

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie



Stanovení bitrexu kapilární elektroforézou s UV-VIS detektorem a tandemovou hmotnostní spektrometrií

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor: Petr Langer

Studijní program: N1407 Chemie

Studijní obor: Analytická chemie

Forma studia: Prezenční

Vedoucí práce: Doc. RNDr. Vítězslav Maier, Ph.D.

Termín odevzdání práce: duben 2015

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora: Petr Langer

Název práce: Stanovení bitrexu kapilární elektroforézou s UV-VIS detektorem a tandemovou hmotnostní spektrometrií

Typ práce: Diplomová

Pracoviště: Katedra analytické chemie

Vedoucí práce: Doc. RNDr. Vítězslav Maier, Ph.D.

Rok obhajoby práce: 2015

Abstrakt: Bitrex, bílá krystalická látka vyráběná od roku 1958, má jednu velmi specifickou vlastnost. Výrazná hořkost této látky se využívá v drogistických přípravcích, jako příměs zabraňující nežádoucímu pozření těchto výrobků dětmi nebo domácími zvířaty. Hořkosti Bitrexu se také využívá pro denaturaci alkoholu, který by měl být používán pouze pro technické účely. Avšak využitím oxidačních činidel je možné alkohol Bitrexu zbavit, čehož využívali i někteří nelegální výrobci pančovaného alkoholu. Je proto nutné mít rychlou a účinnou metodu pro analýzu nejen drogistického zboží, ale také pro vzorky pančovaného alkoholu. Vhodnou metodou pro toto stanovení může právě kapilární elektroforéza ve spojení s různými typy detektorů.

Klíčová slova: Kapilární elektroforéza, hmotnostní spektrometrie, Bitrex, denatonium benzoát

Počet stran: 61

Počet příloh: 0

Jazyk: Česky

Bibliographical identification:

Autor's name: Petr Langer

Title: Determination of Bitrex by capillary electrophoresis with UV-VIS detection and tandem mass spectrometry

Type of thesis: Diploma thesis

Department: Department of analytical chemistry

Supervisor: Doc. RNDr. Vítězslav Maier, Ph.D.

The year of presentation: 2015

Abstract: Bitrex, which is white crystalline substance made from 1958, has one very specific attribute. Its strong bitterness is used in drugstore products as an additive that helps to stop children and pets from eating them. Bitterness of Bitrex is also used for denaturation of alcohol which is meant to be used only for technical purposes. However Bitrex can be removed from alcohol by the use of oxidation agents. This procedure was used for illegal production of adulterated alcohol. Because of this it is important to have quick and effective method for analyze not only drugstore products but also for samples of adulterated alcohol. Appropriate method for this analysis can be capillary electrophoresis with different types of detectors.

Keywords: Capillary electrophoresis, mass spectrometry, Bitrex, denatonium benzoate

Numbers of pages: 61

Numbers of appendices: 0

Language: Czech

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou v seznamu použité literatury.

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

V Olomouci dne

.....

vlastnoruční podpis

Poděkování

Chtěl bych především poděkovat doc. RNDr. Vítězslavu Maierovi, Ph.D. za vedení mé diplomové práce, za jeho trpělivost, rady a informace při sepisování teoretické i experimentální části.

Také bych rád poděkoval mé rodině, přítelkyni, přátelům a spolubydlícím, kteří mě neustále podporovali při studiu i psaní.

Petr Langer

Souhrn

Tato diplomová práce se zabývá studiem stanovení Bitrexu kapilární elektroforézou se zapojením s DAD detektorem a také hmotnostním spektrometrem.

V teoretické části jsou uvedeny a popsány nejpoužívanější elektromigrační techniky, včetně samotné kapilární elektroforézy, její historie i teorie. Teoretická část dále obsahuje popis hmotnostního spektrometru, jeho propojení s technikou kapilární elektroforézy, zvláště pak samotný iontový zdroj.

Praktická část se věnuje optimalizaci podmínek pro samotné měření, vývoj a vytvoření částečné validace metody pro stanovení Bitrexu ve vzorcích komerčně dostupných přípravků a také ve vzorcích pančovaného alkoholu. Cílem bylo vytvořit vhodnou a rychlou metodu pro stanovení látky Bitrex kapilární elektroforézou.

Summary

This thesis deals with study of determination of Bitrex by capillary electrophoresis with combination of DAD detector and mass spectrometer.

Most used electromigration techniques as well as capillary electrophoresis with its history and theory are described in theoretical part. This part also contains description of mass spectrometer, its combination with technique of capillary electrophoresis and finally ion source.

Practical part deals with optimization of conditions for measurement and with development and creation of partial validation of method for determination of Bitrex in samples of commercially available drugstore products and in samples of adulterated alcohol. The goal of this thesis was to create appropriate and quick method for determination of Bitrex by capillary electrophoresis.

Obsah

1	Úvod.....	9
2	Teoretická část.....	10
2.1	Kapilární elektroforéza (CE).....	10
2.1.1	Historie	10
2.1.2	Základní instrumentace.....	10
2.1.3	Detekce	11
2.1.4	Teorie elektroforézy	14
2.1.5	Elektroosmotický tok.....	14
2.2	Parametry elektroforetické separace	17
2.2.1	Migrační čas	17
2.2.2	Účinnost.....	17
2.2.3	Selektivita	18
2.2.4	Rozlišení	18
2.3	Módy kapilární elektroforézy.....	19
2.3.1	Kapilární zónová elektroforéza (CZE)	19
2.3.2	Micelární elektrokinetická kapilární chromatografie (MEKC).....	20
2.3.3	Kapilární gelová elektroforéza (CGE).....	20
2.3.4	Kapilární izoelektrická fokusace (CIEF)	20
2.3.5	Kapilární isotachoforéza (CITP)	21
2.4	Hmotnostní spektrometr jako detektor kapilární elektroforézy	21
2.4.1	Trojité kvadrupól	24
2.5	Denatonium benzoát.....	27
3	Experimentální část.....	29
3.1	Instrumentální vybavení	29
3.2	Podmínky CE-DAD	29
3.3	Podmínky CE-ESI-MS/MS	29
3.4	Chemikálie a analyzované vzorky.....	30

4	Výsledky a diskuze.....	32
4.1	Optimalizace podmínek stanovení Bitrexu pomocí CE-DAD	32
4.2	Kalibrace	38
4.3	Reálné vzorky.....	40
4.4	Vzorek alkoholu	41
4.5	Kapilární elektroforéza s hmotnostní spektrometrií v analýze Bitrexu.....	45
4.5.1	Vliv složení pomocné sprejovací kapaliny na intenzitu signálu Bitrexu.....	47
5	Závěr.....	57
6	Citovaná literatura	58
7	Seznam použitých zkratk a symbolů	61

1 Úvod

Když v roce 1958, při rutinní práci na lokálních anestetikách, laboratorní pracovníci poprvé připravili látku denatonium benzoát, určitě nevěděli, jakého úspěchu tím dosáhli. Připravená látka, později pojmenovaná Bitrex, byla neuvěřitelně hořká a proto se rozhodlo, že bude sloužit jako denaturant alkoholu místo do té doby používaného a jedovatého brucinu.

I dnes po padesáti letech stále používáme Bitrex jako denaturant alkoholu, který má zabránit případnému nechtěnému požití nebo odradit od další konzumace. Avšak po nedávné Methanolové aféře, který zasáhla Českou republiku na podzim roku 2012, vyšlo na povrch, že nelegální výrobci alkoholických nápojů používají i alkohol denaturovaný právě Bitrexem. K odstranění Bitrexu z alkoholu jim pak stačí oxidační činidlo, kde v mnoha případech bylo použito Savo. Takto připravený alkohol pak dále ředili, ochucovali a distribuovali do obchodů. I proto je nutné mít určitou analytickou techniku, která by rychle, ale účinně tento pančovaný alkohol odhalila.

Dalším odvětvím, které využívá onu hořkost Bitrexu je výroba drogistického zboží. Dětské šampony, čističe skel, rozmrazovače či nástrahy na hlodavce. Tyto přípravky jsou mnohdy barveny do pastelových barev a tím mohou být velmi lákavé pro malé děti nebo domácí mazlíčky. Pokud však výrobce přidá do svého produktu Bitrex, může tím ochránit mnohé životy.

Pokud bychom chtěli mít metodu schopnou detekce Bitrexu v nízkých koncentracích, můžeme využít metody kapilární nebo plynové chromatografie. Neměli bychom ale zapomínat i na elektromigrační metody. Bitrex tvoří kvartérní amoniový kationt, který by měl být výhodný pro metody separující nabitě částice. Propojení takové metody s hmotnostním spektrometrem může nabídnout vysokou citlivost i rychlost samotné analýzy.

2 Teoretická část

2.1 Kapilární elektroforéza (CE)

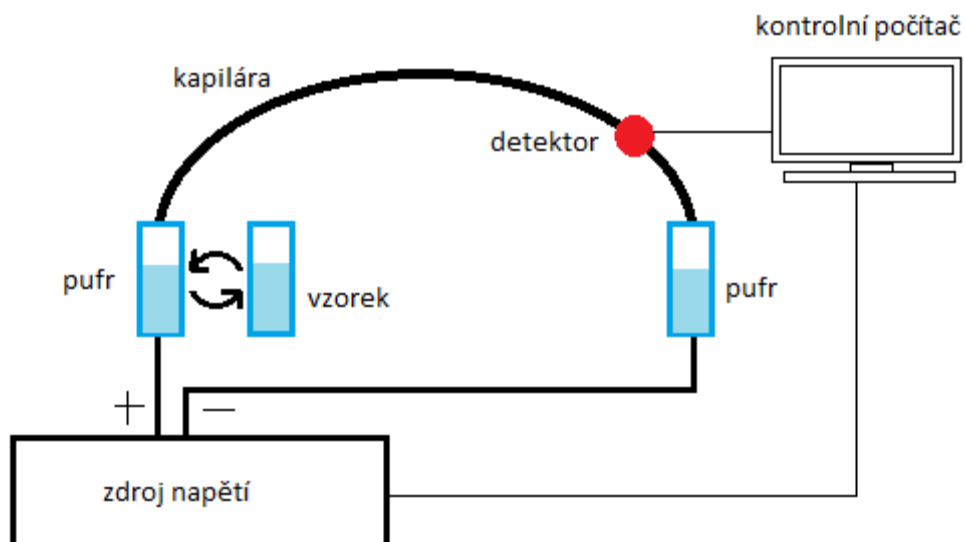
Elektroforézou dnes rozumíme separační metodu, při které dochází k separaci nabitých částic (iontů) díky jejich odlišné pohyblivosti ve stejnosměrném elektrickém poli. Pokud separace probíhá v kapiláře, mluvíme o kapilární elektroforéze. [1]

2.1.1 Historie

Elektroforéza byla poprvé popsána jako separační technika Tiselium v roce 1937, který umístil směs proteinů krevního séra do trubice naplněné roztokem pufru a na vzorek nechal působit elektrické pole. Zjistil, že ionty se pohybují v závislosti na jejich mobilitě a náboji. Za tento objev byl Tiselius oceněn v roce 1948 Nobelovou cenou. Protože separační účinnost takovéto metody je limitována vodivostí a tepelnou difúzí, probíhá tradiční elektroforéza v nevodných médiích. Tím mohou být agarosové gely nebo polyakrylamidové gely umístěné do kapiláry nebo na desce. V případě deskového formátu gelu, který je dnes nejběžnější, je elektroforéza výrazně pomalejší, méně efektivní, těžší pro detekci i automatizaci celého procesu. Toto plošné uspořádání také nedovoluje separovat nízkomolekulární látky, avšak pro separaci vysokomolekulárních látek mají nezastupitelnou roli. První práce s kapilární elektroforézou se datuje do roku 1967, kdy Hjertén použil kapiláru s průměrem 1mm, se kterou otáčel podél podélné osy, aby minimalizoval účinky proudění. Později Virtanen a také Mekkers a Everaerts provedli elektroforézu v kapiláře s vnitřním průměrem přibližně 200 μ m vyrobené ze skla, respektive teflonu. Po roce 1980 se začínají používat také kapiláry z taveného křemene i s vnitřním průřezem méně než 75 μ m. [2-3]

2.1.2 Základní instrumentace

Jednou z velkých výhod kapilární elektroforézy je její instrumentální jednoduchost. Na schematickém obrázku 1. jsou oba konce křemenné kapiláry umístěny do rezervoáru s pufrům. Do nádobek s pufrům jsou navíc zavedeny elektrody (zpravidla platinové), které zajišťují generování elektrického pole v kapiláře.



Obr. 1: Schéma kapilární elektroforézy

Vzorek se dávkuje do kapiláry výměnou jednoho rezervoáru s pufrům za nádobku se vzorkem. Nejčastější je dávkování elektrokinetické, kdy se na několik sekund připojí na elektrody dávkovací napětí v řádu kilovoltů. Během této doby se do kapiláry nasaje malé množství vzorku (jednotky až desítky nI). Nadávkovaný vzorek je pak obohacen o kationty.

Druhým typem dávkování je dávkování hydrodynamické. Kapilára se ponoří do vzorku a tlakem plynu se po uzavření vzorkovací nádoby natlačí několik nI do kapiláry. Potřebného přetlaku lze dosáhnout i zvednutím nádoby se vzorkem nad výstupní nádobku. Při tomto plnění se složení vzorku nemění.

Po nadávkování vzorku a opětovné výměně nádoby se vzorkem za rezervoár pufru může začít samotná separace. Nejčastěji používaným detektorem pro kapilární elektroforézu je v současnosti detektor optický, který může zaznamenat analyty přímo přes stěnu kapiláry.

2.1.3 Detekce

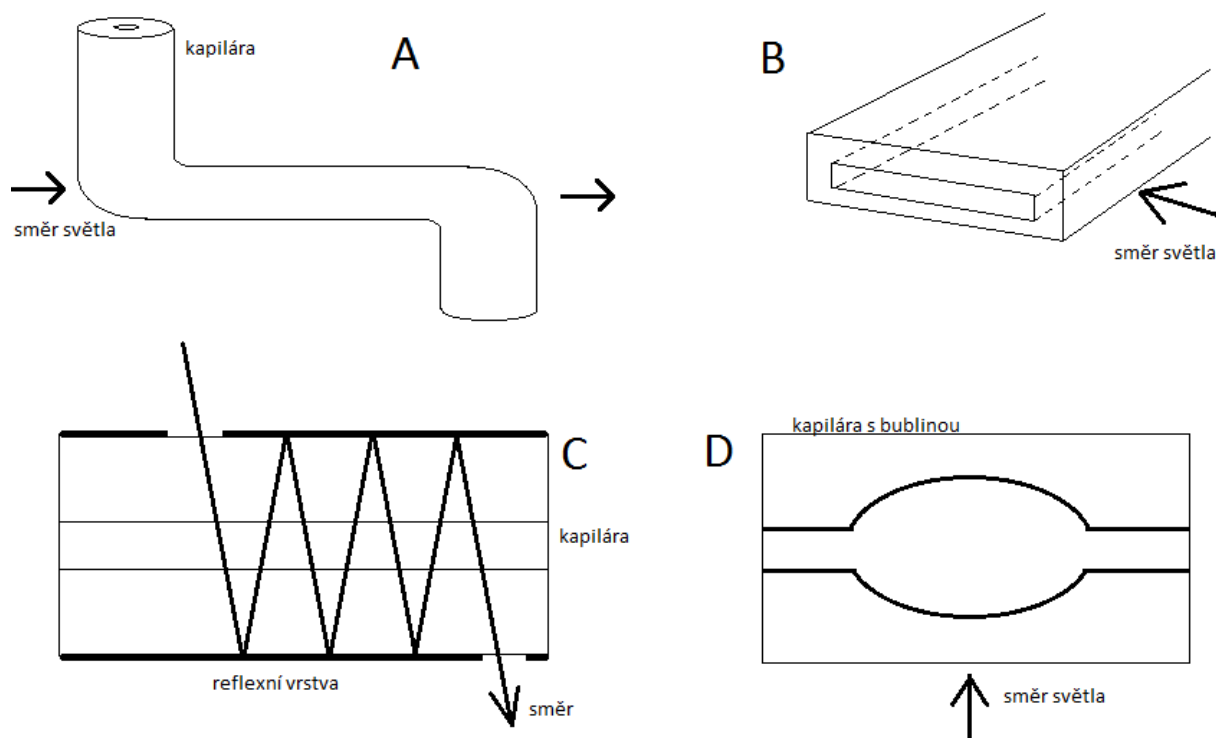
Techniky používané pro detekci v kapilární elektroforéze jsou velmi podobné jako pro HPLC techniky. Metody je možné rozdělit na on-column, kdy je látka detekována přímo v kapiláře a na off-column, kdy je detektor až na konci kapiláry.

2.1.3.1 UV-VIS detektor

Vůbec nejčastěji používaným detektorem pro kapilární elektroforézu je UV-VIS detektor pracující v rozpětí 190 až 800 nm. Je vybaven mřížkou nebo diodovým polem (DAD). Tyto detektory měří absorbanci (A) podle Lambert-Beerova zákona:

$$A = \varepsilon cd \quad (1)$$

podle kterého je absorbance přímo závislá na molárním absorpčním koeficientu (ε), koncentraci látky (c) a také na délce absorpční vrstvy (d), která je v případě klasické kapilární elektroforézy rovna vnitřnímu průřezu kapiláry. Klasické kapiláry z taveného křemene mají vnitřní průměr 25-75 μm , díky tomu je naměřena velmi nízká absorbance. Způsobů jak délku absorpční vrstvy prodloužit existuje dnes již mnoho. Například ohnutí kapiláry do tvaru „Z“ [4], použití ploché kapiláry [5], využití multireflexe [6] nebo využití vypouklé kapiláry do tvaru bubliny [7].



Obr. 2: Různé způsoby prodloužení délky absorpční vrstvy: A „Z“ kapilára, B plochá kapilára, C kapilára s reflexní vrstvou, D kapilára s bublinou

Všechny tyto způsoby sice mnohonásobně vylepší a zvýší absorpční schopnosti, ale na druhou stranu je jejich pořizovací cena příliš vysoká. Navíc z důvodu použití borosilikátového skla jsou pro některé experimenty nevhodné.

2.1.3.2 Fluorescenční detektor

Fluorescenční detektor dosahuje vyšší citlivosti než UV-VIS detektory, jeho linearita je však velmi nízká a pouze ve velmi nízkých koncentracích (10^{-7} - 10^{-9} mol/l). Tyto detektory jsou založeny na principu fluorescence a měření sekundárního záření po absorpci primárního elektromagnetického záření. Konstrukce je velmi podobná jako u UV-VIS s tím rozdílem, že fotonásobič je umístěn kolmo ke zdroji excitačního záření. Jako zdroj se používají rtuťové výbojky, v novějších přístrojích pak lasery, které mají větší intenzitu.

Při měření UV-VIS i fluorescenčním detektorem je možné použít také nepřímou metodu. Ta byla vyvinuta pro látky, které dostatečně neabsorbují světlo (nefluoreskují) [8]. Do pufru použitého pro elektroforézu se v tom případě přidá určité množství světlo pohlcujícího absorbujícího iontu. Když neabsorbující (nefluoreskující) látka migruje detektorem, zaznamenáme pokles absorpce a negativní pík na elektroferogramu. Nepřímá metoda měření je univerzální a použitelná pro všechny ionty.

2.1.3.3 Elektrochemická detekce

Hlavními dvěma metodami elektrochemické detekce jsou amperometrická detekce a měření konduktivity. V případě amperometrické detekce měříme proud vyvolaný průchodem redukované nebo oxidované látky. Měrné elektrody jsou vyráběné ze skelného uhlíku, grafitových vláken, zlata, platiny nebo jiných kovů. Jejich povrch podléhá oxidaci a proto je nutné je čistit mechanicky nebo otočením polarity elektrodového systému. Nejčastěji se měří v tříelektrodovém systému.

Detektory pro měření konduktivity měří změnu elektrické vodivosti roztoku, kterou způsobují ionty procházející mezi dvěma elektrodami se střídavým napětím.

2.1.4 Teorie elektroforézy

Separace v elektroforéze je založena na rozdílech rychlostí pohybu látek v elektrickém poli. Tato rychlost je dána následujícím vztahem:

$$v = \mu_e E \quad (2)$$

podle kterého je rychlost (v) podmíněna právě elektroforetickou mobilitou (μ_e) a intenzitou elektrického pole (E). Elektroforetická mobilita je pro daný iont v daném médiu a teploty konstantní a charakterizuje tak tento iont. Její hodnota je tabelována, avšak tyto hodnoty byly naměřeny v roztocích s jednotkovým stupněm ionizace (α_i), tedy kdy jsou všechny rozpuštěné látky v nabitěm stavu a následně jsou přepočteny pro nekonečné zředění. Experimentálně naměřená mobilita (efektivní) se od teoretické liší, jelikož je vysoce závislá například na pH a teplotě:

$$\mu_{eff} = \alpha_i \mu_e \quad (3)$$

a je stanovena silou elektrického pole (F_E), působící na ionty o náboji q .

$$F_E = qE \quad (4)$$

Proti této síle působí třecí síla, která je přímospměrná poloměru (r) a rychlosti částic (v). Tento vztah popisuje Stokesův zákon, ve kterém je zahrnuta i viskozita rozpouštědla (η).

$$F_F = -6\pi\eta r v \quad (5)$$

Při ustálení se v soustavě obě síly vyrovnají, a dochází ke vzniku rovnováhy mezi oběma silami:

$$qE = -6\pi\eta r v \quad (6)$$

Pro výpočet elektroforetické mobility lze pak použít rovnici:

$$\mu_e = \frac{q}{6\pi\eta r v} \quad (7)$$

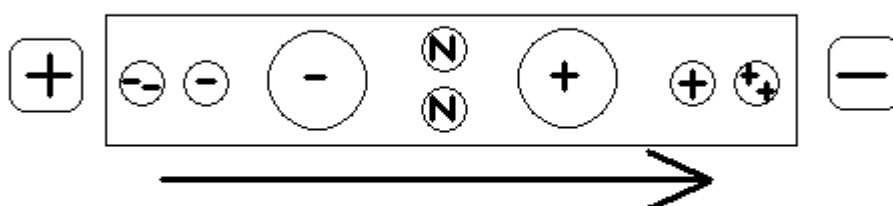
ze které plyne, že menší ionty s větším nábojem mají mobilitu větší, než menší, méně nabitě ionty.

2.1.5 Elektroosmotický tok

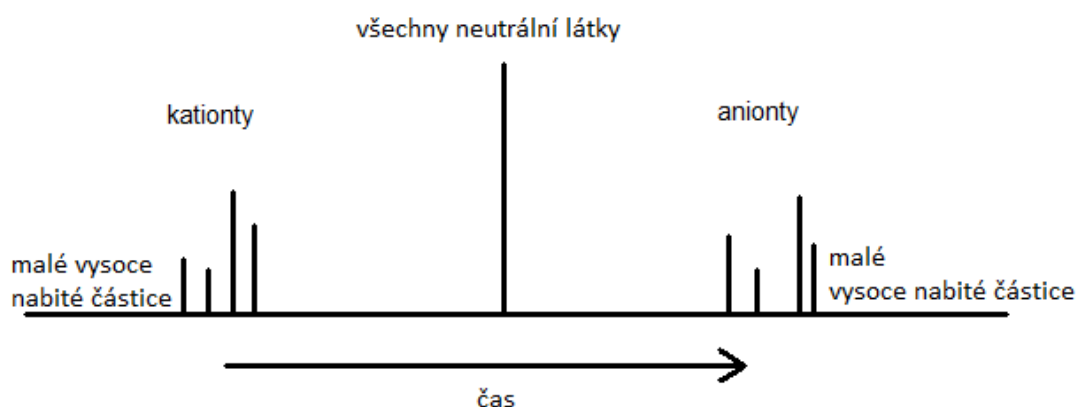
V kapilární elektroforéze se v kapiláře kromě rozpuštěných látek pohybuje pod vlivem působení elektrického pole i samotný pufr. Tento jev se nazývá elektroosmotický tok (EOF).

Za normálních podmínek je směr elektroosmotického toku od kladné k záporně nabitě elektrodě, což znamená, že skrz kapiláru a detektor proudí i samotný pufr.

Nabitě molekuly jsou separovány na základě rozdílných elektroforetických mobilit a mají tendenci migrovat k elektrodě nabitě opačně, než je její náboj. Záporně nabitě molekuly by měly migrovat ke kladně nabitě elektrodě. Síla EOF je však obvykle mnohem větší než samotné mobility jednotlivých iontů a proto jsou unášeny směrem k detektoru. EOF je tak silný, že dokáže odnést k negativní elektrodě směrem do detektoru i malé, trojnásobně nabitě ionty [9]. Naopak kladně nabitě ionty, které jsou přitahovány katodou, jsou silou EOF ještě urychlovány. Rozpuštěné látky, které nemají žádný náboj a tudíž ani žádnou mobilitu, se pohybují v kapiláře stejnou rychlostí jako samotný EOF. To znamená, že látky procházejí kapilárou v pořadí kationy, neutrální látky, aniony. (Obr. 3) Nabitě molekuly se navíc rozdělí díky svým rozdílným elektroforetickým mobilitám. Neutrální látky zůstávají nerozděleny, ale jsou odděleny od nabitých látek. (Obr. 4)



Obr. 3: Zastoupení neutrálních (N), kladně (+) a záporně (-) nabitých částic v kapiláře vlivem EOF a elektroforetických mobilit



Obr. 4: Schematické znázornění elektroferogramu s působením EOF a elektroforetických mobilit

Elektroosmotický tok vzniká vlivem pufrů s pH větším než 2, při kterém ionizují silanolové skupiny (Si-OH) na stěnách křemenných kapilár. Negativně nabitě silanolové skupiny (Si-O⁻) přitahují kladně nabitě ionty z pufru a vytvářejí tak vnitřní, kladně nabitou vrstvu kapiláry. Tyto kationty tvoří fixní nepohyblivou (Sternovu) vrstvu, se kterou mohou reagovat negativně nabitě ionty. Anionty jsou jen zpomaleny, ne však úplně poutány. Vytváří proto mobilní vrstvu. Tyto dvě vrstvy společně tvoří difuzní dvojvrstvu.

Elektroosmotický tok má v porovnání s laminárním tokem v HPLC relativně úzký profil. Díky tření je průtok kapaliny při stěně kapiláry pomalejší, než ve zbytku kapiláry. Toto tření je však zanedbatelné, protože oblast v blízkosti stěny je poměrně malá. Výhoda plochého průtokového profilu je, že na všechny molekuly rozpuštěné látky působí stejná složka rychlosti způsobená EOF bez ohledu na jejich polohu v profilu kapiláry a vycházejí tak jako úzké pásy odpovídající úzkým píkům s vysokou účinností.

Rychlost EOF je možné změnou různých parametrů změnit. Například zvýšením intenzity elektrického pole je zvýšen EOF, tím pádem je zkrácena doba analýzy [10]. Zvýšením pH, stejně tak jako zvýšením teploty, lze zvýšit disociaci silanolových skupin a tím zrychlit elektroosmotický tok. Hlavní výhodou EOF je separace všech nabitých látek ve vzorku, jak

kladných tak záporných, v jediném experimentu. V některých případech je však třeba EOF částečně potlačit nebo úplně zastavit. Příliš rychlý EOF může urychlit průchod vzorku do takové míry, že neproběhne dostatečná separace jednotlivých iontů. Pro jiné případy je možné směr EOF úplně obrátit a to přidáním například kvartérního aminu do pufru.

2.2 Parametry elektroforetické separace

Mezi parametry elektroforetické separace počítáme migrační čas, účinnost, selektivitu a rozlišení. Každý z těchto parametrů je ovlivňován jedním nebo více faktory a samotným nastavením experimentu.

2.2.1 Migrační čas

Migrační čas (t_m) je doba, kterou iont potřebuje pro migraci efektivní délkou kapiláry (l) a je dán poměrem této délky a rychlosti iontu.

$$t_m = \frac{l}{v} = \frac{lL}{t_m U} \quad (8)$$

Pro migrační čas je také důležitá celková délka kapiláry (L), stejně tak jako vložené napětí (U), které se většinou pohybuje v rozpětí 0 – 30 kV. Jak je vidět z rovnice (8), vyšší napětí, kratší kapilára a tím vyšší elektroosmotický tok poskytují menší migrační časy a tím i kratší doby analýzy. Při velmi krátkých analýzách však může docházet ke zhoršení rozlišení [11].

2.2.2 Účinnost

Účinnost (N) je vyjádřena jako počet teoretických pater, vypočtených z poměru migračního času a šířky píku při jeho základně (w) nebo v jeho polovině ($w_{1/2}$):

$$N = 16 \left(\frac{t_m}{w} \right)^2 = 5,54 \left(\frac{t_m}{w_{1/2}} \right)^2 \quad (9)$$

to znamená, že užší píky a delší migrační časy zajišťují vyšší účinnost.

V kapilární elektroforéze se zóny příliš nerozšiřují, protože se pohybují kapilárou jako ucpávky. Tím se liší od HPLC, kde se zóny rozpuštěné látky pohybem pod vlivem laminárního toku v koloně rozšiřují a detekujeme širší, rozmyté píky.

Rozsah, jakým se zóna rozmývá, je dán rozptylem (σ^2), což je hodnota udávající, jak moc se nekonečně tenká zóna bude rozšiřovat v průběhu času (t):

$$\sigma^2 = 2Dt \quad (10)$$

kde D je difúzní koeficient rozpuštěné látky. Za předpokladu, že by bylo všechno Joulovo teplo odváděno, byly by použity malé objemy nástřiku, adsorpce vzorku na stěnu kapiláry by neprobíhala a zóny by nebyly rozšiřovány radiální difúzí, mohla by být rovnice použita pro výpočet rozšiřování zón.

2.2.3 Selektivita

Selektivita (α) udává, jak daleko od sebe budou dvě sousedící rozpuštěné látky při průchodu detektorem, to znamená vzdálenost vrcholů sousedících píků na elektroferogramu. Selektivita se vypočítá podobně jako v HPLC:

$$\alpha = \frac{t_2}{t_1} \quad (11)$$

kde t_2 a t_1 označují migrační časy dvou sousedních píků (t_2 je čas později eluujícího píku). Účinnost lze určit také podílem jednotlivých elektroforetických mobilit (μ_1, μ_2):

$$\alpha = \frac{\mu_1}{\mu_2} \quad (12)$$

Nejsnadnější a nejefektivnější způsob ovlivnění selektivity je změna pH pufru použitého pro separaci. [12]

2.2.4 Rozlišení

Nejdůležitějším parametrem separace je rozlišení, které označuje, jak dobře jsou jednotlivé komponenty ze směsi separovány. Rozlišení (R) může být vypočítáno z elektroferogramu pomocí rovnice:

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

kde w_1 a w_2 jsou šířky dvou sousedních píků. Pro dostatečné rozlišení jsou vhodné velké rozdíly v elektroforetických mobilitách jednotlivých látek. Většího rozlišení lze dosáhnout také zvýšením použitého napětí, prodloužením délky kapiláry nebo optimalizací elektroosmotického toku. Také změnou složení pufru a jeho pH lze snadno dosáhnout kvalitnějšího rozlišení. Nejčastěji se za úspěšnou separaci považují experimenty s dosaženým rozlišením 1,5 a vyšším.

2.3 Módy kapilární elektroforézy

Stejně jako má HPLC různé režimy, má kapilární elektroforéza různé módy. Ty nejčastěji používané jsou popsány níže. V mnoha případech může být použit pouze jediný, který poskytne určitou separaci, zatímco v jiných případech mohou být vzorky separovány dvěma nebo více technikami. Oproti HPLC, kde změna módu znamená většinou výměnu kolony i mobilní fáze, stačí v případě kapilární elektroforézy pozměnit složení pufru. Kapilára z taveného křemene může být použita pro více módů. Například ke změně z CZE na MEKC stačí pouze do pufru přidat tenzid.

2.3.1 Kapilární zónová elektroforéza (CZE)

CZE je nejpoužívanější elektroforetická technika, protože relativně snadno dosáhneme separace aniontů i kationtů (i když ne neutrálních látek) v jediné analýze. V CZE je kapilára naplněna pufrům konstantního složení. Po injektování vzorku do takto naplněné kapiláry a vložení napětí je vzorek separován vlivem mobilit jednotlivých analytů i účinkem EOF do jednotlivých zón. Neutrální látky separovány nejsou. Technika CZE může být použita pro separaci téměř všech nabitých částic, které jsou rozpustné v pufru. Mohou to být malé anorganické ionty i velké biomolekuly. Při použití nevodných pufrů můžeme separovat i ve vodě nerozpustné látky. [13-17]

2.3.2 Micelární elektrokinetická kapilární chromatografie (MEKC)

Hlavním úkolem MEKC je, kromě klasické separace iontů, také separace neutrálních nebo vysoce hydrofobních látek. Metoda využívá solvatace těchto látek v micelách, které vzniknou v pufru po přidání povrchově aktivní látky. Těmito látkami jsou tenzidy, nejčastěji pak dodecylsírany sodný (SDS), které ve vodném prostředí tlumivého roztoku po překročení kritické micelární koncentrace začnou tvořit micely. Micely jsou zpravidla kulového tvaru, kdy hydrofobní část tenzidu je vně micely a hydrofobní část molekuly je otočena do středu micely, pryč od vodného prostředí pufru. Nadávkováním hydrofobního analytu do pufru obsahujícího micely se budou hydrofobní molekuly snažit dostat do hydrofobní dutiny micel. Disociované skupiny na povrchu micel způsobují povrchový náboj micel a po vložení napětí mohou všechny micely migrovat stejnou rychlostí. Analyty se podle své polaritě dělí mezi vodnou a micelární fázi a tím vzniká separace. I zde však musíme počítat se silou EOF.

2.3.3 Kapilární gelová elektroforéza (CGE)

CGE kombinuje principy plošné gelové elektroforézy a prvky používané v CZE jako je úzký průměr kapiláry. V kapilárách dochází k lepšímu rozptýlení tepla než v plošné vrstvě gelu, a možnost využití vyšší intenzity elektrického pole poskytuje rychlejší separace, je rychlejší a dosahuje vyšší účinnosti. Výhodou oproti plošné variantě elektroforézy je také možnost on-line detekce. V CGE je kapilára plněna gelem (nejčastěji polyakrylamidem), látky jsou pak separovány pouze na základě velikosti jejich molekul, ne jejich poměru náboje k velikosti, jako u klasické CZE. Gel tak plní funkci molekulového síta. CGE je nejvhodnější pro separaci vysokomolekulárních biologicky aktivních látek, jako jsou peptidy, bílkoviny, polynukleotidy nebo fragmenty DNA.

2.3.4 Kapilární izoelektrická fokusace (CIEF)

Technika CIEF se používá k separaci proteinů a peptidů na základě jejich isoelektrického bodu (pI). Kapilára je naplněna roztokem amfolytů a proteinů, které po připojení elektrického pole vytvoří v kapiláře lineární gradient pH. Konce kapiláry jsou ponořeny do nádobek s katolytem s katodou a anolytem s anodou. Analyty migrují podle náboje do svého isoelektrického bodu ($pH = pI$), kde se zastaví a fokusují. Poté je celý objem kapiláry

i s fokusovanými zónami mobilizován směrem k detektoru. Jednou z metod mobilizace je hydrodynamický tok [18]. Mnohem častěji se však využívá elektroforetická mobilizace, založena na výměně anolytu a katolytu. Po zavedení napětí začnou hydroxylové ionty migrovat k anodě a začnou posouvat gradient pH i zóny fokusovaných analytů, které tak vytlačí až k detektoru, kde jsou postupně zaznamenány. Tuto metodu je možné použít také v kapiláře plněné gelem. Vždy je však nutné eliminovat EOF, například pokrytím vnitřního povrchu kapiláry vrstvičkou hydroxyethylcelulosity.

2.3.5 Kapilární isotachoforéza (CITP)

Kapilární elektroforéza vyžaduje na rozdíl od ostatních technik použití dvou pufrů – vedoucí a koncový. Vedoucí elektrolyt obsahuje koiont stejného znaménka jako analyty a velkou elektroforetickou pohyblivost. Naopak koncový tlumivý roztok obsahuje koiont také se stejným znaménkem, ale s malou pohyblivostí. Při nadávkování vzorku mezi tyto dva pufrы vzniknou zóny jednotlivých analytů s ostře ohraničenými hranicemi, které na sebe navazují. Zóny jsou seřazeny podle elektroforetických mobilit jednotlivých analytů v nich obsažených. CITP má navíc schopnost samozaostřování, což znamená, že při přechodu částice do jiné zóny, například difúzí, je iont ihned zpomalen či urychlen díky vlivu rozdílné intenzity elektrického pole v jednotlivých zónách. Díky tomu jsou zóny velmi striktně odděleny a technika se často používá jako technika prekoncentrační. V jednom měření je možné separovat buď kationty nebo anionty, vždy je však nutné eliminovat EOF vrstvou hydroxyethylcelulosity nebo použít kapiláru z PTFE.

2.4 Hmotnostní spektrometr jako detektor kapilární elektroforézy

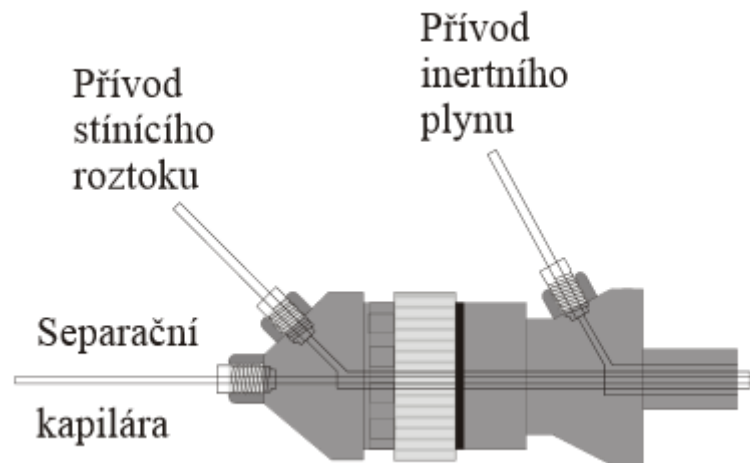
Hmotnostní spektrometr (MS) má oproti jiným detekčním technikám používaným pro kapilární elektroforézu několik výhod. Má relativně dobrou senzitivitu, funguje jako univerzální detektor, ale může být i velmi selektivní. Navíc spojení těchto dvou technik přináší další klady a jednotlivé techniky navzájem kompenzují svá omezení. Například látky stejné molekulové hmotnosti, které nelze rozlišit pomocí MS, se rozseparují pomocí techniky CE a až poté jsou detekovány MS. Také v opačném případě, kdy látky, které eluují ve stejný čas, mohou být detekovány a rozlišeny MS.

Další výhodou spojení hmotnostního spektrometru s CE oproti klasické HPLC je nízký průtok. Ten u HPLC dosahuje okolo 1 ml/min a musí být před přímým spojením s MS dělen. U kapilární elektroforézy, kde se průtok pohybuje okolo 1 μ l/min, může být použito přímé spojení s vakuovým systémem MS. Pokud je tento průtok nedostačující, používají se tzv. stínící roztoky (roztoky těkavé soli a vhodného organického rozpouštědla), musíme se však vyhybat aditivům, které by mohly snížit citlivost MS nebo kontaminovat iontový zdroj.

Jako nejvhodnější pro spojení těchto dvou technik se zdá být metoda ionizace elektrosprejem (ESI). Kapilára tak může být v některých případech spojena přímo s iontovým zdrojem ESI, které je vhodné pro ionizaci polárních látek a nabitých částic. Obě techniky tedy separují nabitě částice, používají na to ovšem jiné principy.

Jako nevýhoda jejich spojení může být použití elektrického pole oběma technikami současně. I když obě techniky pro svou činnost elektrické pole využívají a potřebují, je zde velký rozdíl v použitých řádech napětí. Jelikož je samotná křemenná kapilára sprejovací špičkou elektrospreje, je nutné na ni vložit napětí nutné pro separaci a také samostatné napětí potřebné pro ESI. Další obtíž přináší nutnost využití vysokého vakua v prostředí MS, zatímco separace v CE probíhá za normálního tlaku.

Špička elektrospreje se většinou skládá ze soustavy tří koncentrických kapilár. Vnitřní je vlastní separační kapilára CE, která je upevněna v kapiláře pro přívod stínícího roztoku, vně je kovová kapilára přivádějící interní plyn (nejčastěji dusík), jež je spojena přes redukční ventil se zásobní tlakovou nádobou. Stabilní přívod stínící kapaliny je zajištěn nejčastěji lineárním dávkovačem s mikrostříkačkou nebo chromatografickou pumpou s děličem. Zemnicí elektroforetická elektroda je ponořena do zásobní nádoby se stínící kapalinou, v případě použití mikrostříkačky tuto elektrodu tvoří přímo její kovový hrot. Stínící roztok bohužel naředí roztok vzorku a tím snižuje citlivost detekce MS. [19]



Obr. 5: Spojení CE s ESI [19]

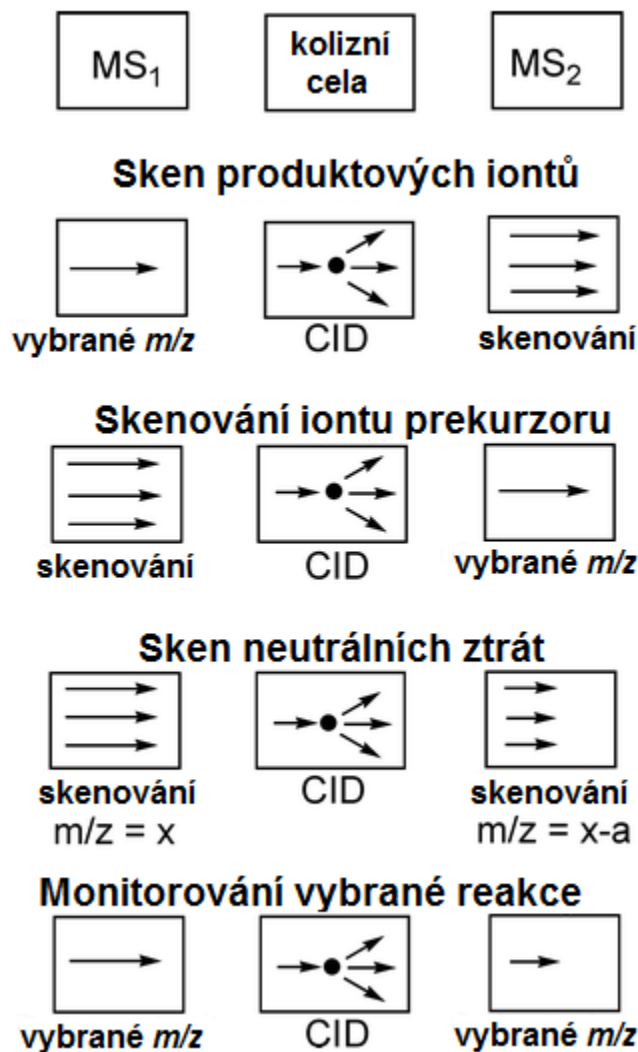
U špičky kapiláry se vytvoří Taylorův kužel, jehož povrch tvoří kladné nebo záporné částice nabité vlivem vysokého gradientu elektrického pole. Z kužele jsou postupně odtrhávány kapičky, které se dalším odpařováním rozpouštědla zmenšují, a na jejich povrchu začne převládat náboj, který v určitém okamžiku začne být silnější než povrchový náboj kapky (Rayleighova mez stability) a kapka „exploduje“ a vznikne mnoho menších stabilnějších kapek. Tento děj se opakuje až do vzniku protonizovaných molekul $[M+H]^+$, v případě otočeného elektrického pole detekujeme deprotonované molekulární ionty $[M-H]^-$. V ESI mohou vznikat také vícenásobně nabitě ionty $[M+z.H]^{z+}$, díky čemuž je touto technikou možné zaznamenávat také makromolekuly.

Vzniklé ionty jsou poté vtahovány do vakuového prostoru MS analyzátoru, kde dochází k jejich dělení. Nejběžněji používaným analyzátozem je kvadrupól (Q). Oproti jiným zařízením je kvadrupól kompaktní velikosti a ne příliš vysoké ceny. Srdcem přístroje jsou čtyři paralelně umístěné válcové tyče, které fungují jako elektrody. Dvě protilehlé tyče jsou vždy spojeny a napojeny na zdroj stejnosměrného napětí. Navíc je na oba páry připojeno vysokofrekvenční střídavé napětí. Ionty jsou zde urychlovány při průletu mezi tyčemi rozdílem potenciálu 5 – 10 V. Všechny ionty, mimo těch s přesně vymezeným poměrem hmotnosti k náboji (m/z), narazí do tyčí nebo vyletí z jejich dosahu. Pouze ionty vybraného m/z proletí kvadrupólem až k detektoru, kde mohou být zaznamenány.

2.4.1 Trojitý kvadrupól

Velkou výhodou kvadrupólu je možnost zapojit více těchto přístrojů za sebou a získat tak tandemový hmotnostní spektrometr (MS^n). Trojitý kvadrupól (QqQ) je jediným zástupcem první generace tandemových analyzátorů, který je stále komerčně dostupný. Ostatní rané tandemové přístroje používaly jako analyzátory magnetické sektory. I přesto je QqQ stále nejčastěji používaným tandemovým hmotnostním spektrometrickým systémem. Pokud jde o analytické využití, je trojitý kvadrupól nesprávné označení, protože látky mohou snímat pouze dva vnější kvadrupóly (Q1 a Q2). Prostřední kvadrupól (q2) nemá analytickou funkci, ale plní funkci kolizní cely, pro ionty opouštějící Q1 a dochází zde ke kolizně indukované disociaci (CID). Na tyče q2 se vkládá pouze vysokofrekvenční napětí, aby zachytilo fragmenty iontů vzniklé při kolizích a předaly je dále do Q3 bez jejich separace. Kolizní cely tak vlastně ani nemusí být kvadrupóly, ale pouze komora, ve které kolize mezi částicemi vyvolává fragmentaci analyzovaných iontů.

Kvadrupól je analyzátor, který má limitovanou citlivost pro sběr plného spektra, ale je také vysoce citlivý, pokud zaznamenává pouze jednu hodnotu m/z . Použití dvou analyzátorů, kdy je možné každý použít buď pro sken celého hmotnostního spektra nebo pouze vymezené hodnoty m/z , nám dává více možností spojení, v čemž spočívá univerzálnost trojitých kvadrupólů. Možné kombinace těchto nastavení dovolují několik módů sběru dat, které dovolují provádět významně odlišné způsoby analýzy.



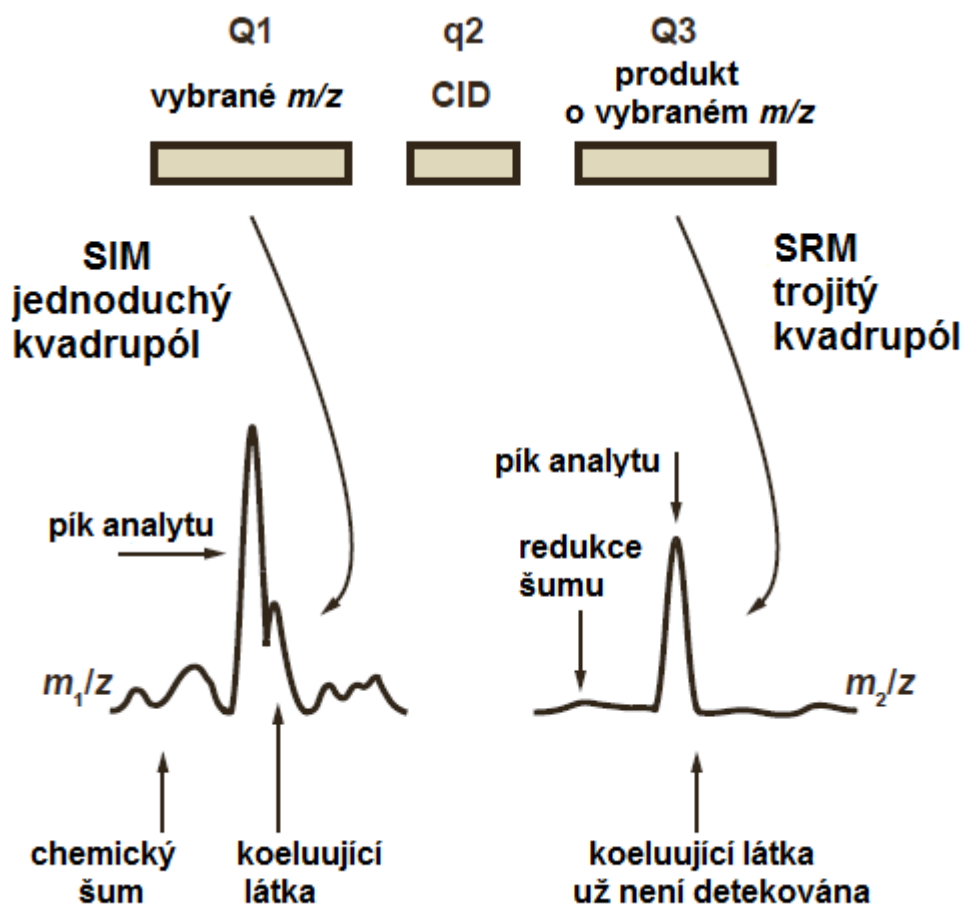
Obr. 6: Schéma skenovacích módů trojitého kvadrupólu (převzato a upraveno) [20]

Jedním z těchto módů je sken produktových iontů, kdy se v Q1 vyberou ionty o určitém m/z , které dále v kolizní cele q2 podstupují CID interakcí s neutrálními atomy nebo molekulami reakčního plynu, nejčastěji dusík či argonu. Takto vzniklé produktové ionty v q2 jsou analyzovány na základě jejich m/z v Q3. Jedná se o nejčastěji používaný mód, díky kterému se dají získat informace o struktuře neznámé látky.

V módu skenování iontu prekurzoru provede Q1 celkový sken, v q2 opět proběhne CID a v Q3 se vybere pouze iont o určitém m/z . Spektrum je získáno z prekurzorů iontů, které se oddělily od specifického produktu. Tento mód je používán pro identifikaci složek ze směsi obsahující látky s určitou funkční skupinu, kterou je možno odštěpit fragmentací v q2.

Mód neutrálních ztrát, kdy Q1 i Q3 skenují stejný rozsah m/z , ale skeny se od sebe liší o hodnoty m/z , odpovídající ztrátě některých neutrálních molekul při procesu CID v q2. Těmito neutrálními ztrátami mohou být například molekuly vody nebo oxidu uhličitého.

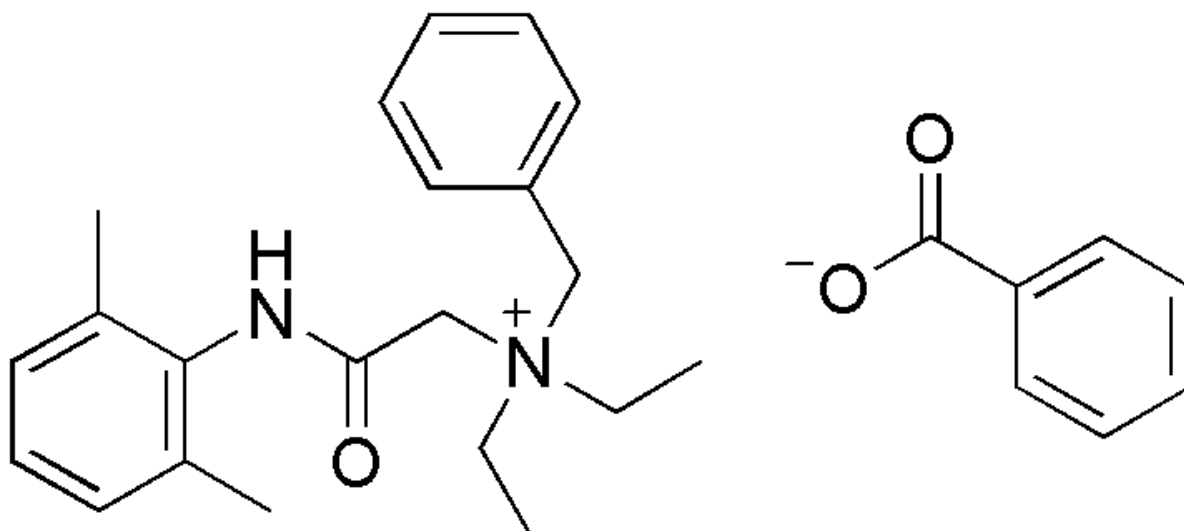
Dalším módem QqQ je mód monitorování vybrané reakce (selected reaction monitoring SRM). Q1 je nastaven na průchod pouze jedné hodnoty m/z , která odpovídá analytu. Ionty vycházející z Q1 podstoupí CID v q2, ze které se vybere pouze specifický produkt v Q3. SRM je obdobná metoda jako monitorování vybraného iontu (SIM) při použití přístrojů s jedním analyzátozem. I přes to, že je část iontů ztracena při procesu CID v q2, SRM poskytuje lepší poměry signál/šum. Toto zlepšení nastává v důsledku malé pravděpodobnosti, že látky, které jsou odpovědné za šum, budou mít stejné produkty vlivem CID jako analyt a nejsou tak propuštěny přes Q3. Sníží se chemický šum a odstraní koeluující látky. [21][22]



Obr. 7: Porovnání výsledků jednoduchého kvadrupólu a trojitého kvadrupólu

2.5 Denatonium benzoát

Denatonium benzoát (IUPAC: phenylmethyl-[2- [(2,6-dimethylphenyl)amino]- 2-oxoethyl]-diethylammonium benzoát) je bílá krystalická látka bez zápachu, známá také pod obchodním názvem Bitrex. Poprvé byla připravena v roce 1958 ve firmě Macfarlan Smith Limited v Edinburgu ve Skotsku. Jde o nejvíce hořkou látku na světě, která je díky tomu zapsaná i v Guinnessově knize rekordů.



Obr. 8: Strukturální vzorec denatonium benzoátu [23]

První použití Bitrexu jako aktivní averzní přísady bylo zaznamenáno jako přísada v masti používané dánskými chovateli prasat, kteří jí potírali ocásky svých malých vepřů, aby jim zabránili ve vzájemném okusování.

Dnes se Bitrex používá jako denaturant alkoholu, olejů, pleťových vod, parfémů a mnoha dalších potencionálně toxických věcí, aby znepríjemnil chuť a tím odradil děti nebo domácí zvířata od jejich konzumace. Výrobky obsahující Bitrex jsou dostupné v 66 zemích světa hlavně díky velkým světovým značkám jako je Gillette, Avon nebo Tesco. Na většině komerčně dostupných produktů ošetřených Bitrexem můžeme najít znak (Obr. 9), podle kterého spotřebitel ihned pozná zdali Bitrex skutečně obsahuje.



Obr. 9: Znak na produktech obsahujících Bitrex

Podle české legislativy a Zákona o lihu je třeba 20 mg Bitrexu k denaturaci 1 l ethanolu kvasného hydrogenačně rafinovaného, nebo 10 mg na 1 l pokud jde o líh syntetický. Pokud je denaturačním prostředkem směs methylethylketonu, methylenová modři, thiofenu a Bitrexu je potřeba použít nejméně 10 mg Bitrexu. [22-35]

Ve většině dnes uváděných prací v odborných časopisech se Bitrex stanovuje za pomoci HPLC metod. Například studie z Oregonské státní univerzity, která si dala za úkol validovat metodu pro měření koncentrace Bitrexu ve spotřebním zboží jako jsou nemrznoucí směsi a čističe oken. Byly naměřeny hodnoty v širokém rozpětí, pod mezí detekce (1,25 ppm) až nad 30 ppm. Dobrou zprávou je také, že koncentrace Bitrexu se v přípravcích nezměnila ani po šestiměsíčním uskladnění při pokojové teplotě. [36]

Metoda popsaná Faulknerem a DeMontignym pro detekci denatonium benzoátu v ethanolu s 5% polyvinylpyrrolidonu využívá také techniku HPLC ovšem iontově párovou metodou. Jako detektor použili UV spektrofotometr (210 nm). Vysoké výtěžky (i přes 98%) jsou však získávány měřením, které každé jednotlivé trvá 20 minut. [37]

Jakákoli nová metoda pro zjištění přítomnosti Bitrexu a jeho koncentraci může být přínosem jak pro forezní tak i pro klinickou chemii. V těchto případech pak bude hrát prim čas a rychlost s jakou nám látku podaří identifikovat, ale také přesnost samotného měření.

3 Experimentální část

3.1 Instrumentální vybavení

Pro všechny separace byl použit systém kapilární elektroforézy od firmy Agilent série 7100, vybavený DAD detektorem pracujícím v rozmezí 190 - 600 nm, spojeným s hmotnostním spektrometrem Agilent 6460 s trojitým kvadrupólem (QqQ). Stínící kapalina pro elektrospej byla přiváděna pomocí isokratické pumpy kapalinového chromatografu Agilent 1260 vybaveného děličem toku 1:100.

3.2 Podmínky CE-DAD

Při použití DAD detektoru byla použita neupravená kapilára z taveného křemene o délce 33 cm (efektivní délka 24,5 cm) o vnitřním průměru 50 μm (Microsolv Technology, Eatontown, NJ, USA). Separační napětí bylo +15kV. Vzorek byl elektrokineticky injektován 10 s napětím 10kV. Vlnová délka pro detekci byla nastavena na 200 nm. Před prvním použitím byla kapilára promyta 1M NaOH 15 min, poté 15 min deionizovanou vodou a nakonec separačním pufrem 30 min. Před každým dalším měřením byla kapilára promyta 3 minuty separačním pufrem. Na začátku každého dne byla kapilára promývána 1M NaOH, deionizovanou vodou a také separačním pufrem - každým 10 minut. Všechna měření byla provedena třikrát, pokud není uvedeno jinak.

3.3 Podmínky CE-ESI-MS/MS

Pokusy se zapojením CE-ESI-MS/MS byla prováděny s neupravenou kapilárou z taveného křemene o celkové délce 90 cm a 50 μm vnitřního průměru, jejíž začátek (zhruba 75% celkové délky) byl uzavřen v termostatové kazetě nastavené na 25°C. Zbytek kapiláry byl vyveden ven a konec byl připojen k iontovému zdroji (ESI). Dávání bylo uskutečněno hydrodynamicky tlakem 100 mbar po dobu 10 s. Separační napětí bylo +25 kV.

Pro potřeby MS byly parametry optimalizovány následovně: stínící kapalina se skládala ze směsi methanolu, vody a kyseliny mravenčí v poměru 50:49,5:0,5 (v/v/v) a její průtok byl nastaven na 0,4 $\mu\text{l}/\text{min}$. Sprejovací napětí bylo +4 kV, teplota zmlžujícího plynu (N_2) byla

nastavena na 200°C při průtoku 10 l/min a tlaku 5 psi. Všechna měření byla provedena třikrát pokud není uvedeno jinak.

Detekce probíhala jak v SIM módu, kdy byl detekován kladně nabitý molekulární ion $[M]^+$ (denatonium) při $m/z = 325.3$. Dále bylo měření prováděno i v SRM módu, kdy byl monitorován nejintenzivnější fragment při poměru $m/z = 233.1$.

3.4 Chemikálie a analyzované vzorky

Pro všechny analyzované vzorky byl použit amonný pufr kyseliny octové o koncentraci 50 mM a pH 10. Postup přípravy tohoto pufru byl následovný: pro výrobu 50 ml pufru bylo napipetováno 143 μ l kyseliny octové a doplněno po rysku 50 ml odměrné baňky. Takto připravený a promíchaný roztok se kvantitativně přelil do kádinky, ve které se titroval 1 M hydroxidem amonným až na pH 10.

Mezi analyzované látky byly zařazeny komerčně dostupné přípravky, které podle složení uvedeného na obalu měly obsahovat Bitrex. Do výběru se tak dostaly (Obr. 10):

Denkmit nature čistič na sklo, 750 ml

Denkmit čistící gel WC nature, 750 ml

Ratimor granule, 200 g

Bayer tekutá nástraha proti mravencům, 4 g

FA dětský sprchový gel a šampon, 250 ml.

Kromě těchto komerčně dostupných přípravků analyzován také skutečný vzorek 40 % pančovaného alkoholu denaturovaný přísadkou Bitrexu.



Obr. 10: Fotografie komerčně dostupných přípravků obsahující Bitrex [38 - 41]

4 Výsledky a diskuze

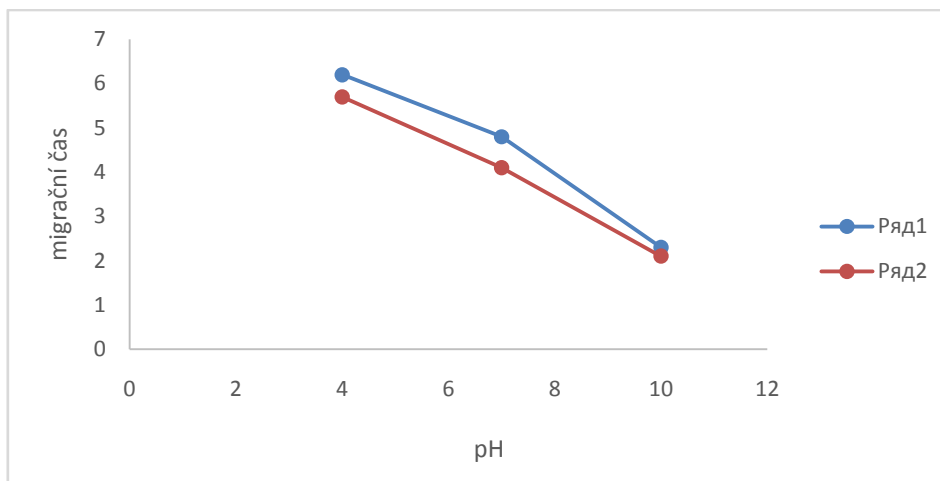
4.1 Optimalizace podmínek stanovení Bitrexu pomocí CE-DAD

Ze struktury Bitrexu (Obr. 8) vyplývá, že je Bitrex tvořen kvarterním amoniovým kationtem a benzoátem. Pro prokázání přítomnosti Bitrexu v alkoholických nápojích je nutné identifikovat a následně stanovit množství kvarterního amoniového kationtu. Jak bylo diskutováno v teoretické části diplomové práce, kapilární zónová elektroforéza je vhodná instrumentální technika právě pro separaci nabitých molekul. Ve vodném prostředí jsou kvarterní amoniové kationty kladně nabitě v celém rozmezí pH, je tedy možné pro jejich separaci využít pracovního elektrolytu o téměř libovolném pH. Na druhou stranu kvarterní amoniové kationty podléhají sorpci na stěnu křemenné kapiláry, takže pro dosažení rychlé separace je nutné nalézt vhodné složení pracovního elektrolytu, vhodné pH a také koncentraci složek pracovního elektrolytu. Dalším kritériem při optimalizaci podmínek byl předpoklad, že vyvinutá metoda CE-DAD separace Bitrexu bude použita i pro účely CE-MS. Z tohoto důvodu, byla optimalizace podmínek separace uskutečněna pro těkavé pracovní elektrolyt na bázi octanu a formiátu amonného.

Studovány byly následující pracovní elektrolyty:

50 mM octan amonný pH 4.0; 50 mM octan amonný pH 7.0; 50 mM octan amonný pH 10.0 a dále 50 mM mravenčan amonný pH 4.0; 50 mM mravenčan amonný pH 7.0 a 50 mM mravenčan amonný pH 10.0. Ostatní podmínky pro analýzy byly shodné s podmínkami uvedenými v kapitole 3.2.

Na obr. 11 je uveden závislost migračního času Bitrexu na pH pro elektrolyty na bázi 50 mM octanu amonného a 50 mM mravenčanu amonného.



Obr. 11: Závislost migračního času kationtu Bitrexu na pH pracovního elektrolytu pro elektrolyty na bázi 50 mM acetátu amonného a 50 mM mravenčanu amonného. Řady 1 odpovídají 50 mM acetátu amonnému pH 10.0; řady 2 jsou pro 50 mM mravenčan amonný pH 10.0.

Z obr.11 plyne, že pro oba pracovní elektrolyty dochází ke snižování migračního času, což je způsobeno zvýšením mobility elektroosmotického toku, který má v tomto případě shodný směr s migrací kationtu Bitrexu. Dále byl studován vliv složení a pH pro uvedené pracovní elektrolyty na symetrii a účinnost píku kationtu Bitrexu.

Pro výpočet symetrie S a výpočet účinnosti píku vyjádřené jako počet teoretických pater N byly použity následující vztahy:

$$S = \frac{a}{2b} \quad (14)$$

kde

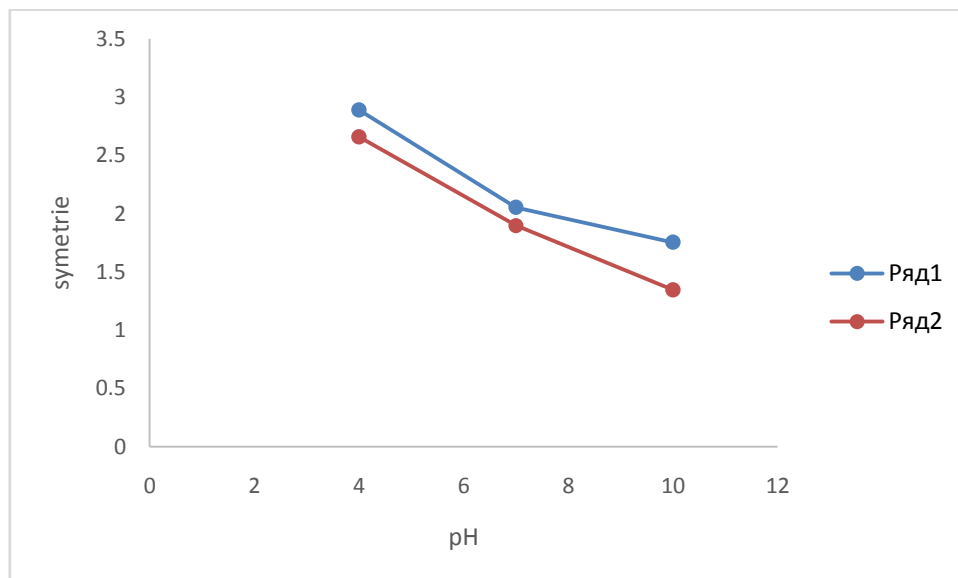
a ... šířka píku v 10% jeho výšky

b ... je vzdálenost mezi kolmicí spuštěnou z vrcholu píku a vzestupnou částí píku v 10% jeho výšky.

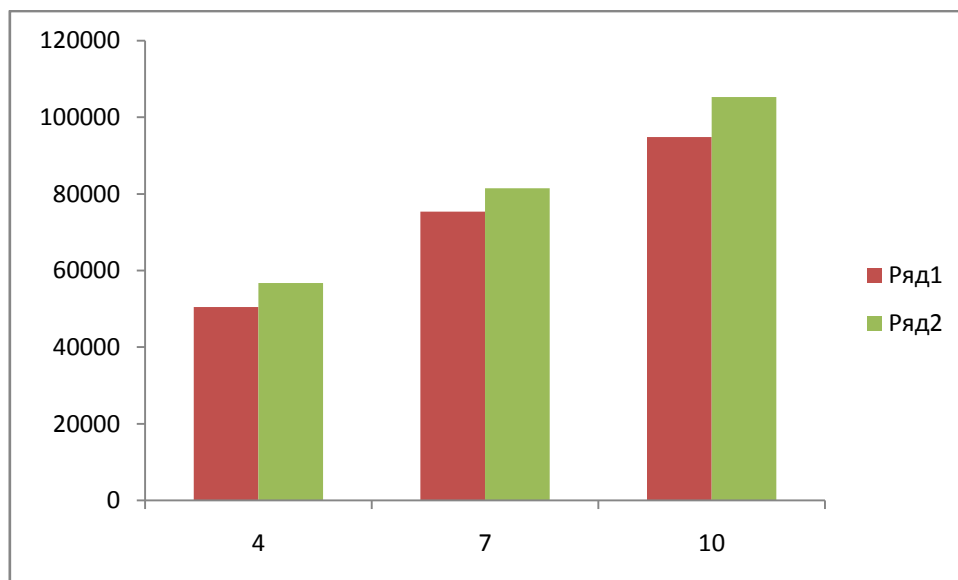
Hodnota symetrie 1,0 odpovídá ideální symetrii píku.

$$N = 5,54 \left(\frac{t_m}{w_{0,5}} \right)^2 \quad (15)$$

kde t_m odpovídá retenčnímu času dané látky a $w_{0,5}$ šířce píku v polovině jeho výšky.



Obr. 12: Závislost symetrie píku kationtu Bitrexu na pH pro elektrolyty na bázi 50 mM octanu amonného (Řady 1) a 50 mM mravenčanu amonného (Řady 2).



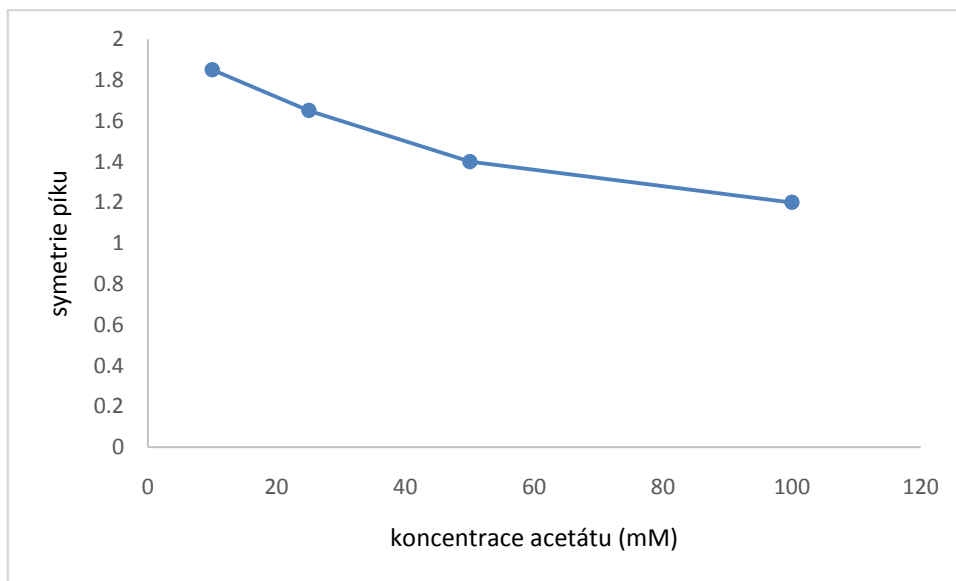
Obr. 13: Závislosti účinnosti píku kationtu Bitrexu na pH pro elektrolyty na bázi 50 mM octanu amonného (Řady 1) a 50 mM mravenčanu amonného (Řady 2).

Z Obr. 12 plyne, že symetrie nabývají nižších hodnot pro elektrolyt na bázi acetátu amonného než pro elektrolyty na bázi mravenčanu amonného. Ideálně symetrický pík nabývá hodnoty symetrie $s = 1$. V závislosti na zvyšujícím se pH pro oba typy elektrolytů dochází k snižování hodnoty symetrie a zároveň se hodnoty symetrií blíží hodnotě 1. Symetričtější pík vzniká během separace v bazickém prostředí, přičemž o něco příznivější hodnota symetrie (bližší 1) je pak dosažena v 50 mM mravenčanu amonného pH 10.

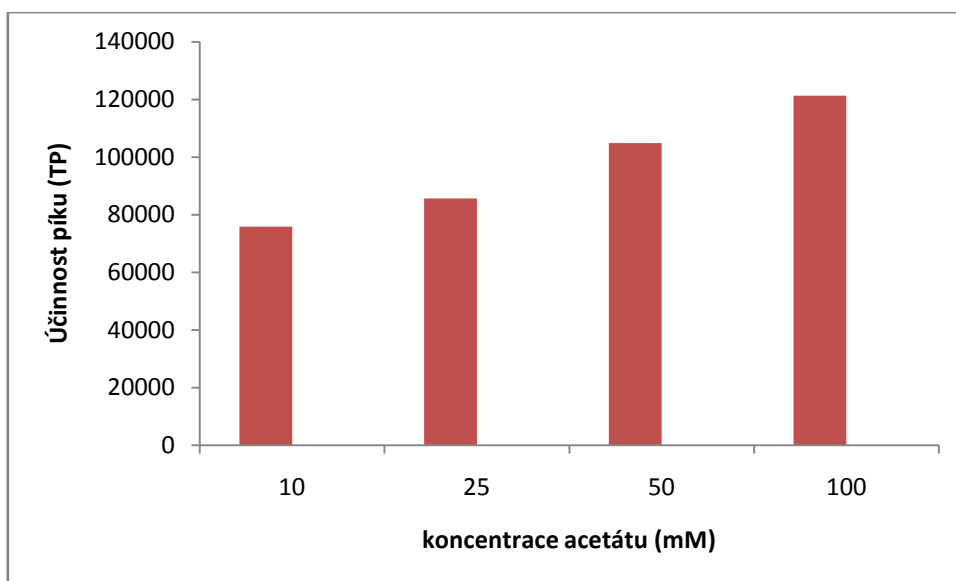
Naproti tomu účinnost píků (Obr. 13) vyjádřená počtem teoretických pater v závislosti na složení a pH pracovního elektrolytu roste s rostoucím pH a mírně vyšší jsou hodnoty účinnosti píků dosaženy pro 50 mM mravenčan amonný pH.

Kritéria pro optimální separace Bitrexu jsou: rychlá separace, symetrický pík a vysoká účinnost píku. Z uvedených kritérií tedy plyne, že nejvhodnější podmínky splňuje pracovní elektrolyt o složení 50 mM acetát amonný pH 10.0. V tomto elektrolytu je také velmi rychlý elektroosmotický tok. Rychlý elektroosmotický tok, pak může být výhodou, při převodu podmínek na CE-MS protože, vede ke vzniku stabilního elektrospreje.

Dalším parametrem, který ovlivňuje kvalitu separace, je koncentrace (iontová síla) složek pracovního elektrolytu. Z tohoto důvodu byl sledován vliv koncentrace acetátu v pracovním elektrolytu při konstantním pH. Studovány byly pracovní elektrolyty o složení 10 mM octan amonný pH 10.0, 25 mM octan amonný pH 10.0, 50 mM octan amonný pH 10.0 a 100 mM octan amonný pH 10.0. I pro tyto pracovní elektrolyty byly sledovány parametry symetrie a účinnost píku kationtu Bitrexu. Odpovídající závislosti jsou zobrazeny na Obr. 14 a Obr. 15.



Obr. 14: Závislost symetrie píku Bitrexu na koncentraci acetátu v acetátu amonném pH 10.0



Obr. 15: Závislost účinnosti píku Bitrexu na koncentraci acetátu v acetátu amonném pH 10.0

Z uvedených závislostí symetrie a účinnosti píku vyplývá, že nejpříznivějších parametrů, tj. symetrie blízké 1 a vysoké účinnosti píku je dosažena pro 100 mM acetát amonný pH 10.0. Tento pracovní elektrolyt je ale poměrně vodivý a průchodem proudu dochází ke generaci poměrně velkého množství Joulova tepla, což se negativně odrazilo na

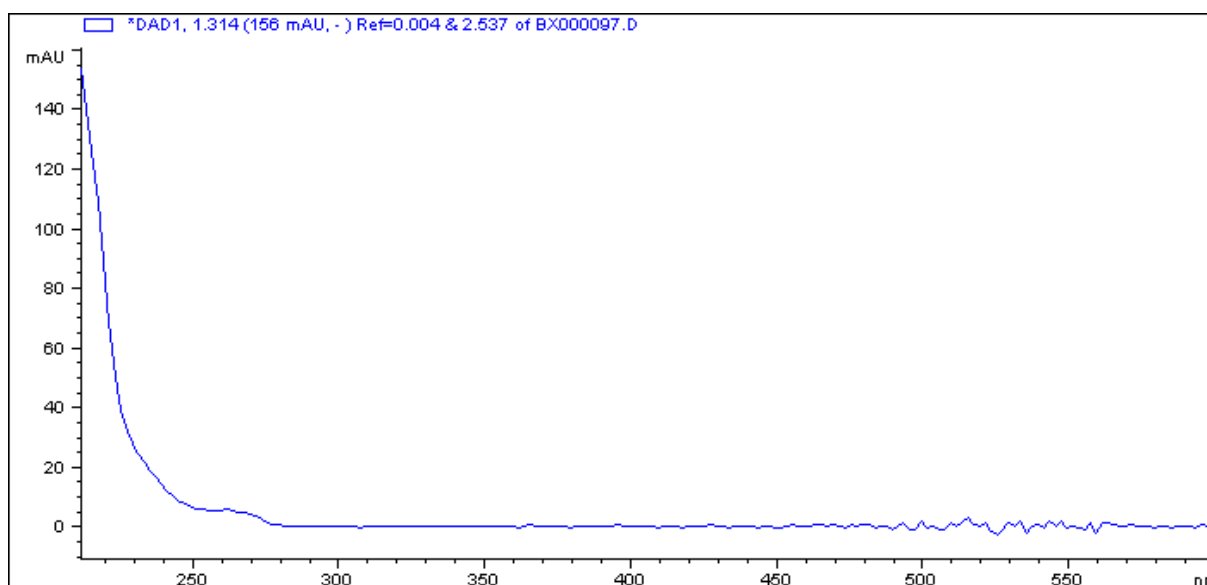
opakovatelnosti migračního času píku Bitrexu. Výrazně vyšší opakovatelnosti bylo dosaženo při použití pracovního elektrolytu 50 mM acetát amonný pH 10.0.

Finální podmínky pro CE-DAD separaci Bitrexu jsou shrnuty v následující tabulce 1:

Tabulka1:Shrnutí optimálních podmínek separace Bitrexu

Pracovní elektrolyt	50 mM acetát amonný pH 10.0
Separační napětí	+15 kV
Dávkování	50 mbar/5s
Celková délka kapiláry	33 cm
Efektivní délka kapiláry	24.5 cm
Vlnová délka detekce	200 nm

Na Obr.16 je zobrazeno UV spektrum kationtu Bitrexu odečtené v pracovním elektrolytu uvedeném v Tabulce 1.



Obr. 16: UV spektrum kationtu Bitrexu.

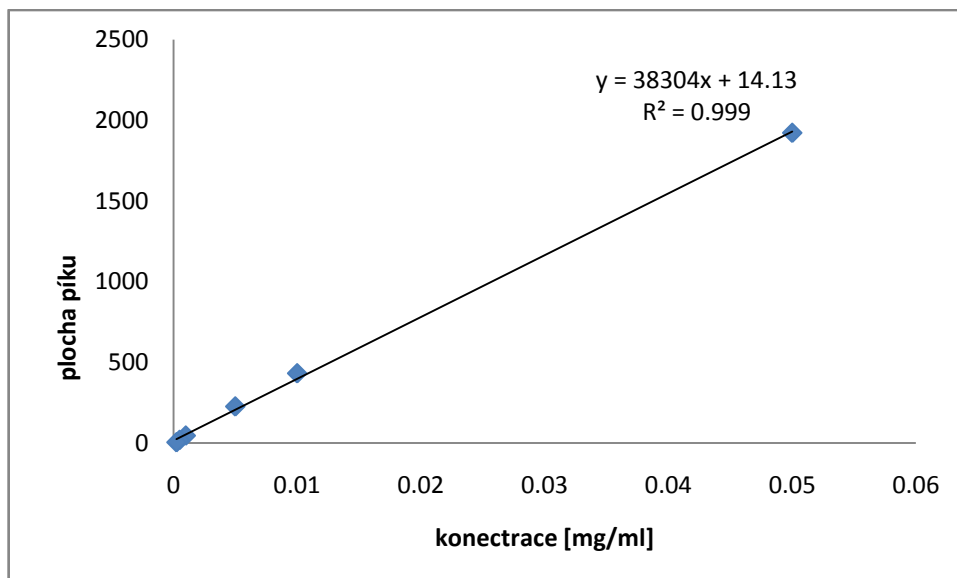
S využitím finálních podmínek separace byla provedena částečná validace metody. Validovány byly základní parametry: linearita kalibrační závislosti, limity detekce a kvantifikace, intra-day opakovatelnost ploch a migračních časů a inter-day opakovatelnost ploch migračních časů.

4.2 Kalibrace

Prvním úkolem bylo zjištění, zda bude závislost plochy píků na koncentraci Bitrexu v roztoku lineární. Pro tento účel byla vytvořena kalibrační řada koncentrací Bitrexu v rozmezí od 0,05 mg/ml až 0,00025 mg/ml. Jednotlivé výsledky měření i jejich průměry jsou zaznamenány v následující tabulce 2.

Tabulka2: Plochy píku Bitrexu pro jednotlivé kalibrační roztoky ve vodě.

Koncentrace Bitrexu [mg/ml]	Plocha píku	Průměr plochy píků
0,05	1940,71	1921,173
	1933,57	
	1889,24	
0,01	356,41	430,5597
	441,372	
	493,897	
0,005	257,838	224,9727
	226,801	
	190,279	
0,001	43,9022	44,4828
	44,3871	
	45,1591	
0,0005	18,4101	17,5096
	17,8976	
	16,2211	
0,00025	3,30366	2,93769
	3,13197	
	2,37744	



Obr. 17: Kalibrační závislost pro stanovení Bitrexu metodou CE-DAD

Z kalibrační závislosti je jasně patrné, že závislost plochy píků na koncentraci je lineární a to v celém rozsahu mnou zvolené koncentrace (od 0,25 do 50 mg/l). V tomto rozmezí lze očekávat koncentrace všech komerčně dostupných přípravků obsahujících Bitrex.

V následující Tabulce 3 jsou uvedeny další validované parametry.

Tabulka 3: Přehled validovaných parametrů metody stanovené Bitrexu s pomocí CE-DAD

Limit detekce	0.61 mg/L
Limit kvantifikace	2.0 mg/L
Intra-day opakovatelnost migračního času (vyjádřena jako relativní směrodatná odchylka) n = 5	0.56 %
Inter-day opakovatelnost migračního času (vyjádřena jako relativní směrodatná odchylka) n = 5	2.65 %
Intra-day opakovatelnost plochy píku (vyjádřena jako relativní směrodatná odchylka) n = 5 (měřeno na koncentrační hladině 0.001 mg/ml)	1.92 %
Inter-day opakovatelnost plochy píku (vyjádřena jako relativní směrodatná odchylka) n = 5 (měřeno na koncentrační hladině 0.001 mg/ml)	4.45 %

Limit detekce a limit kvantifikace byl vyhodnocen na základě vztahu:

$$LOQ = \frac{10h_n}{m} \quad (16)$$

$$LOD = \frac{3h_n}{m} \quad (17)$$

Kde h_n je šum základní linie a m je směrnice kalibrační křivky (zde, ale pro závislost výšky píku na koncentraci).

4.3 Reálné vzorky

Následovalo měření jednotlivých reálných vzorků komerčně dostupných přípravků obsahujících Bitrex. Vzorky nebyly nikterak upravovány, kromě částečného naředění (přílišná viskozita některých vzorků znemožňovala měření a vzorky pak velmi často ucpávaly kapiláru). Vzorek Ratimor, tvrdé granule s obsahem rodenticidů, bylo potřeba nejdříve roztlouct tloučkem. Takto předpřipravený prášek vzorku byl následně rozpuštěn ve vodě, 5 minut ultrazvukován ve vodní lázni a poté 1 minutu centrifugován při 14 000 otáčkách za minutu. V následující tabulce jsou shrnuty výsledky.

Tabulka 4: Shrnutí studovaných reálných vzorků obsahujících Bitrex

Vzorek	Úprava vzorku	Výsledek měření
Čistič skla	Ředění vodou 1:1	Pozitivní
Čistič WC	Ředění vodou 1:8	Negativní
Ratimor granule	250 mg v 1 ml	Negativní
Nástraha proti mravencům	27mg ve 200 μ l vody	Negativní
Dětský šampon	46,7 mg ve 200 μ l vody	Negativní

U většiny komerčně dostupných přípravků nebyl Bitrex detekován. Pouze u vzorku Denkmitt nature čistič na sklo (čistič skla) byl Bitrex metodou zaznamenán. Protože byla splněna podmínka linearity mezi plochou píku a koncentrací, mohla být pro výpočet přesné

koncentrace ve vzorku využita metoda standardního přidavku. Byly proto provedeny dvě analýzy. První analýza známého objemu vzorku V_i o neznámé koncentraci Bitrexu c_i . Výsledkem této analýzy byla plocha píku A_i . Ke vzorku se pak přidal známý objem standardu V_S o známé koncentraci standardu c_S a po analýze jsme dostali plochu píku A_{iS} . Pomocí následující rovnice pak bylo vypočítána neznámá koncentrace Bitrexu ve vzorku čističe skla.

$$c_i = \frac{A_i c_S V_S}{(A_{iS}(V_i + V_S) - A_i V_i)} \quad (14)$$

Tabulka 5: Výsledky stanovení Bitrexu v komerčním přípravku

Vzorek	Plocha píku	Průměr plochy píků
Čistič skla 1:1	5,11132	5,2098
	5,00394	
	5,51412	
Čistič skla s přídavkem	5,76399	5,7969
	5,94200	
	5,68460	

Vzorek čističe skla byl připravován smícháním 500 μ l analytu s 500 μ l vody. Vzorek se standardním přidavkem byl připraven smícháním 500 μ l analytu s 490 μ l vody a 10 μ l standardu o koncentraci 10 mg/l. Koncentrace zjištěná pomocí metody standardního přidavku ve vzorku čističe skla byla stanovena na 148 mg/l.

Ve všech ostatních přípravcích nebyl Bitrex detekován.

4.4 Vzorek alkoholu

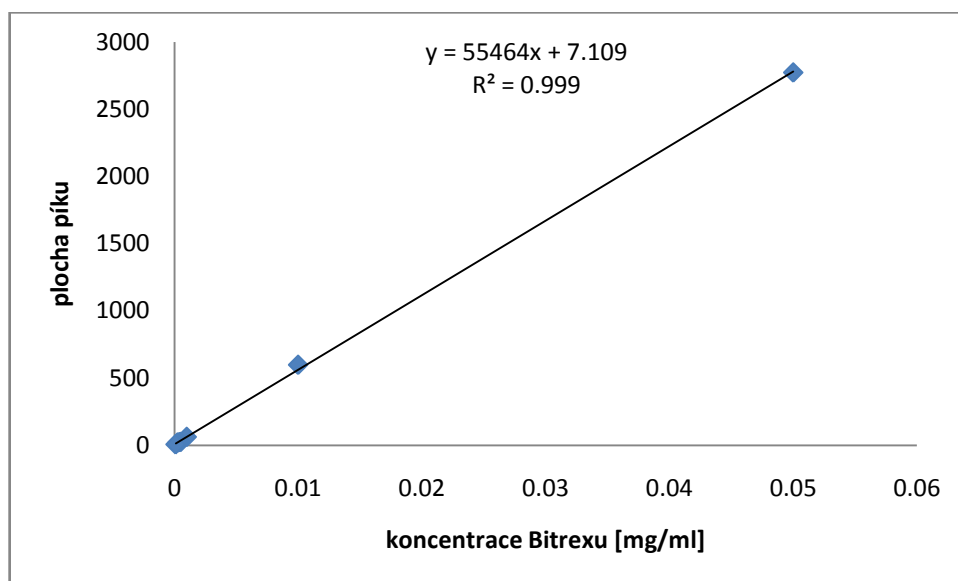
Pro zjištění koncentrace Bitrexu ve vzorku alkoholu bylo nutné nejprve vytvořit samotnou kalibrační závislost plochy píku na koncentraci Bitrexu ve 40% alkoholu. V tomto případě je nutné zohlednit významný rozdíl mezi deionizovanou vodou (matrice vzorků v předcházejícím stanovení Bitrexu v komerčních přípravcích) a 40% roztokem ethanolu. Mezi hlavní matriční rozdíly lze uvést jinou viskozitu vzorku připraveného rozpuštěním v deionizované vodě a vzorku 40% alkoholu. Viskozita je stěžejní veličina, na které závisí

množství nadávkovaného vzorku do kapiláry. V tabulce 5 jsou zobrazeny výsledky měření ploch Bitrexu pro 40 % ethanol.

Tabulka 5: Plochy píku Bitrexu pro jednotlivé kalibrační roztoky ve 40% ethanolu

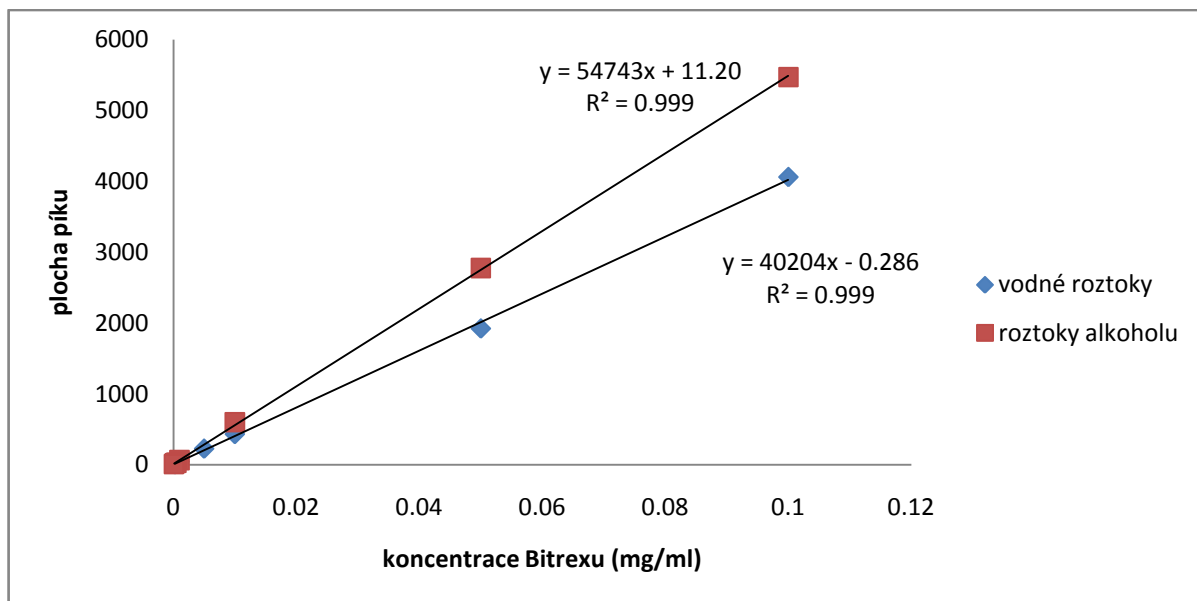
Koncentrace Bitrexu [mg/ml]	Plocha píku	Průměr plochy píků
0,1	5527	5469,333
	5638	
	5243	
0,05	2935	2773,333
	2770	
	2615	
0,01	609,848	597,75
	566,95	
	616,452	
0,001	67,524	61,38757
	65,712	
	50,9267	
0,0005	27,9639	23,4798
	22,0272	
	20,4483	
0,0004	22,7061	21,63243
	21,6511	
	20,5401	
0,00025	18,9951	19,10383
	20,0414	
	18,275	
0,0001	6,05396	5,713273
	5,18234	
	5,90352	

Naměřené výsledky kalibračních roztoků byly následně zaznamenány také do grafu, ze kterého je patrné, že i závislost plochy píku na koncentraci Bitrexu v 40% alkoholu je lineární.



Obr. 18: Kalibrační závislost pro stanovení Bitrexu metodou CE-DAD ve 40% ethanolu jako matrici

Porovnáním obou kalibračních závislostí pro Bitrex ve vodě a pro 40% ethanol lze konstatovat, že kalibrační závislost pro Bitrex ve 40% ethanolu je strmější a stanovené by tedy bylo citlivější. Porovnání obou kalibračních závislostí je na Obr. 19.



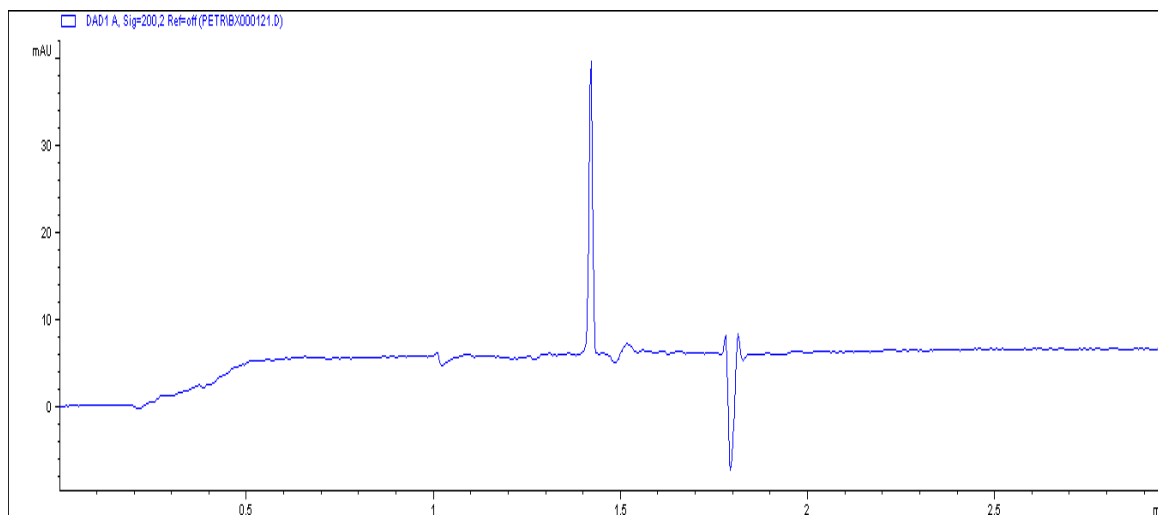
Obr. 19: Porovnání kalibračních závislostí pro Bitrex ve vodném roztoku a v roztoku 40% ethanolu.

I pro tento typ matrice byla vyvinutá metoda CE-DAD stanovené Bitrexu v alkoholu validována. V následující tabulce 6 jsou shrnuty analogické parametry.

Tabulka 6: Přehled validovaných parametrů metody stanovené Bitrexu ve 40 % ethanolu s pomocí CE-DAD.

Limit detekce	0.21 mg/l
Limit kvantifikace	0.70 mg/l
Intra-day opakovatelnost migračního času (vyjádřena jako relativní směrodatná odchylka) n = 5	2.36 %
Iter-day opakovatelnost migračního času (vyjádřena jako relativní směrodatná odchylka) n = 5	3.25 %
Inter-day opakovatelnost plochy píku (vyjádřena jako relativní směrodatná odchylka) n = 5 (měřeno na koncentrační hladině 0.001 mg/mL)	3.58 %
Itra-day opakovatelnost plochy píku (vyjádřena jako relativní směrodatná odchylka) n = 5 (měřeno na koncentrační hladině 0.001 mg/mL)	8.74%

Na Obr. 20 je zobrazen elektroferogram separace Bitrexu ve vzorku pančovaného alkoholu.

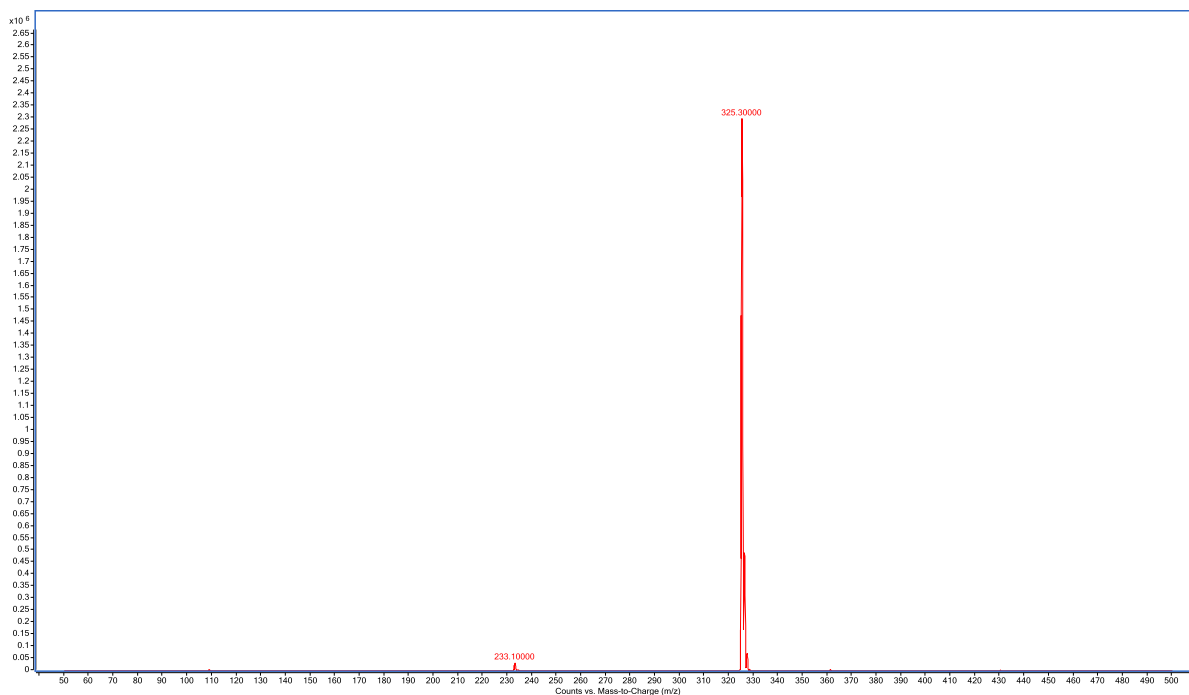


Obr. 20: Elektroferogram separace Bitrexu ve vzorku pančovaného alkoholu

4.5 Kapilární elektroforéza s hmotnostní spektrometrií v analýze Bitrexu

V případě spojení kapilární elektroforézy s hmotnostní spektrometrií byla již vyvinutá metoda separace Bitrexu s pomocí CE-DAD převedena na CE-ESI-MS. V tomto případě je výhodou použití těkavého elektrolytu na bázi octanu amonného. Iontový zdroj pro ionizaci elektrosprejem je citlivý na obsah netěkavých složek v pracovním elektrolytu. Netěkavé složky pracovního elektrolytu by mohli kontaminovat iontový zdroj, což vede ke snížení účinnosti ionizace a v konečném důsledku také ke snížení citlivosti stanovení.

Kation Bitrexu je kvarterní amoniová báze a jak již bylo uvedeno, je kladně nabitá v celém rozmezí pH ve vodném prostředí. Při ionizaci elektrosprejem v případě kvartérních amoniových bází nedochází k jejich protonaci, ale kladně nabitá molekula tvoří molekulární ion $[M]^+$ přímo a poměr m/z odpovídá molekulové hmotnosti kationtu. Z tohoto důvodu byla detekce v SIM (singl ion monitoring) módu provedena při hodnotě $m/z = 325.3$ odpovídající molekulové hmotnosti kationtu Bitrexu. Na Obr. 21 je zobrazeno MS spektrum standardu 0.001 mg/mL Bitrexu měřeno v kladném SIM módu.



Obr. 21: MS spektrum Bitrexu měřeno v kladném módu

Z obrázku 21 je patrné, že skutečně nedochází k protonizaci molekuly při ESI ionizaci a pík v MS spektru odpovídá přímo kladně nabitému molekulovému iontu kvartérního kationtu Bitrexu.

Další problém, který je při spojení CE s hmotnostní spektrometrií nutné řešit je nedostatečný průtok eluátu ze separační kapiláry do iontového zdroje, tak aby byl zajištěn vznik stabilního elektrospreje. Pro zajištění stabilního elektrospreje a zároveň zajištění vodivého spojení mezi elektrodou kapilární elektroforézy a zemnicí elektrody, která je v tomto případě zároveň sprejovací kapilárou je nutné koaxiálně přivádět pomocnou sprejovací kapalinu. Pomocná sprejovací kapalina má zajistit dostatečný průtok eluátu, tak aby vznikl stabilní elektrosprej, dále má zajistit převod analytu z kapalně do plynné fáze. Kromě složení pomocné kapaliny má na vznik stabilního elektrospreje a tím také na citlivost detekce vliv průtok pomocné kapaliny, teplota sušícího plynu v iontovém zdroji, tlak a průtok zamlžujícího plynu (dusíku).

Všechny výše uvedené parametry byly studovány a optimalizovány, tak aby bylo dosaženo, co nejvyšší citlivosti detekce, tj. co nejvyšší intenzity a plochy píku Bitrexu v SIM módu.

4.5.1 Vliv složení pomocné sprejovací kapaliny na intenzitu signálu Bitrexu

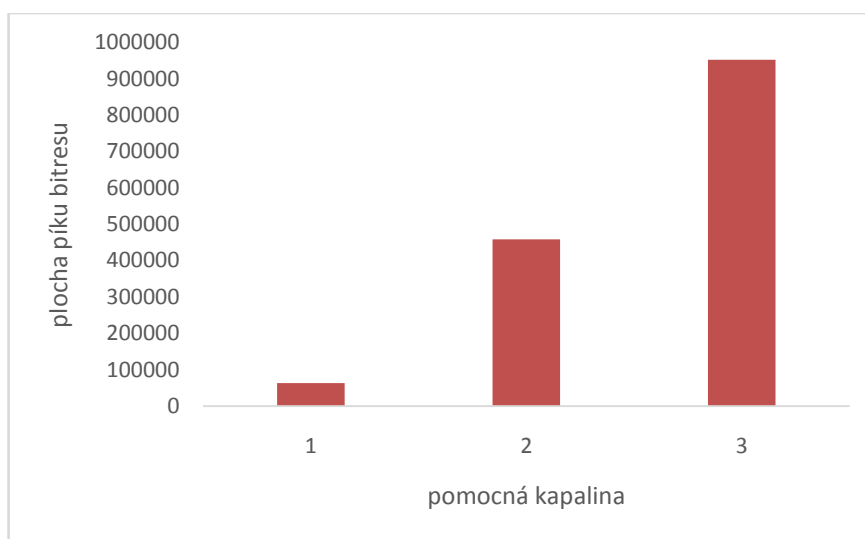
Byly studovány pomocné kapaliny s následujícím složením:

- 1) 50 : 50 methanol : voda (v/v)
- 2) 50 : 49.5 : 0.5 methanol : voda : kyselina mravenčí (v/v/v)
- 3) 50 : 49.5 : 0.5 methnaol : voda : hydroxid amonný (v/v/v)

Vliv složení pomocné kapaliny na intenzitu signálu Bitrexu byl studován za následujících podmínek:

50 mM acetát amonný pH 10.0, injekce vzorku 100 mbar/5s, koncentrace Bitrexu 0,005 mg/ml ve vodě, průtok pomocné sprejovací kapaliny 4 μ L/min, teplota sušícího plynu 150 °C, tlak dusíu 10 psi, sprejovací napětí + 4.0 kV.

Na následujícím obrázku 22 je závislosti intenzity signálu vyjádřená jako plocha píku Bitrexu v závislosti na složení pomocné sprejovací kapaliny.



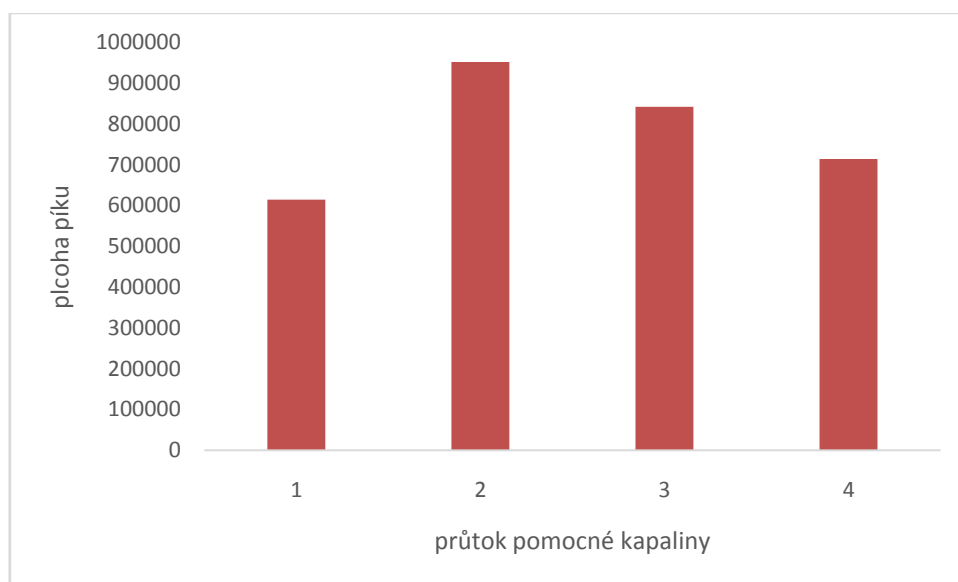
Obr. 22: Závislost plochy píku Bitrexu na složení pomocné sprejovací kapaliny
(1 - 50 : 50 methanol : voda (v/v),
2 - 50 : 49.5 : 0.5 methanol : voda : kyselina mravenčí (v/v/v),
3 - 50 : 49.5 : 0.5 methanol : voda : hydroxid amonný (v/v/v)).

Z uvedeného Obr. 22 plyne, že nejvyšší plocha píku Bitrexu byla dosažena s použitím pomocné sprejovací kapaliny o složení 50 : 49.5 : 0.5 methanol : voda : hydroxid amonný (v/v/v). S použitím této sprejovací kapaliny byly také dosaženy nejstabilnější proudy pro

separaci v kapilární elektroforéze. Výsledek také koresponduje se skutečností, že CE separace Bitrexu je prováděna v bazickém pracovním elektrolytu a tedy přídavek hydroxidu amonného do směsi methanolu s vodou je vhodnější než přídavek mravenčí kyseliny. Přítomnost hydroxidu amonného zřejmě nemá vliv na ionizaci kationtu Bitrexu, vzhledem k tomu, že se jedná o permanentní kation.

4.5.2 Vliv průtoku pomocné sprejovací kapaliny

Dalším sledovaným parametrem byl průtok pomocné sprejovací kapaliny. Průtok byl měněn v intervalu od 2 $\mu\text{L}/\text{min}$ do 8 $\mu\text{L}/\text{min}$ s vždy s přírůstkem 2 $\mu\text{L}/\text{min}$. Na Obr. 23 je zobrazena závislost plochy píku kationtu Bitrexu na průtoku pomocné sprejovací kapaliny.

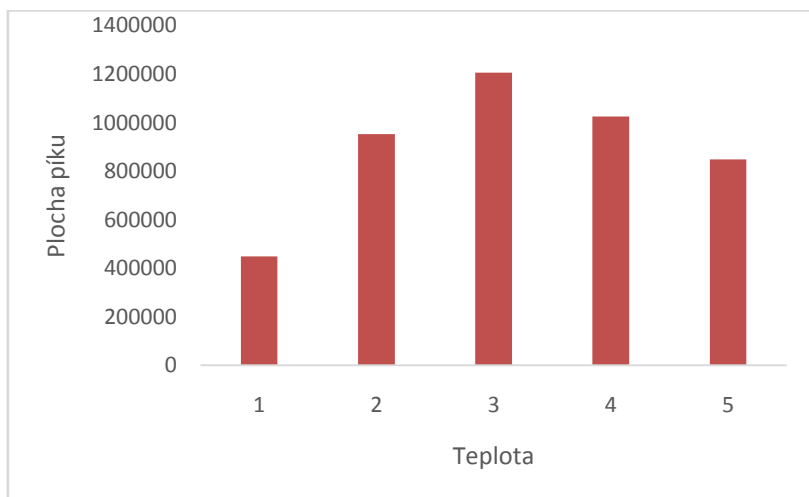


Obr. 23: Vliv průtoku pomocné sprejovací kapaliny na plochu píku Bitrexu (1 – průtok 2 $\mu\text{L}/\text{min}$, 2 – 4 $\mu\text{L}/\text{min}$, 3 – 6 $\mu\text{L}/\text{min}$ a 4 – 8 $\mu\text{L}/\text{min}$).

Nejvyšší odezva (nejvyšší plocha píku) byla dosažena s využitím průtoku 4 $\mu\text{L}/\text{min}$. Další optimalizace byly prováděny s využitím tohoto optimálního průtoku pomocné sprejovací kapaliny o složení methanol : voda : hydroxid amonný (50 : 49.5 : 0.5, v/v/v).

4.5.3 Vliv teploty sušícího plynu

Teplota sušícího plynu (dusíku) ovlivňuje desolvataci při sprejovacím procesu a má vliv na množství vzniklých iontů v plynné fázi. Vliv sušícího plynu na plochu píku kationtu Bitrexu je na Obr. 24. Vliv teploty na plochu píku Bitrexu byl studován v rozmezí teplot 100 až 300 °C s přírůstkem 50 °C.



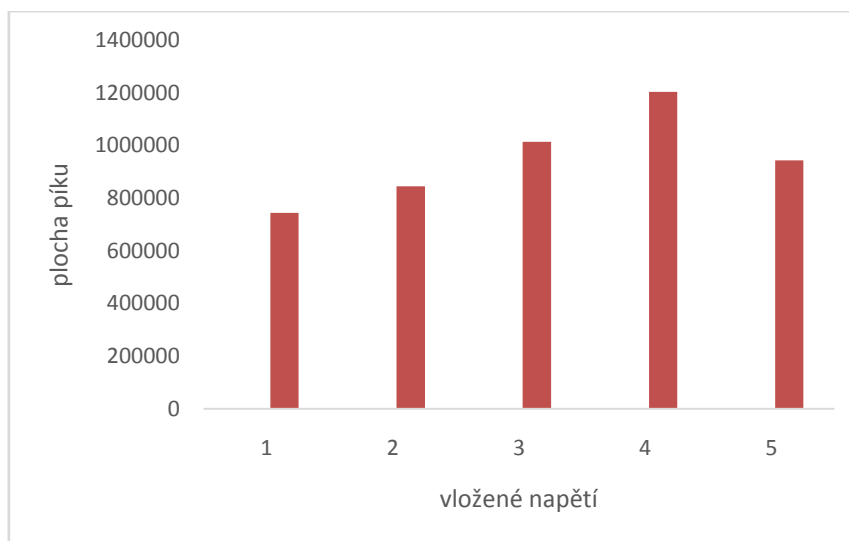
Obr. 24: Závislost plochy píku na teplotě zmlžujícího plynu (1 – 100 °C, 2 – 150 °C, 3 – 200 °C, 4 – 250 °C, 5 – 300 °C).

Jak plyne z Obr. 24 je nejvyšší účinnosti desolvatace a tedy nejvyšší plochy píku dosaženo při teplotě 200 °C. Tato teplota tedy byla dále použita při další optimalizaci.

4.5.4 Vliv sprejovacího napětí

Následujícím optimalizovaným parametrem byl vliv sprejovacího napětí na velikost plochy píku kationtu Bitrexu. Sprejovací napětí má vliv na výtěžnost vzniklých iontů v iontovém zdroji a tedy na citlivost detekce.

Sprejovací napětí bylo studováno v rozmezí +2.5 kV do +4.5 kV. Závislost plochy píku na sprejovacím napětí je zobrazena na Obr. 25.



Obr 25: Závislost plochy píku kationtu Bitrexu na vloženém sprejovacím napětí
 (1 – 2.5 kV,
 2 – 3.0 kV,
 3 – 3.5 kV,
 4 – 4.0 kV,
 5 – 4.5 kV)

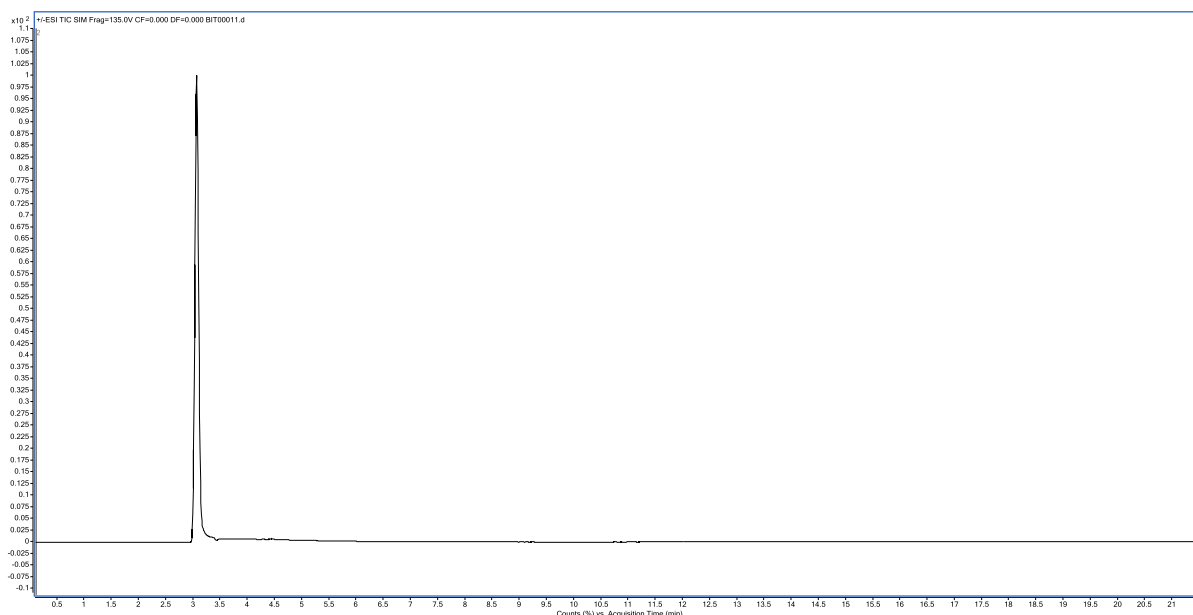
Z uvedené závislosti plyne, že nejvyšší citlivosti a také nejvyšší hodnoty plochy kationtu Bitrexu je dosaženo s využitím sprejovacího napětí + 4.0 kV. Nižší hodnoty použitého sprejovacího napětí vedly k nižší citlivosti detekce Bitrexu. Naproti tomu vyšší hodnota sprejovacího napětí +4.5 kV vedla ke snížení citlivosti a k nižší opakovatelnosti ploch píků.

Finální optimální podmínky separace a detekce Bitrexu s pomocí CE-ESI-MS jsou shrnuty v následující tabulce:

Tabulka 7: Optimální podmínky CE-ESI-MS stanovené Bitrexu

Složení separačního elektrolytu	50 mM acetát amonný pH 10.0
Délka separační kapiláry	80 cm
Sprejovací napětí	+4.0 kV
Teplota zmlžujícího plynu	200 C
Tlak zmlžujícího plynu	10 psi
Složení pomocné sprejovací kapaliny	50 : 49.5 : 0.5 (methanol : voda : hydroxid amonný, v/v/v)
Průtok pomocné sprejovací kapaliny	4 µl/min

Na Obr. 26 je zobrazen rekonstruovaný SIM elektroferogram separace kationtu Bitrexu za optimálních podmínek uvedených v Tabulce 7.



Obr. 26: Separace Bitrexu s pomocí CE-ESI-MS za optimálních podmínek. Optimální podmínky jsou uvedené v Tabulce 7.

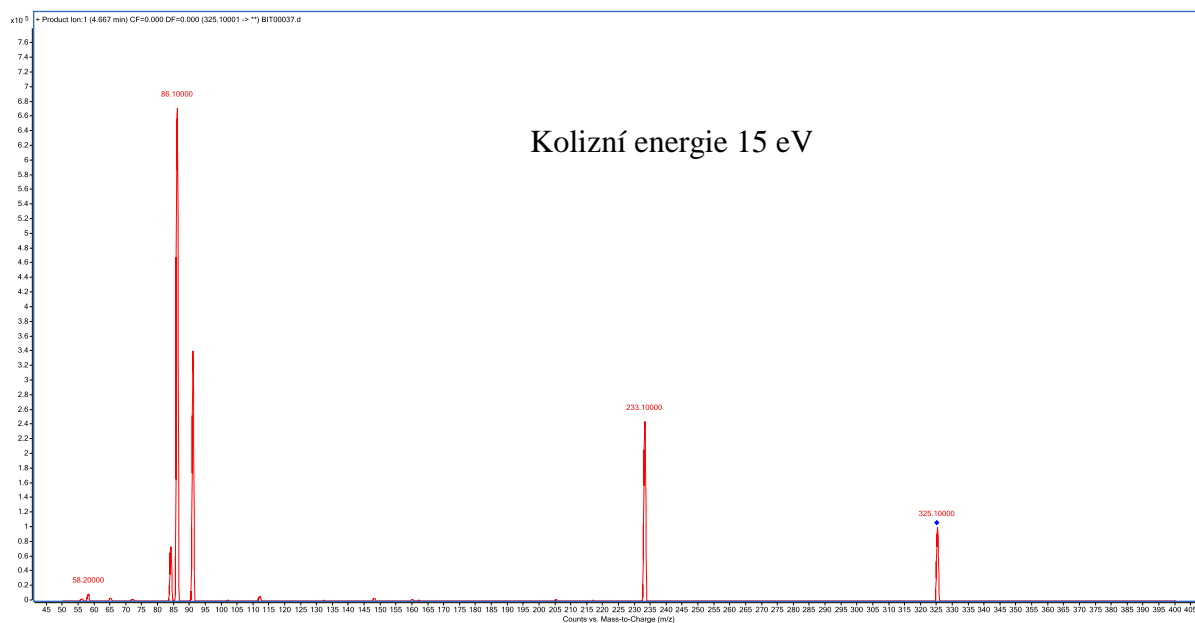
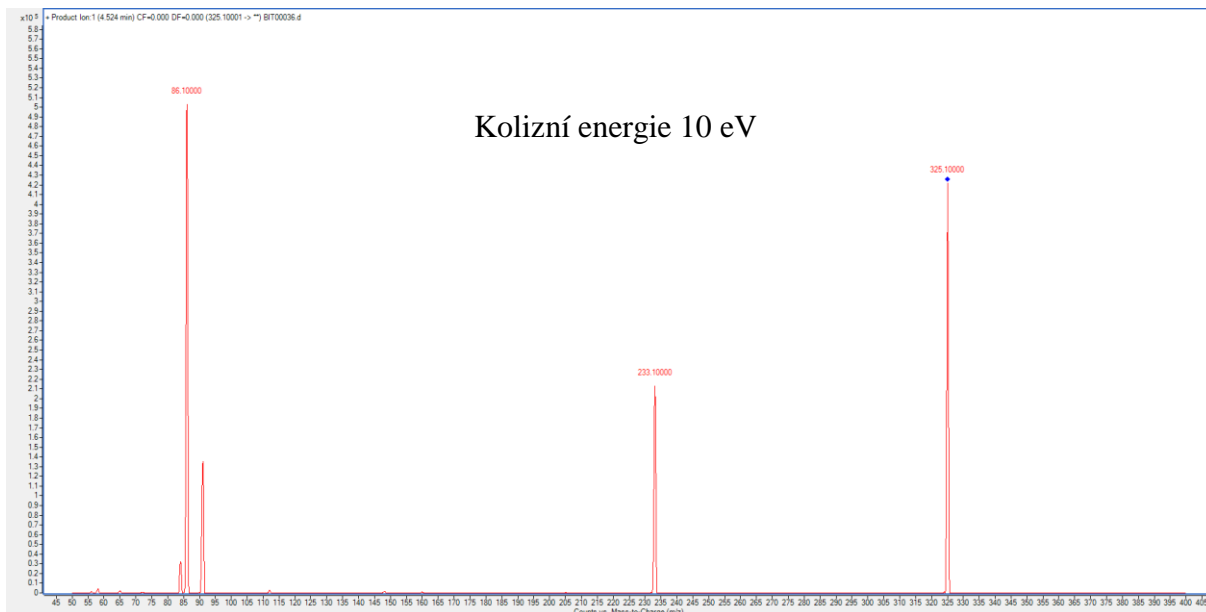
4.6 Tandemová hmotnostní spektrometrie – studium fragmentace Bitrexu

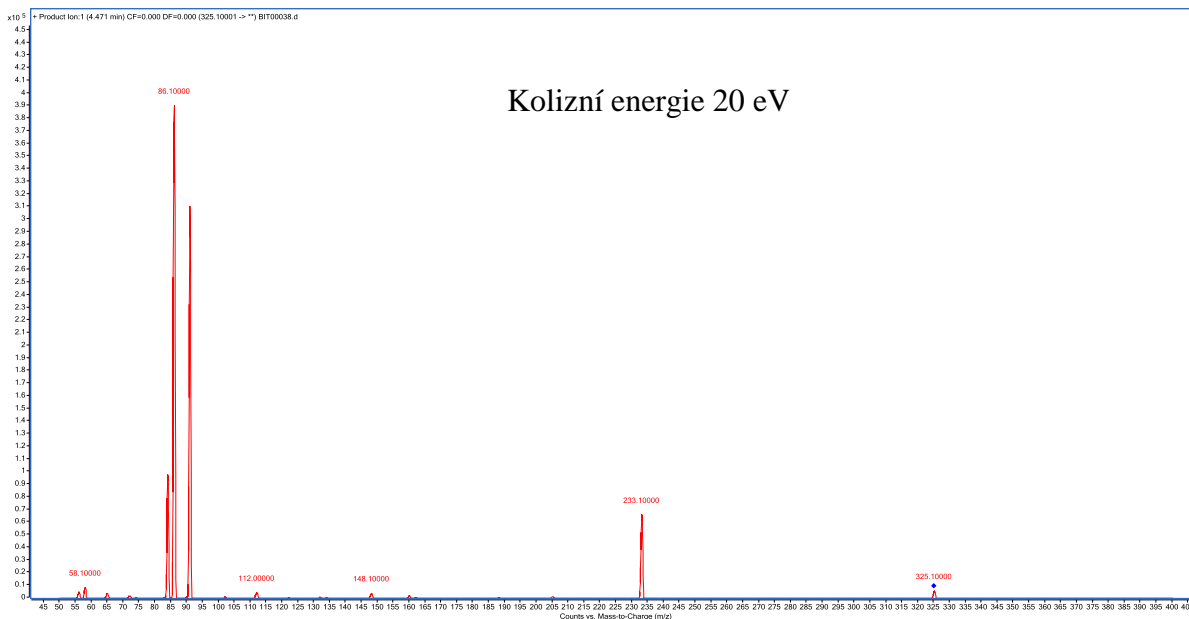
Pro přesnou identifikaci přítomnosti kationtu Bitrexu v analyzovaných vzorcích je možné využít měření tandemových hmotnostních spekter a využít k identifikaci některého z vhodných fragmentů, které vzniknou s využitím kolizí indukovanou disociací. Navíc je možné provést citlivější kvantifikaci Bitrexu s využitím metody SRM (selective reaction monitoring) jejíž princip byl popsán v teoretickém úvodu diplomové práce.

Pro studium fragmentace kationtu Bitrexu byly zvoleny kolizní energie v rozmezí 10 až 20 eV, přičemž fragmentován byl molekulární iont s hodnotou $m/z = 325$ odpovídající mateřskému kationtu Bitrexu.

Kolizní MS/MS spektra byla měřena s využitím metody přímého nástřiku do hmotnostního spektrometru přes křemennou kapiláru kapilární elektroforézy. Vzorek Bitrexu o koncentraci 1 mg/l by rozpuštěn v 50 mM acetátu amonného pH 10.0 a tlakem byl dávkován přes křemennou kapiláru do iontového zdroje hmotnostního spektrometru.

Jednotlivá MS/MS spektra pro studované kolizní energie jsou zobrazeny na následujícím obrázku.





Obr. 27: MS/MS spektra fragmentace Bitrexu v závislosti na velikosti kolizní energie.

Jak plyne z Obr. 27 k téměř úplné fragmentaci mateřského molekulového iontu dochází při vložení kolizní energie 20 eV. Nejintenzivnější fragmenty odpovídají poměrům $m/z = 223.1$; 91.0 a 86.1. Pro kvalitativní potvrzení přítomnosti Bitrexu byl využit přechod odpovídající fragmentaci 325.1 \rightarrow 233.1 a pro kvantifikaci v SRM módu byl využit přechod odpovídající fragmentaci 325.1 \rightarrow 86.1.

Jako optimální kolizní energie byla pak v dalším měření při validaci a kvantifikaci použit kolizní energie 20 eV a měření v SRM módu.

Vyvinutá metoda separace Bitrexu s pomocí CE-MS/MS byla částečně validována. Sledovány byly stejné parametry jako v případě separace Bitrexu s pomocí CE-DAD. Výsledky validace jsou shrnuty v následující tabulce:

Tabulka 8: Výsledky částečné validace stanovení Bitrexu s pomocí CE-MS/MS

Limit detekce	23 ng/l
Limit kvantifikace	77 ng/l
Intra-day opakovatelnost migračního času (vyjádřena jako relativní směrodatná odchylka) n = 5	1.21 %
Inter-day opakovatelnost migračního času (vyjádřena jako relativní směrodatná odchylka) n = 5	3.84 %
Intra-day opakovatelnost plochy píku (vyjádřena jako relativní směrodatná odchylka) n = 5 (měřeno na koncentrační hladině 0.001 mg/mL)	6.23 %
Inter-day opakovatelnost plochy píku (vyjádřena jako relativní směrodatná odchylka) n = 5 (měřeno na koncentrační hladině 0.001 mg/mL)	8.9 %
Lineární rozsah	0.090 –1000 µg/l
Rovnice kalibrační přímky	$y = 134563x + 121$ ($R^2 = 0.9989$)

4.7 Analýza reálných vzorků s obsahem Bitrexu s pomocí CE-MS/MS

Stejně jako v případě CE-DAD byly vzorky s obsahem Bitrexu proměřeny s využitím vyvinuté metodiky CE-ESI-MS/MS. Jednotlivé vzorky byly připraveny stejným způsobem jako v případě stanovení s pomocí CE-DAD jak bylo uvedeno v kapitole 4.3, rozdíl je pouze v použití ředění.

Tabulka9: Měřené reálné vzorky s obsahem Bitrexu a jejich způsob přípravy pro účely stanovení na CE-ESI-MS/MS.

Vzorek	Úprava vzorku	Výsledek měření
Čistič skla	Ředění vodou 1:100	Pozitivní
Čistič WC	Ředění vodou 1:8	Pozitivní
Ratimor granule	250 mg v 100 ml	Pozitivní
Nástraha proti mravencům	30mg ve 25 ml vody	Pozitivní
Dětský šampon	50 mg ve 20 mL vody	Pozitivní

Vzhledem k tomu, že limit kvantifikace pro metodu CE-ESI-MS/MS je výrazně nižší mohl být Bitrex identifikován a kvantifikován i ve vzorcích, kde s metodou CE-DAD je obsah Bitrexu pod limitem detekce.

Výsledky dosažené s pomocí metody CE-ESI-MS/MS pro komerční přípravky obsahující Bitrex jsou uvedeny v následující tabulce 10:

Tabulka 10: Výsledky stanovení obsahu Bitrexu v komerčních přípravcích získané pomocí metody CE-ESI-MS/MS

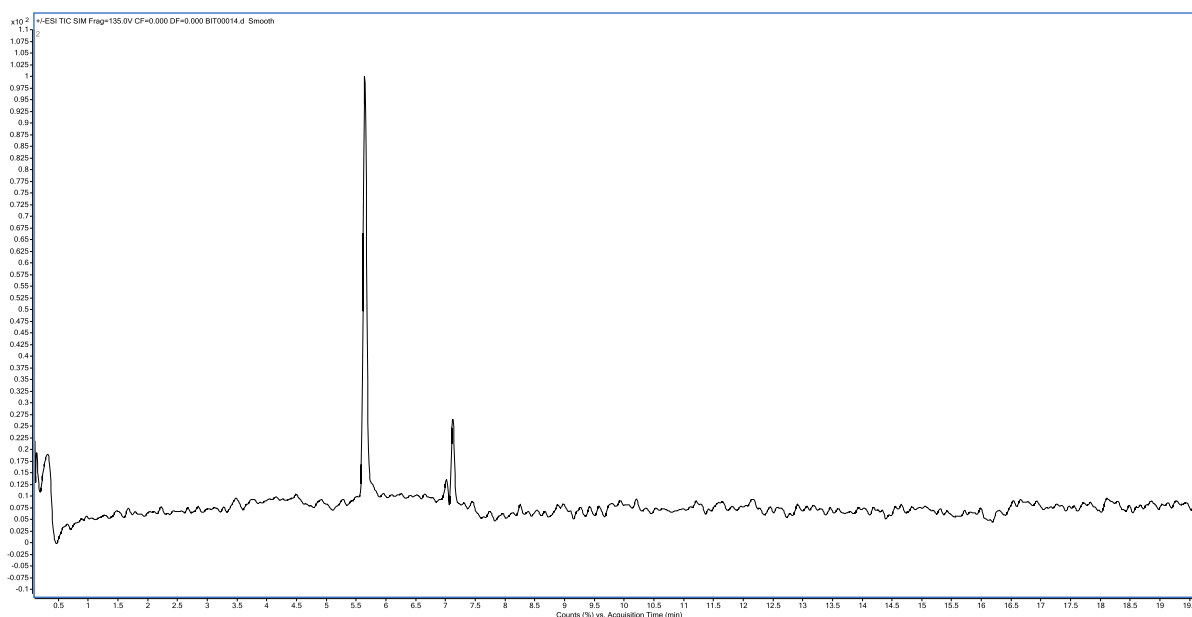
Vzorek	Koncentrace Bitrexu
Čistič skla	165.0 mg/L
Čistič WC	52.0µg/L
Ratimor granule	38.1µg/L
Nástraha proti mravencům	15.6µg/L
Dětský šampon	5.3µg/L

Vzhledem k tomu, že se podařilo stanovit obsah Bitrexu pouze v čističi skla s použitím obou metod, lze tyto získané výsledky porovnat. Jak bylo uvedeno množství Bitrexu stanovené bylo 148 mg/L. Výsledek získaný z měření na CE-ESI-MS/MS odpovídá 165 mg/L obsahu Bitrexu pro tentýž vzorek. Rozdíl je dán rozdílnou technikou detekce, nicméně je možné konstatovat, že obě metody poskytují velmi podobné výsledky.

5.5 Stanovení Bitrexu ve vzorku pančovaného alkoholu pomocí CE-ESI-MS/MS

Vyvinutá metoda CE-ESI-MS/MS byla využita pro stanovení Bitrexu ve vzorku pančovaného alkoholu. Při nelegální výrobě pančovaného alkoholu se používá denaturovaný alkohol, který se různými nelegálními postupy upravuje a zbavuje denaturantu. Bitrex je jednou z denaturačních přísad, kterou lze rozložit oxidačními činidly. Pro tento účel se využívá nejčastěji prostředku Savo. Zbytky nerozloženého Bitrexu je možné stanovit v alkoholu a odhalit tak původ nelegálního alkoholu.

Pro ověření vyvinuté metodiky CE-MS/MS separace, identifikace a stanovení Bitrexu byl analyzován vzorek alkoholu pocházející z nelegální distribuce. Na Obr. 28 je zobrazen rekonstruovaný SRM elektroforegram separace Bitrexu v analyzovaném vzorku.



Obr. 28: SRM rekonstruovaný elektroferogram separace Bitrexu ve vzorku pančovaného alkoholu.

Jak je patrné z elektroferogramu, je Bitrex ve velmi nízké koncentraci přítomen v pančovaném alkoholu. Jeho koncentrace ve vzorku odpovídá 22 $\mu\text{g/l}$. Jde o velmi nízké množství nicméně přítomnost Bitrexu v tomto alkoholu je objektivně prokázána.

5 Závěr

Byly vyvinuty dvě metody separace a stanovení Bitrexu, jako složky, která se přidává do celé řady výrobků jako extrémně hořká látka. Hořká chuť má odradit případné náhodné požití takových komerčních přípravků. Jde hlavně o přípravky z řad drogistického zboží, jejichž náhodné požití by mohlo ohrozit zdraví člověka. Další užití Bitrexu spočívá v jeho přidavku při znehodnocení (denaturaci) alkoholu. Ilegální výrobci alkoholu v některých případech využívají denaturovaný alkohol Bitrexem k výrobě alkoholických nápojů, přičemž se snaží různými postupy Bitrexu v alkoholu zbavit.

Pro odhalení původu alkoholu je nutné stanovit případné zbytky Bitrexu v pančovaném alkoholu pomocí vhodné analytické techniky. Kapilární elektroforéza je výhodná technika, neboť kation Bitrexu je permanentní kation (kvartérní amoniová báze) a je možné ho tedy separovat od ostatních případných složek.

V průběhu řešení diplomové práce byly vyvinuty dvě metody stanovení Bitrexu, a to s pomocí kapilární elektroforézy se spektrofotometrickou detekcí a s pomocí kapilární elektroforézy s tandemovou hmotnostní spektrometrií. Zejména druhá vyvinutá metoda kapilární elektroforézy s tandemovou hmotnostní spektrometrií je velmi citlivá a umožňuje také spolehlivou identifikaci Bitrexu ve vzorku. Z uvedených výsledků vyplývá, že citlivost metody využívající tandemovou hmotnostní spektrometrií je nepoměrně citlivější (asi 26 tisíc krát). Pro spolehlivou identifikaci a stanovení Bitrexu v pančovaném alkoholu pro forenzní účely je tedy nutné využívat metody CE-ESI-MS/MS.

Z tohoto důvodu je tato metoda vhodná i pro forenzní účely a svou jednoduchostí a rychlostí můžou konkurovat zavedeným chromatografickým technikám.

6 Citovaná literatura

- [1]. **Skoog, Douglas A., Holler, F. James a Crouch, Stanley R.** *Principles of Instrumental Analysis*. Belmont : Brooks/Cole, 2007. 1-800-354-9706.
- [2]. **Baker, D. R.** *Capillary Electrophoresis*. New York : John Wiley & Sons, Inc., 1995. 0-471-11763-3.
- [3]. **Lauer, H.H. a Rozing, G.P.** *High Performance Capillary Electrophoresis*. místo neznámé : Agilent Technologies.
- [4]. **Moring, Stephen E., Reel, Richard T. a Soest, R. E. J. van.** Optical improvements of a Z-shaped cell for high-sensitivity UV absorbance detection in capillary electrophoresis. *Anal. Chem.* 65, 1993, stránky 3454-3459.
- [5]. **Tsuda, Takao, Sweedler, Jonathan V. a Zare, Richard N.** Rectangular capillaries for capillary zone electrophoresis. *Anal. Chem.* 62, 1990, stránky 2149-2152.
- [6]. **Wang, Tiansong, a další, a další.** Nanoliter-scale multireflection cell for absorption detection in capillary electrophoresis. *Anal. Chem.* 63, 1991, stránky 1372-1376.
- [7]. **Heiger, David N.** *High Performance Capillary electrophoresis-An Introduction*. France : Hewlett-Packard, 1992. 5968-9963E.
- [8]. **Small, Hamish a Miller, Theodore E.** Indirect photometric chromatography. *Anal. Chem.* 54, 1993, stránky 462-469.
- [9]. **James W. Jergenson, Krynn DeArman Lukacs.** Zone electrophoresis in open-tubular glass capillaries. *Anal. Chem.* 53, 1981, stránky 1298-1302.
- [10]. **McLaughlin, G. M., a další, a další.** Pharmaceutical drug separations by HPCE: practical guidelines. *J. Liquid Chrom.* 15, 1992, stránky 961-1021.
- [11]. **Jorgenson, J. W. a Lukacs, K. DeArman.** Simple sampling device for capillary isotachopheresis and capillary zone electrophoresis. *J. of Chromatography.* 471, 1989, stránky 429-436.
- [12]. **McLaughlin, G. M., a další, a další.** *J. Liquid Chrom.* 1992, stránky 961-1021.
- [13]. **Lauer, Henk H. a McManíggill, Douglass.** Capillary zone electrophoresis of proteins in untreated fused silica tubing. *Anal. Chem.* 58, 1986, stránky 166-170.
- [14]. **Harrold, Michael P., a další, a další.** Parameters influencing separation and detection of anions by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr.* 640, 1993, stránky 463-471.
- [15]. **Jandik, P. a Jones, W.R.** Optimization of detection sensitivity in the capillary electrophoresis of inorganic anions. *J. Chromatog.* 546, 1991, stránky 431-443.

- [16]. **Walbroehl, Yvonne a Jorgenson, James W.** On-column UV absorption detector for open tubular capillary zone electrophoresis. *J. Chromatog.* 315, 1984, stránky 135-143.
- [17]. —. Capillary zone electrophoresis of neutral organic molecules by solvophobic association with tetraalkylammonium ion. *Anal. Chem.* 58, 1986, stránky 479-481.
- [18]. **Hjerten, Stellan.** High-performance electrophoresis : Elimination of electroendosmosis and solute adsorption. *J. Chromatog.* 347, 1985.
- [19]. **Jelínek, Ivan.** *Vysokoučinné analytické separace biologicky aktivních látek.* Praha : VŠCHT Praha, 2006.
- [20]. **Griffiths W.J., Wang Y.** Mass spectrometry: from proteomics to metabolomics and lipidomics. *Chem. Soc. Rev.* 38, 2009, stránky 1882-1896.
- [21]. **Bier, M. E.** Coupling ESI and MALDI Sources to the Quadrupole Mass Filter, Quadrupole Ion Trap, Linear Quadrupole Ion Trap and Orbitrap Mass Analyzers. *Electrospray and MALDI Mass Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation, Practicalities and Biological Applications.* New York : John Wiley & Sons, 2010.
- [22]. **Greaves, J. a Roboz, J.** *Mass Spectrometry for the Novice.* Boca Raton : CRC Press, 2014. 978-1-4200-9418-3.
- [23]. [Online] 2014. http://cs.wikipedia.org/wiki/Denatoniumbenzo%C3%A1t#mediaviewer/File:Denatonium_benzoate.png.
- [24]. [Online] 2014. <http://www.bitrex.com/about-bitrex/history>.
- [25]. *Vyhláška Ministerstva zemědělství č. 141/1997 Sb., o technických požadavcích na výrobu, skladování a zpracování lihu .* [Online] 2014. <http://eagri.cz/public/web/mze/potravinyl/legislativa/zakon-o-lihu/100048040.html>.
- [26]. *Denatonium benzoate as a detergent to ingestonof toxic substances: toxicity and efficacy.* **Hansen, S. R., Janssen, C. a Beasley, V.R.** místo neznámé : *Vet. Hum. Toxicol.*, 1993, Sv. 35, stránky 234-236.
- [27]. **Budvari, S.** *The Merck Index (Eleventh Edition).* Rahway NJ : Merck and Co., Inc, 1989. str. 454.
- [28]. **Damon, C.E. a Pettitt, B.C.** High-performance liquid chromatographic determination of denatonium benzoate in rapeseed oil. *J. Chromatogr.* 195, 1980, stránky 243-249.
- [29]. **Pranaityté, B., Daunoravičius, Ž. a Padarauskas, A.** DEvelopment and validation of a capillary elctroposeis method for the determination of dentonium benzoate in denatured alcohol formulations. *Chromatographia.* 60, 2004, stránky 353-357.

- [30]. **Daunoravičius, Ž., a další, a další.** Simple and rapid determination of denaturants in alcohol formulations by hydrophilic interaction chromatography. *Chromatographia*. 63, 2006, 2006, stránky 373-377.
- [31]. **Sugden, K., Mayne, T.G. a Loscombe, C.R.** Determination of denaturants in alcoholic toilet preparations. *Analyst*. 103, 1978, stránky 653-656.
- [32]. **Blake, A.J. a Glover, M.J.** Separation and thin-layer chromatographic determination of denatonium benzoate and other quaternary ammonium denaturants in spirituous preparations. *Analyst*. 97, 1972, str. 891.
- [33]. [Online] 2014. <http://www.cpsc.gov/PageFiles/96066/aversive.pdf>.
- [34]. [Online] 2014. http://www.matthey.com/innovation/history/bitrex_bitter_safe_sorry.
- [35]. [Online] 2014.
<http://www.szpi.gov.cz/docDetail.aspx?docid=1007496&docType=ART&nid=11816>.
- [36]. **Henderson, M.C., Neumann, C.M. a Buhler, D.R.** Analysis of denatonium benzoate in Oregon consumer products by HPLC. *Chemosphere*. 36, 1997, stránky 203-210.
- [37]. **Faulkner, A. a DeMontigny, P.** High- performance liquid chromatographic determination of denatonium benzoate in ethanol with 5% polyvinylpyrrolidone. *J. of chromatog. A*. 715, 1995, stránky 189-194.
- [38]. [Online] březen 2015. http://www.dm.drogeriemarkt.cz/cz_homepage/nove/nove_produkty/218708/denkmit_sklo.html.

7 Seznam použitých zkratk a symbolů

CE	Kapilární elektroforéza
CGE	Kapilární gelová elektroforéza
CID	Kolizní indukovaná disociace
CIEF	Kapilární izoelektrická fokusace
CITP	Kapilární izotachoforéza
CZE	Kapilární zónová elektroforéza
DAD	detektor s diodovým polem
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
EOF	Elektroosmotický tok
ESI	Ionizace elektrosprejem
HPLC	Vysokoučinná kapilární chromatografie
LOD	Limit detekce
LOQ	Limit kvantifikace
MEKC	Micelární elektrokinetická chromatografie
MS	Hmotnostní spektrometrie
MS/MS	Tandemová hmotnostní spektrometrie
MS ⁿ	Vícetupňová hmotnostní spektrometrie
pI	Izoelektrický bod
PTFE	Polytetrafluorethylen
QqQ	Trojité kvadrupól
SDS	Dodecylsírán sodný
SIM	Monitorování vybraného iontu
SRM	Monitorování vybrané reakce
UV-VIS	Ultrafialovo-viditelné spektrum