

# MALDI-TOF masa-espektrometria ezagutzen

(Knowing MALDI-TOF mass spectrometry)

*Antonio Veloso*

POLYMAT, Euskal Herriko Unibertsitatea UPV/EHU

antonio.veloso@polymat.eu

DOI: 10.1387/ekaia.16965

Jasoa: 2016-09-05

Onartua: 2017-04-25

**Laburpena:** Gaur egun, nahiko informazio ageria ematen dute biomolekulak eta materialak karakterizatzeko erabiltzen diren laborategi-teknika analitikoek, baina azaldu ezin diren efektuak edo emaitzak lortzen dira askotan. Horregatik, informazio hau lortzeko, hau da, molekulen mikroegiturak karakterizatzeko edota gertatu diren kutsadurak ezagutzeko ere, gero eta gehiago hedatzen ari da teknika bat, Matrix Assisted Laser Desorption-Ionization/Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI/TOF-MS) izeneko, edo laserraren bidezko desortzio-ionizazio matrizez lagundua/hegaldi-denbora masa-espektrometria teknika. Masa-espektrometria delako karakterizazio teknika hau hainbat alorretara hedatu da, masa molarra jakitea ahalbidetzen duelako inolako zatiketarik gabe eta,aldi berean, ehun edo material baten banaketaren berri ematen duelako Imaging Mass Spectrometry (IMS) edo masa-espektrometriaren bidezko irudia deritzon teknikari esker. Lan honek helburu hartuko du teknika berri honen oinarriak eta aplikazioak azaltzea eta aztertzea.

**Hitz gakoak:** MALDI/TOF, masa-espektrometria, IMS.

**Abstract:** Nowadays, the used analytic techniques to characterize biomolecules and materials in laboratories gives high amount of information, but sometimes there are some results and effects that cannot be explained. For that reason, in order to obtain this information, that is, to characterize molecules microstructures or determine contaminations, Matrix Assisted Laser Desorption-Ionization/Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI/TOF-MS) technique is used. This mass spectrometry characterization technique has been spread in different fields because it allows to determine molar mass without fragmentation and, at the same time, using Imaging Mass Spectrometry (IMS) technique the spatial distribution in a tissue or material is obtained. In this work, the fundamentals and applications of this technique are going to be explained and analyzed.

**Keywords:** MALDI/TOF, mass spectrometry, IMS.

## 1. SARRERA

Tanaka et al [1], Karas eta Hillenkampek [2] 1980ko hamarkadan garatu zuten *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI/TOF-MS)* edo laserraren bidezko desortzio-*ionizazio matrizez lagundua/hegaldi-denbora masa-espektrometria*. Teknika hau hainbat arlotan erabili da, hain zuzen ere proteinak, peptidoak, lipidoak eta farmakoak identifikatzeko edo polimeroak karakterizatzeko.

Beste teknika analitiko batzuekin alderatuz, masa-espektrometriak informazio gehigarria ematen du, analito osoaren eta bere zatien masa molekularrak, esate baterako. Gainera, analisia egiteko laginaren oso kantitate txikia kontsumitzen da denbora laburrean (mikrolitro esaten zaie kantitate horiei), eta lortzen diren masa molekularrak molekulen egiturarekiko independenteak dira. Bestalde, gainontzeko masa-espektrometriekin alderatuz, MALDI teknikan ioi gehienek karga bakarra dute; honek erraztu egiten du datuen tratamendua eta interpretazioa, eta gainera lortzen den bereizmena hobetu egiten da masa tarte handiagoetan. Alabaina, lagin konplexuen kasuetan molekula batzuek *ionic suppression effect* edo supresio ionikoaren eragina jasan dezakete, eta ondorioz, nekezago detektatzen dira. Askotan, antzeko masa duten ioien artean ioi batzuk, beste batzuk baino hobeto edo errazago ionizatzen dira bere egiturari esker, eta beraz, ioi horiek beste espezie batzuen detekzioa galarazten dute.

Lan honetan, teknika honen oinarriak eta aplikazioak azaldu eta aztertuko dira. Lehendabizi, ionizazioaren prozesua azalduko da eta ondoren, laginaren prestakuntza. Gero, masa-espektrometroaren atal guztien zereginak ikusiko dira (analizagailuak eta detektagailuak), eta ostean erakutsiko da zertan datzan *Imaging Mass Spectrometry (IMS)* edo masa-espektrometriaren bidezko irudia izeneko teknika.

## 2. MALDI-TOF MS TEKNIKA

Teknika honetan, lagina matrizearekin nahasten da eta espektrometroko laserrak ionizatu egiten ditu laginean dauden osagai guztiak. Ondoren, ioien masak analizagailuan banatzen dira eta azkenik, ioiak detektagailura iristen dira eta espektro bat lortzen da. Laginean dagoen konposatu bakoitza, espektroan gailur bezala ikusiko da. Atal honetan, pausu bakoitza zertan datzan ikusiko da, eta baita lagina nola prestatu behar den ere.

### 2.1. Ionizazioaren Mekanismoa

MALDI teknikan, urrats garrantzitsua da aztergai dugun laginetik ioiak sortzea. Orokorrean, laserraren irradiazioa analito molekulen desortzioa eta/edo ionizazioa eragiteko erabiltzen da; matrizea, aldiz, energia absorptziorako bitartekari gisa erabiltzen da.

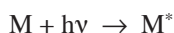
Egun, oraindik, eztabaida sakona dago MALDI teknikan gertatzen diren prozesu fisiko-kimikoen inguruan. Hala ere, prozesu horietako batzuen berri izatea lortu da esperimentazioari esker [3]: (1) normalean karga bakarreko ioiak sortzen dira; (2) Aukeratutako eremuaren arabera positiboki edo negatiboki kargaturiko ioiak sortzen dira; (3) UV matrize ohikoenetan ioi-erradikal molekularrak detektatzen dira; (4) Oso antzeko masa-espektroak lortzen dira analito berean uhin-luzera desberdinetako laser bat baino gehiago erabiliz (UV vs IR); (5) espektroetan analito-zatiak ikusten ez direnez, MALDI teknikari ionizazio-teknika leuna ere deitzen zaio.

Matrizearen aukera erabakigarria da MALDI MS analisirako eta 2.2 atalean deskribatuko da. Gainera, desortzio/ionizazio prozesuaren ikerketa zehatzak egin dira [4, 5]. Laserraren kitzikapenak matrize/analito geruzako gainazalaren ablazioa eragiten du. Honi MALDI *plume* edo luma deitzen zaio, norabide guztietan hedatzen baita. Zenobi eta Knochenmussen artikuluan [6] ematen da ionizazioen ikerketaren berri. Antzaenez, bi ionizazio prozesu daude:

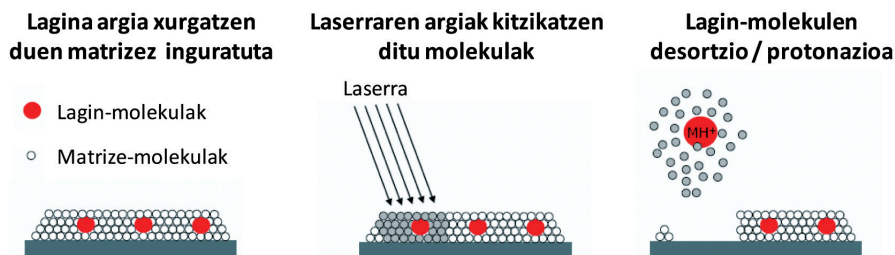
### Lehenengo Ionizazioaren Prozesua

Katioi-erradikalak, protonatutako ioiak eta kationizatutako ioiak sortzen dira, modu positiboan ionizatzeke (1. Irudia). Karas et al.-en lanean [7] erakusten da kluster gutxiago sortzen direla ionizazio-energia murriztuz. Efektu honek azaldu ditzake beste lan batzuetan fotoionizazioa erabilita lortu diren emaitzak [6, 8].

Hauek dira ionizazio prozesu honetan gertatzen diren erreakzio ohikoenak [9]:



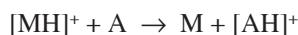
non M matrizearen espezie molekularrei dagokien, eta A analitoei



**1. irudia.** MALDI ionizazio prozesuaren oinarri eskematikoa ionizatzeke modu positiboan.

### *Bigarren Ionizazioaren Prozesua*

Gas faseko MALDIren luma berotu ondoren, elkarren arteko talkak jasan ditzakete matrizearen molekula neutrotik sortzen diren ioiak eta klusterrak. Horren ondorioz, ioi molekularren bigarren erreakzioak eragiten dira eta analitoaren espezie protonatua edo kationikoa sortzen dira. Horregatik, bi prozesu desberdin gerta daitezke gas fasean: protoi transferentzia eta kationizazioa.



non X katioia den.

Bigarren ionizazioa errazteko, matrizearen disoluzioan gatz alkalinoak gehitzen dira [10, 11]. Karas et al.-ek [7] erakutsi zuten ionizazio prozesuaren hasieran matrize eta analitoaren artean kargatutako klusterrak sortzen direla eta erlaxamendua gertatzen denean karga bakarreko espezieak sortzen direla.

## **2.2. Matrizeak eta Laginaren Prestakuntza**

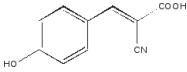
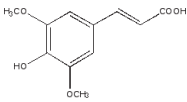
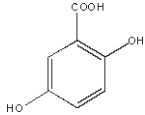
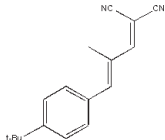
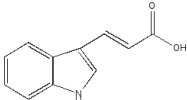
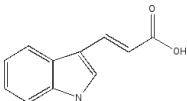
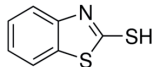
Matrize ezberdin asko eta haiek prestatzeko teknika ugari azaltzen dira bibliografian. Aurreko atalean azaldutako oinarri orokorren arabera, arau batzuk eman ahal dira matrizearen aukera egokia aukeratzeko, eta horrela, lana sinplifikatzeko. Analitoaren azidotasun edo basikotasunari begiratu aukera daitezke protoiarekiko afinitate edo gas fasearen basikotasun egokia duten matrizeak.

Analito kationikoak espero badira, aukeratu behar den matrizeak ez du lehiatu behar analitoen katioiekin. Heteroatomorik gabeko konposatueta AgTFA (zilar trifluoroazetatoa) edo CuCl<sub>2</sub> (kobre kloruroa) erabiltzen dira katioi agente gisa. 1. taulan agertzen da matrize ohikoenetako zerrenda. Taulan ikus daiteke matrize gehienek barne eraztun aromatiko daukagela haien egituran. Eraztun aromatiko honi esker, laserreko irradiazio-xurgapen nahikoa bermatzen da (orokorrean, N<sub>2</sub> laserretik eta/edo 355 nm Nd:YAG laserretik).

Dogruel et al.-en taldean [12] pH-aren efektua ikertu da. Fitzgerald et al.-ek [13] deskribatu dute matrize ezberdinek 2 eta 11 pH bitartean ahalbidetzen dutela MALDI laginen prestaketa.

Tartean molekularren egitura eta ionizazioa daudelarik, ez da protokolo estandar orokorrik deskribatu MALDI laginen prestakuntzarako. Orokorrean, matrizearen eta laginaren prestaketak hiru baldintza bete behar dituzte: (a) analitoaren ko-kristalizazioa, analito molekularren klusterrak sortzea

**1. taula.** Gehien erabilitako matrizeen zerrenda.

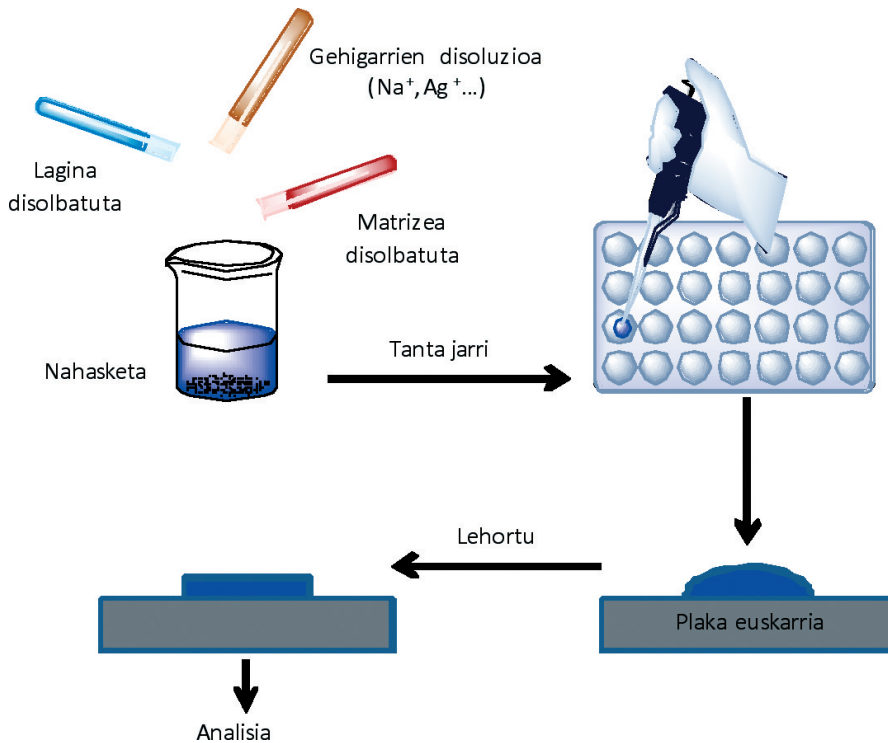
Matrizea	Masa Molarra (g mol <sup>-1</sup> )	Izena	Egitura
CHCA	189.17	Azido $\alpha$ -ziano-4-hidroxi zinamikoa	
SA	224.21	Azido sinapinikoa	
DHB	154.13	Azido 2,5-dihidroxi-benzoikoa	
DCTB	250.15	Trans-2-[3-(4-tert-Butilfenil)-2-metil-2-propenilidene]malonitriloa	
IAA	187.20	Azido trans-3-indoleakrilikoa	
Ditranol	226.23	1,8,9-Trihidroxiantrazenoa	
MBT	166.99	2-merkaptobenzotiazola	

saihesteko; (b) kitzikatzerakoan, matrizeak xurgatu behar du laserraren argia eta energia hori analitora transferitu behar da; (c) analitoaren ionizazioa lortzea.

Lagina prestatzeko metodo ugari daude, baina *dried droplet* edo tanta-lehorraren metodoa da ohikoena edo erabiliena. 2. Irudian erakusten da laginaren prestakuntza, azken metodo hau erabilia. Matrizearen eta laginaren kantitate egokiak disolbatu behar dira disolbatzaile bateragarri batean, eta gero matrize/analito erlazio molar egokian nahasi behar dira.

Oso prozedura egokia da hurrengo hauek erabiltzea: 20 g l<sup>-1</sup> matrize-disoluzio, 1-10 g l<sup>-1</sup>-ko analito-kontzentrazioa duen disoluzioa eta 10 g l<sup>-1</sup>-ko kontzentrazioa duen katioiak sortzeko agente-disoluzioa

Hiru disoluzioak nahastu egiten dira 10:10:1 (matrize : analito : agente) erlazioan. Mikropipeta baten bidez disoluzio honen 1-5  $\mu\text{l}$  hartu eta MALDI plakan jartzen dira. Azkenik, nahasketa airean lehortzen uzten da, espektrometroan sartzeko.



**2. irudia.** MALDI MS analisirako laginaren prestaketa: *dried droplet* prozedura.

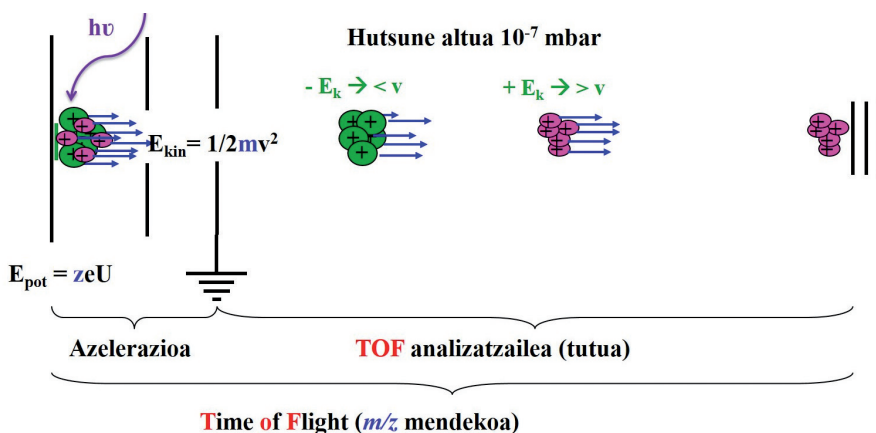
Oraindik eztabaida dago lagin-prestaketaren inguruan, eta ikerketek bere horretan jarraitzen dute, baina tanta lehorren prozedura erabilia lortu dira bibliografian aurkezten diren emaitza gehienak.

### 2.3. Hegaldi-denbora (TOF) Analizagailua

Ioia sortu ondoren, balioaren arabera banatu behar dira ioiak beraien  $m/z$  edota masa/karga erlazioaren arabera. Analizagailuak hutsune handiko «kutzak» dira; bertan, laginetik sortutako ioiak banatu egiten dira eremu estatiko batean, edo elektromagnetikoki oszilatzen diren eremuetan. Banatuta bildu ahal dira masa, abiadura, eta/edo karga ezberdineko ioiak, eremu hauek kontrolatuz gero.

*Time of Flight* (TOF) edo hegaldi-denbora izeneko analizagailua da ioi pulsatuen iturri erabiliena, batez ere, MALDI masa-espektrometrian. 1946. urtean azaldu zuen Stephensek TOF lineal analizagailuaren funtzionamendua nolakoa izan litekeen [14]. 1955.ean Wiley eta McLarenek plazaratu zuten merkaturako lehen TOFen diseinua, masa espektrometro batekin akoplatuta [15].

TOF analizagailuari TOF deritzo, eta funtsean, ioi baten masa/karga erlazioa ( $m/z$ ) zehazten du, energia zinetiko finko bat erabilita ioi baten abiadura neurtuz (3. irudia).



**3. irudia.** MALDI-TOF masa-espektrometriaren eskema TOF analizagailua erabilita.

Funtsezko ekuazioen emaitzak energia zinetiko eta elektrostatikoen berdintzatik lortzen dira:

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

edo

$$v = (2zeU/m)^{1/2} \quad (2),$$

non  $m$  = masa,  $z$  = karga kopurua,  $v$  = ioien abiadura, eta  $U$  = tentsio-azelerazioa. Ondorioz,  $z$  karga daukan ioi baten abiadura, bere masaren erro karratuarekiko alderantziz proportzionala da  $U$  tentsio-azelerazio batean. Energia zinetiko finko batean ioi txikiak abiadura handiagoz mugitzen dira handienak baino; horregatik,  $L$  luzerako hodi-eskualdea igaro ondoren, lehenago heltzen dira detektagailura. Azelerazio-tentsio tartea 3 kV-30 kV-koa da, eta beraz, hegaldi-denbora mikrosegundotan neurtzen da. Ioiek

L hodi-eskualdean ematen dute denbora gehiena, eta beraz, detektagailurainoko hegaldi-denborak  $m/z$  balioa ematen du:

$$t = (m/2eUz)^{1/2}L \quad (3).$$

TOF espektroa masa-espektro bihur daiteke hurrengo ekuazioaren araberaz:

$$m/z = 2eU(t/L)^2 \quad (4).$$

Elektronikako barneko atzerapenen eta beste ziurgabetasun batzuen ondorioz, hegaldi-denbora ezberdinak gerta daitezke neurketetan. Horrela, gutxienez masa ezaguna duten bi ioiren hegaldi-denborak neurtzen dira izatez; erlazio enpiriko honi jarraituz kalibratzen da espektroa:

$$m/z = at^2 + b \quad (5).$$

Masaren bereizmena *time of flight* sisteman ematen da [16].

$$\Delta m/m = 2\Delta t/t \quad (6).$$

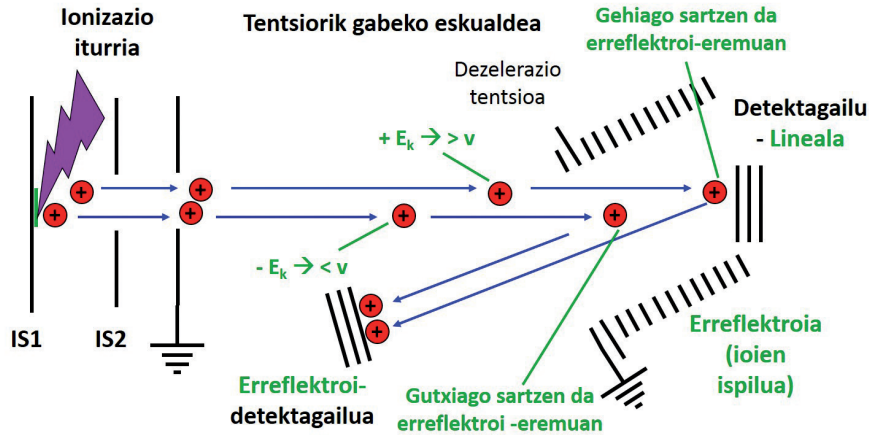
TOF analizagailuan masa-bereizmenaren aldaketa txikiak gertatzen dira, masa bereko ioien hegaldi-denboraren aldaketen ondorioz [16]. Iturrian sortutako ioien banaketaren ondorioz gertatzen dira hegaldi-denboraren aldaketa garrantzitsuenak, hau da, ioiak sortzeko kokapenaren eta hasierako hedapen-energiaren ondorioz.

### Erreflektroia

Erreflektroi elektrostatikoa erabiliz gailurren masaren bereizmena hobeto daiteke. Normalean erreflektroia izen soila ematen zaio, eta termino hori, TOF linealetik bereizteko erabiltzen da. Mamyrinek deskribatu zuen lehendabizi erreflektroiaren egitura [17]. Erreflektroia elektrodo-eraztunez osaturik dago. Era honetan, atzerapen-eremu bat sortzen da, hau da, ioien ispilu bezala jarduten du erreflektroiak, eta deflektatu egiten dituelarik, hegaldi hodiaren atzealdera bidaltzen ditu ioiak. Malguki batek bezala funtzionatzen du. Malgukiaren kontra indar txikia (abiadura baxua) egiten denean, malgukia ia ez da trinkotzen, baina indar handiagoa eginez (abiadura altua) asko trinkotzen da. Horrela, masa bereko ioiek beren kokapenagatik desfase bat edukitzen dutenean, erreflektroiak, indar elektrostatiakoaren bidez ahalbidetzen du ioiak detektagailura aldi berean iristea.

Erreflektroia oso erabilgarria da masa bereko baina energia zinetiko ezberdineko ioiak daudenean; izan ere, ioien dispertsio-energiak zuzentzen dituelarik,  $m/z$  erlazio berdinak lortzen dira, 4. irudian ikusten den bezala.





4. irudia. Erreflektroia duen MALDI-TOF espektrometroaren eskema.

Gainera, erreflektroian barnerago sartuko dira energia zinetiko handiagoa duten ioiak eta denbora gehiago emango dute bertan. Horregatik, masa bereko ioi guztiak une berean iristen dira detektagailura. Erreflektroiak masa-bereizmena handiagotzen du, baina sentsibilitatea jaitsi eta masa-tarte muga handiagoak ditu.

#### 2.4. Detektagailuak

Ioi-sorta masa analizagailutik igarotzen denean detektagailura iristen da, eta erabilgarria den seinale bihurtzen da. Azken urratsean, ioiak detektatzen dira eta datuak prozesatzen dira. Elektroibiderkatzailea, Faraday kopa edo *scintillator* (dirdiratzailea) detektagailuak erabiltzen dira ioien detekzioarako, eta fotobiderkatzaile detektagailuarekin konbinatzen dira.

Gaur egun, *multichannel plates* (MCP) izenekoa da MALDI-TOF espektrometroetan maizen erabiltzen den detektagailua. Normalean dirdiratzaile/fotobiderkatzaile batekin akoplatzen da. Horrela, sortaren intentsitate erlatiboaren hurbilketa balore bat ematen du  $m/z$  erlazio berdina duten ioiek detektagailu xaflara iristerakoan eragindako orbanen iluntasunak.

### 3. ESPEKTROAK ULERTZEN: EGITUREN KARAKTERIZAZIOA

Espektroetan masa absolutu independenteen baloreak lortzen dira; beraz, hauek ondo ulertzeko lehendabizi beharrezkoa da MALDI espektrometroa kalibratzea. TOF analizagailuari dagokion atalean esanda dago, (5) Ekuazioa erabilita ( $m/z = at^2 + b$  non  $a$  eta  $b$  konstanteak diren),  $m/z$  ba-

loreak hegaldi denborarekin ( $t$ ) erlazionatzen direla, eta bi ioi ezagunen  $m/z$  erabilita zehaztu daitezkeela.

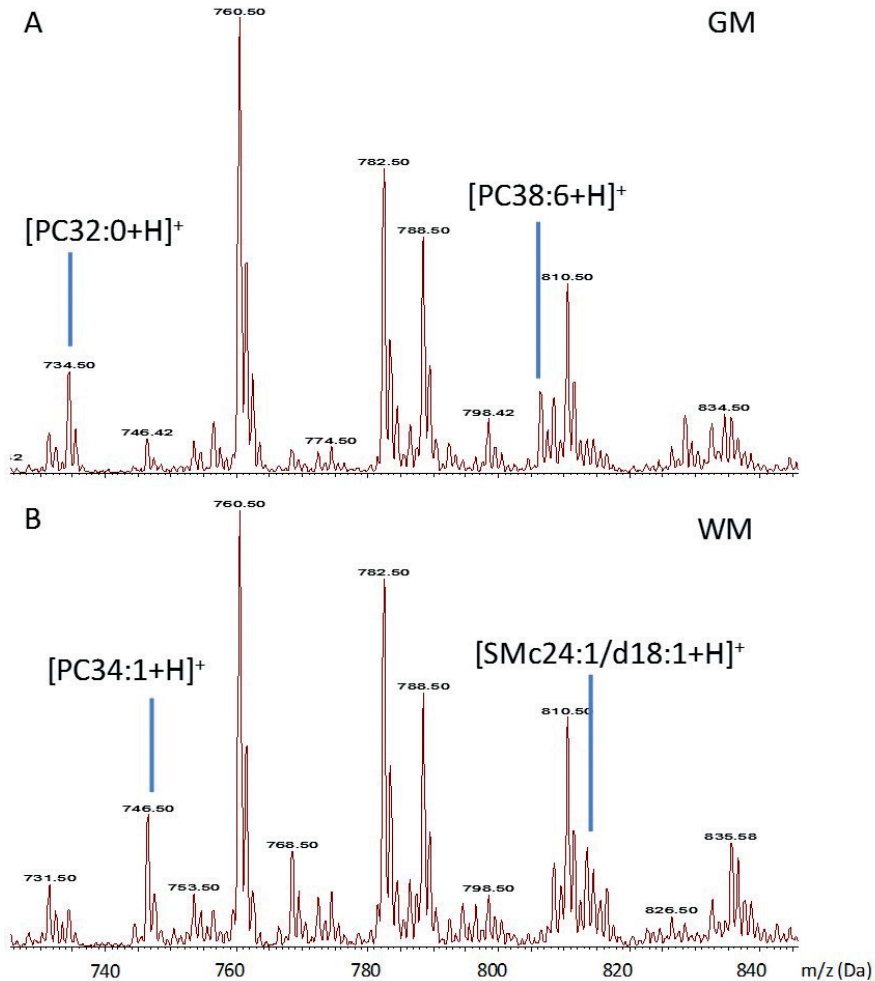
Proteinak eta peptidoak analizatzen direnean, lehendabizi tripsina bezalako entzima bat erabilia, zenbait peptido lotura apurtzen dira peptido zatiak lortzeko. Ondoren, matrizearekin nahasten da eta espektrometro barruan burutzen da analisisia. Horrela, proteinaren aminoazidoen sekuentzia zehaztuko dugu, hau da, proteinaren egitura primarioa.

Polimeroen kasuan, polimero kate bakoitza detekta daiteke eta horregatik, monomero unitatea eta mutur taldeak jakiteko aukera izaten dugu. Gainera, masa molarren banaketa (MMD) jakitea ere ahalbidetzen da, hots, masa molarra zenbakian ( $M_n$ ), masa molarra pisuan ( $M_w$ ) eta polidispersitate ( $\mathcal{D}$ ).

Farmakoen eta lipidoen kasuan, masa absolutua jakitea lortzen da. Lipidoak karakterizatzeko geruza fineko kromatografia (TLC) teknika erabiltzen da normalean. Kromatografia honetan lipidoak bere polaritatearen arabera banantzen dira. Bi fase bereizten dira: fase egonkorra eta higikorra. Zehazki, silikazko euskarri inerteak bustitzen duen ura da TLC kromatografiako fase egonkorra, eta fase egonkorrean zehar mugitzen dena da fase higikorra. Lipidoen kasuan disolbatzaile apolarren nahasketak erabiltzen dira, fase higikor moduan. Lipido-patroiak erreferentzia gisa jartzen dira. Horrela, laginaren lipidoak polaritatearen arabera bananduko dira TLC x-flan. Lipidoen banaketa egin ondoren, plakaren tindaketa egiten da eta orbain ezberdinak bereiziko dira plakaren altuera ezberdinetan (lipido motaren arabera). Orbain bakoitzaren altuera patroien orbainekin alderatuko da. Beraz, teknika honekin lipido mota jakitea baizik ez da lortzen eta ezin da zehaztu zein den lipidoaren egitura. Farmakoak bestetik, erresonantzia magnetiko nuklearra (NMR) teknika erabiliz karakteriza daitezke, baina askotan konposatuen banaketa behar da erauzkin bat karakterizatzeko. Horretarako, kromatografia teknikak erabiltzen dira, eta beraz, denbora kontsumitzen da eta molekulen degradazioa gerta daiteke. MALDI teknika erabiliz ez da lehendabiziko banaketarik behar, eta beraz, denbora aurrezten da eta baita molekulen degradazioa saihestu ere.

5. irudian ikus daitezke arratoi baten bizkarrezur-muineko erauzkin lipidikoen MALDI espektroak, 700-900 Da masa tartean. Bizkarrezur-muinean, burmuinean gertatzen den bezala, bi egitura daude: materia grisa (GM) eta zuria (WM). Materia ezberdinak lipido kontzentrazio ezberdinak ditu eta materia mota bakar batekoak izaten dira batzuetan lipido espezie batzuk. Espektroetan gailur bakoitzak molekula bati dagokio. Espektro hauetan, bi materietan agertzen dira gailur gehienak eta ugarienak, baina gailur ezberdinak ere bereizten dira. Lipido espezie desberdinak gailurraren gainean adierazi dira. Horrela, GM-n bi fosfatidilkolina detektatu dira: [PC32:0+H]<sup>+</sup> eta [PC38:6+H]<sup>+</sup>; WM-n aldiz, [PC34:1+H]<sup>+</sup> fosfatidil-

kolina eta  $[SMc24:1/d18:1+H]^+$  esfingomielina aurkitu dira. Horrela, materia bakoitzaren konposizio zehatza jakitea lortzen da.

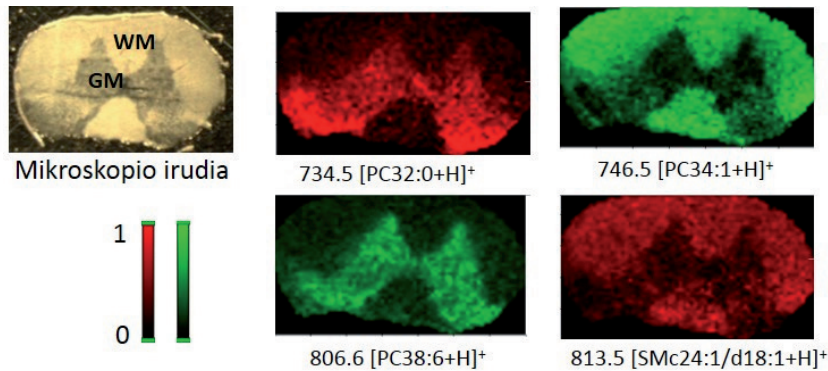


**5. irudia.** Arratoien bizkarrezur-muineko erauzkin lipidikoen batez besteko espektroen alderaketa 700-900 Da masa tartean eta MALDI-TOF masa-espektrometria erabilita: (A) materia grisa (GM) eta (B) materia zuria (WM). Espektroen arteko aldaketa nabarmenenak gailurraren gainean letra desberdinekin adierazita.

Bestalde, egun, autorradiografia teknika erabili behar da ehun batean lipidoek edo farmakoek duten banaketa ezagutzeko, hau da, arriskutsuak diren isotopo erradioaktiboak erabili behar dira. MALDI *Imaging Mass*

*Spectrometry* (IMS) edo masa-espektrometriaren bidezko irudiak izeneko teknikari esker, inolako isotopo erradioaktiborik erabili gabe lor daitezke irudiak. Teknika hau, beraz, oso garbia da. IMS teknika, teknika bikaina da ehun biologikoetan dauden molekulen banaketa aztertzeko. Izan ere, molekula mota ezberdinen identifikazioa eta kokapena ahalbidetzen du, konposatuaren edota familia kimikoaren aukera egin aurretik [18-20]. MALDI IMS egiteko lehendabizi, matrizez estali behar da analizatu nahi den azalera. Zenbait teknika erabili dira ehunak matrizez estaltzeko: lainoztatzea, sublimazioa, aerografoa, inprimatzailea... Guztiek dute helburu modura matrizez asetatutako disoluzio bat erabilita analizatu nahi den azalera homogeneoki estaltzea. Egun, zenbait enpresak matrizez estaltzeko tresnak garatu dituzte. Datuen tratamenduan espeketroak jaso ondoren, lerrokatu eta kalibratu egin behar dira.

6. irudian ikus daitezke MALDI IMS bidez lortutako arratoien bizkarrezur-muineko lipido batzuen banaketen irudiak. Goiko aldean, ezkerrean, ehun horren mikroskopio-irudia erakusten da, materia grisa eta zuria ondo bereizita. Ondoko irudiak, IMS teknika erabilita lortu dira. Koloreen eskala alboan adierazten da: kolore bizia dagoen lekuan (gorriz edo berdez), espeziearen gailurra intentsitate handikoa da, eta kolorea iluna bada (beltzez), espezie hori ez da izango inguru horretan. Ikusten den bezala, materia zurian (WM) barreiatuta daude PC34:1 (fosfatidilkolina), edo SMc24:1/d18:1 (esfingomielina) bezalako espezie batzuk. Materia grisean (GM) daude PC32:0 eta PC38:6 fosfatidilkolinak bezalako beste batzuk.



**6. irudia.** Arratoien bizkarrezur-muineko mikroskopio irudia (goiko aldean, -ezkerrean) eta MALDI IMS teknika erabilita lortutako lipido espezie batzuen banaketa-irudiak (gorriz eta berdez). Oetik 1erako lipido gailurren intentsitate-eskala agertzen da (beheko aldean, ezkerrean).

#### 4. ONDORIOAK

MALDI masa-espektrometriak, analitoaren eta analito zatien masa zehazten ditu, eta beraz, beste analisi teknika batzuek baino hobeto karakterizatzen ditu zenbait arlotako molekulak. Gainera, IMS teknikak aukera ematen du molekula ezberdinak aldi berean detektatzeko eta gainazal batean bakoitzaren banaketa ikusteko; hori dela eta, informazioa ugari lortzen da. Era honetan, erraz eta konposatu erradiaktiborik erabili gabe jakin daiteke ehunetan lipido-espezie ezberdinek duten kokapena. Beraz, ehunean farmakoen banaketa ikusteko aukera ematen du, hau da, zehazten du non daukaten eragina edo non metatzen diren. Lan honek agerian utzi du beharrezkoa dela teknika hau garatzea, hainbat esparrutako ikerkuntza hobetu nahi badugu.

#### 5. ESKER ONAK

Lan hau «*Biomolekulen eta farmakoen detekzioa MALDI-IMS Masa-espektrometria erabilia*» doktore-tesiaren atal batzuetan oinarrituta dago. Kimika Fisikoa saileko Espektroskopia Molekularraren taldean egin da, Dr. José Andrés Fernández eta Dr. Rafael Rodríguez-Puertas ikertzaileen zuzendaritzapean. Eskertu egin nahi diot Euskal Herriko Unibertsitateari (UPV/EHU) doktore-tesia aurrera eraman ahal izateko emandako diru-laguntza. Dr. Gustavo Amoresi euskara maila hobetzeko eman didan laguntza ere eskertzen diot.

#### 6. BIBLIOGRAFIA

- [1] TANAKA K.; WAKI H.; IDO Y.; AKITA S.; YOSHIDA Y.; YOSHIDA T. 1988. «Protein and polymer analyses up to  $m/z$  100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry». *Rapid communications in Mass Spectrometry* 2, 151-153.
- [2] KARAS M.; HILLENKAMP F. 1988. «Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10000 daltons». *Analytical Chemistry* 60, 2299-2301.
- [3] KARAS M.; BAHR U. 1990. «Laser desorption ionization mass spectrometry of large biomolecules». *Trends in Analytical Chemistry* 9, 321-325.
- [4] VERTES A.; IRINYI G.; GJIBELS R. 1993. «Hydrodynamic model of matrix-assisted laser desorption mass spectrometry». *Analytical Chemistry* 65, 2389-2393.
- [5] JOHNSON R. E. 1999. «Models for matrix-assisted desorption by a laser-pulse». *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* 139, 25-38.

- [6] KNOCHENMUSS R.; LEHMANN E.; ZENOBI R. 1998. «Polymer cationization in matrix-assisted laser desorption/ionization». *European Mass Spectrometry* **4**, 421-426.
- [7] KARAS M.; GLÜCKMANN M.; SCHÄFER J. 2000. «Ionization in matrix-assisted laser desorption/ionization: singly charged molecular ions are the lucky survivors». *Journal of Mass Spectrometry* **35**, 1-12.
- [8] LAND C. M.; KINSEL G. R. 1998. «Investigation of the mechanism of intracluster proton transfer from sinapinic acid to biomolecular analytes». *Journal of American Society of Mass Spectrometry* **9**, 1060-1067.
- [9] KARAS M.; BACHMANN D.; BAHR U.; HILLENKAMP F. 1987. «Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds». *International Journal of Mass Spectrometry and Ionization Processes* **78**, 53-68.
- [10] HARRISON A. G. 1992. *Chemical Ionization Mass Spectrometry*. CRC Press.
- [11] THOMSON B.; SUDDABY K.; RUDIN A.; LAJOIE G. 1996. «Characterisation of low molecular weight polymers using matrix assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry». *European Polymer Journal*, **32**, 239-256.
- [12] DOGRUEL D.; NELSON R.; WILLIAMS P. 1996. «The Effects of Matrix pH and Cation Availability on the Matrix- assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry of Poly (methyl methacrylate)». *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **10**, 801-804.
- [13] FITZGERALD M. C.; PARR G. R.; SMITH M. 1993. «Basic matrices for the matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of proteins and oligonucleotides». *Analytical Chemistry* **65**, 3204-3211.
- [14] STEPHENS W. 1946. «A pulsed mass spectrometer with time dispersion». *Physical Review* **69**, 674-691.
- [15] WILEY W. C.; MCLAREN J. B. 1955. «Time-of-flight mass spectrometer with improved resolution». *Review of Scientific Instruments* **16**, 1150-1157.
- [16] COTTER R.J. 1994. «Time-of-flight Mass Spectrometry». *ACS Symposium Series* **549**, 16-48.
- [17] MAMYRIN B. A.; KARATAEV V. I.; SCHMIKK D. V.; ZAGULIN V. A. 1973. «The mass-reflectron, a new nonmagnetic time-of-flight mass spectrometer with high resolution». *Soviet Physics JETP* **37**, 45-48.
- [18] FUCHS B.; NIMPTSCH A.; S, R.; SCHILLER J. 2008. «Analysis of brain lipids by directly coupled matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry and high-performance thin-layer chromatography». *Journal of AOAC International* **91**, 1227-1236.
- [19] GOTO-INOUE N.; HAYASAKA T.; TAKI T.; GONZALEZ T. V.; SETOU M. 2009. «A new lipidomics approach by thin-layer chromatography-blot-matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry for analyzing detailed patterns of phospholipid molecular species». *Journal of Chromatography A* **1216**, 7096-7101.
- [20] FUCHS B.; SCHILLER J.; SÜß R.; ZSCHARNACK M.; BADER A.; MÜLLER P.; SCHÜRENBERG M.; BECKER M.; SUCKAU D. 2008. «Analysis of stem cell lipids by offline HPTLC-MALDI-TOF MS». *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **392**, 849-860.