

# Úvod do hmotnostní spektrometrie

Zkráceno dle [http://holcapek.upce.cz/teaching/01\\_Uvod.pdf](http://holcapek.upce.cz/teaching/01_Uvod.pdf)

a

[http://holcapek.upce.cz/teaching/Holcapek\\_EMSV\\_MS.pdf](http://holcapek.upce.cz/teaching/Holcapek_EMSV_MS.pdf)

# Úvod do hmotnostní spektrometrie

- **Hmotnostní spektrometrie (MS)** je analytická metoda sloužící k převedení molekul na ionty, rozlišení těchto iontů podle poměru hmotnosti a náboje ( $m/z$ ) a následnému záznamu relativních intenzit jednotlivých iontů
- **Hmotnostní spektrometr** je iontově-optické zařízení, které rozlišuje ionty podle poměru jejich  $m/z$ 
  - + vysoká citlivost
  - + kvalitativní analýza - určení  $M_R$  a dalších strukturních informací
  - + kvantitativní analýza - odezva je závislá na koncentraci
  - + minimální spotřeba vzorku
- destruktivní metoda
- vysoké pořizovací a provozní náklady

# Hmotnostní spektrometrie

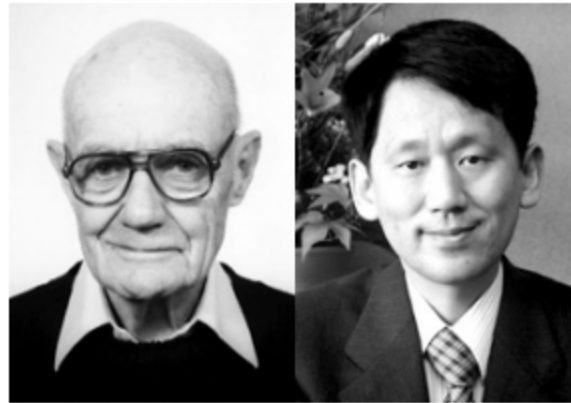
## Držitelé Nobelových cen za chemii nebo fyziku



Francis William Aston (1922, chemie)  
hmotnostní spektrometrie izotopů



Wolfgang Paul (1989, fyzika)  
popis iontové pasti



John B. Fenn (elektrosprej) a Koichi Tanaka (MALDI) (2002, chemie)  
vývoj měkkých ionizačních technik pro hmotnostní spektrometrii biomakromolekul

# Základní termíny

- **hmotnostní spektrometrie** (MS) - obor zabývající se hmotnostními spektrometry a jejich výsledky
  - zkratku MS nelze využívat jako zkratku pro hmotnostní spektrometr
  - nepoužívat hmotnostní spektroskopie nebo hmotnostní spektroskop - využívají pro detekci iontů fotografickou desku
- **hmotnostní spektrometr** - zařízení, které měří  $m/z$  hodnoty a zaznamenává jejich intenzitu
  - ~~ne hmotnostní spektroskop, hmotnostní spektrofotometr, atd.~~
- **hmotnostní spektrum** - graf závislosti intenzity iontů (absolutní/relativní) na jejich  $m/z$ 
  - ne chromatogram

## Základní termíny

- **m/z** - bezrozměrná veličina získaná vydělením hmotnosti iontu nábojovým číslem (počtem elementárních nábojů, bez ohledu na polaritu)
- **základní pík** spektra - pík s největší intenzitou ve spektru
- **molekulární ion** - ion vzniklý odebráním nebo přidáním jednoho a více elektronů za vzniku kladného nebo záporného iontu
- **protonovaná molekula** - ion vzniklý interakcí molekuly s protonem,  $[M+H]^+$
- **deprotonovaná molekula** - ion vzniklý odštěpením protonu,  $[M-H]^-$

# Základní části hmotnostního spektrometru

**1/ iontový zdroj** - slouží k převedení neutrálních molekul analytu na nabitě částice (tzv. ionizace), konstrukce se liší podle použité ionizační techniky

**2/ hmotnostní analyzátor** - slouží k rozdělení iontů v plynné fázi za vysokého vakua podle poměru hmotnosti a náboje ( $m/z$ )

**3/ detektor** - slouží k detekci iontů po jejich rozdělení podle  $m/z$  a k určení relativní intenzity (četnosti) jednotlivých iontů

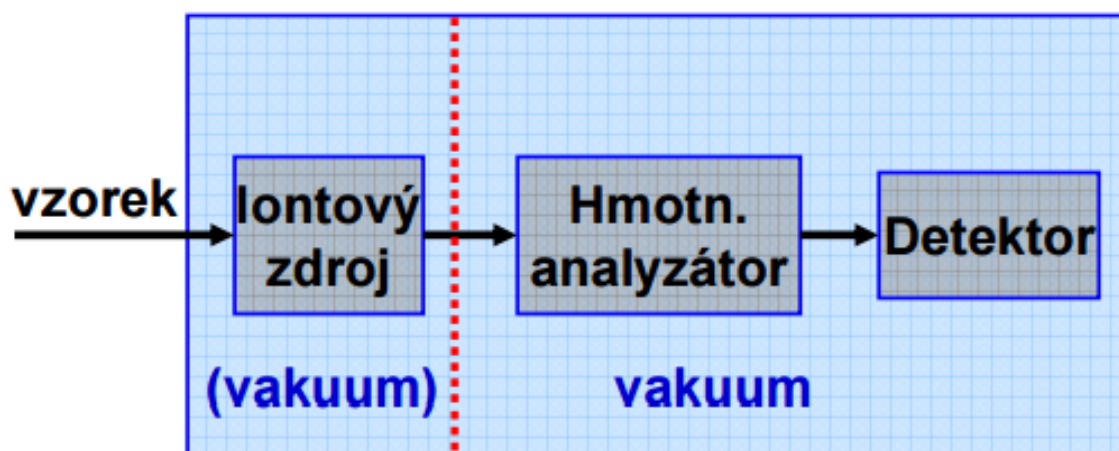
• další důležité části přístroje:

- vakuový systém

- iontová optika sloužící k urychlení a fokusaci iontů

- počítač na ovládání a ladění přístroje, sběr, ukládání a zpracování dat, porovnání spekter s knihovnou

## Hmotnostní spektrometr



## Ionizační techniky (= tvorba iontů)

- iontový zdroj hmotnostního spektrometru slouží k převedení neutrálních molekul analytu na nabitě částice (ionty)
- tvrdé ionizační techniky (EI) - ionizovaná molekula při ionizaci získá nadbytek vnitřní energie, což se projeví fragmentací molekulového iontu na menší části (tzv. fragmentové ionty)
- měkké ionizační techniky - (šetrné) ionizovaná molekula získá mnohem menší množství energie oproti EI, proto ve spektrech pozorujeme zejména (de)protonované molekuly a minimum fragmentových iontů
- ionizace může probíhat za sníženého tlaku (EI, CI, MALDI, atd.) nebo za atmosférického tlaku (ESI, APCI, APPI)
- volba ionizační techniky podle povahy analytu ( $M_R$ , polarita), příp. podle použité separační techniky (GC - EI, CI; HPLC - ESI, APCI, APPI)
- zavádění vzorku do iontového zdroje - přímá infúze, separační technika, odpařování z kapiláry, atd.

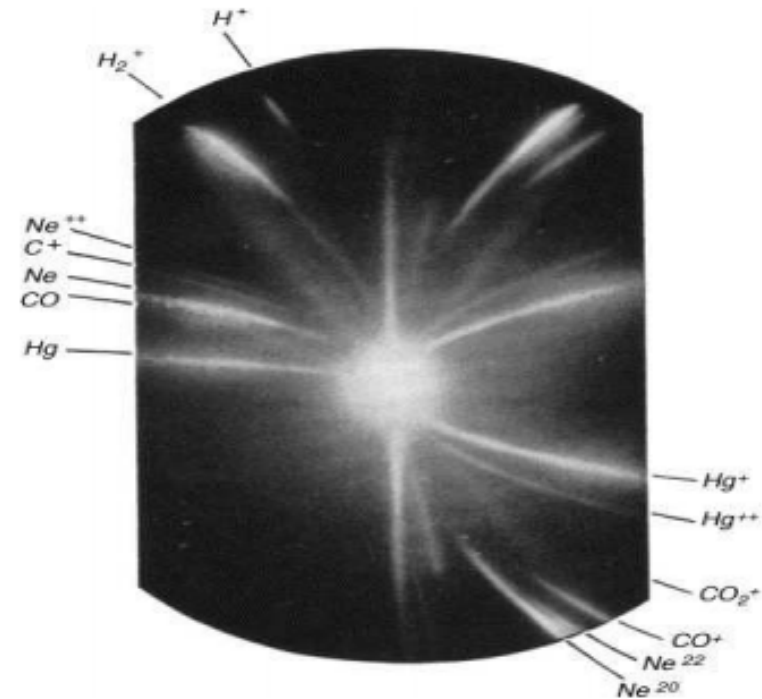
# Hmotnostní analyzátory (= dělení iontů)

- hmotnostní analyzátor slouží k dělení iontů v plynné fázi za vakua podle poměru jejich hmotnosti a náboje ( $m/z$ )
- analyzátor je umístěn za iontovým zdrojem (tzn. molekuly již byly převedeny na ionty) a před detektorem (před detekcí musíme ionty rozdělit podle  $m/z$ )
- dělení iontů v analyzátoru probíhá za vysokého vakua (cca.  $10^{-3}$ - $10^{-11}$  Pa, podle typu analyzátoru)
- dělení iontů podle  $m/z$  lze dosáhnout na základě různých fyzikálních principů:
  - 1/ zakřivení dráhy letu iontů v magnetickém nebo elektrickém poli (magnetický nebo elektrostatický analyzátor)
  - 2/ různá stabilita oscilací iontů v dvoj- nebo trojrozměrné kombinaci stejnosměrného a vysokofrekvenčního střídavého napětí (kvadrupól nebo iontová past)
  - 3/ různá doba rychlosti letu iontů (analyzátor doby letu – TOF)
  - 4/ různá frekvence harmonických oscilací v Orbitrapu
  - 5/ různá absorpce energie při cykloidálním pohybu iontů v kombinovaném magnetickém a elektrickém poli (iontová cyklotronová resonance – ICR)



# Detekce iontů

- detektory iontů používají všechny analyzátory kromě FTICR a Orbitrap, kde je v analyzátoru prováděna zároveň detekce
- ionty po rozdělení v hmotnostním analyzátoru dopadají na detektor iontů, který generuje signál z dopadajících iontů
  - tvorba sekundárních elektronů, které se následně zesilují
  - indukce proudu po dopadu iontů
- dříve využití fotografické desky, kde ionty o určité  $m/z$  dopadají na jedno místo desky a vytvářejí body, intenzita iontů je dána intenzitou zbarvení bodu



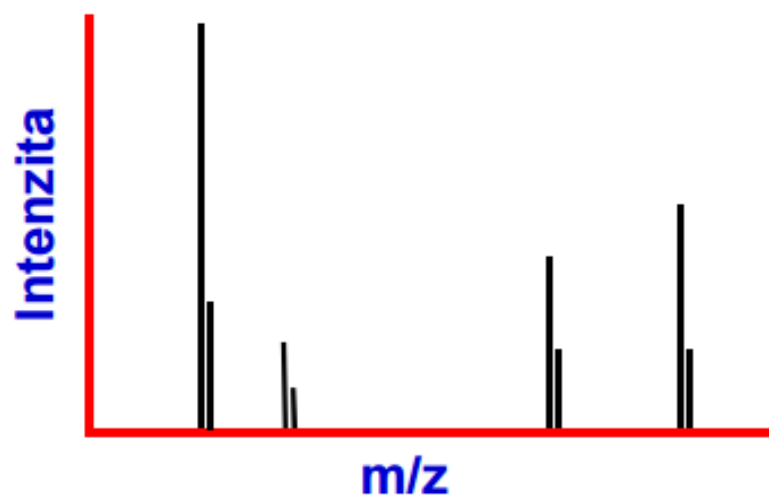
Fotografická deska Thompsonova spektroskopu (1907)

# Vakuová technika

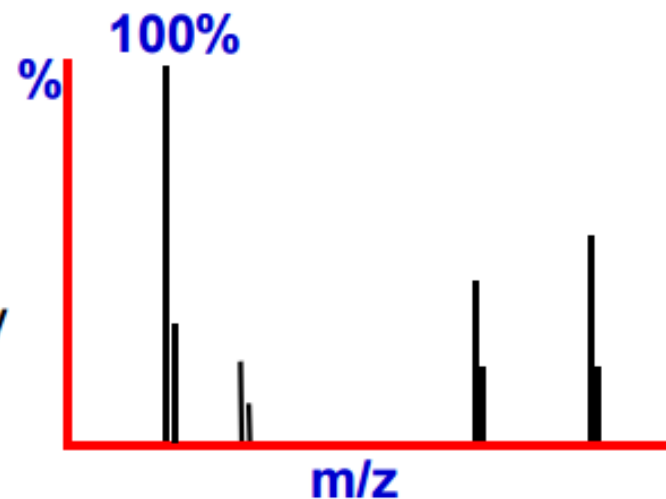
- různé požadavky na hodnotu vakua v různých částech hmotnostního spektrometru
  - iontový zdroj - za atmosférického tlaku (API - ESI, APCI, APPI) nebo vakua (EI, CI, MALDI)
  - hmotnostní analyzátor - vždy pracuje za vysokého vakua, hodnota vakua se liší podle typu analyzátoru ca.  $10^{-3}$  až  $10^{-11}$  Pa
  - detektor - vakuum
- k získání vysokých hodnot vakua je obvykle potřeba dvou- nebo třístupňové čerpání velmi výkonnými vakuovými pumpami
  - 1. stupeň čerpání - rotační olejové, spirálové a membránové pumpy (výkon 80 l/s)
  - 2. stupeň čerpání - turbomolekulární nebo difúzní pumpy (výkon 250 l/s)
- proč vysoké vakuum? ionty musí mít dostatečně dlouhou střední dráhu a nesmí docházet ke kolizním srážkám s neutrálními atomy

# Hmotnostní spektrum

- **Základní veličiny** – intenzita (absolutní, relativní), poměr hmotnosti a náboje ( $m/z$ )

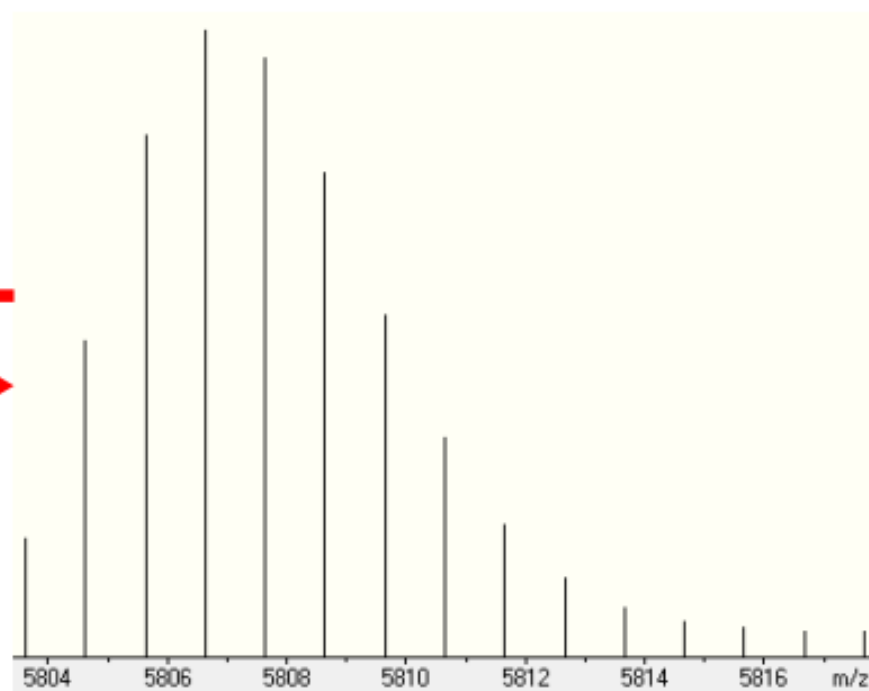
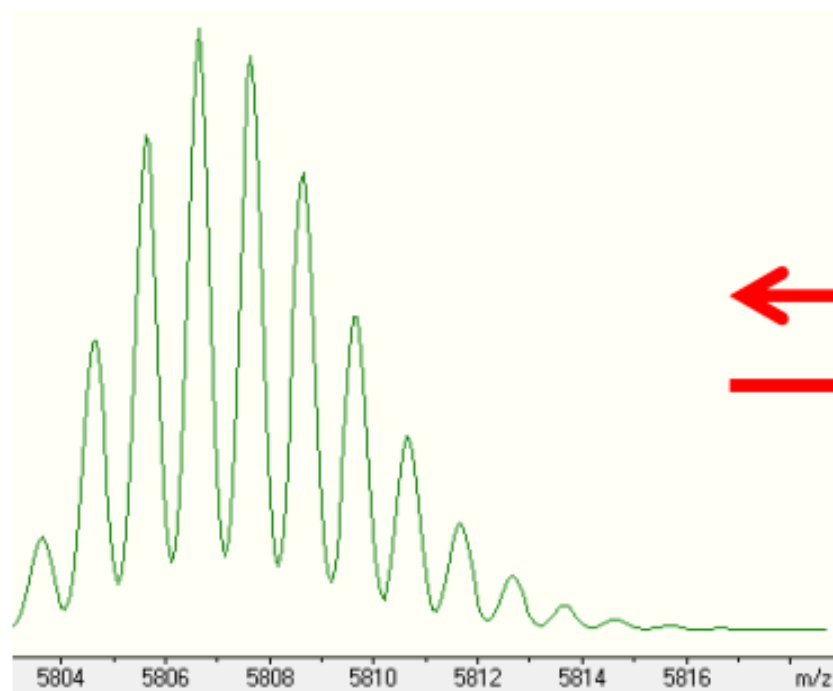


- měří se intenzita iontů v závislosti na  $m/z$ :
  - skenování = změna skenované veličiny ( $U, V, B$ ) –  $Q$ , sektorové analyzátory, IT
  - záznam signálu v čase – TOF, FTICR, Orbitrap
- normalizace spekter:
  - převedení absolutních intenzit na relativní
  - intenzita osy y je v rozsahu 0-100%
  - intenzita základního píku spektra je 100% a intenzity ostatních píků jsou k ní vztaženy



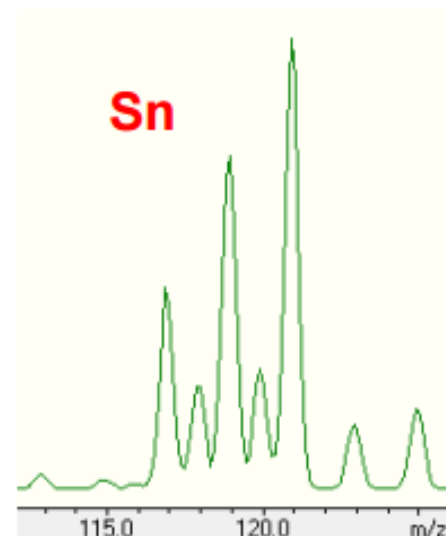
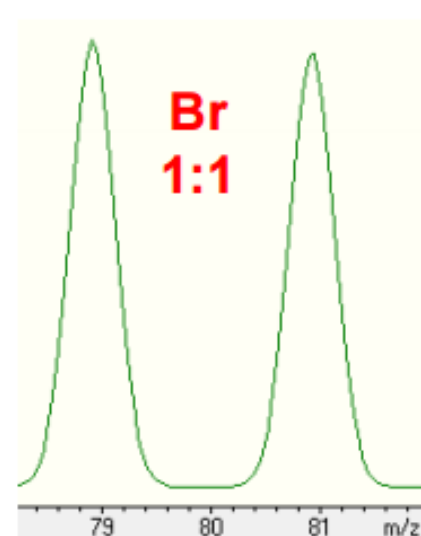
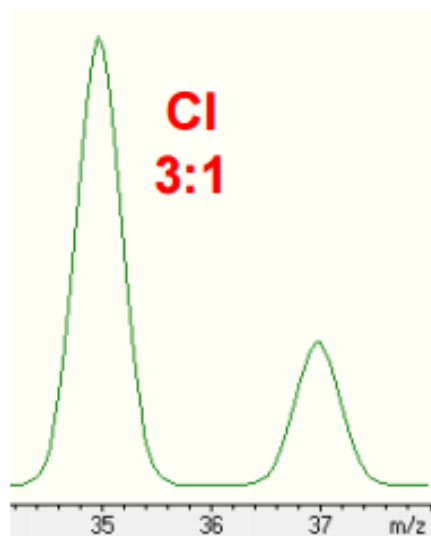
# Hmotnostní spektrum

- profilové spektrum (kontinuální) - profil složený z naměřených bodů, gaussovský tvar píků, vhodné pro kontrolu kvality píků, velké množství dat
- čárové spektrum (centroidální) - píky převedené na čáry, které odpovídají jejich středu, intenzita odpovídá výšce nebo ploše píku, menší množství dat, nelze převést zpětně na profilové spektrum!



# Ionty v hmotnostních spektrech

- závislé na typu použité ionizace
- ionty s **lichým počtem elektronů** -  $M^+$ , především elektronová ionizace
- ionty se **sudým počtem elektronů** - spektra měkkých ionizačních technik
- ionty **(de)protonovaných** molekul -  $[M+H]^+$ ,  $[M-H]^-$ , určení molekulové hmotnosti ( $M_R$ )
- **adukty** molekul -  $[M+Na]^+$ ,  $[M+K]^+$ ,  $[M+NH_4]^+$ , s mobilní fází, atd., ověření  $M_R$
- **fragmentové** (produktové) ionty – strukturní informace, fragmentace funkčních skupin, částí molekuly, atd.
- ionty **izotopů** - atomy chemického prvku, které mají stejný počet protonů, ale rozdílný počet neutronů, tedy stejné atomové číslo a rozdílnou atomovou hmotnost



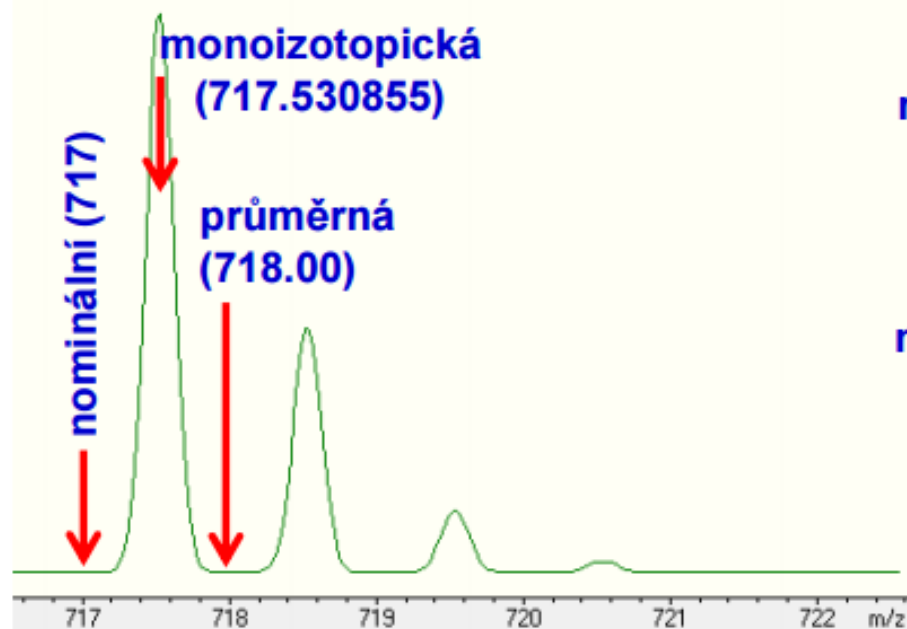
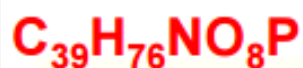
## Přírodní zastoupení izotopů běžných organických prvků

Prvek	"M"		"M+1"		"M+2"		Typ prvku
	m/z	%	m/z	%	m/z	%	
<b>H</b>	<b>1</b>	<b>100</b>	<b>2</b>	<b>0.015</b>			"M"
<b>C</b>	<b>12</b>	<b>100</b>	<b>13</b>	<b>1.1</b>			"M+1"
<b>N</b>	<b>14</b>	<b>100</b>	<b>15</b>	<b>0.37</b>			"M+1"
<b>O</b>	<b>16</b>	<b>100</b>	<b>17</b>	<b>0.04</b>	<b>18</b>	<b>0.2</b>	"M+2"
<b>F</b>	<b>19</b>	<b>100</b>					"M"
<b>Si</b>	<b>28</b>	<b>100</b>	<b>29</b>	<b>5.1</b>	<b>30</b>	<b>3.4</b>	"M+2"
<b>P</b>	<b>31</b>	<b>100</b>					"M"
<b>S</b>	<b>32</b>	<b>100</b>	<b>33</b>	<b>0.79</b>	<b>34</b>	<b>4.4</b>	"M+2"
<b>Cl</b>	<b>35</b>	<b>100</b>			<b>37</b>	<b>32</b>	"M+2"
<b>Br</b>	<b>79</b>	<b>100</b>			<b>81</b>	<b>97.3</b>	"M+2"
<b>I</b>	<b>127</b>	<b>100</b>					"M"

# Hmotnosti iontů ve spektru

- **nominální hmotnost:** hmotnost vypočítaná z celočíselných hmotností prvků  
 $\text{CO}_2: 1 \times 12 + 2 \times 16 = 44$
- **monoizotopická hmotnost:** hmotnost vypočítaná z přesných hmotností prvků  
 $\text{CO}_2: 1 \times 12.0000 + 2 \times 15.9949 = 43.9898$
- **průměrná hmotnost:** vážený průměr hmotností jednotlivých izotopů  
 $\text{CO}_2: 1 \times 12.01 + 2 \times 16 = 44.01$

**Fosfoethanolamin - PE(16:0/18:1)**

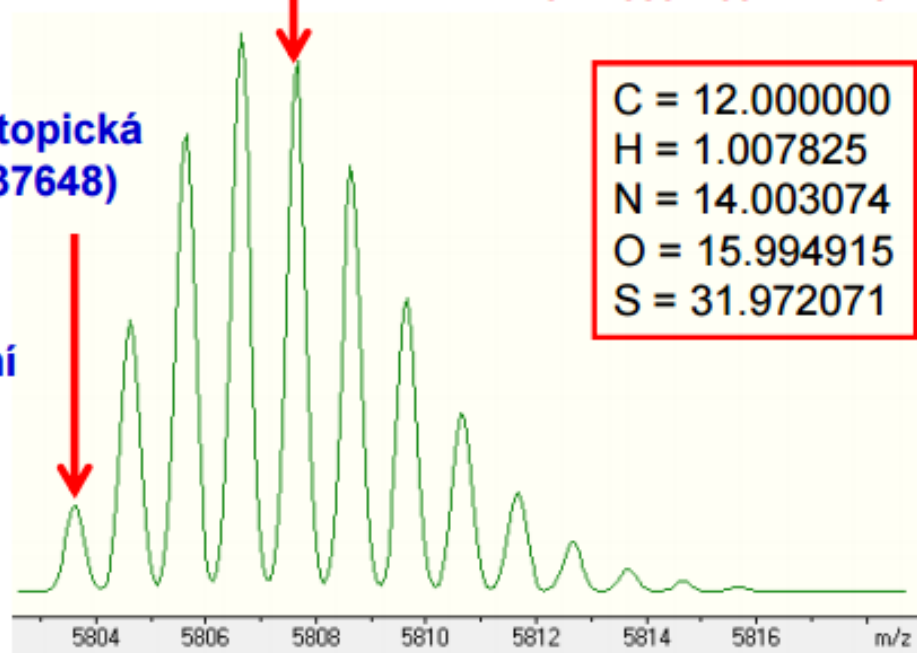


**průměrná  
(5807.59)**

**Inzulín**  
 $\text{C}_{257}\text{H}_{383}\text{N}_{65}\text{O}_{77}\text{S}_6$

monoizotopická  
(5803.637648)

nominální  
(5801)



C = 12.000000
H = 1.007825
N = 14.003074
O = 15.994915
S = 31.972071

# Ionizační techniky

- neexistuje univerzální ionizační technika pro všechny látky, které se mohou lišit z různých chemických hledisek, proto je vždy třeba vybrat optimální způsob ionizace pro danou látku
- celá řada ionizačních technik, některé ionizační techniky byly nahrazeny novými a dnes se nevyužívají
- podle množství vnitřní energie po ionizaci lze dělit na "tvrdé" a "měkké"
- mohou pracovat za atmosférického nebo sníženého tlaku
- dnes největší praktický význam:
  - ESI, APCI, APPI - pro spojení HPLC/MS
  - ESI, MALDI - analýza biomolekul, nejšetrnější ionizační techniky
  - EI - GC/MS, možnost porovnání s knihovny spekter, strukturní informace, dobře popsaná pravidla fragmentace
  - MALDI, DESI, SIMS - pro MS zobrazování
  - DESI, DART - desorpční ambientní techniky



# MALDI

**(Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization)**

MALDI-TOF nastudovat z URL:

[http://web2.mendelu.cz/af\\_239\\_nanotech/J\\_Met\\_Nano/0214/pdf/d-microbial\\_identification\\_by\\_maldi-tof\\_ms.pdf](http://web2.mendelu.cz/af_239_nanotech/J_Met_Nano/0214/pdf/d-microbial_identification_by_maldi-tof_ms.pdf)

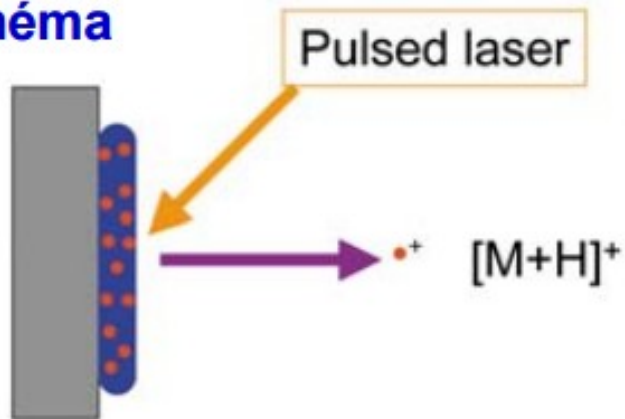
# Ionizace laserem za účasti matrice

- ionizace molekul s velkou molekulovou hmotností - biopolymery a syntetické polymery (desítky až stovky tisíc Da, existují aplikace i přes milión Da)
  - proteiny, oligonukleotidy, lipidy, polymery
- pro látky **nepolární** až **polární**
- ionizace může probíhat za různých tlaků
  - nízkotlaké MALDI (klasické) - ionizace probíhá za vakua (<1 Pa)
  - středně tlaké MALDI - ionizace za sníženého tlaku
  - atmosférické MALDI (AP-MALDI) - pracuje za okolního tlaku, jiné ionty ve spektrech, nižší citlivost
- **měkká** ionizační technika, většinou jednou či dvakrát nabité ionty
  - $[M+H]^+$ ,  $[M+2H]^{2+}$ ,  $[M-H]^-$
  - adukty s alkalickými kovy
- spojení s HPLC v **off-line** uspořádání - nanášení spojité stopy na terčik nebo sběr frakcí
- možnost archivace vzorku a jeho opětovné přeměření
- obtížná kvantitativní analýza
- ionty matrice ve spektrech

# Ionizace laserem za účasti matrice

- vzorek je společně s matricí nanesen na MALDI terčik
- energie krátkého laserového pulsu je absorbována matricí
- následně dojde k lokální desorpci matrice a analytu (vznikají klastry matrice a analytu)
- excitované molekuly matrice jsou stabilizovány přenosem protonu na analyt nebo dochází ke kationizaci molekul analytu za vzniku iontů analytu
- ionty jsou následně urychleny do hmotnostního analyzátoru

Schéma



MALDI terčik



# Ambientní ionizační techniky

- ionizační techniky pracující mimo hmotnostní spektrometr
- ionizace neprobíhá v iontovém zdroji jako třeba u ESI, ale **v otevřeném prostoru**
  - lze analyzovat i objekty neobvyklého tvaru a velikosti
- umožňují přímou analýzu vzorků s **minimální** nebo **žádnou** přípravou vzorku
- jsou použitelné jako zdroj iontů pro většinu hmotnostních analyzátorů
- jsou to **měkké** a velmi **šetrné** ionizační techniky - vnitřní energie vzniklých iontů by měla být srovnatelná nebo nižší než při použití ESI, APCI, APPI
- využívají principy běžných ionizačních technik, ale v otevřeném prostoru
  - ESI, CI, fotoionizace, atd.
- lze využít i pro **hmotnostně spektrometrické zobrazování** - nižší prostorové rozlišení v porovnání se SIMS a MALDI

# Praktické ukázky DESI

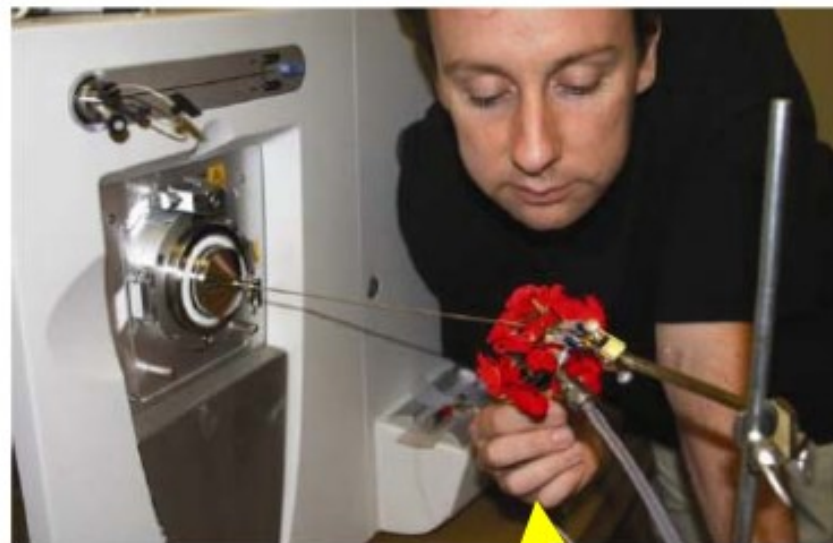
- živočišná tkáň (prst živého člověka)



Photograph S3 Aqueous alcohol being sprayed onto outer skin surface to detect compounds including drugs and metabolites by DESI

- bez jakékoliv úpravy vzorku!

- rostlinná tkáň (kytka)



# Hmotnostní analyzátory

## Podle způsobu dělení iontů:

- **skenující** - postupně mění skenovanou veličinu (U, V, B) a propouští ionty o určité m/z (kvadrupólový analyzátor, sektorový magnetický analyzátor)
- **iontové pasti** - zadržuje ionty pomocí napětí na elektrodách a následně je analyzuje (iontová past, orbitrap, FT-ICR)
- **průletový** - měří čas iontů potřebný pro překonání určité vzdálenosti (TOF)
- analyzátory **pohyblivosti iontů** - dělení iontů podle jejich velikosti a tvaru

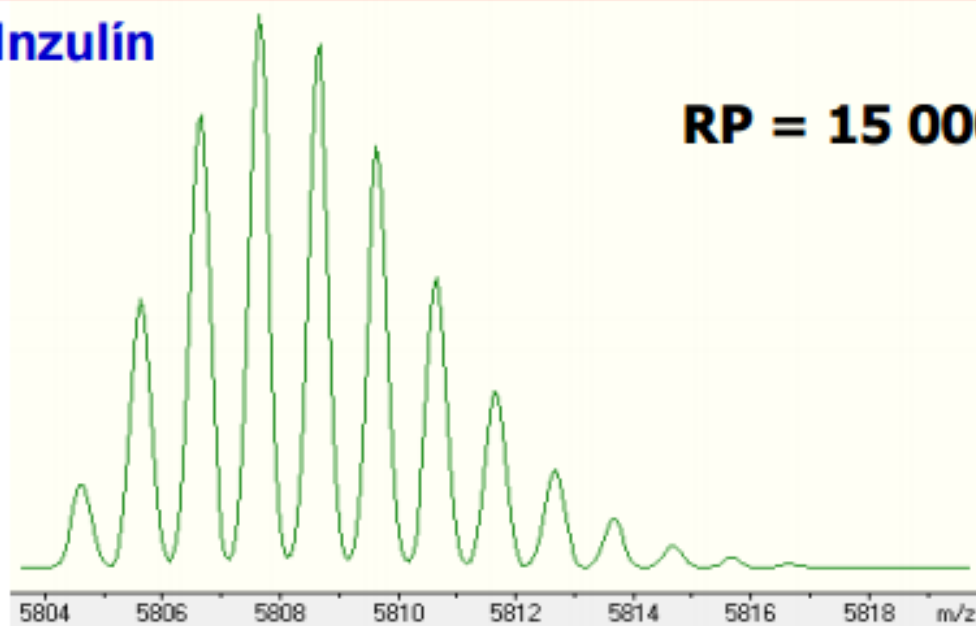
## Základní parametry hmotnostních analyzátorů:

- **rozlišovací schopnost (rozlišení)** – schopnost analyzátoru poskytnout rozlišené signály pro ionty s podobnou m/z
- **správnost určení m/z** - míra schopnosti analyzátoru určit správnou hodnotu m/z
- **hmotnostní rozsah** – rozsah m/z hodnot, přes který analyzátor může zaznamenat spektra
- **dynamický rozsah** - rozmezí koncentrací, v nichž je odezva (lineárně) závislá na koncentraci
- **rychlost** – rychlost záznamu spekter

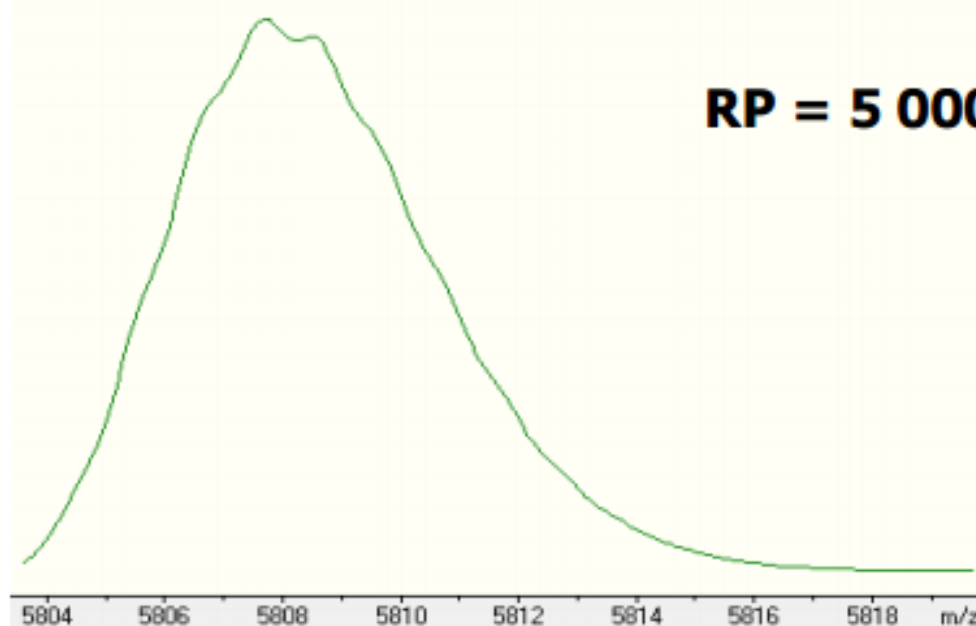
# Vysoká a nízká rozlišovací schopnost

Inzulín

**RP = 15 000**



**RP = 5 000**



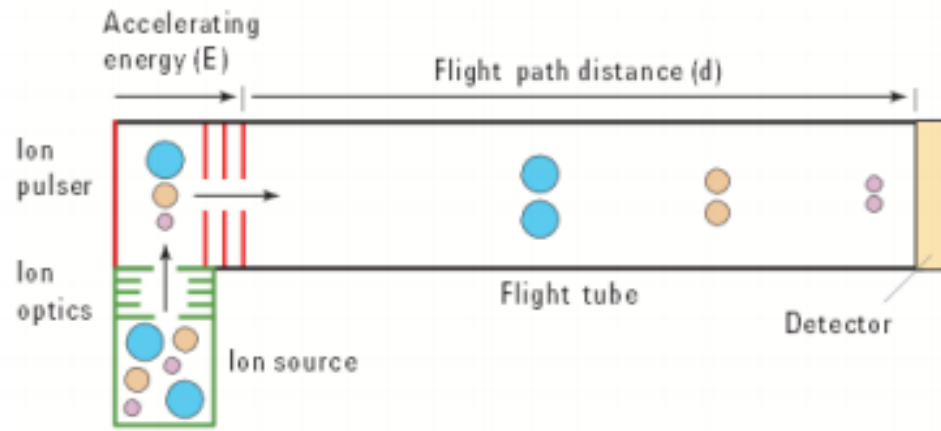
# **Analyzátor doby letu**

**(Time-of-Flight, TOF)**



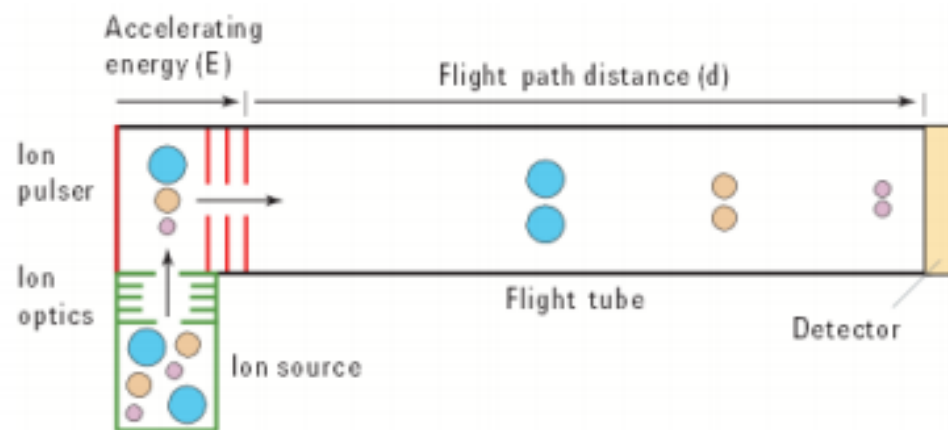
# Analyzátor doby letu

- RP: 10 000 - 60 000
- správnost určení hmotnosti: 1 - 5 ppm
- hmotnostní rozsah: až  $10^5$  (až  $10^6$  bez reflektoru, 20 000 pro QqTOF spektrometr)
- skenovací rychlost: 10 - 50 Hz
- hmotnostní analyzátor s teoreticky neomezeným hmotnostním rozsahem
- pulzní analyzátor - často s MALDI ionizací



# Analyzátor doby letu

- měří **dobu letu iontů** potřebnou pro překonání určité dráhy
- ionty jsou urychleny napěťovým pulsem do **letové trubice** (oblast bez pole), kde letí různou rychlostí v závislosti na jejich  $m/z$  a dopadají na detektor v různém čase
  - ionty s menší hodnotou  $m/z$  o stejné kinetické energii se pohybují rychleji, takže se rychleji dostanou na detektor (“malé ionty letí rychleji”)
- měření spekter je velice rychlé a hmotnostní rozsah  $m/z$  není teoreticky omezen, záleží pouze na době, po kterou budeme čekat na dopad iontů (lze  $m/z > 10^6$ )
- jedná se o typicky pulzní hmotnostní analyzátor, protože nejdříve jsou velmi krátkým pulzem ionty urychleny na vstupu do analyzátorové trubice a potom se přesně měří čas (řádově ns –  $\mu$ s), za který ionty “dolétnou” k detektoru, podle čehož se určí jejich  $m/z$



## Zvýšení rozlišení u TOF analyzátoru

- rozlišovací schopnost lineárního TOF analyzátoru není příliš vysoká (cca. 1 000 – 3 000), použitím dále uvedených technik lze výrazně zvýšit RP až na ca. 15 - 25 000, ve speciálním případě prodloužené letové trubice až 60 000

### 1/ Analyzátor doby letu s reflektorem (rTOF)

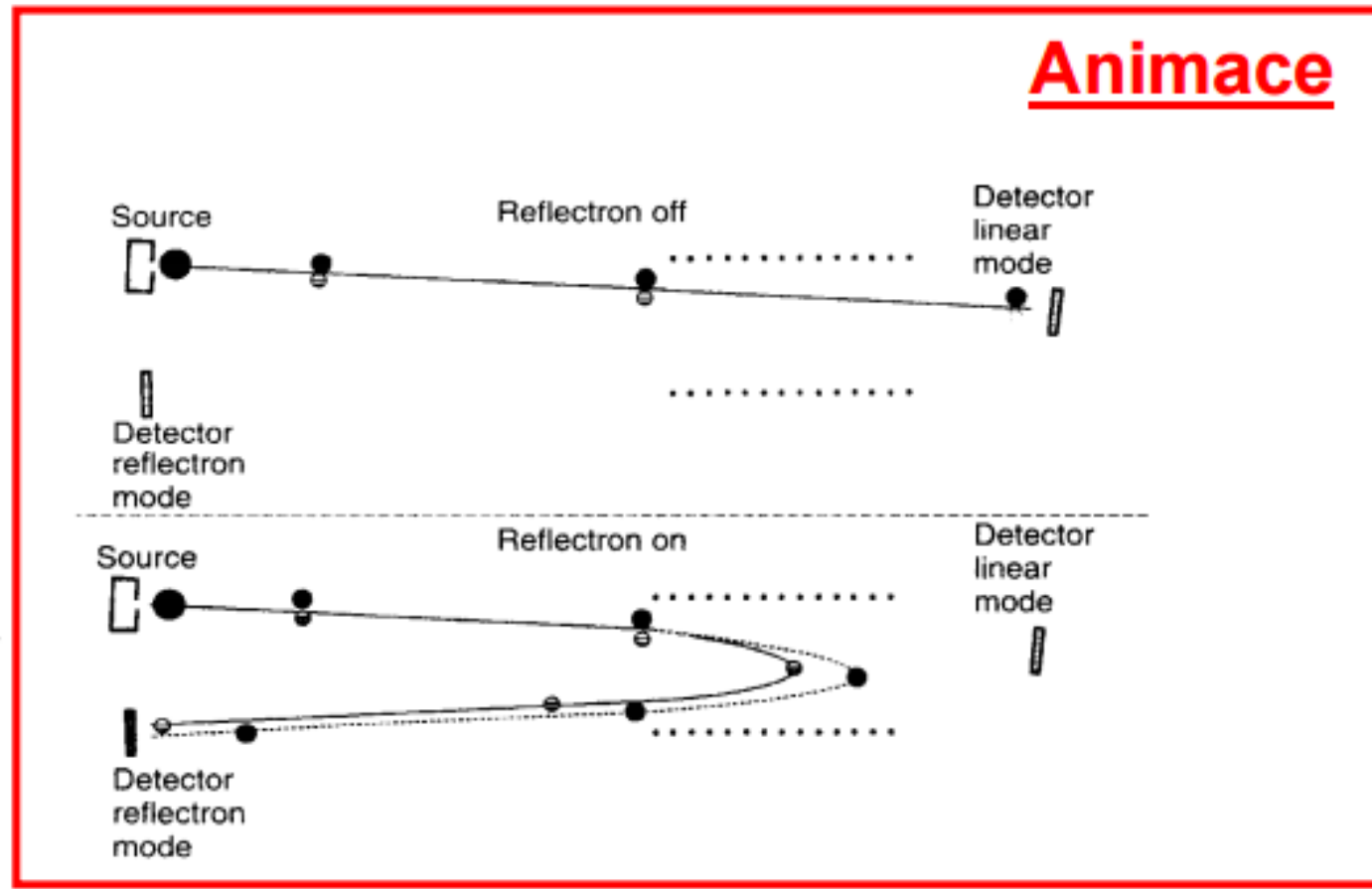
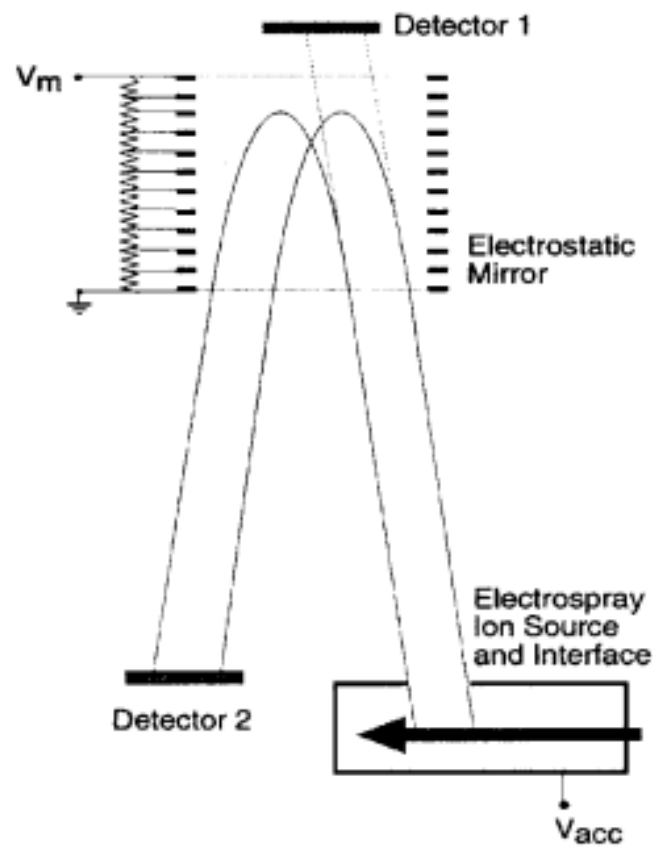
- použití tzv. iontového zrcadla neboli reflektoru, které slouží k vyrovnání různých kinetických energií pro ionty se stejnou hodnotou  $m/z$  (při ionizaci získají ionty kinetickou energii s určitou distribucí, což vede k rozšíření jejich píků a tím ke zhoršení RP)

### 2/ Opožděná extrakce iontů (Delayed Extraction)

- ionty jsou z MALDI zdroje extrahovány s malým zpožděním, čímž dojde díky vzájemným srážkám ke sjednocení jejich kinetických energií

# Princip iontového zrcadla (reflektronu)

- ionty s větší kinetickou energií proniknou hlouběji do odrazového elektrického pole reflektoru před jejich odrazem (oproti iontům s nižší  $E_k$ ), čímž dojde k jejich opoždění oproti iontům s nižší  $E_k$  a tím i k vyrovnání celkových drah iontů s různou  $E_k$
- hloubka průniku iontů do elektrického pole reflektoru je úměrná jejich  $E_k$  a nezávisí na  $m/z$



# **Kalibrace hmotnostní stupnice**

# Kalibrace hmotnostní stupnice

- u všech typů analyzátorů je vždy nutné kalibrovat hmotnostní škálu
- není tak kritické u analyzátorů s nízkým rozlišením / nízkou správností určení hmoty (např. Q, iontové pasti)
  - postačuje správnost  $\pm 0.1$  m/z
  - obvykle stabilní poměrně dlouhou dobu, ale i přesto je třeba pravidelně kontrolovat a v případě pochybností kalibrovat
- analyzátoři s vysokou správností určení hmoty ( $< 5$  ppm)
  - vysoké nároky na správnost a přesnost kalibrace, potřebná stabilita a robustnost systému
  - interval kalibrace silně závisí na typu analyzátoru - před každou analýzou (QqTOF), jednou za týden (orbitrap), atd.

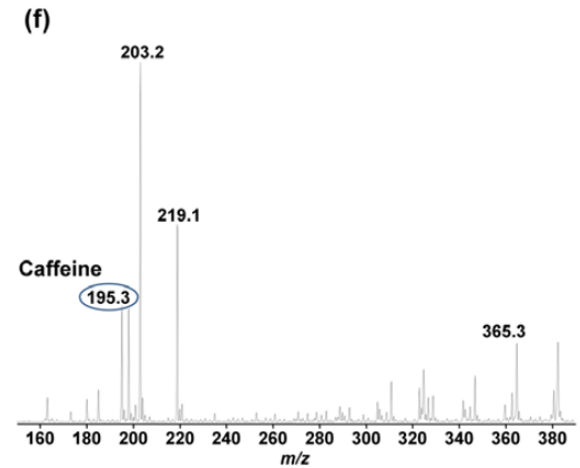
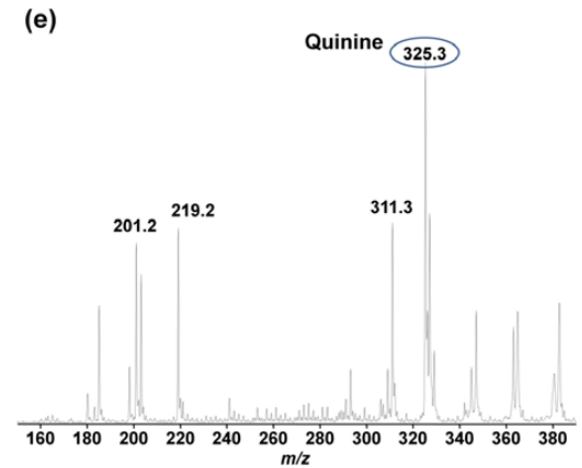
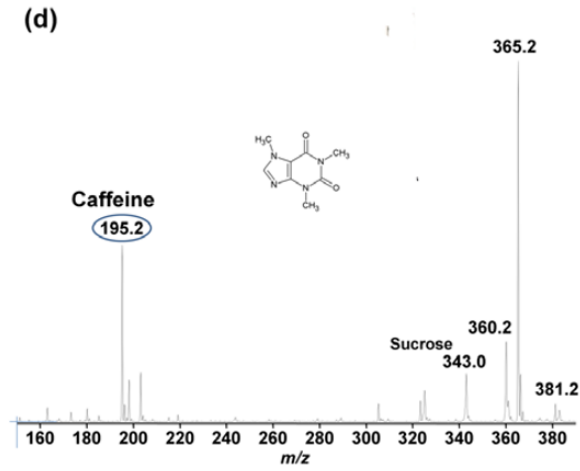
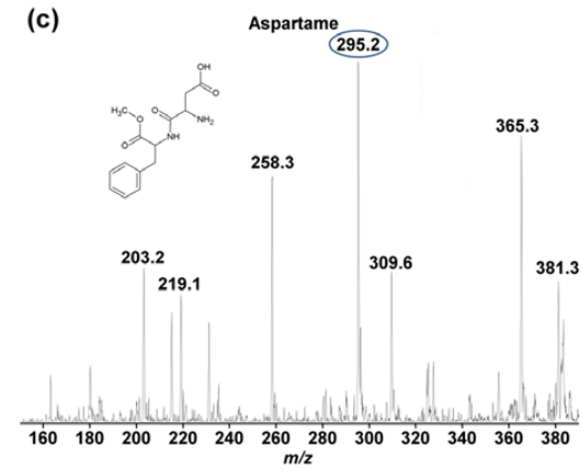
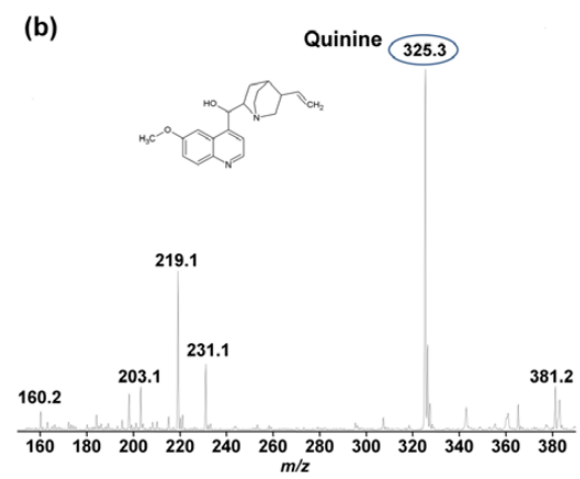
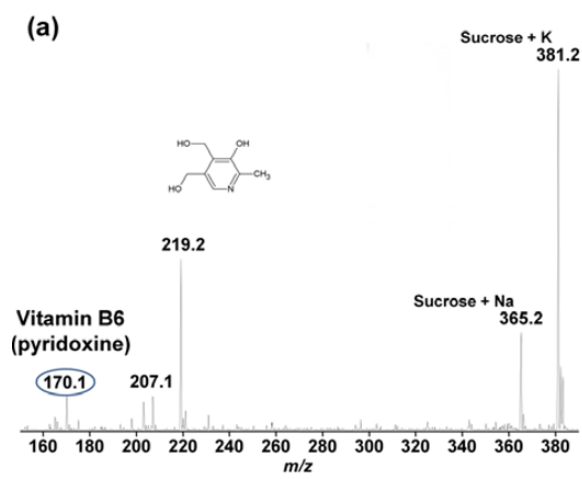
## Kalibrace hmotnostní stupnice

- **externí kalibrace** – kalibrace a vlastní měření není ve stejný okamžik, nejdříve kalibrace a pak měření (nebo naopak), což někdy může způsobit určitý posun  $m/z$ 
  - obecně poskytuje mírně horší výsledky oproti interní kalibraci, ale je menší riziko hmotnostních interferencí analytu s kalibrantem
- **interní kalibrace** – kalibrant i analyt jsou do iontového zdroje přivedeny ve stejný okamžik a ve spektru pozorujeme jak analyt tak i kalibrant
  - poskytuje nejpřesnější výsledky, ale hrozí riziko hmotnostních interferencí (tzn. analyt a kalibrant nesmí mít příliš blízké hmotnosti, aby je daný typ analyzátor dokázal spolehlivě rozlišit, pokud by se píky analytu a kalibrantu ovlivnily, pak vzniká chyba)
    - "lock mass" kalibrace - založena na kontinuální kalibraci na vybraný ion pozadí o známém složení nebo sprejování standardu druhým sprejem
- **kalibranty** – musí se jednat o látky s přesně definovaným elementárním složením a známým typem iontu, hodnoty  $m/z$  nesmí interferovat s analytem, výhodné může být též blízký strukturní typ analytu (není podmínkou) nebo přítomnost monoizotopických prvků (např. perfluorované látky, CsI)
  - typické kalibranty: syntetické polymery (např. PEG, PPG), klastry solí (např. monoizotopický CsI), směsi peptidů, apod.

## Kvantitativní analýza pomocí MS

- kvantitativní výsledky jsou závislé na typu analyzátoru a ionizace
  - QqQ - standard pro kvantitativní analýzu, citlivý, rychlý a vysoká selektivita díky možnosti MS skenů, omezený rozsah a rozlišovací schopnost
  - při správně zvoleném standardu lze použít všechny typy analyzátorů
  - MALDI - obecně horší kvantitativní analýza díky nižší reprodukovatelnosti
- metody kvantitativní analýzy
  - metoda interního standardu, externí se nedoporučuje
  - metoda přímého srovnání - koncentrace je počítána na základě srovnání se standardem o známé koncentraci (pouze jedna koncentrace)
  - metoda kalibrační přímky - kalibrační závislost interního standardu na koncentraci
  - metoda standardního přídatku
- pro zvýšení citlivosti a selektivity se využívají pro kvantitativní analýzu často speciální MS skeny
  - nejčastěji sken iontové reakce - vysoká selektivita





# Úkol

- změřit MALDI-TOF spektrum:
  - matrice
  - vzorku obsahujícího kofein (s matricí)
  - vzorku A slin bez kofeinu (s matricí)
  - vzorku B slin po konzumaci nápoje bez kofeinu (s matricí)
  - vzorku C slin po konzumaci nápoje s kofeinem (s matricí)
  - (vzorky B, C jsou vzorky slin po konzumaci nápoje, jeden z nápojů obsahoval kofein, druhý ne)
- ověřit, že hlavní pík kofeinu není současně píkem matrice
- určit, který ze vzorků B, C obsahoval kofein