate nanospheroids (PNSs) can be used as substrates for SALDI-MS of bipyridine-containing transition metal complexes and whether they tolerate intense laser and the presence of inorganic salts. TiO₂ NPs (an average diameter of 5 nm) and PNSs (length: 40–50 nm, the lateral dimension: 14–16 nm) were characterized microscopically and their mass spectra were analyzed, as well as the spectra of bipyridine-containing Pt(II) and Ru(III) complexes.

Our results show that seven times higher analyte signals can be obtained in the presence of PNSs compared to the signals acquired with NPs and three times higher compared to spectra acquired without a substrate. The presence of inorganic salt did not affect the spectra, which makes both TiO₂ nanocrystals suitable for MS analysis of transition metal complexes in biological fluids.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Nanostructured materials are attractive for laser-induced desorption and ionization mass spectrometric analysis (LDI MS) of small molecules, because they overcome drawbacks caused by the use of organic matrices, which are reflected in a large number of intense signals in the low mass range and intolerance to the presence of inorganic salts [1].

The use of various nanoparticles as substrates in surface-assisted LDI (SALDI) MS has attracted a lot of attention in the last decade [2]. Metal-oxide such as TiO₂ is a good candidate for SALDI substrate since it is chemically inert, stable in air, non-toxic, inexpensive and finally readily available. The use of nanocrystalline sol–gel titania films was already demonstrated [3], but the search for reliable titania substrates has been expanded to nanoparticles (NPs) [4], nanotubes

[5] and nanowires [6]. Even quantitative determination of certain compounds was achieved by titania-assisted SALDI-MS [7]. It is known that the size, shape and surface structure of nanomaterials affects their properties [8–10] and since the mechanisms of desorption/ionization in SALDI are not yet fully resolved, the choice of substrate for a specific analyte is still empirical [11].

Previously, we described the potential of colloidal titania NPs as substrate for the SALDI-TOF MS analysis of bipyridine-containing transition metal complexes [4]. Aim of the present study was to evaluate the potential of titania prolate nanospheroids (PNSs) to serve as a substrate for SALDI MS of transition metal complexes and to compare their performances with NPs expecting that their size and shape affect ionization efficiency of analyte in SALDI-MS. In addition, the spectral changes in the presence of inorganic salts are analyzed.

2. Materials and methods

Materials: Transition metal complexes; dichloro-(bipyridine) ruthenium(III)chloride, [RuCl₂(bipy)₂]Cl and tetrachloro-(bipyridine) platinum(IV), [PtCl₄(bipy)] were synthesized by from Prof. Ž. Bugarčić

* Correspondence to: Laboratory of Physical Chemistry, Vinča Institute of Nuclear Sciences, University of Belgrade, Mike Petrovića Alasa 12-14, 11 000 Belgrade, Serbia. Tel.: +381 11 3408 649.

E-mail address: marijanapetkovic@vin.bg.ac.rs (M. Petković).

PAPER

Cite this: *RSC Adv.*, 2016, 6, 1027

TiO₂ nanocrystals – assisted laser desorption and ionization time-of-flight mass spectrometric analysis of steroid hormones, amino acids and saccharides. Validation and comparison of methods†

I. Popović,* M. Nešić, M. Vranješ, Z. Šaponjić and M. Petković

In the present study, the possibility for the application of TiO₂ nanocrystals of various shapes and sizes, for substrate-assisted laser desorption and ionization time-of-flight mass spectrometric (SALDI TOF MS) quantitative analysis of small molecules (steroid hormones, amino acids and saccharides) was investigated. Parameters, such as homogeneity of the substrate/analyte distribution, reproducibility of the measurements, within-day, and day-to-day repeatability, were determined. The homogeneity of different nanocrystal/analyte combinations on the target plate were compared based on the signal-to-noise values of several analyte signals. Obtained results show that all TiO₂ nanocrystals, regardless of their shape, have great potential for the detection and determination of steroid hormones, amino acids and saccharides with good analytical parameters and detection limits. On the other hand, the reproducibility of the S/N ratio and detectability of the analytes recorded in various modes differ depending on the substrate. All examined molecules were detectable in negative ion mode with TiO₂ NTs, in contrast to all other organic matrices and substrates, and the best reproducibility was obtained with the larger nanocrystals, TiO₂ PNSs and TiO₂ NTs, making them good candidates for the quantitative determination of small molecules.

Received 28th September 2015
Accepted 2nd December 2015

DOI: 10.1039/c5ra20042c

www.rsc.org/advances

Introduction

The interference of matrix with analyte signals in the low mass range and non-uniform analyte distribution within the matrix during their co-crystallization limit the application of conventional MALDI for the analysis of low molecular weight compounds ($M < 1500$ Da, “small molecules”).^{1,2} One of the most important features of substrate-assisted laser desorption and ionization mass spectrometry, SALDI MS, on the other hand, is the absence of matrix intrusion in the low-mass region because the use of organic matrices is not required. SALDI MS thus extends the detectable mass range of small molecules to less than m/z 500.

The term SALDI MS was first introduced by Sunner *et al.* using graphite as a matrix.³ Since that time, numerous substrates have been tested as matrices and in general, they enable efficient ionization with minimal analyte fragmentation, and with the possibility of achieving high selectivity, sensitivity and reproducibility of the analysis due to appropriate surface

chemistry and morphology.² Substrates for SALDI MS techniques often utilize nanoparticles, which absorb the laser energy and efficiently transfer it to the analyte.

The performance of SALDI has been improved in terms of a soft LDI process, with the detection of both polar and nonpolar compounds. Literature highlights indicate the signal enhancement factors for molecular ions in the SALDI mass spectra.⁴ In contrast to MALDI, the SALDI process has a disadvantage based on the fact that the efficiency of generating protonated molecular ions is low.⁴

The use of metal nanoparticles for SALDI MS was originally inspired by Tanaka *et al.*, exploiting a suspension of 30 nm cobalt nanoparticles in glycerol to analyze proteins and synthetic polymers.⁵ Besides metals, semiconductors with good UV absorbance are promising candidates for SALDI MS.⁶ In the UV region, TiO₂ NPs exhibit strong absorption characteristics (band gap of bulk anatase TiO₂: 3.2 eV).⁶ TiO₂-based substrates afford the advantages of being chemically stable in air, chemically modified and readily available.^{4,7}

The usual approach in LDI mode for the detection of molecules that do not have sufficient proton donating activity is to apply higher laser power, which in turn might result in the increased onset of side-processes, such as aggregation or fragmentation.⁸ However, LDI mass spectrometry when applicable

Vinča Institute of Nuclear Sciences, University of Belgrade, P. O. Box 522, 11000 Belgrade, Republic of Serbia. E-mail: ivavukicevic@vin.bg.ac.rs

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c5ra20042c

Dependence of the quality of SALDI TOF MS analysis on the TiO₂ nanocrystals' size and shape

Iva Popović¹ · Dubravka Milovanović¹ · Jadranka Miletić¹ ·
Maja Nešić¹ · Mila Vranješ¹ · Zoran Šaponjić¹ ·
Marijana Petković¹

Received: 29 October 2015 / Accepted: 13 January 2016
© Springer Science+Business Media New York 2016

Abstract Titanium dioxide is widely used substrate for laser desorption and ionization [(SA)LDI] mass spectrometry. As the semiconductor with high UV absorbance and rapid energy transfer to analytes, TiO₂ provides soft and efficient desorption/ionization of analytes with relatively low degrees of fragmentation in the gas phase. TiO₂ nanocrystals are convenient for small molecules (molecular mass <1000 Da) analysis due to low number of background signals. Desorption/ionization processes on TiO₂ nanocrystals are related to the physical properties of the substrate, such as the ability to absorb and dissipate energy from the irradiating laser light source. In addition, size and shape of nanocrystals also affect these abilities. The aim of this study is to investigate the influence of shape and size dependant TiO₂ nanocrystals/UV laser interaction on the quality of the mass spectra, detectability of analyzed molecules, intensities of the signals and homogeneity of co-crystals onto the MALDI plate, of carbohydrates. It is shown that the size and shape of nanocrystals influenced the way of packing carbohydrates onto plate, and thus affects homogeneity and reproducibility of mass spectrometry analysis.

Keywords SALDI TOF MS · TiO₂ nanocrystals · Homogeneity

This article is part of the Topical Collection on Advances in the science of light.

Guest Edited by Jelena Radovanovic, Milutin Stepić, Mikhail Sumetsky, Mauro Pereira and Dragan Indjin.

✉ Iva Popović
ivavukicevic@vin.bg.ac.rs

¹ Institute of Nuclear Sciences “Vinča”, University of Belgrade, Mike Petrovića Alasa 12-14, Belgrade, Serbia

Published online: 20 January 2016

 Springer

SALDI-TOF-MS analyses of small molecules (citric acid, dexasone, vitamins E and A) using TiO₂ nanocrystals as substrates

Iva A. Popović¹ · Maja Nešić¹ · Mila Vranješ¹ · Zoran Šaponjić¹ · Marijana Petković¹

Received: 25 April 2016 / Revised: 28 June 2016 / Accepted: 28 July 2016
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2016

Abstract Surface-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry (SALDI-TOF-MS) might be the method of choice for the analysis of low mass molecules (less than m/z 500). Titanium dioxide (TiO₂) nanocrystals as a substrate for SALDI-TOF-MS improve the reproducibility of the signal intensities and prevent the fragmentation of some molecules upon laser irradiation, as we have previously shown. In addition, variously shaped and sized TiO₂ nanocrystals/substrates for SALDI-MS could be used for quantification of small molecules, which are otherwise difficult to detect with the assistance of organic matrices. TiO₂-assisted LDI-MS spectra could be acquired with excellent reproducibility and repeatability and with low detection limit. In the current study, we analysed the spectra of dexasone, citric acid, vitamin E and vitamin A acquired with TiO₂ nanocrystals of various shapes and dimensions, i.e. the colloidal TiO₂ nanoparticles (TiO₂ NPs), TiO₂ prolate nanospheroids (TiO₂ PNSs) and TiO₂ nanotubes (TiO₂ NTs). Various shapes and dimensions of substrates were used since these factors determine desorption and ionisation processes. The homogeneity on the target plate was compared based on signal-to-noise values of peaks of interest of analysed molecules as well as the within-day and day-to-day repeatability. In summary, the obtained results show that the applicability of individual TiO₂ nanocrystals depends on the analyte. Signals which are acquired with the assistance of

TiO₂ PNSs have the highest sensitivity and reproducibility (the smallest standard deviation), even compared with those in the LDI mode. This implies that TiO₂ PNSs could also be suitable for quantitative analyses of small molecules.

Keywords Citric acid · Dexasone · SALDI-TOF-MS · TiO₂ nanocrystals · Vitamin A · Vitamin E

Introduction

In spite of numerous advantages of matrix-assisted laser desorption/ionisation (MALDI) time-of-flight mass spectrometry (TOF-MS), such as simplicity, high sensitivity, reasonable tolerance against impurities, potential of high sample throughput, uncomplicated mass spectra, low sample consumption and robustness [1, 2], there are serious drawbacks of the MALDI-TOF-MS application for small molecule analyses (below 500 Da) and quantification [3]. The main problem is the background interference (below 500 Da) from commonly used MALDI matrix materials [1, 2, 4–9]. The high number of signals in the low mass region significantly decreases the sensitivity of the detection and also limits the utility of MALDI-TOF for several important applications, including the automated high-throughput combinatorial and chip array analysis [10]. Essentially, if MALDI matrix provides efficient ionisation and minimal or controllable fragmentation and exhibits lack of mass interferences, it can be used for analysis of low mass weight compounds [9]. The choice of matrix for a specific analyte is still empirical, and a matrix/analyte combination has to be tested for each particular case, since there is no universal matrix [8, 11]. It has also been shown that different sample preparation techniques with traditional organic matrices do not lead

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00216-016-9846-8) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Iva A. Popović
ivavukicevic@vin.bg.ac.rs

¹ Vinča Institute of Nuclear Sciences, University of Belgrade, P.O. Box 522, 11000 Belgrade, Republic of Serbia

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, **Ива Поповић**, изјављујем да докторска дисертација под насловом:

„Испитивање примене неорганских супстрата на бази нанокристала TiO_2 за детекцију и квантификацију малих молекула SALDI TOF масеном спектрометријом“

која је одбрањена на **Природно-математичком факултету**

Универзитета у Крагујевцу представља *оригинално ауторско дело* настало као резултат *сопственог истраживачког рада*.

Овом Изјавом такође потврђујем:

- да сам *једини аутор* наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији *нисам извршила повреду* ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,
- да умножени примерак докторске дисертације у штампаној и електронској форми у чијем се прилогу налази ова Изјава садржи докторску дисертацију истоветну одбрањеној докторској дисертацији.

У Крагујевцу, 14.10.2016. године,



потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, **Ива Поповић**,

дозвољавам

не дозвољавам

Универзитетској библиотеци у Крагујевцу да начини два трајна умножена примерка у електронској форми докторске дисертације под насловом:

„Испитивање примене неорганских супстрата на бази нанокристала TiO_2 за детекцију и квантификацију малих молекула SALDI TOF масеном спектрометријом“

која је одбрањена на **Природно-математичком факултету**

Универзитета у Крагујевцу, и то у целини, као и да по један примерак тако умножене докторске дисертације учини трајно доступним јавности путем дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу и централног репозиторијума надлежног министарства, тако да припадници јавности могу начинити трајне умножене примерке у електронској форми наведене докторске дисертације путем *преузимања*.

Овом Изјавом такође

дозвољавам

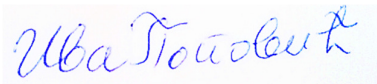
не дозвољавам²

²Уколико аутор изабере да не дозволи припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци, то не искључује право припадника јавности да наведену докторску дисертацију користе у складу са одредбама Закона о ауторском и сродним правима.

припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од следећих *Creative Commons* лиценци:

- 1) Ауторство
- 2) Ауторство - делити под истим условима
- 3) Ауторство - без прерада
- 4) Ауторство - некомерцијално
- 5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
- 6) Ауторство - некомерцијално - без прерада³

У Крагујевцу, 14.10.2016. године,



потпис аутора

³Молимо ауторе који су изабрали да дозволе припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци да заокруже једну од понуђених лиценци. Детаљан садржај наведених лиценци доступан је на: <http://creativecommons.org.rs/>