

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie

ANALÝZA ETHYLGLUKURONIDU POMOCÍ
KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZY S HMOTNOSTNÍ
SPEKTROMETRIÍ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Jméno autora: Martin Švidrnoch

Vedoucí práce: RNDr. Jan Petr, Ph.D.

Studijní program: N1407 Chemie

Studijní obor: Analytická chemie

Rok: 2012

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou diplomovou práci vypracoval samostatně a použil jsem pouze podklady uvedené v příloženém seznamu.

Souhlasím s tím, aby práce byla prezenčně zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie, Přírodovědecké fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne 25.4.2012

.....
Vlastnoruční podpis

Poděkování

Chtěl bych poděkovat svým kolegům, učitelům i přátelům, kteří svou nemalou pomocí a podporou významně přispěli ke vzniku této práce, především pak RNDr. Janu Petrovi, Ph.D. za vedení mé práce a doc. RNDr. Vítězslavu Maierovi, Ph.D. za cenné rady a konzultace.

Děkuji také své rodině za vytrvalou podporu a pomoc, které mi ochotně poskytovali po celou dobu mého studia.

Martin Švidrnoch

SOUHRN

Předložená diplomová práce se zabývá studiem podmínek pro stanovení ethylglukuronidu, produktu konjugačního metabolismu ethanolu v organismu, pomocí kapilární elektroforézy a hmotnostní spektrometrie.

Teoretická část práce se věnuje popisu základních mechanismů kapilární elektroforézy, hmotnostní spektrometrie, jejich instrumentaci a spojení. Samostatná kapitola se také věnuje popisu konjugačního metabolismu ethanolu se zaměřením na ethylglukuronid a jeho využití ve forenzní chemii a toxikologické analýze.

Experimentální část je zaměřená na studium podmínek separace a detekce ethylglukuronidu v moči. Je v ní diskutován vliv složení a koncentrace pracovního elektrolytu, jeho pH, průtok a složení pomocné kapaliny, tlak pomocného plynu a teplota sprejovací kapiláry. Zjištěné podmínky jsou aplikovány na analýze reálných vzorků moči po požití alkoholických nápojů.

SUMMARY

This diploma thesis is concerning with the study of the conditions for determination of ethylglucuronide, a product of the bioconjugation metabolism of ethanol in the human body using the capillary electrophoresis and mass spectrometry.

The theoretical part is devoted to the description of the basic mechanisms of capillary electrophoresis, mass spectrometry, its instrumentations and their hyphenations. Another separate chapter is dealing with the description of the conjugation metabolism of ethanol focusing on ethylglucuronide and its use in the forensic chemistry and toxicology analysis.

The experimental part is focused on the study of conditions for separation and detection of ethylglucuronide in human urine samples. The influence of composition and concentration of the background electrolyte, its pH, flow and composition of the sheath liquid, pressure and temperature of the sheath gas and the spraying capillary temperature is discussed. The determined conditions are applied to the analysis of the urine samples after ingestion of alcoholic beverages.

OBSAH

1 Úvod	1
2 Teoretická část	3
2.1 Kapilární elektroforéza a její instrumentace	3
2.1.1 Elektroforetická mobilita	3
2.1.2 Elektroosmotický tok	5
2.1.3 Migrační čas	8
2.2 Základní aspekty separace	8
2.2.1 Účinnost separace	8
2.2.2 Selektivita	9
2.2.3 Rozlišení	9
2.2.4 Instrumentace v kapilární elektroforéze	10
2.2.5 Separační kapiláry	10
2.2.6 Dávkování vzorku	11
2.2.7 Separační napětí	12
2.3 Detektory	12
2.3.1 Absorpční optické detektory	13
2.3.2 Emisní optické detektory	14
2.3.3 Elektrochemické detektory	15
2.4 Spojení kapilární elektroforézy a hmotnostní spektrometrie	16
2.4.1 Iontový zdroj	16
2.4.2 Ionizace elektrosprejem	17
2.4.3 Elektrický obvod – spojení dvou systémů	20
2.4.4 Hmotnostní analyzátory	21
2.4.5 Tandemová hmotnostní spektrometrie	27
2.4.6 Sběr dat a skenovací módy v CE-MS	28
2.4.7 Mechanismus fragmentačních reakcí	29
2.4.8 Spojení CE-MS v toxikologické analýze	30
2.5 Ethylglukuronid a konjugační metabolismus ethanolu	31
3 Experimentální část	36
3.1 Studium experimentálních podmínek	36
3.1.1 Chemikálie a materiál	36

3.1.2 Instrumentace	36
3.1.3 Optimalizace CE-ESI-MS podmínek	37
3.2 Linearita a kalibrační závislost	46
3.3 Analýza reálných vzorků	47
4 Závěr	51
5 Rejstřík použitých pojmů a zkratk	52
6 Seznam použité literatury	54

*„Nejkrásnější a nejhlubší pocit
jaký může člověk zažít je poznat tajemno.
To je základním principem náboženství, stejně tak
jako veškerého seriózního úsilí v umění a ve vědě.“*

Albert Einstein (1879-1955)

1. Úvod

Analytická chemie dnes představuje moderní a dynamicky se rozvíjející vědeckou disciplínu, zahrnující mnoho technik, které se vzájemně propojují a naplňují tak jednu z mnoha jejích definic – je to věda chemických informací [1]. Současný trend, který se objevuje napříč celou analytickou chemií, je miniaturizace. Ať už je jejím výsledkem zmenšení instrumentálních technik nebo jejich částí, vývoj mikroanalytických systémů nebo jen prostý požadavek na čím dál menší detekční limity pro stanovení látek i ve velmi nízkých koncentracích. Tyto trendy se stále častěji aplikují v analýze fyziologicky účinných látek, které jsou předmětem bohatého a intenzivního vývoje a potřeba efektivní a přesné analýzy je vysoká. Fyziologicky aktivní látky jsou v zájmu lidstva od nepaměti. Potřeba nových léčiv je o to výraznější s rostoucím počtem a rozvojem civilizačních chorob, které člověka postihují. Analytická chemie pak umožňuje získávat detailnější informace nejen o struktuře dané látky, ale rovněž umožňuje odhalit mechanismus jejího působení a to i na úrovni molekulární biologie. Tyto informace jsou o to cennější, když uvážíme, jak důležitá je komplexní znalost interakce účinné látky s organismem.

Sofistikovanou instrumentální technikou, která se stále více dostává do popředí zájmu mezi ostatními analytickými technikami je kapilární elektroforéza. Její všestrannost a obrovský aplikační potenciál z ní činí jednu z nejuniverzálnějších metod vůbec. Ve spojení s hmotnostní spektrometrií je pak účinným nástrojem pro identifikaci a strukturní charakterizaci nepřeberného množství látek různého charakteru. Spojení těchto dvou technik v analýze metabolitů fyziologicky aktivních látek v lidském organismu je hlavním předmětem této práce. Kromě experimentální části, která se zabývá možnostmi analýzy vybraných metabolitů v biologických vzorcích, jsou v teoretické části široce diskutovány teoretické aspekty obou technik, zasazené do moderních poznatků a aplikací. Cílem předkládané práce

je v teoretické rovině poskytnutí přehledu a charakterizace používaných metod spojení kapilární elektroforézy a hmotnostní spektrometrie v analýze metabolitů fyziologicky aktivních látek. V experimentální části jsou pak teoretické poznatky aplikovány na příkladech analýzy metabolitů pro forenzní a toxikologické účely.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Kapilární elektroforéza a její instrumentace

Obecným principem kapilární elektroforézy (CE) je separace nabitých látek ve stejnosměrném elektrickém poli na základě rozdílných elektroforetických mobilit [3]. Kapilární elektroforéza dnes patří mezi vysoce účinné separační techniky, které umožňují kvalitativní i kvantitativní analýzu a ve spojení s dalšími detekčními technikami dovolují také identifikaci zkoumaných látek. Moderní elektromigrační separační techniky zahrnují několik metod, které se liší svým separačním mechanismem. Z těchto lze jmenovat zejména micelární elektrokinetickou chromatografii (MEKC), kapilární elektrochromatografii (CEC), kapilární izoelektrickou fokusaci (CIEF), kapilární izotachoforézu (CITP), kapilární gelovou elektroforézu (CGE) a v neposlední řadě také nejvíce rozšířenou a využívanou kapilární zónovou elektroforézu (CZE). Uvedené techniky umožňují separovat jak látky s nízkou molekulovou hmotností, tak také biomakromolekuly, jejichž molekulová hmotnost se pohybuje v řádu kDa.

2.1.1 Elektroforetická mobilita

Základní veličinou charakterizující pohyb nabitě částice ve stejnosměrném elektrickém poli je elektroforetická mobilita, resp. pohyblivost, označovaná obvykle jako μ_{ep} . Jedná se o veličinu, která určuje rychlost pohybu nabitých částic v_{ep} ve stejnosměrném elektrickém poli o intenzitě E :

$$v_{ep} = \mu_{ep} E \quad (1)$$

Pohyb nabitých částic v elektroforetickém systému je určován výslednicí působení dvou sil. Po aplikaci elektrického napětí mezi oba konce kapiláry vzniká elektrické pole. Intenzita elektrického pole E je definována jako podíl vloženého napětí U a délky separačního lože (kapiláry) L podle vztahu (2):

$$E = \frac{U}{L} \quad (2)$$

Působením elektrického pole se nabité částice začnou pohybovat vlivem elektrické síly F_{el} k elektrodám s opačnou polaritou. Velikost elektrické síly je přímo úměrná náboji dané částice q a intenzitě vloženého elektrického pole E podle vztahu (3):

$$F_{el} = qE \quad (3)$$

Pohyb iontů, vznikající v důsledku působení elektrické síly, je brzděn tzv. frikční silou F_{fr} , která je podle Stokesova zákona (4) závislá na velikosti iontu a prostředí, v němž se iont pohybuje:

$$F_{fr} = 6\pi\eta r v_{ep} \quad (4)$$

V rovnovážném stavu si budou obě opačně orientované síly rovny a elektroforetickou mobilitu lze tedy také definovat pomocí rovnosti obou sil, tedy $F_{el} = -F_{fr}$:

$$\mu_{ep} = \frac{q}{6\pi\eta r} \quad (5)$$

Z výše uvedeného vztahu (5) je patrné, že elektroforetická mobilita μ_{ep} je přímo úměrná náboji iontu q a nepřímo úměrná jeho velikosti (uvažujeme-li iont s kulovým tvarem o efektivním poloměru r) a viskozitě prostředí η . Obecně lze tedy říci, že malé ionty s velkým nábojem se budou v závislosti na podmínkách pohybovat rychleji, než velké molekuly s nábojem malým. Jelikož je velikost viskozity η závislá na teplotě T (s rostoucí teplotou má viskozita tendenci klesat), bude rovněž elektroforetická mobilita ovlivňována změnou teploty a to v tom smyslu, že se bude zvyšovat s rostoucí teplotou.

Z experimentálních výsledků je možno určit tzv. zdánlivou mobilitu (μ_{av}), která je vektorovým součtem elektroforetické mobility μ_{ep} a mobility μ_{eof} , která vzniká v důsledku elektroosmotického toku:

$$\mu_{av} = \mu_{ep} + \mu_{eof} \quad (6)$$

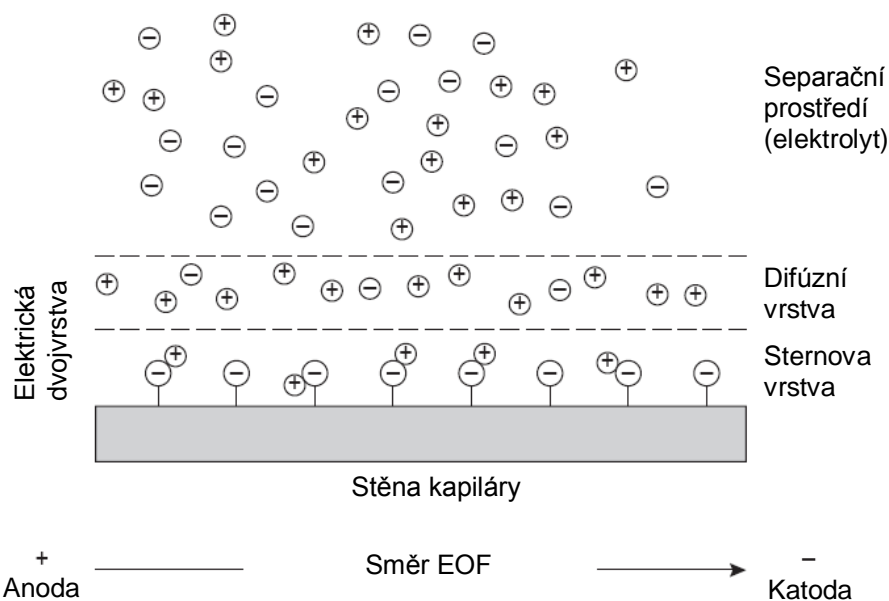
Měřenou veličinou je v elektromigračních technikách tzv. migrační čas t_m , který je možné vypočítat pomocí vztahu (7).

$$t_m = \frac{lL}{\mu_{av}U} \quad (7)$$

Ve vztahu (7) se vyskytují, kromě již definovaných nebo popsaných veličin, také celková délka kapiláry L a efektivní délka kapiláry l (délka kapiláry od začátku po detektor).

2.1.2 Elektroosmotický tok

Dalším důležitým transportním jevem v elektromigračních technikách je elektroosmotický tok (EOF), který se projevuje jako fyzický tok kapaliny uvnitř separační kapiláry vznikající po aplikaci stejnosměrného elektrického pole [2,3,8]. Je důsledkem interakce elektrického pole s difúzní částí elektrické dvojvrstvy, která vzniká mezi povrchem kapiláry a separačním elektrolytem (roztokem). Pro vznik elektrické dvojvrstvy je zapotřebí buďto adsorpce iontů na stěnu kapiláry, nebo disociace ionizovatelných skupin na jejím povrchu při kontaktu s elektrolytem. V obou uvedených případech je nezbytná přítomnost elektrického náboje na vnitřní stěně kapiláry. Vzniklá elektrická dvojvrstva se skládá z nepohyblivé Sternovy vrstvy jako výsledek elektrostatických interakcí mezi povrchovým nábojem kapiláry a ionty s opačným nábojem, a tzv. difúzní vrstvy, která je díky slabším interakcím pohyblivá. Na jejich rozhraní pak vzniká potenciálový rozdíl, který je obvykle nazýván jako *zeta* potenciál, ζ . Při vložení elektrického pole se kromě pohybující se difúzní vrstvy začne díky silné solvataci pohybovat i zbylá část roztoku, čím vzniká elektroosmotický tok. Jak je uvedeno na obr. 1, je za normálních podmínek elektroosmotický tok vyvolán pohybem solvatovaných kationtů směrem ke katodě, tedy k záporné elektrodě.



Obr. 1 – Grafické znázornění elektroosmotického toku v kapiláře. Převzato a upraveno z [2].

Jak již bylo uvedeno, můžeme ze vztahu (6) vypočítat zdánlivou mobilitu. Ta je podle vztahu (6) vektorovým součtem elektroforetické mobility a elektroosmotické mobility. Rychlost EOF je, podobně jako rychlost migrace analytů, přímo úměrná intenzitě elektrického pole a elektroosmotické mobilitě. Zmíněná elektroosmotická mobilita je přímo úměrná relativní permitivitě rozpouštědla (ϵ_r), v němž je separace prováděna, zeta potenciálu (ζ) a nepřímo úměrná viskozitě prostředí (η) podle vztahu (8):

$$\mu_{eof} = \frac{\epsilon_r \zeta}{4\pi\eta} \quad (8)$$

Důležitou roli hraje uvedený zeta potenciál, jenž je významným faktorem určujícím rychlost EOF. Zeta potenciál je úměrný náboji na vnitřním povrchu kapiláry a kromě jiného závisí na adsorpci iontů a disociaci vlastních ionizovatelných skupin na jejím povrchu. Pro křemennou kapiláru, mající na svém povrchu zejména silanolové (-Si-OH) a siloxanové (-Si-O-Si-) skupiny s $pK_a \sim 3$ je zřejmá závislost rychlosti EOF na pH pracovního elektrolytu [10]. Při hodnotách $pH < 2$ je jen nepatrné množství silanolových skupin disociováno a rychlost EOF limituje k nule. Důležitým kritériem je rovněž iontová síla elektrolytu, kterou lze v obecném případě aproximovat vztahem (9):

$$I = \frac{1}{2} \sum_{i=0}^n c_i z_i^2 \quad (9)$$

Ve vztahu (9) je iontová síla definována jako suma součinu koncentrace iontu a čtverce jeho náboje. Se zvyšující se iontovou silou (s vyšší koncentrací iontů elektrolytu) dochází ke stlačování elektrické dvojvrstvy a tudíž ke snižování zeta potenciálu, což má za následek snížení rychlosti EOF. Přehled možností ovlivňování rychlosti EOF je uveden v tabulce č. I.

Tabulka I. – možnosti ovlivňování EOF

Kontrolovaná proměnná	Efekt	Mechanismus či poznámky	Ref.
pH	pokles rychlosti EOF se snižujícím se pH a naopak	důsledek ionizace silanolových skupin	[1,2]
Iontová síla	pokles rychlosti EOF se vzrůstem iontové síly a naopak	ovlivňování zeta potenciálu	[1,2,57]
Elektrické pole	ovlivnění rychlosti separace	negativně může ovlivnit účinnost, zvyšuje Jouleovo teplo	[1,2]
Teplota/ Viskozita	s rostoucí teplotou viskozita roste a tím se zvyšuje i rychlost EOF		[1,62-64]
Organická aditiva	mají za následek změnu permitivity prostředí a změnu zeta potenciálu	nejčastěji methanol, acetonitril apod.	[7,59]
Dynamické pokrytí	adsorpcí hydrofilních polymerů dochází k eliminaci povrch. náboje a změně viskozity	např. polyvinylalkohol, estery celulózy, ethylen glykol atd.	[4,65-67]
Kovalentní pokrytí	navázáním nejrůznějších skupin na disociovatelné silanolové skupiny dojde k zániku náboje	např. trimethylsilylace, navázání polypyrrolu atd.	[6,58]
Přídavkem tenzidu	sdsorbují se na stěnu kapiláry a mění tak její náboj	Aniontové surfaktanty pak mají tendenci zvyšovat rychlost EOF, zatímco kationtové tenzidy jej snižují, až obrácejí	[60,61]

2.1.3 Migrační čas

Migrační čas je základní kvalitativní charakteristikou analytů v elektromigračních technikách. Jedná se o dobu, kterou stráví analyt v separačním loži od nadávkování vzorku po jeho detekci. Je dán jednoduchým vztahem (10), ve kterém vystupují dříve definované veličiny:

$$t_m = \frac{l}{(\mu_{ep} + \mu_{eof})E} = \frac{lL}{(\mu_{ep} + \mu_{eof})U} \quad (10)$$

Z tohoto vztahu vyplývá, že migrační čas je možné kontrolovat nejen délkou kapiláry, ale také vkládaným separačním napětím (intenzitou elektrického pole). V praxi to znamená, že čím vyšší bude vložené napětí a čím kratší bude kapilára, tím rychleji bude daný analyt migrovat. Ze vztahu je taky vidět, že migrační čas významně závisí na elektroforetické mobilitě (μ_{ep}) a elektroosmotickém toku (μ_{eof}). Zvýšíme-li rychlost EOF, dojde také ke zvýšení rychlosti migrace analytů. Elektroosmotický tok se však neúčastní samotného procesu separace, je tedy pouze jednou z hybných sil, která přispívá k celkové rychlosti migrace, a tudíž jeho zvýšení má sice za následek rychlejší průběh analýzy avšak při současném snížení rozlišení či selektivity. Negativními jevy, které mohou výrazně ovlivnit rozlišení či účinnost separace, jsou také disperze a elektrodifuze. Tyto jevy jsou tím výraznější, čím vyšší jsou migrační časy.

2.2 Základní aspekty separace

2.2.1 Účinnost separace

Podobně jako v ostatních separačních technikách je i v případě elektromigračních technik primárním ukazatelem účinnosti počet teoretických pater, N . I když není separační mechanismus v CE dán rozdělovací rovnováhou a z termodynamického hlediska se jedná o nerovnovážnou techniku, počet teoretických pater je vhodnou charakteristikou účinnosti. Na rozdíl od ostatních separačních technik, které jsou založeny na rovnovážné distribuci mezi mobilní a stacionární fází (např. LC), je základním parametrem separace v CE právě účinnost. Počet teoretických pater se vypočítá podle vztahu (11):

$$N = \frac{(\mu_{ep} + \mu_{eof})U}{2D} \quad (11)$$

V tomto vztahu vystupuje, kromě již definovaných veličin, také difuzní koeficient analytu, D . Je zřejmé, že účinnost separace bude záviset na vloženém napětí U a bude nepřímo úměrná velikosti difuzních koeficientů. Čím vyšší tedy bude difuze analytů v systému, tím nižší bude účinnost separace. Ke snižování účinnosti však přispívá mnohem více faktorů, mimo jiné i teplota, elektrodisperze či adsorpce. I přesto je však účinnost v CE výrazně vyšší než u ostatních separačních technik. Typický počet teoretických pater v CE dosahuje hodnoty okolo 100 – 200 tisíc na metr délky kapiláry, což se v praxi projevuje zejména velmi úzkými píky (vysokou účinností separačního procesu).

2.2.2 Selektivita

Selektivita α je veličina, určující poměr proměnných, které řídí separační proces pro dvojici analytů. U chromatografických technik je touto proměnnou tzv. kapacitní faktor, resp. distribuční konstanta. V kapilární elektroforéze je analogickým vyjádřením selektivity poměr veličin, které jsou zodpovědné za separaci – elektroforetických mobilit (12). Poměr mobilit musí být vždy takový, aby $\alpha \geq 1$:

$$\alpha = \frac{\mu_{ep,1}}{\mu_{ep,2}} \quad (12)$$

2.2.3 Rozlišení

Rozlišení popisuje míru separace vybrané dvojice analytů. Obecně je možné jej vypočítat pomocí tzv. tangenciální metody (13):

$$R = \frac{2(t_2 - t_1)}{(w_2 + w_1)} \quad (13)$$

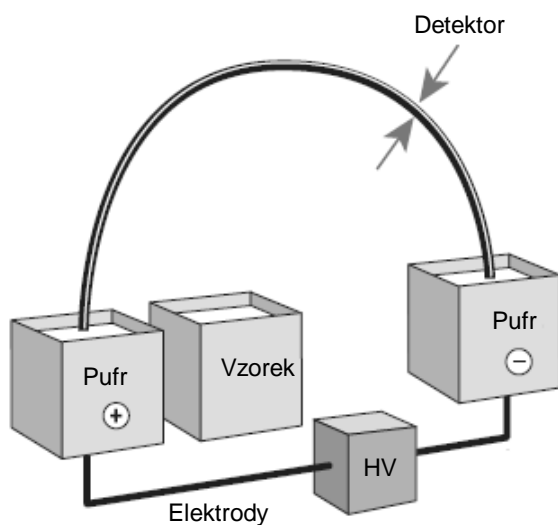
kde t_1 a t_2 jsou migrační časy látky 1 resp. 2 a w_1 a w_2 jsou šířky příslušných píků u základů. Dvě látky budou od sebe separovány tím více, čím vyšší bude hodnota jejich rozlišení. Pro

CE platí také vztah (14), založený na poměru mobilit dvojice separovaných analytů. Z tohoto vztahu je patrné, že rozlišení je přímo úměrné druhé odmocnině vloženého napětí, a nepřímo úměrné difúznímu koeficientu:

$$R = \frac{0,177(\mu_{ep,2} - \mu_{ep,1})\sqrt{U}}{\sqrt{(\mu_{av} + \mu_{eof})D}} \quad (14)$$

2.2.4 Instrumentace v kapilární elektroforéze

Základní schéma uspořádání kapilární elektroforézy je uvedeno na obrázku č. 2. Pro samotnou instrumentaci je nezbytný zdroj vysokého napětí, separační kapilára, systém elektrod, zásobník pufru a vzorku a detekční systém. Jednotlivé části instrumentace budou podrobněji diskutovány dále.



Obr. 2 – Základní schéma kapilární elektroforézy. Převzato a upraveno z [8].

2.2.5 Separační kapiláry

Jedná se o část instrumentace, ve které probíhá samotná separace. Nejčastěji bývají kapiláry vyráběné z křemene, výjimkou však nejsou ani jiné materiály, např. teflon (PTFE) či pyrex. Pro zlepšení mechanické odolnosti a ohebnosti jsou kapiláry potahovány 25 – 35 μm silnou vrstvou polyimidu. Vnitřní průměr kapilár je nejčastěji volen v rozmezí 25 – 100 μm .

Rozměrové parametry kapiláry jsou velmi důležitou charakteristikou, neboť při aplikaci separačního napětí dochází k ohřevu, vzniká tzv. Jouleovo teplo. To vzniká jako důsledek průchodu elektrického proudu kapilárou a je přímo úměrné vkládanému vysokému napětí. Vysoké hodnoty Jouleova tepla způsobují, mimo jiné, vznik vzduchových bublinek při separaci nebo změnu viskozity separačního pufru. To se, obvykle negativně, projeví na výsledku separace. Schopnost kapiláry účinně odvádět vznikající teplo do okolí je závislé právě na její velikosti. Z hlediska spektrofotometrické detekce je výhodnější použití kapilár s větším vnitřním průměrem. Absorbance je podle Lambertova-Beerova zákona přímo úměrná délce optické dráhy. To tedy znamená, že větší průměr kapiláry se výrazně projeví na lepší citlivosti detekce, ovšem negativně přispěje k rozmývání zóny analytu.

2.2.6 Dávkování vzorku

Systémy dávkování vzorků jsou založeny nejčastěji na hydrodynamické nebo elektrokinetické injekci. V obou případech je kapilára nejdříve naplněna separačním pufrům a patričná část kapiláry je poté ponořena do roztoku vzorku. Při hydrodynamickém dávkování je možno působit zvýšeným tlakem na nádobku se vzorkem a dosáhnout tak přímou injekci zóny vzorku do kapiláry. Druhou možností je aplikovat vakuum na opačnou část kapiláry a požadovanou zónu vzorku nasát, nebo provést nasátí vlivem rozdílné výšky obou nádobek, do kterých je kapilára ponořena. Výškový rozdíl způsobí změnu tlaku na obou koncích a tím dojde k nasátí vzorku do kapiláry. Dávkovaný objem lze spočítat z rovnice (15), kde ΔP vyjadřuje rozdíl tlaků, d je průměr kapiláry, t je čas, η je viskozita a L je celková délka kapiláry. V praxi však není nutné přesný dávkovaný objem znát.

$$V = \frac{\Delta P d^4 \pi t}{128 \eta L} \quad (15)$$

Při elektrokinetickém dávkování je konec kapiláry (blíže detektoru) ponořen do nádoby se separačním pufrům a druhý konec je ponořen do roztoku vzorku. Vložním potřebného napětí dojde k migraci iontů dovnitř kapiláry. Látkové množství, které se při elektrokinetickém dávkování dostane do kapiláry, je možno vypočítat z uvedené rovnice (16):

$$n = \pi c t r^2 (\mu_{ep} + \mu_{eof}) E \frac{\kappa_{puf}}{\kappa_{vz}} \quad (16)$$

V rovnici vystupují, kromě již popsaných veličin, také koncentrace analytu c , jeho elektroforetická mobilita μ_{ep} , a podíl vodivostí pufru κ_{puf} , a vzorku κ_{vz} . Z této rovnice je možné odvodit, že dávkované látkové množství jednotlivých analytů je závislé na jejich elektroforetických mobilitách. Látky s vysokou mobilitou jsou nadávkovány ve větším množství. Z charakteru tohoto typu dávkování je také patrné, že je diskriminující především pro látky iontové povahy, které se budou v daném roztoku vzorku vyskytovat v disociované formě.

2.2.7 Separální napětí

Základní hybnou silou, která zprostředkovává separaci v elektromigračních metodách je stejnosměrné elektrické napětí. Nejčastěji je používáno vysoké napětí v rozsahu od 5 do 30 kV. Napětí je vhodné mezi elektrody vkládat postupným zvyšováním, podle definovaného schématu, například lineárně s určeným časem. Tímto je možno podstatně eliminovat vznik vzduchových bublinek, které se mohou objevit po prudkém vložení vysokého napětí jako důsledek rychle vznikajícího Jouleova tepla, které není chladicí systém schopen účinně odvádět.

2.3 Detektory

Velmi podstatnou částí instrumentace je detektor separovaných zón analytů. Detekční systém je obvykle volen podle vhodnosti pro analyzované látky tak, aby poskytoval co nejvyšší citlivost. Běžné detektory jsou založeny především na absorpci nebo emisi záření. V současné době již patří mezi běžnější také spojení kapilární elektroforézy s hmotnostní spektrometrií nebo elektrochemickým detektorem. Přehled detekčních metod pro CE s uvedením jejich detekčních limitů je uveden v tabulce č. II. Nejvýznamnější detektory jsou následně podrobněji diskutovány níže.

Tabulka II. – Přehled detekčních metod pro CE a jejich limity detekce. Převzato a doplněno z [2, 12-13].

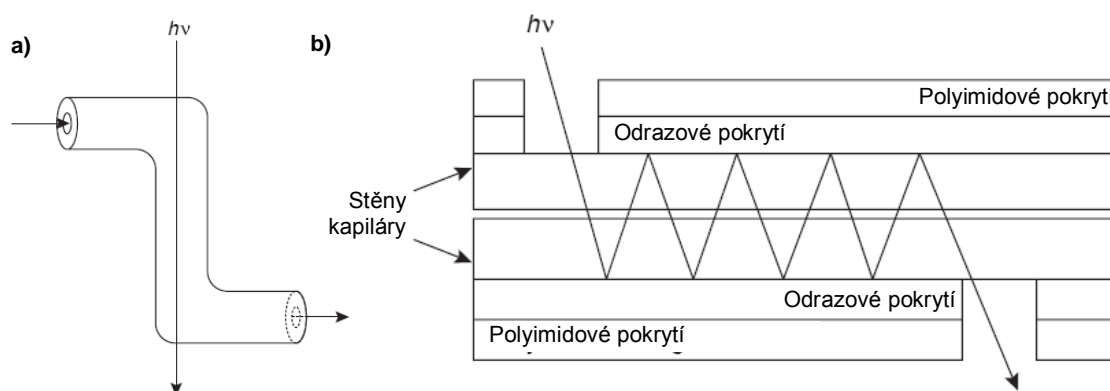
Detekční technika	Limit detekce (LOD)	Poznámka	Ref.
Přímá absorpce	$10^{-4} - 10^{-6}$ mol/l	Při použití standardní délky optické dráhy	[2,12]
Přímá absorpce	10^{-6} mol/l	Při použití prodloužené optické dráhy (viz Absorpční optické detektory)	[12]
Nepřímá absorpce	$10^{-5} - 10^{-6}$ mol/l		[3]
Přímá on-line LIF detekce	$< 10^{-13}$ mol/l	Při použití chemické derivatizace	[12, 15, 16]
Přímá off-line LIF detekce	10^{-16} mol/l	Detekce jednotlivých molekul	[19]
Nepřímá LIF detekce	$10^{-5} - 10^{-7}$ mol/l		[20]
Vodivostní detekce	$10^{-7} - 10^{-8}$ mol/l		[21-23]
Amperometrie	$10^{-7} - 10^{-8}$ mol/l	Analyt musí být elektroaktivní	[2, 26]
Refraktometrická detekce	$10^{-5} - 10^{-6}$ mol/l		[24]
Ramanova spektroskopie	$10^{-3} - 10^{-6}$ mol/l	Obvykle nutná prekoncentrace	[25]
Radiometrie	10^{-10} mol/l	Vyžaduje radioaktivní analyt nebo jeho značení	[24]
Hmotnostní spektrometrie	$10^{-8} - 10^{-10}$ mol/l	Univerzální detekční metoda	[40-43,54,55]

2.3.1 Absorpční optické detektory

Absorpční detektory jsou založeny na absorpci záření ve viditelné nebo UV oblasti zónami vzorku. Jedná se o nejčastěji používané detektory, které dovolují univerzální aplikace při analýzách širokého spektra látek anorganické i organické povahy. Absorpce je podle Lambertova-Beerova zákona závislá na koncentraci c , délce optické dráhy l a molárním dekadickým absorpčním koeficientu ε , podle vztahu (17):

$$A = \varepsilon cl \quad (17)$$

Jak bylo uvedeno výše, je citlivost této detekce závislá na délce optické dráhy. Velkou nevýhodou je tedy její nižší citlivost vzhledem k malým rozměrům kapiláry. Částečně je možné tuto nevýhodu kompenzovat použitím speciálních detekčních cel nebo upravených kapilár. Mezi nejčastější přístupy patří například použití tzv. „Z“ cely (obr. 3a), čímž dojde k nárůstu délky optické dráhy, nebo použitím speciálních odrazových komůrek (obr. 3b). Tyto komůrky způsobují, pomocí speciálního povrchu, mnohonásobný odraz záření a tím zvyšují velikost jeho absorpce.



Obr. 3 – Schématické znázornění tzv. „Z“ cely (a) a odrazové komůrky (b). Převzato a upraveno z [2].

Kromě záření ve viditelné a UV oblasti bylo rovněž popsáno použití infračerveného záření [11]. Typické detekční limity, kterých je možné dosáhnout pomocí spektrofotometrické detekce za použití standardní délky optické dráhy, se pohybují v rozsahu koncentrací od 10^{-4} po 10^{-6} mol/l [2,12].

2.3.2 Emisní optické detektory

Přestože jsou absorpční optické systémy bezesporu nejrozšířenějšími detektory v kapilární elektroforéze, lepších detekčních limitů lze dosáhnout při použití detektorů založených na emisi fluorescenčního záření [12,13]. V praxi se využívá především tzv. laserem indukované fluorescence (LIF), kde se k excitaci molekul analytu využívá vysoce účinného laseru. Jedná se o doposud nejcitlivější detekční metodu, kterou se pro spojení se separačními metodami podařilo vyvinout [14,15]. Detekční limity některých popsanych metod se pohybují v řádech od 10^{-13} po 10^{-16} mol/l, což představuje citlivou detekci i méně než 10 molekul analytu [16]. Nevýhodou emisních optických detektorů je jejich vysoká

selektivita. Pouze omezené množství analytů vykazuje fluorescenční chování. Samotná detekce je pak silně omezena vlnovou délkou použitou k excitaci analytů, neboť běžné laserové zdroje obvykle poskytují záření o fixní vlnové délce. Analýza látek, které samy o sobě nejsou nativními fluorofory, je možná především s použitím derivatizačních reakcí [17]. Komplikovaný průběh reakcí, jejich výtěžnost a především časová náročnost jsou však stále důvodem menší využitelnosti a univerzálnosti LIF detekce.

2.3.3 Elektrochemické detektory

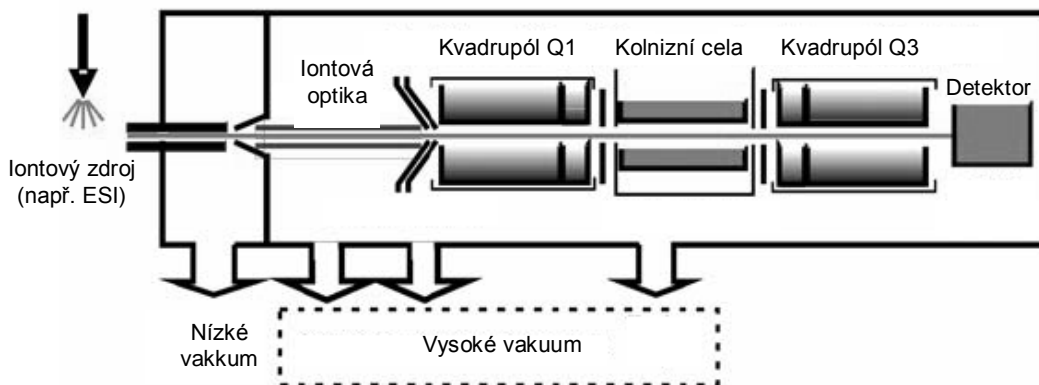
Elektrochemické detektory (ECD) zahrnují veškeré detekční systémy založené na elektrochemické reakci (oxidačně-redukční reakce, resp. transport elektronů) nebo měření elektrických vlastností. V současné době představují rychle se rozvíjející alternativu běžných optických detektorů, zejména s přihlédnutím k možnosti a jednoduchosti jejich miniaturizace a výroby. Mezi běžně využívané a komerčně dostupné patří zejména vodivostní detekce v bezkontaktním provedení (CCD, resp. C⁴D), která je běžně využívána k detekci malých iontů, především pak těch, které neabsorbují záření, a použití jiných detekčních technik je komplikovanější [10,13], popsáno je však i využití v analýze větších molekul, povrchově aktivních látek nebo makromolekul. Princip metody je založen na změně vodivosti prostředí při průchodu analytu mezi elektrodami, na něž je vloženo střídavé VF napětí [33]. Další elektrochemickou detekcí, která se stále běžněji objevuje v případě CE je amperometrie. Tato metoda detekce je založena na sledování proudu redoxní reakce analytu při vložení konstantního potenciálu, jehož hodnota bývá zpravidla blízká hodnotě potenciálu půlvlnového [10,13,34].

2.4 Spojení kapilární elektroforézy a hmotnostní spektrometrie (CE-MS)

Spojení CE-MS je v mnoha směrech specifické a vyžaduje speciální a technicky náročnou instrumentaci. Náročnost spojení bývá kritickým bodem celého analytického systému, přesto se ale dostává stále více do popředí zájmu analytické chemie a je proto vhodné věnovat jeho detailnějšímu popisu samostatnou kapitolu. Z tohoto důvodu bude v následujícím textu diskutována podrobněji.

CE-MS umožňuje separovat a detekovat látky s relativně nízkými detekčními limity a zároveň nabízí možnost jejich identifikace. I když bylo toto spojení poprvé realizováno teprve v roce 1987 [27], nachází široké uplatnění při analýze obrovské skupiny analytů nejrůznější povahy od anorganických iontů, organických molekul, až po makromolekulární systémy [28,29]. Spojení CE-MS kombinuje výhody kapilární elektroforézy, především její vysokou separační účinnost, se selektivní a citlivou detekcí.

Hmotnostní spektrometrie je analytická technika využívající různých mechanismů separace a detekce iontů nebo jejich fragmentů podle poměru jejich hmotnosti a náboje (m/z). Obecně hmotnostní spektrometr sestává z iontového zdroje, akcelérátoru iontů a iontové optiky, hmotnostního analyzátoru a detektoru (obr. 4).



Obr. 4 – Základní uspořádání hmotnostního spektrometru. Uvedený obrázek zobrazuje ortogonální iontový zdroj ve spojení s trojitým kvadrupólovým filtrem. Převzato a upraveno z [9].

2.4.1 Iontový zdroj

Charakter propojení CE a MS je omezující pro použití pouze některých ze značného množství iontových zdrojů [28,29]. V běžné praxi se lze setkat prakticky pouze se spojením

iontového zdroje na bázi elektrosprejové ionizace (ESI). Méně běžné jsou pak ostatní iontové zdroje pracující za atmosférického tlaku, tedy fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI) a chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI). Pro speciální aplikace z oblasti proteomiky je možné spojení CE s desorpcí/ionizací laserem za přítomnosti matrice (tzv. MALDI technika). Ostatní iontové zdroje jsou pro CE prakticky nevhodné.

2.4.2 Ionizace elektrosprejem (ESI)

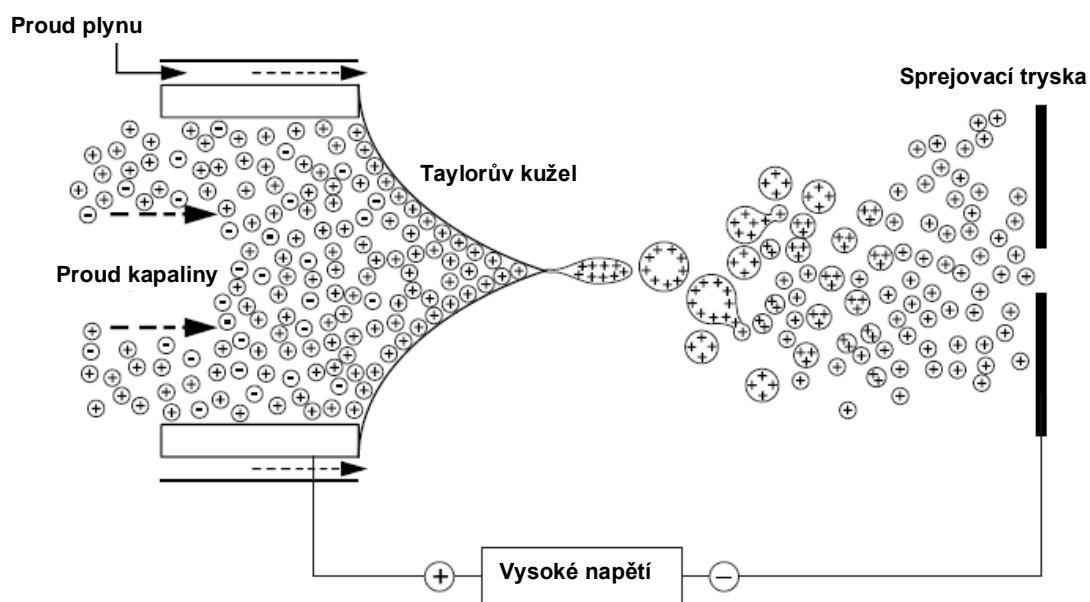
Spojení CE s ESI-MS je založeno na sprejování kapaliny vytékající z křemenné separační kapiláry přes kovovou sprejovací špičku po vložení vysokého napětí, pomocné kapaliny a inertního plynu. Přítomnost pomocné kapaliny je důležitá, neboť objemy kapilár v CE jsou v řádech desítek μl a běžné průtoky se tedy pohybují v řádech desítek nl/min , což je pro klasický elektrosprej příliš málo. Technicky je možné i provedení bez pomocné kapaliny a plynu (tzv. *sheathless*, např. pomocí nano-elektrospreje), je však daleko náročnější na realizaci a optimalizaci. Princip ESI vychází v první fázi z tvorby nabitých kapiček na konci sprejovací kapiláry (obr. 5). Ionty ve vzniklé nabitě kapičce na sebe vzájemně působí elektrostatickou repulzí. Pokud hodnota této repulzní síly přesáhne hodnotu povrchového napětí, dojde ke vzniku tzv. Taylorovy kóny a sprejování vzniklých nabitých částic. Následně dochází ke zmenšování objemu kapičky vlivem odpařování rozpouštědla (pomocné kapaliny, pufry), kdy v určité chvíli dojde k expanzi nabitých částic a vzniknou ionty v plynné fázi. Tento jev se nazývá Coulombická exploze a lze jej teoreticky vysvětlit několika modely, z nich doposud žádný nebyl spolehlivě prokázán [30,80-82]. Limit celkového náboje kapičky se nazývá Rayleighův limit stability Q (18),

$$Q = 8\pi(e_0\gamma R^3)^{1/2} \quad (18)$$

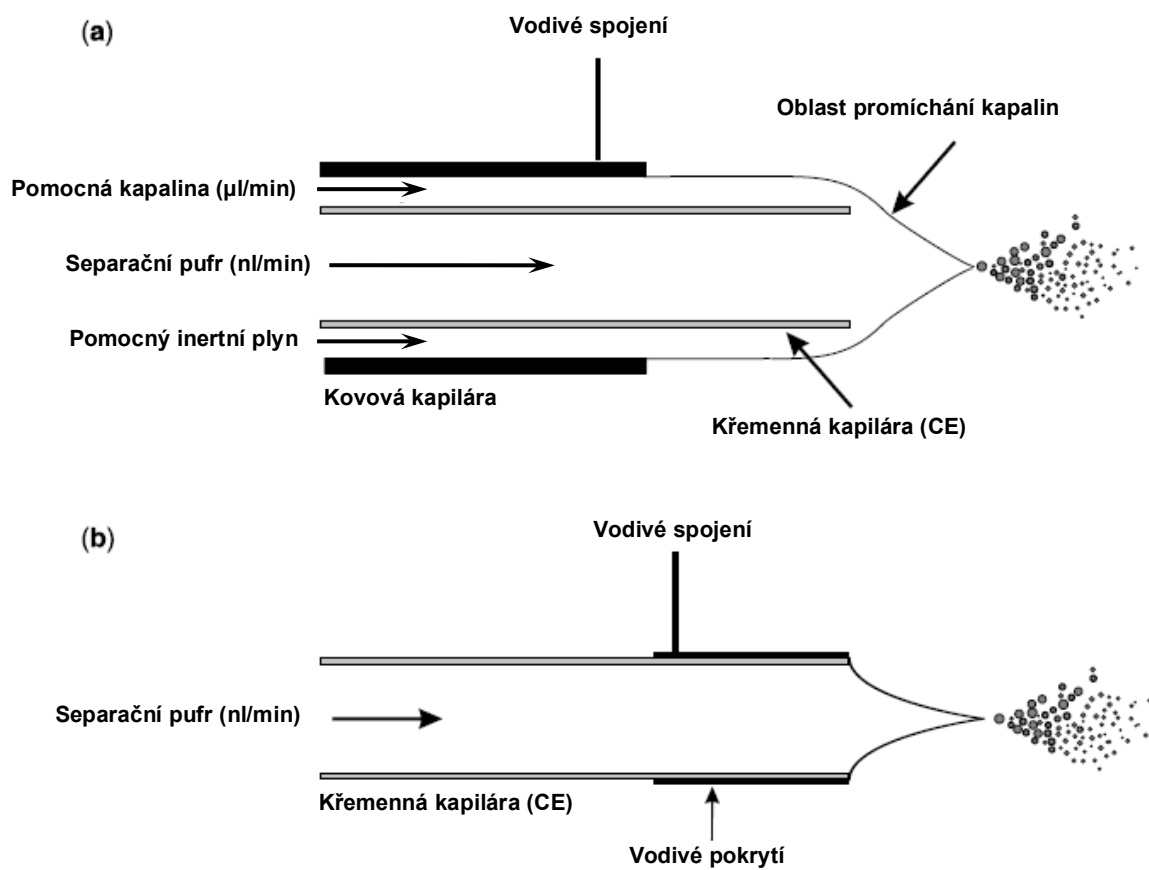
kde Q je celkový náboj kapičky, R je její poloměr, γ je povrchové napětí a e_0 je permitivita vakua. Po překročení Rayleighova limitu náboje dochází ke zmíněné Coulombické explozi. Pro vznik stabilního elektrospreje je, kromě uvedených parametrů, potřeba vložit na sprejovací kapiláru vysoké napětí v určitém rozsahu tak, aby docházelo ke sprejování a zároveň bylo eliminováno riziko tvorby elektrických výbojů. Toto sprejovací napětí se obvykle pohybuje v rozsahu od 3,5 do 5 kV pro ionizaci v pozitivním módu a okolo -4 kV pro

negativní ionizaci. Konkrétní velikost napětí však závisí na konstrukci iontového zdroje a dalších experimentálních parametrech.

Detailní schéma ESI iontového zdroje i jeho propojení s výstupem z kapilární elektroforézy je uveden na obr. č. 5 a 6.

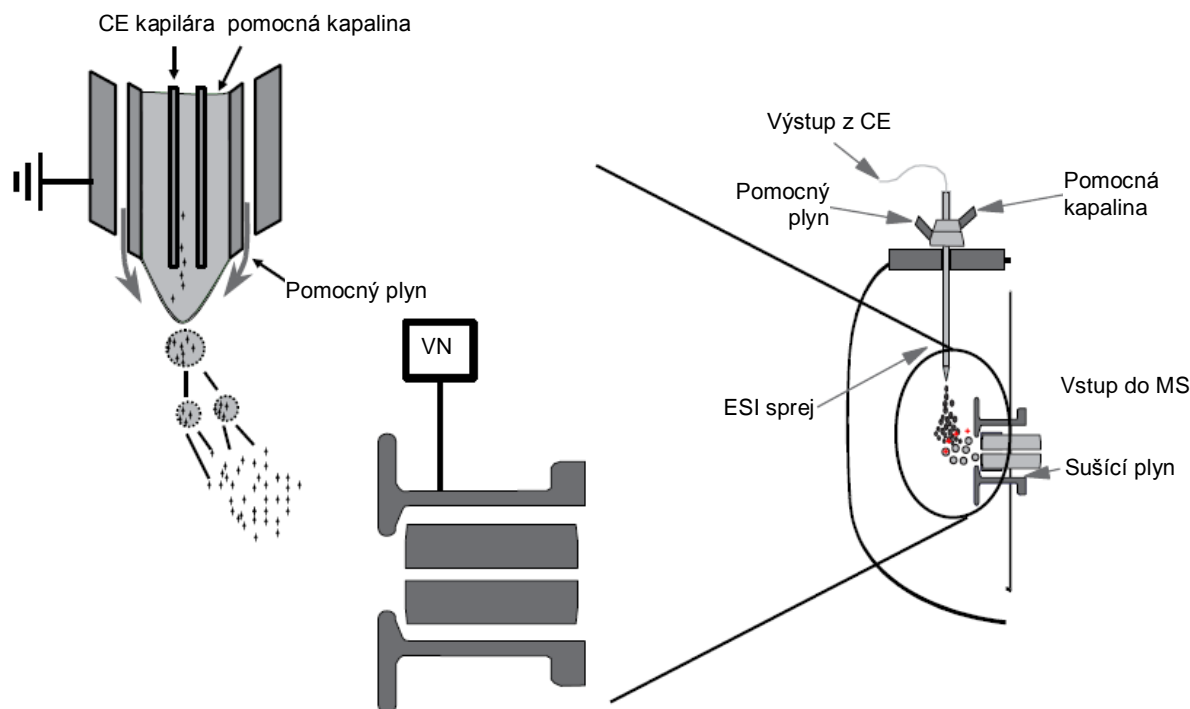


Obr.5 – Schéma tvorby nabitých kapiček a iontů v elektrosprej [30].



Obr. 6 – Schéma propojen  CE a ESI-MS – (a) s přidavkem pomocn  kapaliny a plynu, (b) bez pomocn  kapaliny a plynu [30].

Z uvedených sch emat je patrn  line rn  geometrie spojení CE-ESI-MS. Takto proveden  uspořadání vřak m a za následek v tř n  kontaminaci iontového zdroje slořkami separačního pufru nebo pomocn  kapaliny. B řn jř  a komer n ji dostupn jř  variantou je tzv. ortogonální uspořadání (obr. 7), kdy je sprejovací špička ESI vzhledem ke vstupu do hmotnostního spektrometru pod ur it m u hlem, zpravidla 90° .



Obr. 7 – Ortogonální uspořádání CE-ESI-MS, schéma originálního spojení pro instrumentaci HP1100 MSD.
Převzato a upraveno z [31].

2.4.3 Elektrický obvod – spojení dvou systémů

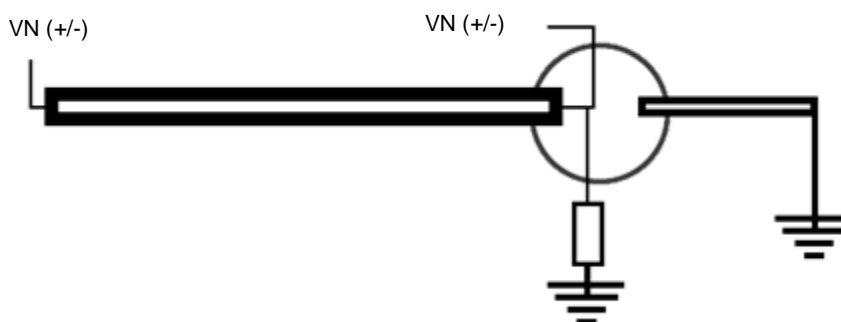
Technicky nejnáročnější část spojení CE-MS je vyřešení propojení dvou vysokonapěťových systémů tak, aby byla zaručena uzavřenost elektrického obvodu, aplikace separačního napětí a dostatečné sprejovací napětí pro ESI. Ve většina případů je elektroda z CE (na straně MS)

sdílána s elektrodou ESI, výsledné separační napětí v CE může být tedy odlišné a obecně se dá vyjádřit následující rovnicí [5]:

$$U = U_{CE} - U_{MS} \quad (19)$$

kde U_{CE} je separační napětí na straně kapilární elektroforézy a U_{MS} je sprejovací napětí vložené na ESI. Jak je patrné z obrázku č. 8 je spojení CE-MS je realizováno vložením separačního napětí pro CE a jeho následným uzemněním přes rezistor. Tím je dosaženo především snížení celkového proudu, který vstupuje do MS, neboť proudy v ESI bývají oproti proudům v CE kapiláře přibližně 10x menší [36]. Rezistor je obvykle nahrazen zařízením,

které umožňuje změnu odporu v závislosti na potřebných podmínkách, nejčastěji pomocí potenciometru nebo fotorezistoru. Optimální podmínky jsou poté automaticky řízeny počítačem.



Obr. 8 – Schéma spojení VN obvodů CE a ESI-MS. Převzato a upraveno z [35].

2.4.4 Hmotnostní analyzátoři

Je jedna z nejdůležitějších částí celé MS instrumentace, která je zodpovědná za samotnou analýzu a v případě hmotnostního spektrometru zastává funkci disperzního prvku. Na hmotnostní analyzátoři jsou přiváděny ionty vzniklé v iontovém zdroji a dochází zde k jejich dělení buďto v prostoru nebo času podle jednotlivých hodnot m/z . Existuje několik typů hmotnostních analyzátořů s různým mechanismem separace iontů. Volba analyzátoři je závislá především na účelu, ke kterému bude sloužit, ale také na cenových parametrech.

a) Magnetický/elektrický sektorový analyzátoři

Jedná se o nejstarší typ hmotnostního analyzátoři, v současné době prakticky zcela nahrazen jinými typy. I přes to se však jedná o analyzátoři umožňující pracovat s velmi vysokým rozlišením a bývá proto součástí hmotnostních spektrometrů především pro přesné měření hmoty. Pracuje na principu rozdělování iontů podle m/z pomocí magnetického pole, které mohou být navíc fokusovány elektrickým polem na základě jejich kinetické energie. Ve spojení s CE se v podstatě neuplatňuje, i když byly vyvinuty a zkoušeny metody pro přesné měření hmotnosti např. peptidů [32].

b) Kvadrupólový filtr

Kvadrupólový filtr je zařízení, které využívání rozdílné stability trajektorií iontů v oscilujícím elektrickém poli. Základní principy kvadrupólu byly popsány již v roce 1953 [37, 38]. Skládá se ze čtyř paralelních tyčí (nejčastěji hyperbolického průřezu, jak je znázorněno na obr. 10a, resp. 10c) na které je vždy proti sobě vkládáno napětí obsahující stejnosměrnou a střídavou složku (obr. 9, rov. 20). Střídavá složka je fázově posunuta, jak znázorňuje rovnice:

$$\phi_0 = (U + V \cos \omega t) \quad (20)$$

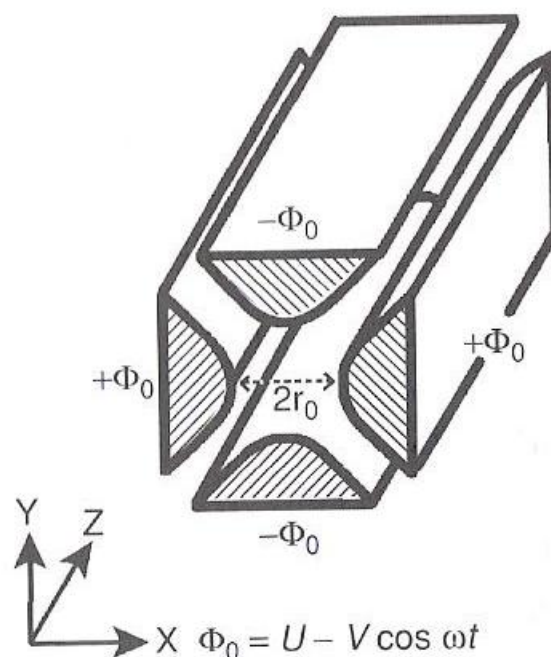
V této rovnici vystupuje napětí U , amplituda radiofrekvenčního (RF) napětí V , úhlová frekvence ω ($\omega = 2\pi\nu$, kde ν je frekvence RF napětí) a čas t .

Ionty, které jsou vedeny z iontového zdroje a vstupují do kvadrupólového filtru jsou ovlivňovány oscilujícím elektrickým polem a pohybují s směrem k detektoru (na obr. č. 11 ve směru osy z). Trajektorie jejich pohybu je dána Mathieuvou rovnicí, která byla sestavena již v roce 1866 [39]:

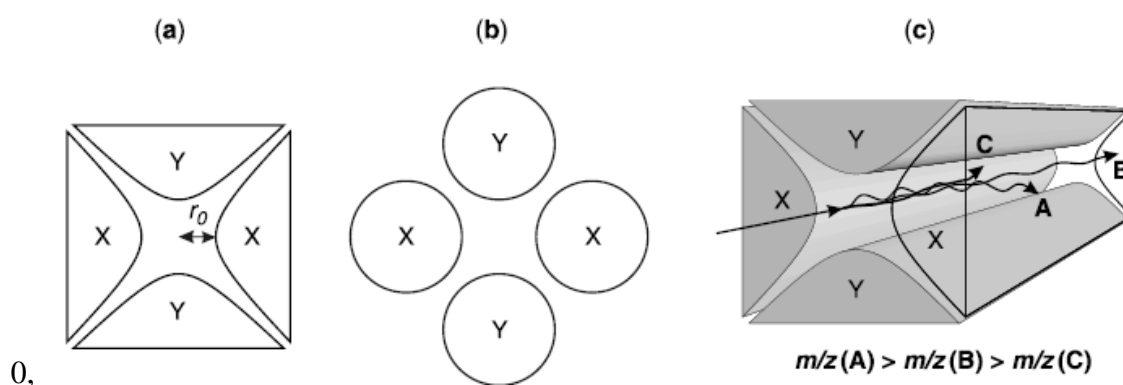
$$\frac{d^2u}{d\xi^2} + (a_u - 2q_u \cos 2\xi)u = 0 \quad (21)$$

kde u reprezentuje souřadnice (x, y). Výsledkem řešení této rovnice jsou dva parametry, a_u a q_u , a pouze při určité kombinaci obou dojde k průchodu sledovaného iontu až k detektoru. Iont tedy projde kvadrupólovým filtrem tehdy, pokud nalezneme vhodné parametry a pokud tyto budou mít hodnotu menší než r_0 (vzdálenost mezi tyčemi kvadrupólu). V opačném případě iont nebude schopen průchodu a dojde k jeho zachycení a vybití na tyčích. Hodnota r_0 je pro daný kvadrupól konstatní, úhlová rychlost ω je udržována na konstatní hodnotě, proměnnými tedy zůstávají hodnoty U a V . Při skenování tedy dochází k současným změnám U a V při zachování jejich poměru ($U/V = \text{konst.}$).

V praxi je kvadrupólového analyzátoru využíváno velice často i přes jeho nízkou rozlišovací schopnost (obvykle v jednotkách nebo desetínách m/z), která nebývá dostatečná k určení přesné hmoty a elementárního složení. Skenovací rychlost kvadrupólu je však velmi rychlá, a proto je vhodný zejména pro běžné aplikace jako detektor v separačních metodách.



Obr. 9 – Kvadrupólový filtr a hyperbolickými tyčemi a znázorněným vloženým potenciálem. Převzato z [39].



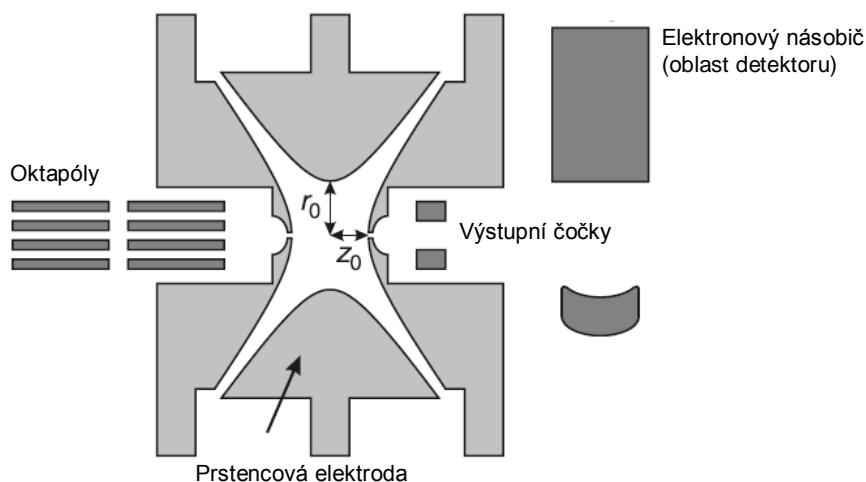
0,

Obr. 10 – Schéma kvadrupólového analyzátoru (pohled zepředu a trojrozměrný pohled). V části (c) je vidět diskriminace iontů, přičemž pouze iont B filtrem projde, zbylé ionty jsou vybity na tyčích. Převzato a upraveno z [30].

c) Iontová past (IT)

Je založena na podobném principu jako kvadrupólový filtr, ionty jsou však zachyceny a uchovávány v RF kvadrupólovém poli. Geometrie celého zařízení je však odlišná (obr. 11). Hmotnostní spektrum je získáváno postupným vypuzováním iontů z IT a jejich detekcí. Za stabilních podmínek mohou být ionty uchovány v IT neomezeně dlouho dobu, běžně však bývá IT využívána především k zachycení iontů a provádění dalších

experimentů, zejména fragmentačních analýz (MS^n). Spojení se separačními technikami bývá poměrně časté, zejména je-li vyžadována fragmentace iontů. Kapilární elektroforéza ve spojení s IT-MS dnes již není ničím neobvyklým. Byla popsána řada aplikací, zejména pak v případě toxikologické a forenzní analýzy, kde IT umožňuje identifikaci nebo potvrzení analytu [40-43].



Obr. 11 – Schéma iontové pasti. Převzato a upraveno z [30].

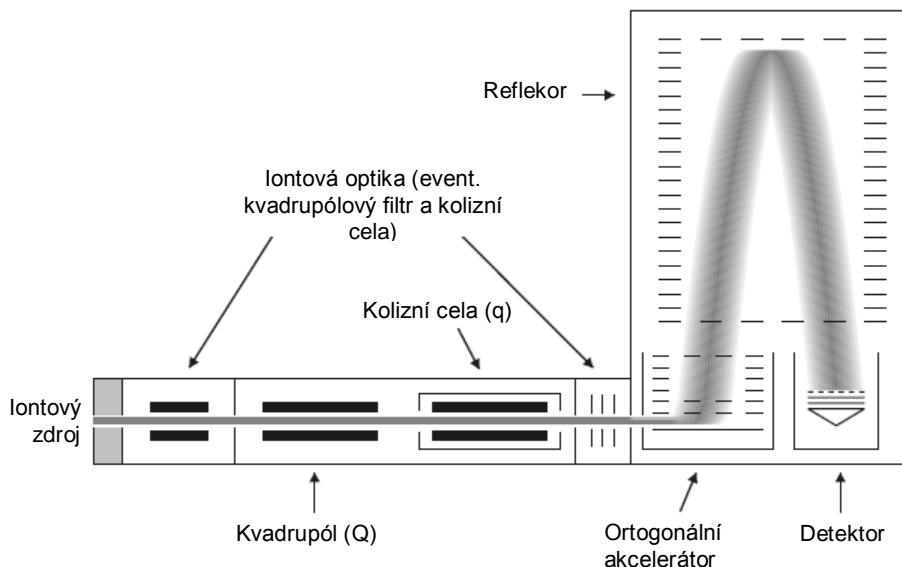
d) Detektor doby letu (TOF)

TOF (z angl. *Time-of-Flight*) je detektor pracující na principu dělení iontů podle jejich rozdílné doby pohybu v definovaném prostoru. Základní princip TOF detekce byl publikován již v roce 1946 [44] a vychází ze vztahu (22):

$$t_{TOF} = \frac{L}{v} = L \sqrt{\frac{m}{2zU_a}} \quad (22)$$

kde t_{TOF} je doba letu (čas mezi vstupem iontu do prostoru analyzátoru a jeho dopadem na detektor), L je délka TOF analyzátoru, v je rychlost iontu po akceleraci, m je hmotnost iontu, z je náboj iontu a U_a je urychlovací napětí. Rychlejší a méně hmotné ionty tedy dopadnou na detektor v kratším čase. Pro měření doby letu iontu je potřeba znát počátek vstupu iontu do analyzátoru, proto je často TOF analyzátor využíván především pro pulzní techniky (např. MALDI). Pro kontinuální přívod iontů (např. z ESI, APCI atd.) je potřeba předřadit tzv. ortogonální akceleraci (obr. 12). Akcelerační napětí je nejdříve sníženo na

nulu a poté opět zvýšeno, aby došlo k urychlení iontů. Okamžik zvýšení urychlovacího napětí je brán jako počáteční pulz a čas vstupu iontu do prostoru TOF analyzátoru [45-49].



Obr. 12 – Schéma QqTOF analyzátoru s předřazeným ortogonálním akcelerátorem. Převzato a upraveno z [30].

Pokud jsou před vstupem do TOF analyzátoru umístěny kvadrupólové filtry s kolizní celou (QqTOF, obr. 14), je možné provádět rovněž fragmentační analýzy (MS/MS). V prvním kvadrupólu (Q) dochází k selekci požadovaného iontu, druhý kvadrupól (q) potom funguje jako kolizní cela. Vzniklé fragmenty jsou poté analyzovány a detekovány pomocí TOF.

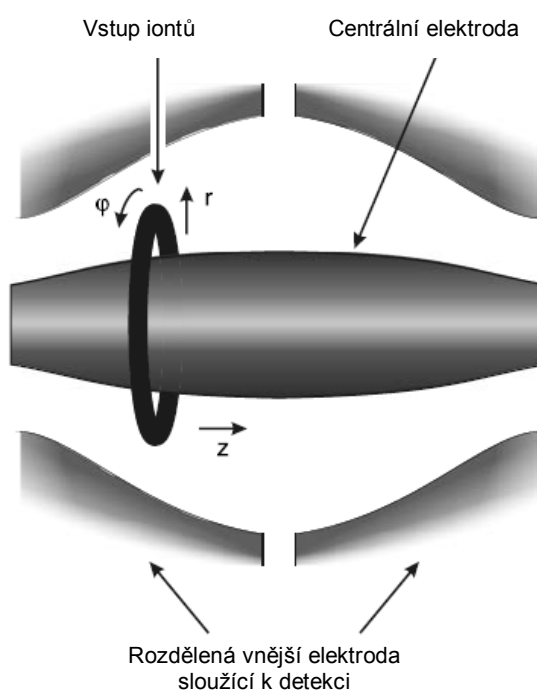
Jak již bylo zmíněno, používá se TOF analyzátor především pro analýzu za pomoci pulzních technik (nejčastěji MALDI-TOF), se separačními technikami je spojován méně často. Nicméně i toto spojení se objevuje v případě CE-MS a byla již publikována řada aplikací, které umožňují získat kromě fragmentačních spekter také velmi přesné určení hmoty [50].

e) Orbitrap

Jedná se o nejmladší typ hmotnostních analyzátorů, který byl popsán teprve v roce 1996, resp. plně patentován až v roce 2004 [51,52]. V principu se jedná o elektrostatickou iontovou past, která používá Fourierovu transformaci k získávání hmotnostních spekter. Mezi vnitřní a vnější elektrody je vloženo stejnosměrné napětí,

kteří vytváří logaritmické elektrostatické pole. Ionty, přivedené z iontového zdroje, vstupují do prostoru Orbitrapu kolmo k vnitřní centrální elektrodě a pohybují se v drahách („orbitech“) okolo ní. Vložení dalšího potenciálu ve směru osy z dojde k oscilaci iontů také v tomto směru. Hodnota m/z je potom úměrná frekvenci oscilace iontů ve směru osy z :

$$f_z \propto \frac{1}{\sqrt{m/z}} \quad (23)$$



Obr. 13 – Orbitrapový hmotnostní analyzátor. Převzato a upraveno z [30].

Měření frekvence bývá velmi přesné a pomocí Fourierovy transformace tak lze získat hodnoty m/z s velkou přesností. Z toho vyplývá i aplikační potenciál Orbitrapu, který se v běžných aplikacích téměř nevyskytuje a využívá se především při strukturní analýze a studiu fragmentačních reakcí.

f) Iontová cyklotronová rezonance (ICR)

Princip ICR je založen na pohybu iontů v homogenním magnetickém poli cyklotronové cely [30,53]. Ionty vzniklé v iontovém zdroji jsou přivedeny do evakuované ICR cely,

kteřá je chlazená na teplotu blízké absolutní nule (nejčastěji kapalným dusíkem nebo héliem). Podobně jako v magnetickém sektorovém analyzátoru působí na ionty magnetická síla (tzv. Lorenzova síla), její hodnota závisí na velikosti magnetické indukce B , náboje iontu z a jeho rychlosti v , podle vztahu (24):

$$F = zvB \quad (24)$$

Magnetická síla je v rovnováze se silou odstředivou, díky čemuž jsou trajektorie iontů fixovány do spirálovitých drah daných poloměrem r . Díky přítomnosti statického elektrického pole je zabráněno iontům dráhy svého pohybu opustit, ionty se tedy pohybují po svých trajektoriích s určitou frekvencí cyklotronového pohybu, která je nepřímo úměrná hodnotě m/z . Měření m/z je založeno na aplikaci pulzu excitačního napětí, díky čemuž dojde k selektivní excitaci iontů o dané m/z . Měřenou vlastností je vzniklý střídavý proud, jehož intenzita je přímo úměrná počtu iontů o určité m/z a frekvence je úměrná cyklotronové frekvenci. Ke skenování se používá změna excitačního napětí a zpracování signálu pomocí Fourierovy transformace. Vzhledem k tomu, že nedochází k destrukci iontů v detektoru, je možné ICR použít k následným tandemovým MS experimentům. Metoda je významná především svojí vysokou přesností a možností fragmentačních analýz. Z toho vyplývá i její aplikační potenciál především pro specializovaná měření a spojení s CE proto nepatří mezi běžná. I přesto je však možné a popsáno v publikovaných pracích [54,55].

2.4.5 Tandemová hmotnostní spektrometrie

Tandemová analýza, obvykle zkracována jako MS/MS nebo obecněji MS^n , představuje jednu z možností strukturní analýzy pomocí hmotnostní spektrometrie. Zahrnuje nejméně dva stupně hmotnostní analýzy, přičemž v prvním stupni dochází k selekci vybraného iontu (prekurzor) a ve druhém stupni k jeho fragmentaci a hmotnostní analýze produktů obecné rovnice:



V zásadě existují dva typy tandemové analýzy, které jsou rozdělovány podle toho, zdali k tandemové analýze dochází v prostoru nebo v čase (obr. č. 16). Tandemová MS v prostoru zahrnuje všechny metody, ve kterých jsou dva a více MS analyzátorů od sebe fyzicky odděleny v prostoru. Typickým příkladem je série kvadrupólových hmotnostních filtrů (QqQ), kdy jeden funguje jako selektor prekurzorových iontů (Q), druhý jako kolizní cela (q) a třetí slouží k analýze vzniklých produktů (Q). Další možností je například kombinace kvadrupólu a TOF detektoru (tzv. qTOF) nebo elektrických a magnetických sektorů, eventuálně rovněž se zařazeným kvadrupólem. Naproti tomu je tandemová MS v čase možná pouze u přístrojů, které umožňují uchovávání iontů, jako například různé varianty iontové pasti nebo ICR.

V případě, že chceme získat MS spektra vyšších řádů (MS^n) je nutné buďto zařazení několika analyzátorů za sebou (kde n vyjadřuje počet takovýchto analyzátorů), nebo využití přístrojů umožňujících tandemovou MS v čase. Teoreticky není počet tandemových analýz omezen, v praxi však u běžných přístrojů dosahuje maximálně sedmi až osmi stupňů [39], neboť s každým dalším stupněm dochází ke ztrátám iontů a tudíž ke snížení jejich celkového množství.

2.4.6 Sběr dat a skenovací módy v CE-MS

Nehledě na separační metodu nebo ionizační techniku je sběr dat v případě spojení s hmotnostní spektrometrií založen na záznamu intenzit jednotlivých iontů během separace. Existuje několik typů skenovacích módů v MS, které se liší především podle informací, které nám poskytují. Základním skenovacím módem je TIC (celkový iontový proud, z angl. *total ion current*), který v zadaném (obvykle širokém) intervalu m/z monitoruje intenzity iontů v čase. Bývá využíván především při analýzách neznámých analytů a směsí, může však být silně ovlivněn nebo překryt šumem z matrice vzorku nebo signálem analytů, které migrují (či eluují) ve stejném čase. Ze získaného TIC záznamu je možné extrahovat pouze vybrané hodnoty m/z , tzv. EIC nebo-li XIC (extrahovaný iontový chromatogram, z angl. *extracted ion chromatogram*), který poté zobrazuje pouze ionty odpovídající zadané hodnotě (nebo hodnotám) m/z . Analogickým případem je selektivní monitorování iontu, SIM (z angl. *selected-ion monitoring*), kdy MS sleduje výskyt pouze jednoho či více námi zadaných iontů. Vzniklý SIM záznam tedy zobrazuje pouze intenzity vybraných iontů a jiné informace nám

neposkytne. Tento mód se využívá spíše v případě rutinních analýz známých analytů a především u přístrojů, které neumožňují fragmentační analýzu (např. jednoduchý kvadrupólový filtr).

Naproti tomu je výběr skenovacích módů v tandemové MS analýze mnohem širší. Kromě výše uvedených typů nabízí navíc různé kombinace skenování iontů vzniklých fragmentačními analýzami (tabulka č. III):

Tabulka III. – skenovací módy používané v tandemové MS

Název módu	Používaná zkratka (anglicky)	Možnosti tandemových analýz
Sken produktových iontů	-	Získávání strukturních informací o iontech o m/z selektovaných pomocí MS_1
Sken prekurzorových iontů	-	Sběr dat v případě látek tvořících shodné fragmenty (např. strukturně podobné látky)
Skenování neutrálních ztrát	NLS	Skenování fixních diferencí m/z mezi MS_1 a MS_2
Monitorování vybrané reakce (reakcí)	SRM/MRM	Skenování jednoho a více vybraných fragmentů vzniklých selekcí v MS_1

2.4.7 Mechanismus fragmentačních reakcí

Vznik fragmentů může být při tandemové hmotnostní analýze možný několika způsoby. Obecně je potřeba dodat iontu takovou energii, která způsobí zánik chemické vazby a disociaci molekuly či asociátu. Forma dodané energie je různá podle typu fragmentace, rozeznáváme tedy fotodisociaci (PSD, z angl. *photodissociation*), kdy je energie dodávána ve formě elektromagnetického záření, ionizaci záchytem elektronu (ECD, z angl. *electron captured dissociation*) a kolizní disociaci. Poslední jmenovaná patří v tandemových analýzách v prostoru i času mezi nejběžnější a bude jí proto věnován detailnější popis.

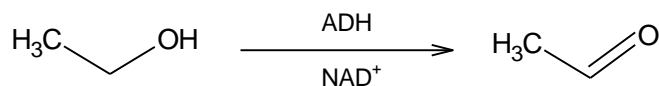
Kolizí indukovaná (aktivovaná) disociace (CID z angl. *collision-induced dissociation*) je typ fragmentačního mechanismus, při kterém je energie potřebná ke vzniku fragmentu dodávána pomocí srážek s neutrálními atomy či molekulami plynu (helium, argon, dusík apod.) přítomným v kolizní cele. Jedná se tedy o přeměnu části kinetické energie na energii vnitřní. Obvykle se CID dělí podle akcelerační energie iontů vzniklých v iontovém zdroji na nízkoenergetickou ($E < 100$ eV) a vysokoenergetickou ($E > 100$ eV).

2.4.8 Spojení CE-MS v toxikologické analýze

Potenciál využití kapilární elektroforézy ve spojení s hmotnostní spektrometrií v toxikologické analýze představuje širokou škálu rychle se rozvíjejících aplikací. Spojení CE-MS tak doplňuje běžně používané a rozšířené separační metody kapalinové chromatografie (LC). I když patří LC mezi často používané techniky nejen v toxikologické analýze a umožňuje separaci značně rozdílných skupin látek, její použití pro látky iontového charakteru bývá mnohdy problematické [45]. V tomto úhlu pohledu se kapilární elektroforéza jeví jako vhodná alternativa, která navíc ve spojení s MS detekcí často nahrazuje konvenčně využívané detektory, které jsou diskutovány výše. I když se první práce zabývající se spojením CE-MS v toxikologické analýze objevují teprve v 90. letech minulého století [46-48], v současné době již existuje mnoho odborných publikací, které se zaměřují právě na aplikaci této metody. Detailnější popis jednotlivých aplikací včetně rozsáhlých zdrojů lze nalézt v přehledových publikacích [např. 49].

2.5 Ethylglukuronid a konjugační metabolismus ethanolu

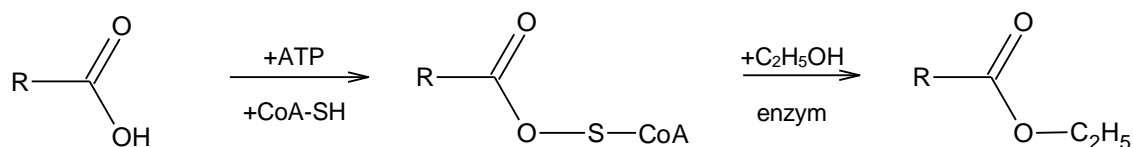
Ethanol a jeho zvýšená konzumace ve formě alkoholických nápojů vede často ke vzniku závislostí a představuje jeden ze závažných problémů moderní společnosti [68,69]. Z hlediska forenzní toxikologie se jedná o nejčastěji stanovovanou látku a její přítomnost svědčí o akutní intoxikaci touto látkou [70]. Ačkoli je za hlavní metabolickou dráhu biodegradace ethanolu považována jeho enzymatická oxidace na acetaldehyd pomocí enzymu alkoholdehydrogenázy (ADH, obr. 14), která zahrnuje metabolickou přeměnu přibližně 90 - 95 % přijatého ethanolu [86], existuje několik dalších metabolických procesů, kterých se ethanol účastní.



Obr. 14 – Schéma biotransformace ethanolu pomocí ADH.

Tyto procesy lze rozdělit na nepřímé a přímé. Nepřímé procesy zahrnují ty děje, při kterých se ethanol pouze nepřímo účastní biotransformace a ovlivňuje vznik nebo množství jiných produktů. Příkladem je zvýšená hladina karbohydrát-deficientního transferinu (CDT) v krvi [74-76], vznik 5-hydroxytryptofanolu [77] nebo fosfodiethanolu [78]. Nepřímo může na chronické zneužívání ethanolu poukazovat i zvýšená hladina sérových aminotransferáz, enzymů zapojených zejména do metabolismu aspartátu a alaninu v játrech [79].

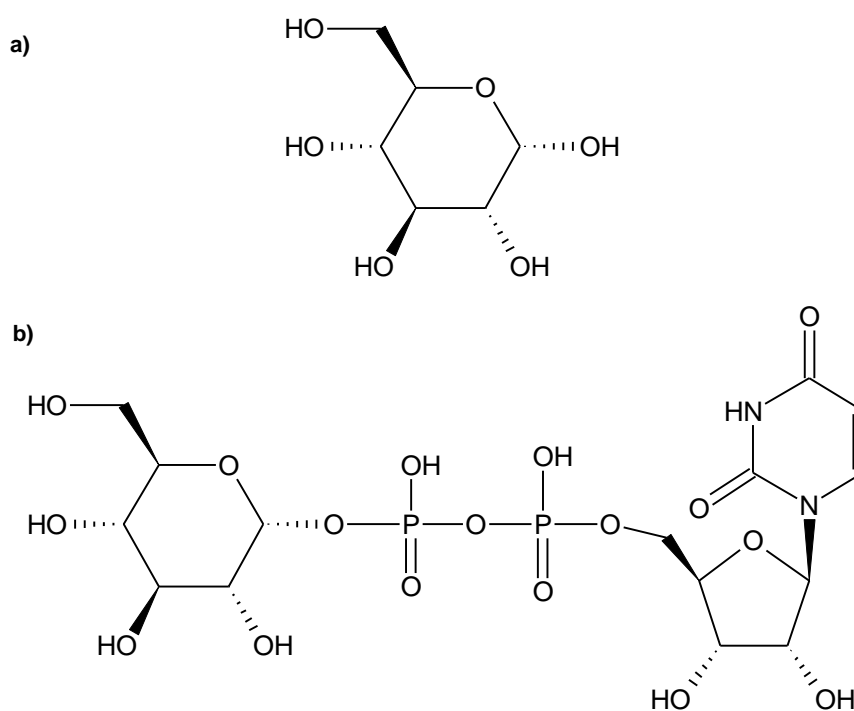
V přímých procesech dochází k biodegradaci ethanolu za vzniku metabolických produktů dle klasického schématu biotransformace látek v organismu. Toto schéma se obecně dělí na nesyntetickou (I. fáze metabolismu) a syntetickou (II. fáze metabolismu) část [70]. Nesyntetická fáze je významná tvorbou konjugátů ethanolu s endogenními substráty, které lze analyticky využít jako tzv. markery užívání ethanolu [56-58, 71-73]. Jako příklad lze uvést tvorbu esterů vyšších mastných kyselin (VMK) s ethanolem. Reakce vyžaduje přítomnost aktivovaných VMK acetylkoenzymem a je katalyzována enzymy ze skupiny syntetáz nebo transferáz (obr. 15). Reakce je rovněž endergonní a spotřebovává se při ní jedna molekula ATP.



R = palmitát, oleát, stearát atp.

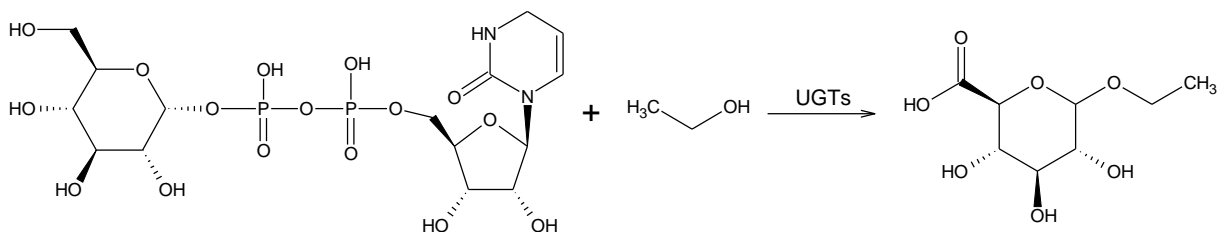
Obr.15- Schéma biosyntézy ethylesterů vyšších mastných kyselin

Dalším příkladem přímé biokonjugace je tvorba glukuronidů. Jedná se o typickou metabolickou dráhu mnoha endogenně přítomných látek i xenobiotik v organismu [85]. Biotransformace látek pomocí glukuronidace je založena na konjugační reakci kyseliny glukuronové (obr. 16a) s hydroxylovou nebo karboxylovou skupinou dané molekuly. Reakce je katalyzována specifickými enzymovými transferázami (tzv. UGTs) a vyžaduje přítomnost aktivované formy kyseliny glukuronové (koenzymu), tzv. uridin-5'-difosfo- α -D-glukuronové kyseliny (UDPGA, obr. 16b).



Obr.16- Kyselina glukuronová (a) a její aktivovaná forma, uridin-5'-difosfo- α -D-glukuronová kyselina (b).

V případě metabolismu ethanolu se jedná o minoritní metabolickou dráhu, kdy je pouze přibližně 0,02 – 0,5 % [73,87] přijatého ethanolu přeměněno na EtG podle reakce na obr. č. 17.



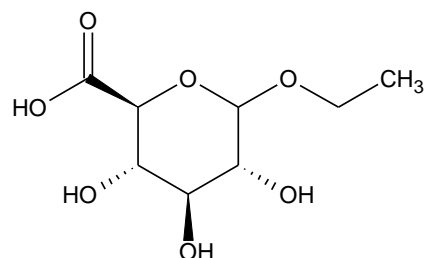
Obr.17- Schéma konjugační reakce ethanolu s UDPGA za tvorby ethylglukuronidu.

Primárním cílem glukuronidace látek v organismu je zvýšení jejich rozpustnosti, čímž je umožněna exkrece močí. Ethanol je obecně považován za dostatečně polární látku, z tohoto důvodu je jeho glukuronidace okrajovým dějem metabolismu o čemž svědčí i nízké množství transformované látky. Jeho výhodou je možnost detekce v širším časovém horizontu od požití ethanolu. Díky tomu je jedním z vhodných markerů, který je v moči detekovatelný až 80 hodin po požití ethanolu [88]. Fyzikálně-chemické charakteristiky a struktura EtG jsou shrnuty v tabulce č. IV.

Tabulka IV. – Fyzikálně-chemické charakteristiky EtG [74,86-90]

Ethylglukuronid

Strukturní vzorec



Sumární vzorec	$C_8H_{14}O_7$
Relativní molekulová hmotnost	$M_r = 222,20$
pK_a	3,21

Instrumentální metody pro stanovení EtG v biologických vzorcích jsou založeny na jeho fyzikálně-chemických vlastnostech. Jak je vidět z charakteristik uvedených v tabulce č. IV jedná se látku ionizovatelnou látku kyselé povahy ($pK_a = 3.21$) bez přirozeného chromoforu. Nejčastěji používané techniky pro separaci a detekci EtG shrnuje tabulka č. V.

Tabulka V. – Přehled instrumentálních metod analýzy EtG v biologických vzorcích.

Metoda	Vzorek	Úprava vzorku	Interní standard	Poznámky	LOD/LOQ	Ref.
GC-MS	Sérum	Srážení methanolem	-	Acetylace	100/- ng/ml	89
GC-MS	Sérum, moč	Srážení acetonem	-	Acetylace	100/- mg/ml	90
GC-MS	Sérum	Srážení acetonem, extrakce isohexanem	Propyl-glukuronid	Acetylace a perfluoracetylace	-	91
GC-MS	Moč	Srážení methanolem	d ₅ -EtG	Silylace (MSTFA)	-	88
GC-MS	Vlasy	Extrakce ultrazvukem v methanolu	Methyl-glukuronid	Silylace (MSTFA)	2.5/5 ng/ml	93
GC-MS	Vlasy	Extrakce ultrazvukem ve vodě	d ₅ -EtG	Silylace (BSTFA)	-	94
GC-MS	Sérum, moč	SPE (aminopropyl)	d ₅ -EtG	Silylace (MSTFA)	37/173 168/560 ng/ml	71
GC-MS	Sérum, moč	Methyl-glukuronid	terc-butyl glukuronid	Acetylace	100/250 ng/ml	95
LC-ESI-MS	Sérum, moč	Srážení methanolem	-	Kolona TSKgel Amdc-80	30/- ng/ml	92
LC-MS/MS	Sérum, moč, tkáně	Srážení methanolem	d ₅ -EtG	Kolona C18, 5 µm	50/100 ng/ml	86,87
CE	Sérum	Ředění vodou 1:1	-	BGE: 10 mM nikotinová kys., pH 4,3	79/- ng/ml	96
CE-ITP	Sérum	Ředění vodou 1:5	-	LE: 10 mM kys. chlorovodíková pH 4,4, EACA, TE: nikotinová kys.	22/- ng/ml	97
CE-ESI-MS	Sérum, moč	Ředění vodou, SPE (Strata X-AW)	-	20 mM acetát amonný, pH 9,5	200/- ng/mL	98

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1. Studium experimentálních podmínek

3.1.1. Chemikálie a materiál

Voda a methanol v čistotě pro LC-MS byly zakoupeny od firmy Merck (Darmstadt, Německo). Na přípravu pufrů a promývacích roztoků byly použity: 25 % vodný roztok amoniaku, hydroxid sodný (Merck, Darmstadt, Německo), kyselina octová, kyselina mravenčí, kyselina boritá, kyselina sulfanilová a hydrogenuhličitan amonný od firmy Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Ethylglukuronid byl zakoupen u firmy Medichem Diagnostica (Steinbronn, Německo). Nebyly-li uvedeny jinak, byly všechny chemikálie analytické čistoty. Standardní roztok ethylglukuronidu (EtG) byl připraven přesným navážením 0,5 mg EtG a jeho rozpuštěním v 1 ml deionizované vody a další potřebné koncentrace byly získány z tohoto roztoku metodou postupného ředění.

Pro měření byly použity křemenné kapiláry o vnitřním průměru 75 μm (MicroSolv Technology Eatontown, NJ, USA).

3.1.2. Instrumentace

Experimenty byly prováděny s pomocí kapilární elektroforézy Agilent 7110 (Waldbronn, Německo) s on-line ESI-MS kvadrupólovým detektorem (Agilent G6130). Studium fragmentačních analýz a reakcí bylo prováděno spojením CE-ESI s hmotnostním spektrometrem s trojitým kvadrupólem (Agilent MSD 6460). Dávkování pomocné kapaliny bylo zajištěno LC isokratickou pumpou (Agilent 1200 a 1260) s děličem toku v poměru 1:100. Veškerý sběr a vyhodnocení dat bylo prováděno softwarem Agilent ChemStation a Agilent MassHunter v příslušných verzích k daným přístrojům.

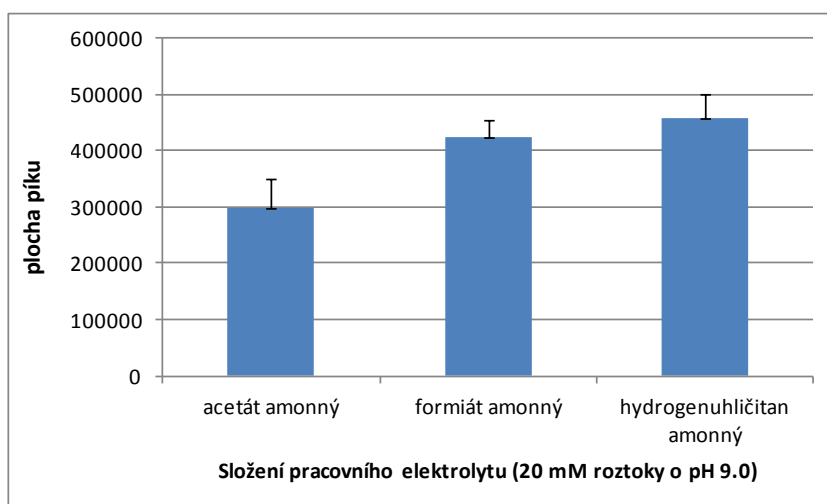
Nepokrytá křemenná kapilára o celkové délce 90 cm a vnitřním průměru 75 μm byla před prvním použitím promyta 0,1 M roztokem NaOH po dobu 30 minut, následně deionizovanou vodou po dobu 15 minut a nakonec pracovním elektrolytem (BGE) po dobu dalších 15 minut. Teplota kapiláry byla udržována na 25 °C. Před každým měřením byla kapilára promyta 5 minut BGE. Celková délka kapiláry a její efektivní délka jsou vzhledem k charakteru propojení CE a MS totožné. Po začátku a před skončením pracovního dne byla kapilára promyta roztokem stejného pracovního elektrolytu po dobu 60, respektive 120 minut. Obdobně se postupovalo i při změně elektrolytu.

3.1.3. Optimalizace CE-ESI-MS podmínek

Složení pufru

Bylo testováno několik typů základních elektrolytů se zaměřením na stabilitu a intenzitu signálu v MS detektoru a opakovatelnost měření na straně kapilární elektroforézy. Jako základní koncentrace byly zvoleny 20 mM roztoky kyseliny octové, mravenčí a borité, které byly vzhledem k aniontové povaze analytu titrovány do bazického pH 9,0 pomocí roztoku amoniaku. Pufř sestávající z hydrogenuhličitanu amonného byl připraven navážením příslušného množství soli a jeho rozpuštěním v deionizované vodě a úpravou pH na 9,0 pomocí stejného vodného roztoku amoniaku. Separační napětí bylo pro všechny experimenty +20 kV (normální polarita), dávkování vzorku bylo provedeno hydrodynamicky tlakem 50 mbar po dobu 10 sekund. Pomocná kapalina se skládala z vody, methanolu a amoniaku v poměru 50 : 49,5 : 0,5 (v/v/v) a její průtok byl 4 μ l/min (za děličem toku). Teplota vyhřívání kapiláry ESI byla 200 °C, zmlžovací plyn (N_2) byl přiváděn pod tlakem 20 psig (1 psig = 6,895 kPa) s průtokem 13 l/min. ESI-MS analýzy byly prováděny v negativním módu a sprejovací napětí elektrospreje bylo nastaveno na -4 kV. Základní experimenty byly prováděny v SIM módu při m/z 221, což odpovídá deprotonované molekule EtG ($[M-H]^-$). Není-li uvedeno jinak, byla všechna uvedená měření opakována třikrát ($n = 3$).

Obrázek č. 18 zobrazuje závislost plochy píku hmoty m/z 221 na použitém pracovním elektrolytu. Je dobře patrné, že intenzita signálů je při stejné iontové síle u všech použitých BGE podobná a liší se pouze směrodatnou odchylkou jednotlivých měření.



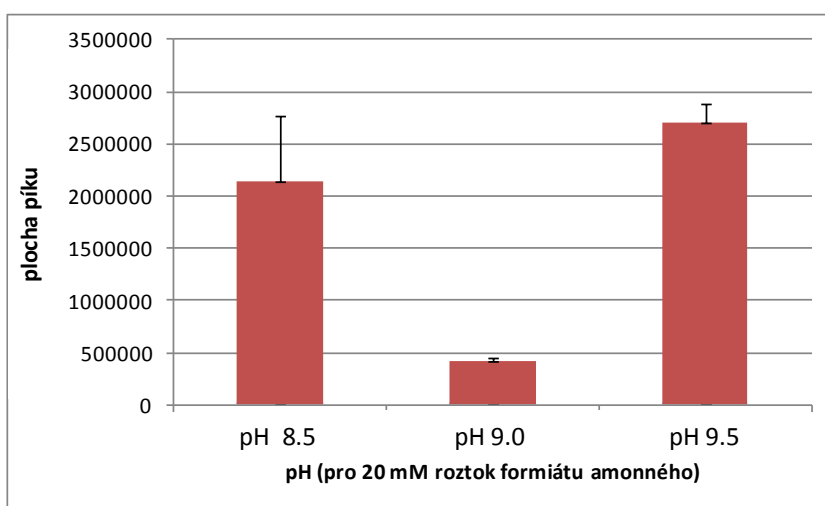
Obr. č. 18 – Závislost intenzity signálu vyjádřený jako plocha píku EtG na složení pracovního elektrolytu. Podmínky měření: Separační napětí +20 kV, kapilára déky 90 cm, 75 μ m v průměru, nástřik 50 mbar/10 s, ESI -4 kV, pomocná kapalina voda/methanol/ NH_4OH (49,5:50:0,5, v/v/v) 4 μ l/min, vzorek EtG 50 μ g/mL.

I když je z výsledků v grafu zřetelné, že nejvyšší intenzity bylo dosaženo s použitím BGE na bázi hydrogenuhličitanu amonného, relativní směrodatná odchylka jednotlivých měření (RSD) byla 14 %. Acetát amonný pak vykazoval RSD o hodnotě 18 %. Dostatečnou intenzitu signálu s nejnižší RSD bylo dosaženo v případě formiátu amonného, kdy RSD byla pouze 7 %. Dalším hodnoceným parametrem byla opakovatelnost migračních časů EtG, vyjádřená jako RSD jednotlivých měření (obrázek č. 16). Nejvyšší opakovatelnost migračních časů vykazoval BGE složený s formiátu amonného ($t_m = 9,0$ min, RSD = 0,3 %). Vyšších hodnot dosahoval BGE s octanem amonným a hydrogenuhličitanem amonným ($t_m = 9,0$ min, RSD = 1 %, resp. $t_m = 9,1$ min, RSD = 0,6 %).

Pro další optimalizaci experimentálních podmínek byl tedy zvolen BGE složený z formiátu amonného.

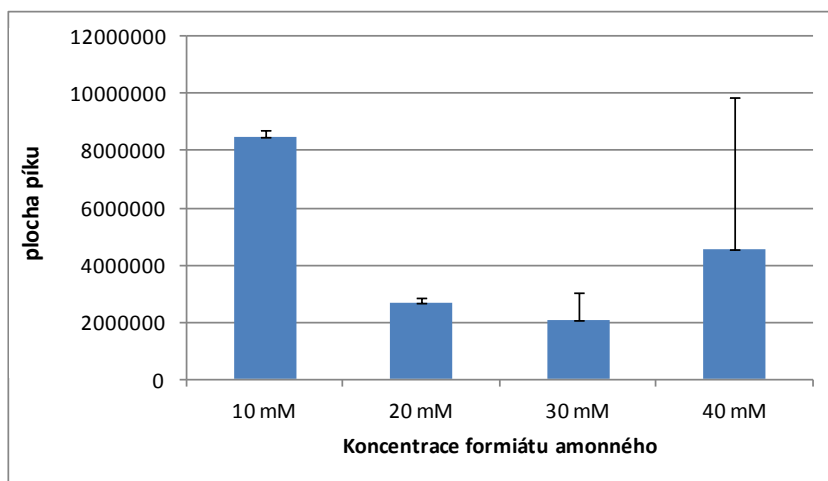
Vliv koncentrace a pH pufru

Jak již bylo uvedeno výše v teoretické části této práce, je separaci v CE možné ovlivňovat, mimo jiné, i koncentrací a pH použitého BGE. Puf, který byl zvolen v předchozí části, byl studován v rozsahu pH od 8,5 do 9,5 a v rozmezí koncentrací od 10 do 40 mM. Byla připravena sada roztoků formiátu amonného o koncentraci 20 mM s pH v rozmezí 8,5 až 9,5. Sledován byl nejdříve vliv pH na intenzitu signálu EtG, který shrnuje obrázek č. 19:



Obr. č. 19 – Závislost pH pracovního elektrolytu na intenzitě signálu. Podmínky měření: Separací napětí +20 kV, kapilára déky 90 cm, 75 μ m v průměru, nástřík 50 mbar/10 s, ESI -4 kV, pomocná kapalina voda/methanol/ NH_4OH (49,5:50:0,5, v/v/v) 4 μ l/min, vzorek EtG 50 μ g/mL.

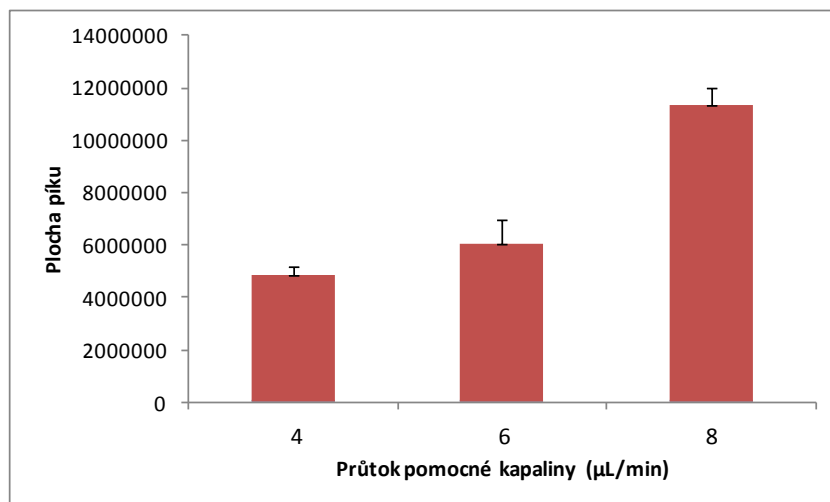
Z tohoto obrázku je zřejmé, že intenzita signálu je nejlepší pro pH 9,5, které poskytovalo rovněž relativně nízkou hodnotu RSD (6,4 %). Pro následné sledování vlivu koncentrace formiátového aniontu na intenzitu signálu EtG bylo vybráno pH 9,5 a byla připravena sada roztoků o koncentracích 10, 20, 30 a 40 mM. Výsledky zobrazuje obrázek č. 20, ze kterého je patrné, že se zvyšující se koncentrací formiátu intenzita signálu výrazně klesá a zvyšuje se rovněž relativní směrodatná odchylka měření. Zatímco v případě 10 mM koncentrace byla RSD pouze 2,5 %, při použití 40 mM BGE již byla 118 %. Podobný trend byl pozorován i při hodnocení opakovatelnosti migračních časů, kdy 10 mM BGE vykazoval RSD jednotlivých t_m 1,4 %, naproti tomu 40 mM již 5 %.



Obr. č. 20 – Závislost koncentrace mravenčnanu amonného v BGE na intenzitě signálu. Podmínky měření: Separční napětí +20 kV, kapilára déky 90 cm, 75 μm v průměru, nástřik 50 mbar/10 s, ESI -4 kV, pomocná kapalina voda/methanol/ NH_4OH (49,5:50:0,5, v/v/v) 4 $\mu\text{l}/\text{min}$, vzorek EtG 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Průtok pomocné kapaliny

Pomocná kapalina (SL, z angl. *sheath liquid*) sestávala ze směsi metanolu a vody s přídavkem amoniaku (49,5:50:0,5, v/v/v). Vliv průtoku pomocné kapaliny byl studován v rozsahu 4 – 10 $\mu\text{l}/\text{min}$. Sledována byla závislost průtoku SL na ploše píku, kterou ukazuje obrázek č. 21. Je zřetelné, že vliv velikosti plochy píku EtG je největší při průtoku 8 $\mu\text{l}/\text{min}$, resp. 800 $\mu\text{l}/\text{min}$ před děličem toku. Další zvyšování průtoku již nebylo možné vzhledem k únikům SL ve spojích mezi CE a sprejovací kapilárou MS.

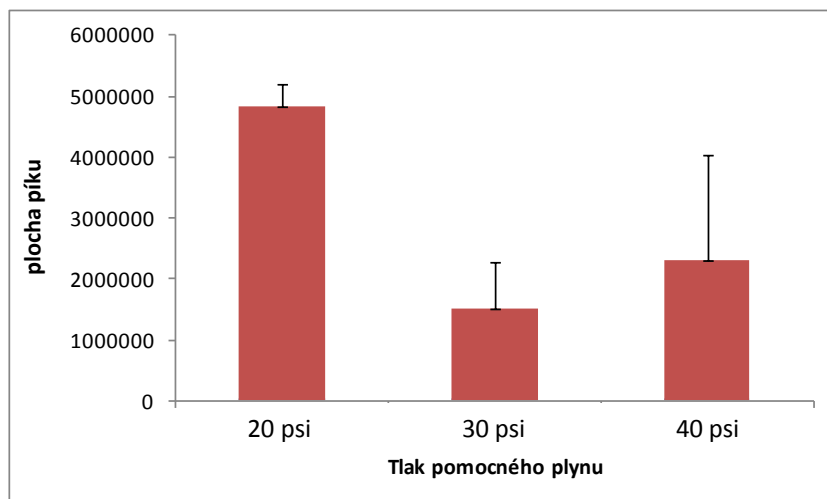


Obr. č. 21 – Závislost průtoku pomocné kapaliny na ploše píku. Podmínky měření: BGE: formiát amonný 10 mM, pH 9,5, separační napětí +20 kV, kapilára délky 90 cm, 75 µm v průměru, nástřík 50 mbar/10 s, ESI -4 kV, pomocná kapalina voda/methanol/NH₄OH (49,5:50:0,5, v/v/v), vzorek EtG 50 µg/mL.

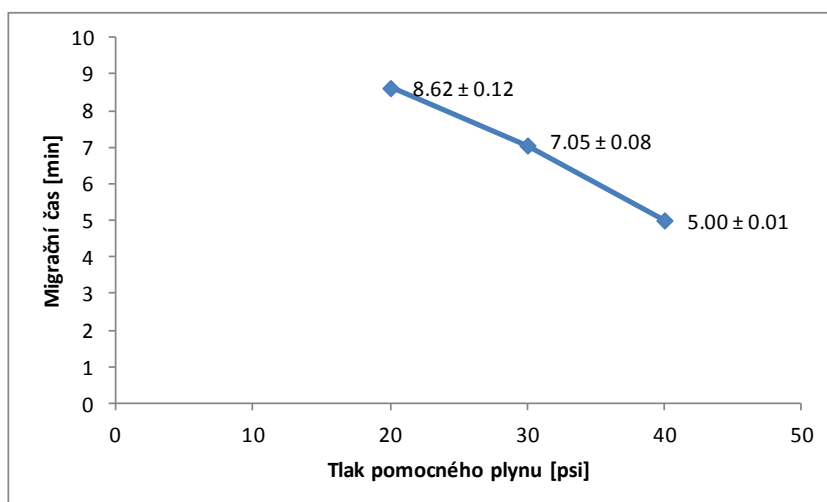
Tlak pomocného plynu a teplota vyhřívání kapiláry

Jako pomocný plyn sloužil dusík, jehož průtok byl nastaven na 13 l/min a testován v rozsahu tlaků od 20 do 40 psi (137,9 – 275,8 kPa). Teplota vyhřívání kapiláry byla testována od 100 do 300 °C. V případě tlaku se velikost plochy píku EtG snižovala se zvyšujícím se tlakem N₂ (obr. č. 22). Naopak migrační časy se snižovaly se zvyšujícím se tlakem pomocného plynu, jak je ukázáno na obr. č. 23, což dobře koresponduje s předpokladem, že při zvyšujícím se tlaku na N₂ dochází k nasávání a fyzickému toku kapaliny v kapiláře. Příklad elektroferogramů s použitím rozdílných tlaků N₂ je uveden na obrázku č. 22, na kterém lze rovněž demonstrovat vliv tlaku na intenzitu signálu v MS.

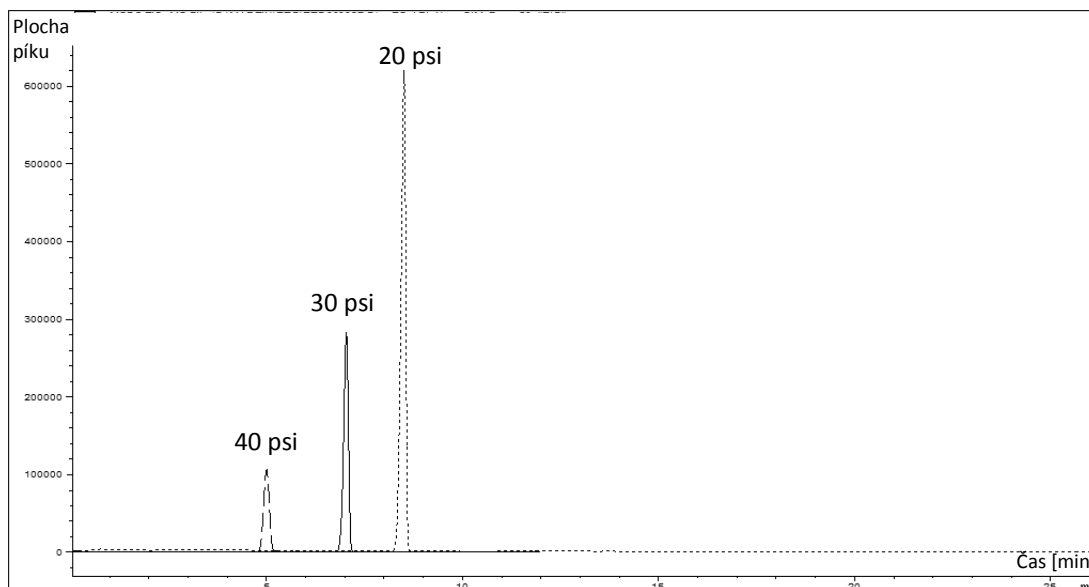
U teploty pak bylo největší velikosti píku dosaženo při 225 °C (obr. č. 24). Teploty pod 200 °C způsobovaly nestabilitu ESI, patrně z důvodu nedostatečného odpaření rozpouštědla a kapaliny z CE. Zvyšování teploty nad 225 °C pak již nevedlo k výraznějšímu zlepšení signálu (obr. 25). Jako optimální hodnoty pro další měření tak byl zvolen průtok dusíku 13 l/min pod tlakem 20 psi a teplotě ESI kapiláry 225 °C.



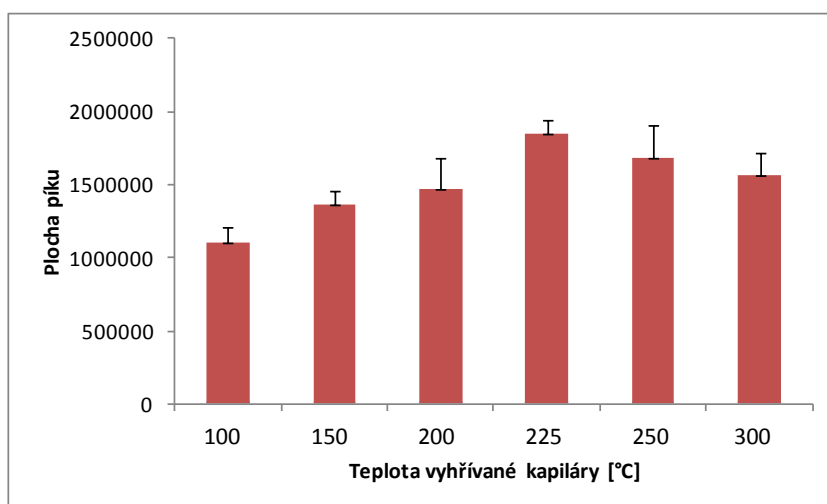
Obr. č. 22 – Závislost tlaku N_2 na ploše píku. Podmínky měření: BGE: formiát amonný 10 mM, pH 9.5, separační napětí +20 kV, kapilára děky 90 cm, 75 μ m v průměru, nástřik 50 mbar/10 s, ESI -4 kV, pomocná kapalina voda/methanol/ NH_4OH (49,5:50/0,5, v/v/v) 4 μ l/min, vzorek EtG 50 μ g/ml.



Obr. č. 23 – Migračního času na tlaku N_2 . Podmínky měření jsou stejné jako u obrázku č. 20.



Obr. č. 24 – Elektroferogramy EtG při různých tlacích N₂. Podmínky měření jsou stejné jako u obrázku č. 20



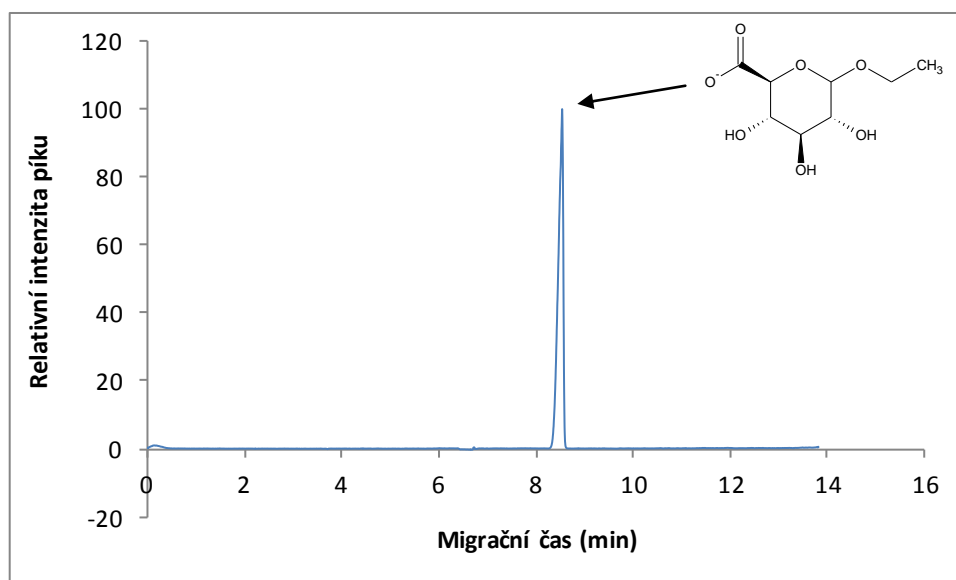
Obr. č. 25 – Závislost teploty ESI kapiláry na ploše píku. Podmínky měření jsou stejné jako u obrázku č. 20.

Shrnutí použitých podmínek

V tabulce č. VI. je uvedeno shrnutí finálních podmínek analýzy, které byly zjištěny optimalizací jednotlivých kroků. Na obr. č. 26 je uveden příklad analýzy modelového vzorku EtG o koncentraci 25 µg/ml při použití níže shrnutých podmínek.

Tabulka VI. – Shrnutí podmínek použitých při CE-ESI-MS analýze EtG

Parametr	Hodnota	Poznámky
m/z	$221 \pm 0,5$	$[M-H]^-$
Skenovací mód	SIM	
Kapilára	75 $\mu\text{m}/90\text{ cm}$	křemenná, nepokrytá
BGE	Formiát amonný 10 mM pH 9,5	
Pomocná kapalina	Metanol/voda/ NH_4OH (49,5:50:0,5, v/v/v)	
Pomocný plyn	N_2 , 20 psi, 13 l/min	
Teplota ESI kapiláry	225 $^\circ\text{C}$	
Nástřík	50 mbar/10 s	

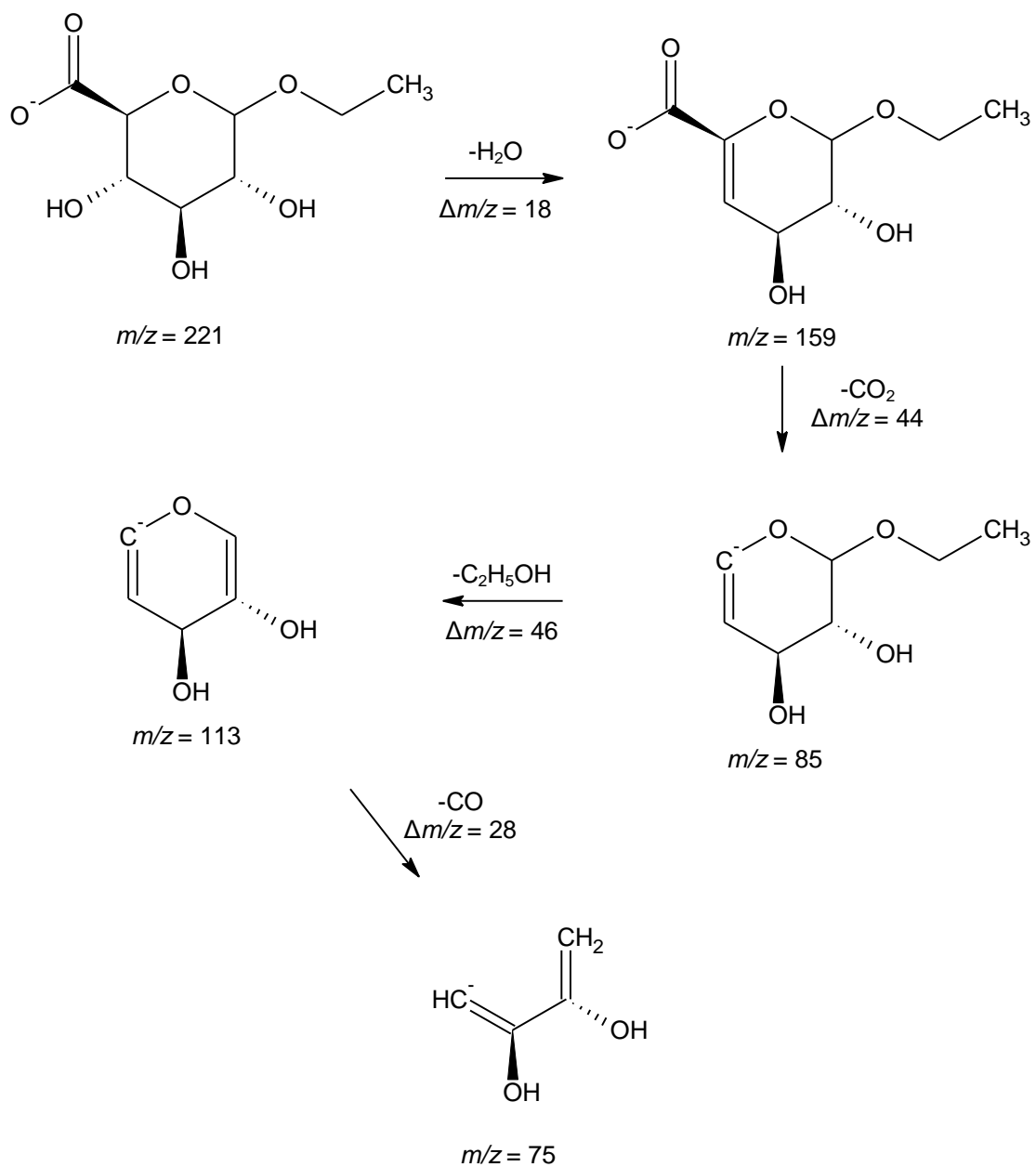


Obr. č. 26 – Elektroferogram ethylglukuronidu o koncentraci 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (SIM m/z 221). Podmínky analýzy jsou shrnuty v tabulce č. IV.

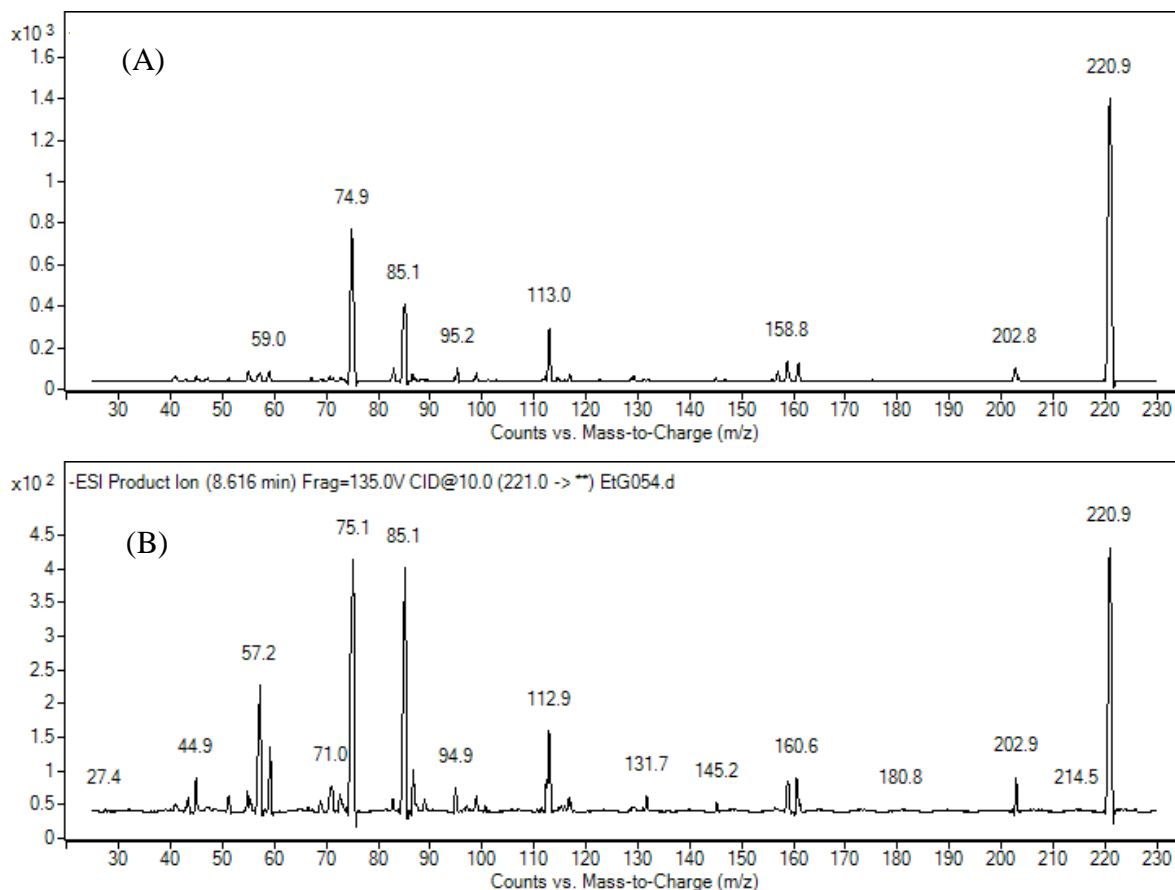
Kolizní energie a fragmentační reakce

Vliv velikosti kolizní energie byl studován s ohledem na vznik a intenzitu jednotlivých fragmentů EtG s použitím nízkoenergetické CID o energii -2 do -20 eV. Fragmentací EtG dovzniká několik poměrně intenzivních fragmentů, z nichž nejvýznamnějšími jsou fragmenty s m/z 75 a 85. Naopak fragmenty, které odpovídají logickým ztrátám ($-\text{H}_2\text{O}$, $-\text{CO}_2$) jsou málo intenzivní a téměř zanedbatelné. Návrh vzniku nejčtenějších fragmentů je uveden v obrázku č. 27 a vychází z návrhů, které byly vytvořeny na základě MS/MS analýz EtG s využitím různých technik tandemové MS, které byly doposud publikovány [56-58].

Za nejvhodnější kolizní energii bylo zvoleno -5 eV pro confirmaci analytu a -15 eV pro MRM měření. Nižší kolizní energie byly vhodnější pro srovnávání spekter pro účely identifikace, protože při nich vznikaly i méně čtené fragmenty. Naopak vyšší kolizní energie (15 eV) umožňovaly opakovatelné měření MRM ($221 \rightarrow 75$; $221 \rightarrow 85$). Typické MS/MS spektrum při použití obou kolizních energií je uvedeno na obrázku č. 28A a B.



Obr. č. 27 – Návrh struktury jednotlivých fragmentů vznikajících při CID tandemové analýze ethylglukuronidu.



Obr. č. 28 – Fragmentační spektra EtG (25 µg/ml) získaná použitím kolizní energie o -5 eV (A) a -15 eV (B).

Příprava vzorku

Vzorky moči byly zpracovány bezprostředně po odběru. Asi 5 ml moči bylo zfiltrováno pomocí diskového mikrofiltru (PTFE, 22 µm) a centrifugováno při 10 000 rpm po dobu 10 minut. Přesně 100 µl takto upravené moči bylo převedeno do mikrozkuhavky a doplněno a 1 ml deionizovanou vodou. Po důkladném promíchání byl vzorek vložen do ultrazvukové lázně na dobu 5 minut. V případě kvantifikace s použitím metody standardního přídatku bylo postupováno obdobně. Do vzorků, které byly použity ke konstrukcím kalibračních závislostí bylo přidáno odpovídající množství kyseliny sulfanilové jako interního standardu (IS), aby výsledná koncentrace byla 5 mg/l. Využití IS spočívalo především ke kontrole migračních časů a funkčnosti ESI.

3.2 Linearita a kalibrační závislost

Lineární dynamický rozsah by měl být zvolen a experimentálně zjištěn v takovém rozsahu koncentrací, které dovolují nejenom určit limity detekce (LOD) a limity kvantifikace (LOQ), ale které rovněž odpovídají předpokládaným koncentracím analytu v reálných vzorcích. Linearita byla testována v rozsahu koncentrací od 1 mg/l do 50 mg/l a byla zjištěna v celém uvedeném rozsahu. Počet měřených bodů kalibrační závislosti byl 6 (1, 2, 5, 10, 25 a 50 mg/l) a každý bod byl měřen třikrát ($n = 3$). Základní charakteristiky kalibračních křivek jsou uvedeny v tabulce č. VII.

Tabulka VII. – Základní charakteristiky kalibračních křivek

Typ MS měření	Lineární dynamický rozsah	Kalibrační křivka	R ²	LOD	LOQ
SIM (221)	1 – 50 mg/l	$y = 2490,3(\pm 28,4)x + 1308,2 (\pm 28,4)$	0,9995	0,87 mg/l	0,57 mg/l
MRM (221 → 85)	1 – 50 mg/l	$y = 25,0 (\pm 1,8)x + 10,81 (\pm 22,13)$	0,9848	3,24 mg/l	2,20 mg/l
MRM (221 → 75)	1 – 50 mg/l	$y = 32,4 (\pm 0,43)x - 7,39 (\pm 5,85)$	0,9996	0,95 mg/l	0,69 mg/l

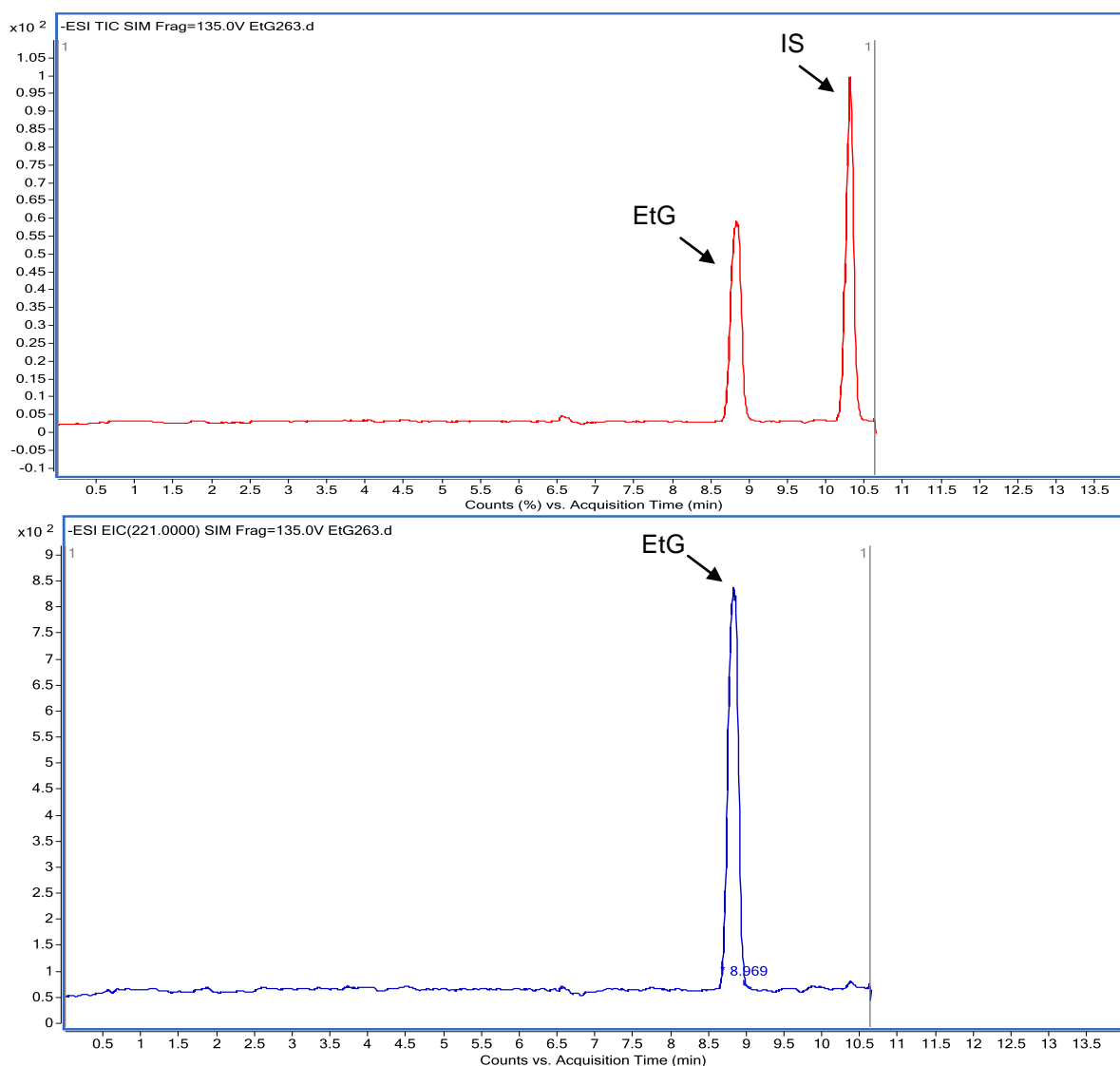
LOD a LOQ byly získány výpočtem z kalibrační křivky za použití statistického softwaru QC Expert 3.1 EN s použitím metody dle ISO 11843-2. Získané výsledky shrnuje tabulka č. VI. Na základě zjištěných výsledků je jasně zřetelné, že MRM měření vykazují horší citlivost (nižší směrnici kalibrační závislosti) i vyšší limity detekce a kvantifikace. Na základě toho bylo pro kvantifikaci v reálných vzorcích zvoleno SIM měření iontu m/z 221.

3.3 Analýza reálných vzorků

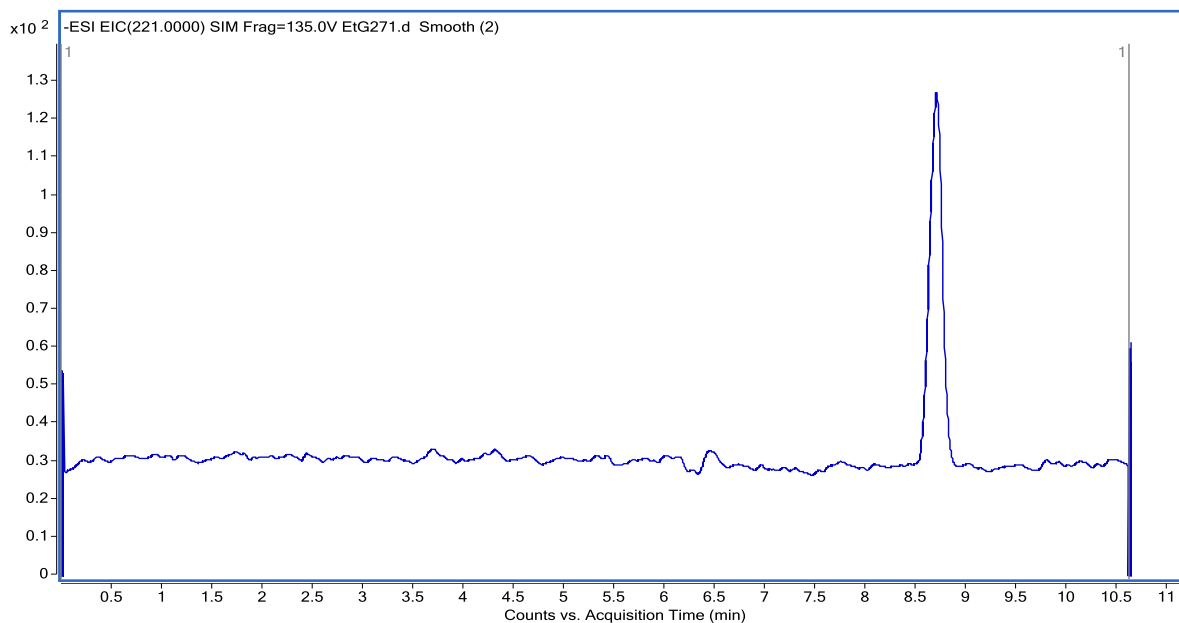
Analýza vzorků moči byla provedena za účelem ověření aplikačních možností vyvinuté metody při analýze reálných vzorků. Vzorky moči pocházely od osob, které ve sledované době požívali alkoholické nápoje a byly upraveny stejným způsobem jako běžné vzorky (viz výše). Pro kvantifikaci obsahu EtG v moči bylo použito metody standardního přídatku. Výsledky analýz shrnuje tabulka č. VII. Příklady typických elektroferogramů moči s obsahem EtG jsou uvedeny na obrázcích č. 29-31.

Tabulka VII. – Analýza reálných vzorků EtG v moči

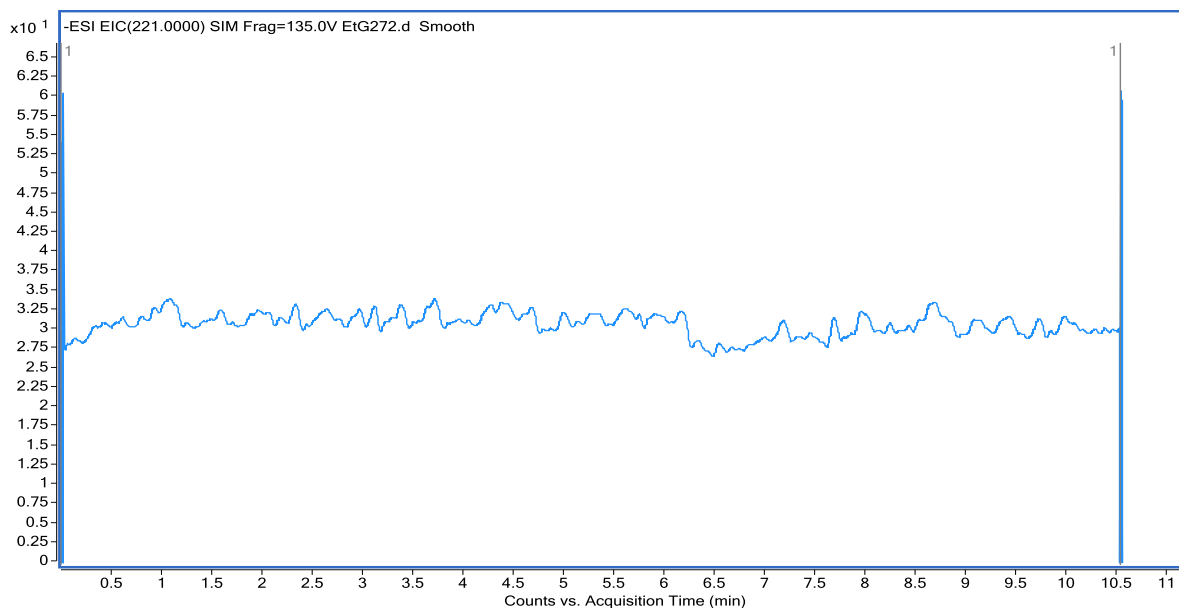
Typ MS měření	Úprava vzorku	Přibližné množství požitého ethanolu	Doba analýzy po požití	Nalezený obsah EtG
SIM (221)	10x naředění vodou	100 g.	8 h	29,0 ± 1,2 mg/l
SIM (221)	10x naředění vodou	100 g.	14 h	< LOD
SIM (221)	10x naředění vodou	Neznámo	Ihned po odběru	< LOD
SIM (221)	10x naředění vodou	Kalibrační vzorek o koncentraci EtG 5 mg/l	-	4,74 ± 0,05 mg/l



Obr. 29 – TIC a EIC elektroferogram analýzy moči (10x naředěné vodou) s EtG o koncentraci 5 mg/l a IS (kys. sulfanilová, 5 mg/l). Podmínky měření: BGE: formiát amonný 10 mM, pH 9.5, separační napětí +20 kV, kapilára déky 90 cm, 75 μm v průměru, ESI -4 kV, pomocná kapalina voda/methanol/NH₄OH (49,5:50/0,5, v/v/v) 4 μl/min. Nástřik vzorku: 50 mbar/10 s.



Obr. 30 – EIC elektroferogram analýzy moči 8 hodin po požití cca 100 g ethanolu. Podmínky měření: BGE: formiát amonný 10 mM, pH 9.5, separační napětí +20 kV, kapilára déky 90 cm, 75 μ m v průměru, ESI -4 kV, pomocná kapalina voda/methanol/ NH_4OH (49,5:50/0,5, v/v/v) 4 μ l/min. Nástřik vzorku: 50 mbar/10 s.



Obr. 31 – TLC elektroferogram analýzy moči 14 hodin po požití cca 100 g ethanolu. Podmínky měření: BGE: formiát amonný 10 mM, pH 9.5, separační napětí +20 kV, kapilára déky 90 cm, 75 μ m v průměru, ESI -4 kV, pomocná kapalina voda/methanol/ NH_4OH (49,5:50/0,5, v/v/v) 4 μ l/min. Nástřik vzorku: 50 mbar/10 s.

Analýzou reálných vzorků byla prokázána přítomnost EtG a metodou standardního přidavku byla stanovena jeho koncentrace (viz tabulka č. VII.). Jak dokládá obrázek č. 31, nepodařilo

se stanoví EtG v čase delším než 14 hodin po požití alkoholického nápoje, neboť obsah EtG v moči byl již pod limitem detekce dané metody. Ve vzorku moči, odebraném bez předchozí konzumace ethanolu po dobu větší než 2 dny, byl přidán standard EtG tak, aby výsledná koncentrace byla 5,0 mg/l. V tomto vzorku byla stanovena jeho koncentrace na $4,74 \pm 0,05$ mg/l, čímž lze demonstrovat správnost měření navzdory přítomné biologické matici. Rozdíl mezi skutečnou a naměřenou koncentrací EtG byl 5,2 %.

4. ZÁVĚR

Byl studován vliv experimentálních podmínek na separaci a detekci ethylglukuronidu se zaměřením především na pH pracovního elektrolytu, jeho složení a koncentraci, průtok pomocné kapaliny a tlak pomocného plynu a teplotu sprejovací kapiláry. Byla vyvinuta metoda pro jeho separaci a detekci pomocí kapilární elektroforézy a hmotnostní spektrometrie, která byla použita při analýze reálných vzorků moči.

Vyvinuté podmínky měření jsou následující: pracovní elektrolyt: formiát amonný 10 mM, pH 9,5, separační napětí +20 kV, nepokrytá kapilára délky 90 cm, 75 μ m v průměru, ESI -4 kV, pomocná kapalina voda/methanol/NH₄OH (49,5:50/0,5, v/v/v) 4 μ l/min, pomocný plyn (N₂) o průtoku 13 l/min a tlaku 20 psig, teplota sprejovací kapiláry 225 °C, nástřik vzorku: 50 mbar/10 s.

Z uvedených výsledků je patrný potenciál využití studované metody pro analýzu ethylglukuronidu v biologických vzorcích. Zjištěné detekční limity (LOD = 0,87 mg/l, LOQ = 0,57 mg/l) jsou, vzhledem k absenci jakéhokoli extrakčního postupu, srovnatelné s doposud publikovanými výsledky v jiných pracích a jsou dostatečné pro stanovení ethylglukuronidu v moči. Metoda je rovněž vhodná pro studium on-line prekoncentračních technik, které budou předmětem dalšího studia.

5. REJSTŘÍK POUŽITÝCH POJMŮ A ZKRATEK

ADH	Alkoholdehydrogenáza
APCI	Chemická ionizace za atmosférického tlaku
APPI	Fotoionizace za atmosférického tlaku
ATP	Adenosin trifosfát
BE	Magnetický sektorový analyzátor
BGE	Pracovní elektrolyt
BSTFA	<i>N,O</i> -bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid
CCD (resp. C ⁴ D)	Bezkontaktní vodivostní detekce
CDT	Karbohydrát-deficientní transferin
CE	Kapilární elektroforéza
CIEF	Kapilární izoelektrická fokusace
CITP	Kapilární izotachoforéza
CGE	Kapilární gelová elektroforéza
CZE	Kapilární zónová elektroforéza
ECD	Elektrochemická detekce
EIC	Extrahovaný iontový chromatogram
EOF	Elektroosmotický tok
ESI	Ionizace elektrosprejem
EtG	Ethylglukuronid
EtOH	Ethanol
FAAE	Ethylestery vyšších mastných kyselin
FT	Fourierova transformace
GC	Plynová chromatografie
ICR	Iontová cyklotronová rezonance
IT	Iontová past
HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie
IR	Infračervené spektroskopie
LC	Kapalinová chromatografie
LIF	Laserem indukovaná fluorescence
LOD	Limit detekce
LOQ	Limit kvantifikace

MALDI	Desorpce a ionizace za účasti matrice
MeOH	Methanol
MS	Hmotnostní spektrometrie
MSTFA	<i>N</i> -methyl- <i>N</i> -trimethylsilyltrifluoracetamid
MRM	Monitorování několika fragmentačních reakcí
NAD(P)H	Nikotinamid adenin dinukleotid (fosfát), redukovaná forma
NAD(P) ⁺	Nikotinamid adenin dinukleotid (fosfát), oxidovaná forma
NLS	Skenování neutrálních ztrát
Q (resp. q)	Kvadrupólový filtr
QqQ	Trojité kvadrupólový filtr
SIM	Monitorování vybraného iontu
SPE	Extrakce tuhou fází
SRM	Monitorování vybrané fragmentační reakce
SULF	Kyselina sulfanilová
TIC	Celkový iontový proud
TOF	Detekce pomocí doby letu
U (resp. V)	Elektrické napětí
UDPGA	Uridin-5'-difosfo- α - <i>D</i> -glukuronová kyselina
UGTs	UDP-glukuronyl transferázy
UV/VIS	Spektrofotometrie ve viditelné a ultrafialové oblasti
VMK	Vyšší mastné kyseliny
XIC	Extrahovaný iontový chromatogram

6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Simonet, B.M., Valcárcel, M., *Microchim. Acta* 153 (2006) 1-5.
2. Harvey D., *Modern Analytical Chemistry*, McGraw-Hill Companies Inc., 2000.
3. Kašička, V., *Chem. Listy* 91 (1997) 320-329.
4. Lucy, C.A., MacDonald, A.M., Gulcev, M.D., *J. Chromatogr. A* 1184 (2008) 81-105.
5. Blanco, E., Casais, del M.C., Mejuto, del M.C., Cela, R., *Electrophoresis* 29 (2008) 3229-3238.
6. Kenndler, E., *Electrophoresis* 30 (2009) S101-S111.
7. Horvath, J., Dolník, V., *Electrophoresis* 22 (2001) 644-655.
8. Agilent Technologies : *High performance capillary electrophoresis: An Introduction*, Publikáční číslo: 5968-9963E.
9. Agilent Technologies: *Agilent 6400 Series Triple Quad LC/MS System: Concepts Guide*, Publikáční číslo: G3335-90069.
10. Felhofer J. L., Blanes L., Garcia C. D., *Electrophoresis* 31 (2010) 2469-2486.
11. Pan T., Kelly R. T., Asplund M. C., Woolley A. T., *J. Chromatogr. A* 1027 (2004) 231–235.
12. Landers J.P. (Ed.): *Handbook of Capillary Electrophoresis*, CRC Press, New York 1997.
13. Swinney K., Bornhop D. J., *Electrophoresis* 21 (2000) 1239-1250.
14. Gassmann E., Kuo J. E., Zare R. N., *Science* 230 (1985) 813-814.
15. Timperman A. T., Khatib K., Sweedler J. V., *Anal. Chem.* 67 (1995) 139-144.
16. Chen D. Y., Aldelhelm K., Cheng X. L., Dovichi N. J., *Analyst* 119 (1994) 349-352.
17. Liu L., Shirota O., Novotny M., *Anal. Chem.* 63 (1991) 413-417.
18. Yeung E. S., *Acc. Chem. Res.* 22 (1989) 125-130.
19. Chen D. Y., Dovichi N. J.: *Anal. Chem.* 68 (1996) 690-696.
20. Kuhr W. G., Yeung E. S., *Anal. Chem.* 60 (1988) 1832-1834.
21. Huang X., Pang T. K., Gordaon M. J., Zare R. N.: *Anal. Chem.* 59 (1987) 2747-2749.
22. Gordon M. J., Huang X., Pentoney S. L., Zare R. N.: *Science* 63 (1988) 224-228.
23. Dasgupta P. K., Bao L., *Anal. Chem.* 65 (1993) 1003-1011.
24. Bruno A. E., Krattinger B., Maystre F., Widmer H. M., *Anal. Chem.* 63 (1991) 2689-2697.
25. Chen C. Y., Morris M. D., *Appl. Spectrosc.* 42 (1998) 515-518.

26. Colon L. A., Dadoo R., Zare R. N., *Anal. Chem.* 65 (1993) 476-481.
27. Oliveras J. A., Nguyen N. T., Yonker C. R., Smith R. D., *Anal. Chem.* 59 (1987) 1230-1232.
28. Schmitt-Kopplin P., Frommberger M., *Electrophoresis* 24 (2003) 3837-3867.
29. Schmitt-Kopplin P., Englmann M., *Electrophoresis* 26 (2005) 1209-1220.
30. Ekman R. (ed.): *Mass Spectrometry – Instrumentation, Interpretation and Application*, John Wiley & Sons, Hoboken, 2009.
31. Hewlett-Packard: *CE-ESI-MS: an integrated solution*. Publikáční číslo 5968-1328E, 1999.
32. Perkins, J. R., Tomer, K. B., *Anal. Chem.* 66 (1991) 2835-2840.
33. Kubáň, P., Hauser, P. C., *Anal. Chim. Acta* 607 (2008) 15–29.
34. Barek J., Opekar F., Štulík K.: *Elektroanalytická chemie*, Praha, 2005.
35. Haex M.: *Protein Identification by CE-MS-TOF*, Agilent Technologies (<http://www.kvcv.be/downloads/ce2/14u30haex.pdf>, staženo dne 28.9.2011).
36. Zhang, B., Liu, H., Karger, B. L., Foret, F., *Anal. Chem.* 71 (1999) 3258-3264.
37. Paul, W., Steinwedel, H., *Naturforsch.*, A8 (1953) 448–450.
38. Paul, W., Steinwedel, H., U. S. Patent 2939952, 1960.
39. Hoffmann, E. (ed.): *Mass Spectrometry – Principles and Applications – 3rd ed.*, John Wiley & Sons, Chichester, UK, 2007.
40. Pascali, J.P., Bortolotti, F., Tagliaro, F., *Electrophoresis* 33 (2012) 117–126.
41. da Costa, J. L., Tonin, F. G., Zanolli, L. A., Chasin, A. A., Tavares, M. F., *Electrophoresis* 30 (2009) 2238–2244.
42. Aturki, Z., D’Orazio, G., Rocco, A., Bortolotti, F., Gottardo, R., Tagliaro, F., Fanali, S., *Electrophoresis* 31 (2010) 1256–1263.
43. Caslavská, J., Jung, B., Thormann, W., *Electrophoresis* 32 (2011) 1760–1764.
44. Stephens, W.E., *Phys. Rev.* 69 (1946) 691.
45. Dawson, J. H. J., Guilhaus, M., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 3 (1989) 155–159.
46. Dodonov, A.F., Chernushevich, I. V., Laiko, V.V., 12th International Mass Spectrometry Conference, 26–30 August, 1991, Amsterdam, the Netherlands, 153.
47. Sin, C.H., Lee, E.D., Lee, M.L., *Anal. Chem.* 63 (1991) 2897–2900.
48. Boyle, J.G., Whitehouse, C.M., *Anal. Chem.* 64 (1992) 2084–2089.
49. Verentchikov, A.N., Ens, W., Standing, K.G., *Anal. Chem.* 66 (1994) 126–133.

50. Staub, A., Schappler, J., Rudaz, S., Veuthey, J-L., *Electrophoresis* 30 (2009) 1610-1623.
51. Makarov, A., *Mass Spectrometr. US Patent*, 5886364.
52. Makarov, A., Hardman M.E., Schwartz, J.C., Senko, M., *US Patent*, 2004108450.
53. Boháč, M., Ingendoh, A., Fuchser, J., Witt, M., *Chem. Listy* 99 (2005) 943-951.
54. Xin, B., Pu, D., Xiong, S.X., Wang, G.H., *Chin. Chem. Lett.* 14 (2003) 191-194.
55. Baidoo, E.E.K., Benke, P.I., Neusüss, C., Pelzing, M., Kruppa, G., Leary, J.A., Keasling, J.D., *Anal. Chem.* 80 (2008) 3112-3122.
56. Cabarcos, P., Hassan, H.M., Tabereroa, M.J., Scottb, K.S., *J. Appl. Tox.* (2012)
57. Lucy, C.A., *J. Chromatogr. A* 850 (1999) 319-337.
58. Righetti, P.G., Gelfi, C., Sebastiano, R., Citterio, A., *J. Chromatogr. A* 1053 (2004) 15-26.
59. Roy, K.I., Lucy, C.A., *Electrophoresis* 24 (2003) 370-379.
60. Riekkola, M.-L., Wiedmer, S.K., Valkó, I.E., Sirén, H., *J. Chromatogr. A* (1997) 13-35.
61. Terabe, S., *Chem. Rec.* 8 (2008) 291-301.
62. Evenhuis, C.J., Haddad, P.R., *Electrophoresis* 30 (2009) 897-909.
63. Xuan, X., Xu, B., Sinton, D., Li, D., *Lab. Chip* 4 (2004) 230–236.
64. Hjerten, S., *Chromatog. Rev.* 9 (1967) 122–219.
65. Righetti, P.G., Gelfi, C., Verzola, B., Castelletti, L., *Electrophoresis* 22 (2001) 603-611.
66. Muijselaar, W.G.H.M., De Bruijn, C.H.M.M., Everaerts, F.M., *J. Chromatogr.* 605 (1992) 115-123.
67. Bello, M.S., De Besi, P., Rezzonico, R., Righetti, P.G., Casiraghi, E., *Electrophoresis* 15 (1994) 623-626.
68. Das, S.K., Dhanya, L., Vasudevan, D.M., *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* 68 (2008) 81-92.
69. Niemelä, O., *Clin. Chim. Acta* 377 (2007) 39-49.
70. Balíková M.: *Forenzní a klinická toxikologie*, Galén, Praha, 2007.
71. Janda, I., Alt, A., *J. Chromatogr. B* 758 (2001) 229-234.
72. Musshoff, F., *J. Chromatogr. B* 781 (2002) 457-480.
73. Politi, L., Leone, F., Morini, L., Polettini, A., *Anal. Biochem.* 368 (2007) 1-16.

74. Allen, J.P., Litten, R.Z., *Alcohol Clin. Exp. Res.* 27 (2003) 1667-1670.
75. Salapuro M., *Alcohol* 19 (1999) 261-271.
76. Stibler H., *Clin. Chem.* 46 (2000) 1894-1902.
77. Beck, O., Helander, A., *Addiction* 98 (2003) 63-72.
78. Wurst, F.M., Alling, C., Aradottir, S., *Alcohol Clin. Exp. Res.* 29 (2005) 465-473.
79. Niemelä, O.: *Serum diagnosis of alcoholic liver disease and markers of ethanol intake*, in Sherman D.I.N., Preedy, V., Watson, R.R. (ed.), *Ethanol and liver* 1st edition, New York and London, 2002, 411-449.
80. Bruins, A.P., *J. Chromatogr. A* 794 (1998) 345-357.
81. Constantopoulos, T. L., Jackson, G. S., Enke, C. G., *Anal. Chim. Acta* 406 (2000) 37-52.
82. Labowsky, M., Fenn, J. B., de la Mora, J. F., *Anal. Chim. Acta* 406 (2000) 105-118.
83. Chen, Y., Lü, W., Chen, X., Teng, M., *Cent. Eur. J. Chem.* 10 (2012) 611-638.
84. Simpson Jr, S.L., Quirino, J.P., Terabe, S., *J. Chromatogr. A* 1184 (2008) 504.
85. Bedford, C.T., *J. Chromatogr. B* 717 (1998) 313-326.
86. Wurst, F.M., Kempter, Ch., Metzger, J., Seidl, S., Alt, A., *Alcohol* 20 (2000) 111-116.
87. Wurst, F.M., Kempter, Ch., Seidl, S., Alt, A., *Alcohol & Alcoholism* 34 (1999) 71-77.
88. Alt, A., Wurst, F.M., Seidl, S., *Blutalkohol* 34 (1997) 360-365.
89. Schmitt, G., Droenner, P., Skopp, G., Aderjan, R., *J. Forensic. Sci.* 42 (1997) 1099.
90. Schmitt, G., Aderjan, R., Keller, T., Wu, M., *J. Anal. Toxicol.* 19 (1995) 91.
91. Sticht, G., Käferstein, H., Staak, M., *Rechtsmed* 7 (1997) 184.
92. Nashikawa, M., Tsuchihashi, H., Miki, A., Katagi, M., Schmitt, G., Zimmer, H., Keller, T., Aderjan, R., *J. Chromatogr. B* 726 (1999) 105.
93. Skopp, G., Schmitt, G., Pötsch, L., Dröner, P., Aderjan, R., Mattern, R., *Alcohol & Alcoholism* 35 (2000) 283.
94. Alt, A., Janda, I., Seidl, S., Wurst, F.M., *Alcohol & Alcoholism* 35 (2000) 313
95. Zimmer, H., Schmitt., G., Aderjan, R., *J. Anal. Toxicol.* 26 (2002) 11.
96. Křivánková, L., Caslavská, J., Malášková, H., Gebauer, P., Thormann, W., *J. Chromatogr. A* 1081 (2005) 2-8.
97. Nováková, M., Křivánková, L., *Electrophoresis* 29 (2008) 1694-1700.
98. Časlavská, J., Jung, B., Thormann, W., *Electrophoresis* 32 (2011) 1760-1764.