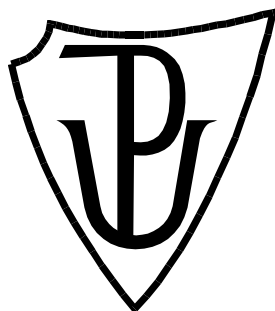


# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta  
Katedra analytické chemie



## Vývoj a aplikace metody stanovení karboxylových kyselin s využitím ion-párové reakce v kapilární elektroforéze s hmotnostní spektrometrií

### DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	<b>Jakub Hajný</b>
Studijní program:	N1407 Chemie
Studijní obor:	Analytická chemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>doc. RNDr. Vítězslav Maier, Ph.D.</b>
Konzultant:	RNDr. Martin Švidrnoch
Rok:	2016

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval/a samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním bakalářské práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byl/a jsem seznámen/a s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne

## **Poděkování**

Rád bych poděkoval svému školiteli doc. RNDr. Vítězslavu Maierovi, Ph.D., za všechny jeho cenné rady, připomínky, konzultace a za odborné vedení mé diplomové práce. Dále bych chtěl poděkovat RNDr. Martinu Švidrnochovi za trpělivost a motivaci, kterou mne zásoboval po celou dobu studia. V neposlední řadě děkuji rodině za podporu při strastech studia.

## **Bibliografická identifikace**

Jméno a příjmení autora	Jakub Hajný
Název práce	Vývoj a aplikace metody stanovení karboxylových kyselin s využitím ion-párové reakce v kapilární elektroforéze s hmotnostní spektrometrií
Typ práce	Magisterská
Pracoviště	Katedra analytické chemie
Vedoucí práce	doc. RNDr. Vítězslav Maier, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2016
Klíčová slova	Ion-párovací činidla, karboxylové kyseliny, kapilární elektroforéza, hmotnostní spektrometrie
Počet stran	50
Počet příloh	0
Jazyk	Český

## **Bibliographical identification**

Autor's first name and surname	Jakub Hajný
Title	Development and application of the method for determination of carboxylic acids using ion-pairing reagents by capillary electrophoresis coupled with mass spectrometry
Type of thesis	Master
Department	Department of analytical chemistry
Supervisor	doc.RNDr. Vítězslav Maier, Ph.D.
The year of presentation	2016
Keywords	Ion-pairing reagents, carboxylic acids, capillary electrophoresis, mass spectrometry
Number of pages	50
Number of appendices	0
Language	Czech

# Obsah

<b>1 Úvod</b>	<b>1</b>
<b>2 Teoretická část</b>	<b>2</b>
2.1 Kapilární zónová elektroforéza	2
2.2 Elektroosmotický tok	5
2.3 Instrumentace elektromigračních metod	9
2.3.1 Zdroj separačního napětí	10
2.3.2 Separační kapiláry	10
2.3.3 Dávkování vzorku	12
2.3.4 Detektory	12
2.4 Spojení kapilární zónové elektroforézy a hmotnostní spektrometrie	13
2.4.1 Iontový zdroj	14
2.4.1.1 Ionizace elektrosprejem	15
2.4.2 Hmotnostní analyzáto	17
2.4.2.1 Kvadrupolový analyzáto	19
2.4.2.2 Tandemová hmotnostní spektrometrie	19
2.4.3 Ion-párová činidla v analýze aniontů pomocí MS	21
2.4.3.1 Mechanismus ion-párové reakce	25
<b>3 Experimentální část</b>	<b>28</b>
3.1 Materiály a chemikálie	28
3.1.1 Chemikálie	28
3.1.2 Materiál	28
3.2 Přístrojové vybavení	29
3.3 Příprava standardů karboxylových kyselin a vzorku vína	29
3.4 Příprava pufru	30
3.5 Příprava pomocné sprejovací kapaliny	30
<b>4 Výsledky a diskuze</b>	<b>31</b>
4.1 Volba experimentálního přístupu pro nalezení vhodných podmínek ion-párové interakce	31
4.1.1 Vliv složení pufru na ion-párovou reakci	32
4.1.2 Studium vlivu kolizní energie	33
4.1.3 Studium vlivu koncentrace ion-párového činidla v pomocné sprejovací kapalině	34
4.1.4 Studium vlivu teploty a tlaku zamlžujícího plynu	34
4.1.5 Vliv sprejovacího napětí	35
4.1.6 Vliv průtoku pomocné sprejovací kapaliny	36

4.1.7 Dávkování vzorku	37
4.1.8 Shrnutí optimálních podmínek	38
4.2 Částečná validace stanovení karboxylových kyselin v pozitivním ionizačním módu	38
4.3 Vliv substituentů karboxylových kyselin na účinnost ionizace v pozitivním módu	41
4.4 Aplikace vyvinuté metody na reálný vzorek	44
<b>5 Závěr</b>	<b>46</b>
<b>6 Literatura</b>	<b>47</b>
<b>7 Seznam zkratk</b>	<b>50</b>

## **Abstrakt**

Tato diplomová práce se zabývá zlepšením analýzy aniontů, konkrétně karboxylových kyselin, hmotnostní spektrometrií díky komplexaci s ion-párovým činidlem v iontovém zdroji. Vzniklý kladně nabitý komplex analytu a ion-párového činidla lze, na rozdíl od standardní analýzy aniontů hmotnostní spektrometrií, analyzovat v pozitivním módu. Teoretická část práce se věnuje úvodu do chemie ion-párových činidel a bližšímu obeznámení s jejich fyzikálně-chemickými vlastnostmi. Součástí je i popis základních mechanismů a instrumentace kapilární elektroforézy s hmotnostní spektrometrií. Experimentální část je zaměřená na optimalizaci podmínek pro detekci aniontů pomocí CE-ESI-MS/MS v pozitivním módu. Pro porovnání byly také optimalizovány metody detekce aniontů pomocí CE-ESI-MS v negativním módu a CE-UV/VIS nepřímou detekcí. Optimalizovaná metoda byla aplikována na analýzu pyrohroznové a mléčné kyseliny ve vzorku vína.



## **Abstract**

This work is focused on the improving of anion analysis, specifically of carboxylic acids, by mass spectrometry through ion-pairing complexation in ion source. The resulting positively-charged complex of analytes and ion-pairing reagent could be detected in positive mode in contrast to standard anion analysis by mass spectrometry in negative mode. Theoretical part deals with introduction to the chemistry of ion-pairing reagents and with closer familiarization with their physicochemical properties. It also includes a basic description of mechanisms and instrumentation of capillary electrophoresis with mass spectrometry. The experimental part is aimed on optimizing conditions for anion detection using CE-ESI-MS/MS in positive mode. On account of comparing was also optimized anion detection by CE-ESI-MS in negative mode and CE-UV/VIS with indirect detection. The optimized method was applied on analysis of pyruvic and lactic acid in wine sample.

# 1 Úvod

Detekce a kvantifikace aniontů je důležitá v široké škále lidské činnosti. Mezi nejběžnější metody analýzy aniontů můžeme řadit např. iontovou chromatografii nebo elektroanalytické přístupy. Díky jejich náboji se také nabízí možnost jejich detekce pomocí hmotnostní spektrometrie. Pro analýzu látek iontové povahy se s oblibou využívá hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem (ESI-MS) ve spojení s vhodnou separační metodou. Ačkoliv spojení ESI-MS umožňuje analýzu jak v pozitivním, tak i v negativní módu, pozitivní mód bývá více preferován, díky jeho větší stabilitě a nižším detekčním limitům. Čím nižší je hodnota poměru  $m/z$  detekovaného iontu v negativní ionizaci tím je horší citlivost detekce. Při analýze iontů lze využít i kapilární zónovou elektroforézu (CZE), kde lze separovat kationty i anionty v jedné analýze. Naproti tomu volba iontoměniče v iontové výměnné chromatografii závisí na povaze separovaných iontů.

Abychom se při analýze aniontů pomocí CZE-ESI-MS vyhnuli negativnímu módu, lze do pomocné sprejovací kapaliny přidat malé množství chaotropního organického kationtu (kationtové ion-párové činidlo), který je schopen tvořit s aniontem pozitivně nabitý iontový pár s vyšší hodnotou poměru  $m/z$ . Koncentrace kationtového ion-párového činidla v pomocné sprejovací kapalině se pohybuje řádově v desítkách  $\mu\text{mol/l}$  a je možné ho přivádět na konec separační kapiláry, kde se míchá s eulátem. Tímto není ovlivněna samotná separace. Vzniklý pozitivně nabitý iontový pár je možné detekovat v pozitivním módu ESI ionizace. Mezi hlavní výhody tohoto přístupu patří: zvýšení citlivosti a snížení limitů detekce široké škály aniontů s nízkou molekulovou hmotností. Rozdíly ve struktuře a povaze použitých kationtových ion-párových činidel mohou ovlivnit stabilitu vzniklých komplexů, účinnost ESI ionizace v pozitivním módu a tím i výsledný limit detekce.

Cílem této práce je vyvinout metodu CZE-ESI-MS/MS analýzy aniontů vybraných karboxylových kyselin s využitím ion-párové reakce s kationtovým ion-párovým činidlem, studovat vliv experimentálních parametrů na citlivost odezvy detektoru u jednotlivých karboxylových kyselin. V závěru pak vyvinutou metodiku aplikovat na analýzu karboxylových sloučenin na reálných vzorcích.



## 2 Teoretická část

### 2.1 Kapilární zónová elektroforéza

Kapilární zónová elektroforéza (CZE) je vysoce účinná separační technika, založená na rozdílné pohyblivosti iontů v elektrickém poli. Na kulový ion působí v křemenné kapiláře dvě síly: síla odporová (frikční)  $F_f$  (1) a síla elektrická  $F_e$  (2) [1]:

$$-F_f = 6\pi\eta r v \quad (1)$$

$$F_e = Eq \quad (2)$$

kde  $\eta$  je dynamická viskozita prostředí,  $r$  je efektivní poloměr iontu (včetně solvatačního obalu),  $v$  je rychlost pohybu iontu,  $E$  je intenzita elektrického pole a  $q$  je náboj daného iontu.

V ustáleném stavu jsou obě síly v rovnováze a pomocí rovnosti obou sil je možné definovat elektroforetickou mobilitu  $\mu_e$ . Elektroforetická mobilita (3) je základní veličina charakterizující pohyb nabitě částice pohybující se rychlostí  $v_e$  ve stejnosměrném elektrickém poli o intenzitě  $E$  [2]:

$$v_e = \mu_e E \quad (3)$$

Elektroforetická mobilita (4) je definována dle vztahu:

$$\mu_e = \frac{q}{6\pi\eta r} \quad (4)$$

z kterého je patrné, že elektroforetická mobilita je přímo úměrná náboji iontu  $q$  a nepřímo úměrná jeho velikosti (kulový iont o efektivním poloměru  $r$ ). Obecně ionty s menším efektivním poloměrem se budou pohybovat rychleji než ionty s větším efektivním

poloměrem. Stejně tak, vícenásobné ionty se budou pohybovat rychleji než ionty s menším počtem nábojů. Ze vztahu je patrný také vliv prostředí, ve kterém se ionty pohybují a jelikož hodnota viskozity  $\eta$  je závislá na teplotě, bude rovněž elektroforetická mobilita ovlivňována změnou teploty (s rostoucí teplotou se bude zvyšovat) [1].

Elektroforetická mobilita je pro daný iont, za předpokladu úplné disociace ( $\alpha = 1$ ) a extrapolace k nulové iontové síle, tabelovanou fyzikální konstantou. V praxi je značně obtížné tyto podmínky splnit, tudíž je nutno definovat efektivní mobilitu  $\mu_{ef}$  (5), která vyjadřuje rychlost pohybu iontu v elektrickém poli o jednotkové intenzitě v daném prostředí [1]:

$$u_{ef} = \alpha u_e \quad (5)$$

Efektivní mobilita  $\mu_{ef}$  je silně závislá na pH a složení pracovního elektrolytu. Je nutno si uvědomit, že migrace látek je značně závislá na jejich disociaci, která způsobuje, že v dynamické rovnováze jsou nabitě i nenabitě formy dané látky [2].

Z experimentálních výsledků je možno určit tzv. zdánlivou mobilitu  $\mu_{av}$  (6), která je vektorovým součtem elektroforetické mobility  $\mu_e$  a elektroosmotické mobility  $\mu_{eof}$ , která vzniká v důsledku elektroosmotického toku [3]:

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

V elektromigračních metodách je měřenou veličinou tzv. migrační čas  $t_m$  (7), který je možné vypočítat pomocí následujícího vztahu:

$$t_m = \frac{lL}{\mu_{av}U} = \frac{l}{(\mu_e + \mu_{eof})E} \quad (7)$$

Kromě již dříve zmíněných veličin, ve vztahu (7) figuruje celková délka kapiláry  $L$  a efektivní délka kapiláry  $l$  (délka kapiláry od místa nástřiku vzorku po detektor). Z tohoto vztahu vyplývá možnost ovlivnění migračního času nejen délkou kapiláry, ale také velikostí

intenzity elektrického pole (vložené separační napětí). Čím tedy bude intenzita elektrického pole větší a délka kapiláry menší, tím rychleji bude analyt migrovat. Migrační čas je také významně ovlivněn příspěvkem elektroforetické mobility dané látky a elektroosmotickým tokem. Elektroosmotický tok je však pouze jednou z hybných sil, přispívající k celkové rychlosti migrace iontu. Zvyšování rychlosti elektroosmotického toku se může negativně projevit na současném snížení rozlišení [3].

Mezi základní veličiny popisující kvalitu separace v CZE patří účinnost separace a rozlišení [4]:

- Účinnost separace: Z termodynamického hlediska je CZE nerovnovážnou technikou, tudíž její separační mechanismus není dán rozdělovací rovnováhou. Přesto je její míra účinnosti, podobně jako u GC nebo HPLC, vyjádřena počtem teoretických pater  $N$ . Počet teoretických pater je vyjádřen vztahem (8):

$$N = \frac{\mu_{av}El}{2D_i t} \quad (8)$$

kde jedinou doposud nezmiňovanou veličinou je difúzní koeficient  $D_i$ .

Ze vztahu (8) je patrné, že čím bude vyšší hodnota difúzního koeficientu vyšší, tím nižší účinnosti separace bude pro daný iont dosaženo

- Rozlišení: charakterizuje míru separace dvojice látek a je definováno vztahem (9):

$$R = \frac{2(t_2 - t_1)}{(w_2 + w_1)} \quad (9)$$

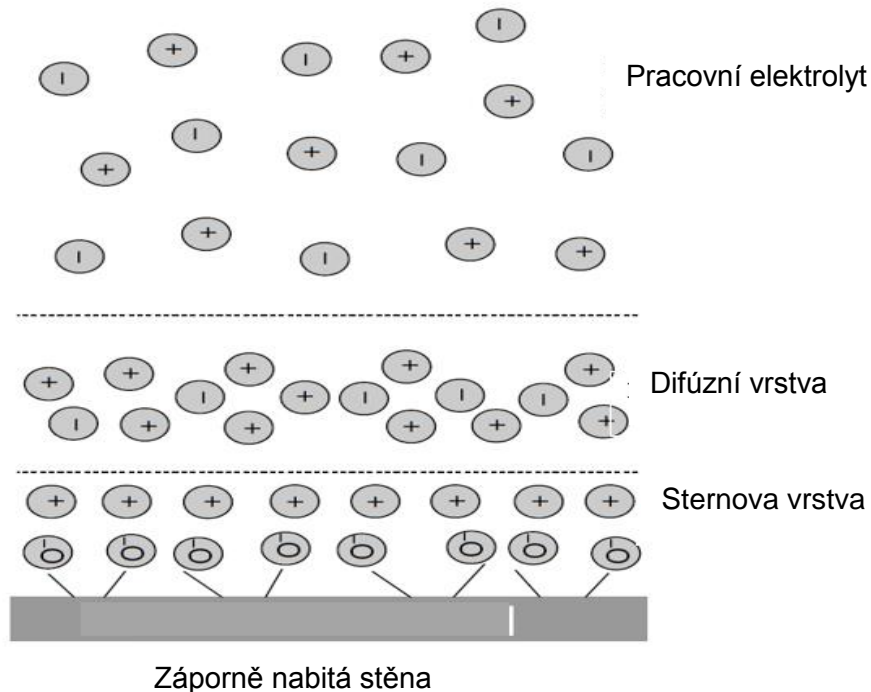
Pro CZE lze předpokládat, že ke ztrátě účinnosti (rozšiřování separovaných zón) dochází pouze díky podélné difúzi. Tento idealizovaný popis bohužel pro reálné systémy nepostačuje a k rozšiřování píku přispívají i jiné zdroje, uvedené přehledně v Tab. 1.

Tab. 1 Zdroje způsobující rozšiřování separovaných zón. Převzato a upraveno z [1].

Příspěvek k rozšiřování zóny	Komentář
Longitudinální difúze	Určuje limit účinnosti; Analyty s nižšími difúzními koeficienty poskytují užší zóny
Joulovo teplo	Vede k radiálnímu tepelnému gradientu a parabolickému profilu toku kapaliny
Délka dávkované zóny vzorku	Délka dávkované zóny by měla být taková, aby nebyla negativně ovlivněna difúzí
Adsorpce vzorku	Interakce analytu s povrchem kapiláry obvykle způsobuje tzv. chvostování píků
Rozdílné vodivosti analytu a pufru	Rozdílné vodivosti vedou k deformacím píků (např. chvostování)
Výškově nevyrovnané zásobníky pufrů	Generují laminární tok

## 2.2 Elektroosmotický tok

Důležitým transportním jevem v elektromigračních metodách je elektroosmotický tok (EOF), který se projevuje jako tok kapaliny uvnitř separační kapiláry. Tento tok vzniká při aplikaci stejnosměrného elektrického pole napříč kapilárou, díky přítomnosti silanolových skupin na povrchu křemenné kapiláry. Silanolové skupiny mají  $pK \sim 3$  a při kontaktu s pracovním elektrolytem, o vhodném pH, jsou schopné disociace. Při vyšším pH vede disociace těchto skupin ke vzniku záporně nabitého povrchu uvnitř kapiláry. Je zřejmé, že čím vyšší pH pracovního elektrolytu zvolíme, tím rychlejší EOF bude. Naopak při  $pH < 2$ , je jen málo silanolových skupin disociováno a tudíž se bude rychlost EOF blížit k nule. Záporně nabitý povrch kapiláry je dle zákona o elektroneutralitě kompenzován kladnými ionty z pracovního elektrolytu, které těsně u povrchu kapiláry tvoří elektrickou dvojvrstvu. Pro vznik elektrické dvojvrstvy je potřeba buď adsorpce iontů na stěnu kapiláry, nebo disociace již zmíněných silanolových skupin. Vzniklá elektrická dvojvrstva se skládá z nepohyblivé Sternovy vrstvy (výsledek interakce mezi povrchovým nábojem kapiláry a ionty s opačným nábojem) a difúzní vrstvy, která je díky slabším interakcím pohyblivá (Obr. 1). Elektrická dvojvrstva je charakterizována určitým potenciálem, který se nazývá *zeta* potenciál, ( $\zeta$ ). Při aplikaci stejnosměrného napětí se kationty pohybují směrem ke katodě a díky solvataci kationtů je strháván i zbytek elektrolytu (včetně neutrálních částic) [4,5].



Obr. 1 Grafické znázornění elektrické dvojvrstvy, skládající se ze Sternovy a difúzní vrstvy. Převzato a upraveno z [4].

Rychlost elektroosmotického toku lze vyjádřit vztahem (10):

$$v_{eof} = \mu_{eof} E \quad (10)$$

kde  $\mu_{eof}$  je elektroosmotická mobilita a  $E$  je intenzita elektrického pole.

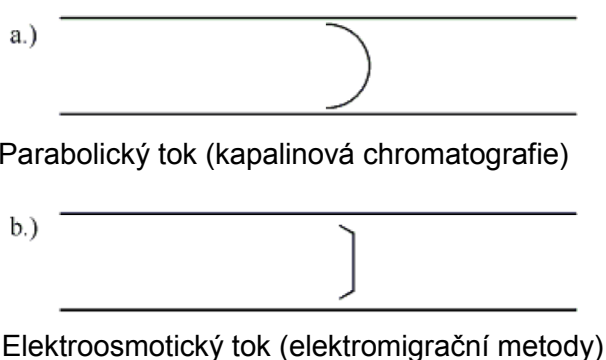
Podobně lze  $\mu_{eof}$  vyjádřit pomocí vztahu (11), z kterého je patrné, že elektroforetická mobilita je přímo úměrná relativní permitivitě rozpouštědla  $\epsilon_r$  (v němž je separace prováděna), zeta potenciálu  $\zeta$  a nepřímo úměrná viskozitě prostředí  $\eta$ :

$$\mu_{eof} = \frac{\epsilon_r \zeta}{4\pi\eta} \quad (11)$$



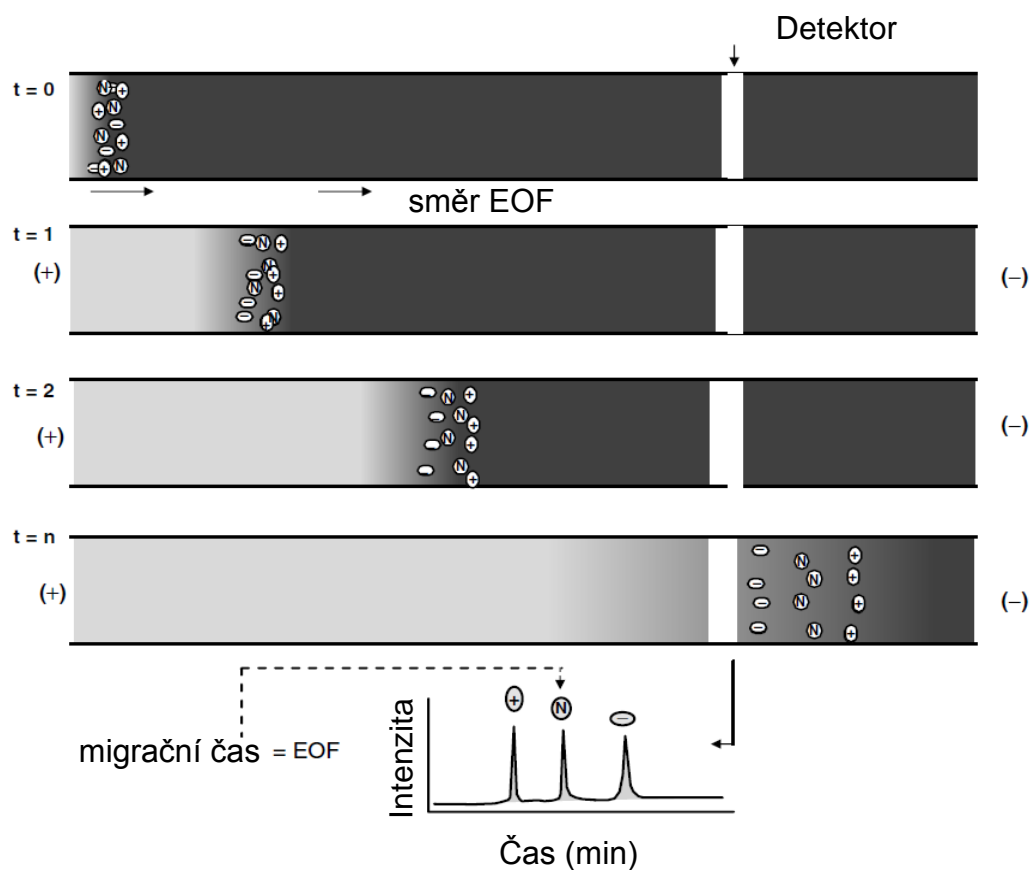
EOF může představovat jak pozitivní, tak i negativní příspěvek k analýze pomocí CZE. EOF může separaci urychlit, ale příliš rychlý EOF může separaci zhoršit. Z toho plyne, že je nutno nejen EOF ovlivňovat, ale je nutné mít i představu, jaká je elektroosmotická mobilita za určitých podmínek. K měření mobility EOF slouží tzv. EOF markery, což jsou neutrální látky rozpustné v prostředí pracovního elektrolytu. Tyto markery jsou unášeny EOF k detektoru. Odečtením migračního času neutrálního markeru ze získaného elektroferogramu, lze vypočítat elektroosmotickou mobilitu. Mezi nejčastěji užívané markery patří např. benzen, mesityloxid, aceton, močovina, ale i voda. Výběr konkrétního markeru závisí na typu detektoru [4].

Unikátní vlastností EOF je plošný profil toku kapaliny v kapiláře, který je umožněn malými vnitřními rozměry kapiláry (vnitřní průměr do 100  $\mu\text{m}$ ). Naopak ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii je hnací silou tlak, zprostředkovaný pumpou. Tlak způsobuje parabolickou deformaci profilu toku kapaliny v koloně, což může vést k rozšiřování separovaných zón a tím k snížení účinnosti [6]. Srovnání profilů toku kapaliny separačním ložem pro elektromigrační techniky a kapalinovou chromatografií je uveden na Obr. 2.



Obr. 2 Porovnání profilů toku kapaliny v HPLC (parabolický tok) a v CE (elektroosmotický tok). Převzato a upraveno z [7].

Schéma separace směsi pozitivně a negativně nabitých analytů spolu s neutrálními látkami je uvedeno na Obr. 3.



Obr. 3 Pohyblivost nabitých a nenabitých molekul v separační kapiláře při aplikaci stejnosměrného napětí. Převzato a upraveno z [4].

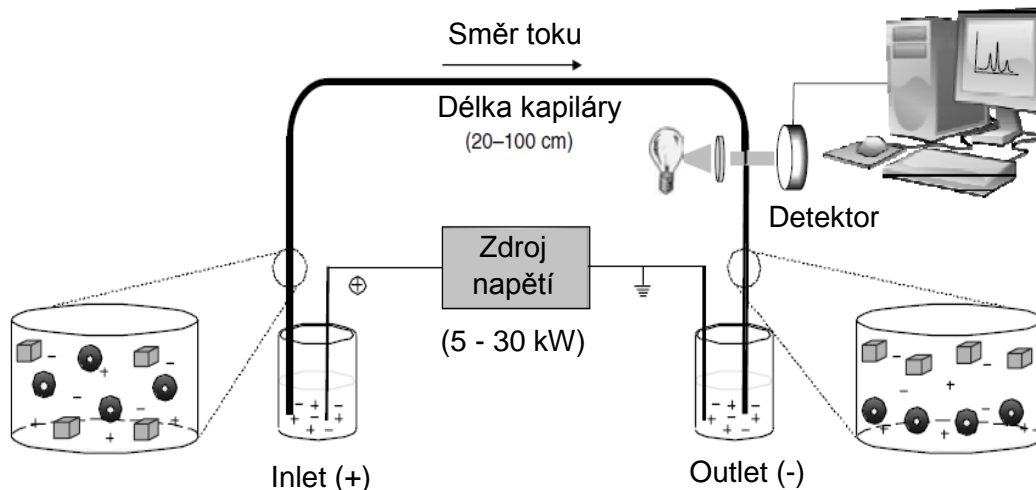
Možnosti ovlivnění rychlosti a směru EOF jsou uvedeny přehledně v Tab 2.

Tab. 2 Vliv proměnných parametrů na EOF. Převzato a upraveno z [1], dále doplněno o poznatky z [4].

Proměnná	Výsledek	Komentář
Intenzita elektrického pole	Rychlost EOF se mění úměrně s intenzitou elektrického pole	Při zvyšování roste Joulovo teplo; snižování může negativně ovlivnit účinnost
pH pufru	Rychlost EOF klesá při nízkém pH a roste při pH vyšším	Může ovlivňovat náboj analytu
Iontová síla pufru	Zvyšující se iontová síla způsobuje stlačení elektrické dvojvrstvy a tím klesá $\zeta$ potenciál - pokles EOF	Vysoká iontová síla generuje vysoký proud a tím Joulovo teplo; nízká iontová síla může zapříčinit adsorpci vzorku; může dojít k deformaci píku vlivem rozdílné vodivosti pufru a vzorku
Teplota	Změny EOF v důsledku změn viskozity	Nutnost termostatování kapiláry
Organická aditiva	Mění $\zeta$ potenciál, viskozitu elektrolytu a solvataci analytu	Změna permitivity prostředí a může ovlivnit selektivitu separace
Tenzidy	Adsorpci na stěnu kapiláry se mění povrchový náboj	Aniontové tenzidy zvyšují EOF; kationtové tenzidy EOF snižují, případně obrazejí (v závislosti na koncentraci)
Neutrální hydrofilní polymery	Adsorbují se na povrch kapiláry, kde odstiňují povrchový náboj a zvyšují viskozitu (klesá EOF)	např. polyvinylalkohol, estery celulózy nebo glykol (např. PEG)
Kovalentní pokrytí stěny kapiláry	EOF se mění v závislosti na náboji a polaritě pokrytí	Problematická může být stabilita pokrytí; možné mnohé modifikace pokrytí

### 2. 3 Instrumentace elektromigračních metod

Základní schéma kapilární elektroforézy je uvedeno na Obr. 4. Základními komponenty jsou zdroj vysokého napětí, separační kapilára, elektrody spojené v obvodu se zdrojem vysokého napětí, zásobníky pufru a detektor. Nezbytným prvkem instrumentace je termostat separační kapiláry (i když není znázorněn na Obr. 4) jehož vliv je kritický na účinnost a reprodukovatelnost separací [4]



Obr. 4 Obecné schéma CE instrumentace. Převzato a upraveno z [4].

### 2.3.1 Zdroj separačního napětí

V elektromigračních metodách je základní hybnou silou, zprostředkovávající separaci, stejnosměrné elektrické napětí. Nejčastěji se napětí pohybuje okolo 0-30 kV a hodnoty procházejícího proudu v jednotkách až desítkách  $\mu\text{A}$ . U zdroje napětí je požadována stabilní regulace napětí ( $\pm 0,1\%$ ) k dosažení opakovatelnosti migračních časů. Napětí je vhodné vkládat mezi elektrody postupným zvyšováním, čímž je možno eliminovat vznik vzduchových bublin. Vzduchové bublinky jsou důsledkem rychle vznikajícího Joulova tepla, které není chladičím systémem schopen účinně odvádět [1,5].

Zdroj napětí by měl mít schopnost přepínat polaritu. Je-li EOF obrácen (např. v důsledku kationtového pokrytí vnitřní stěny kapiláry), je nezbytné změnit směr intenzity elektrického pole obrácením polarity elektrod.

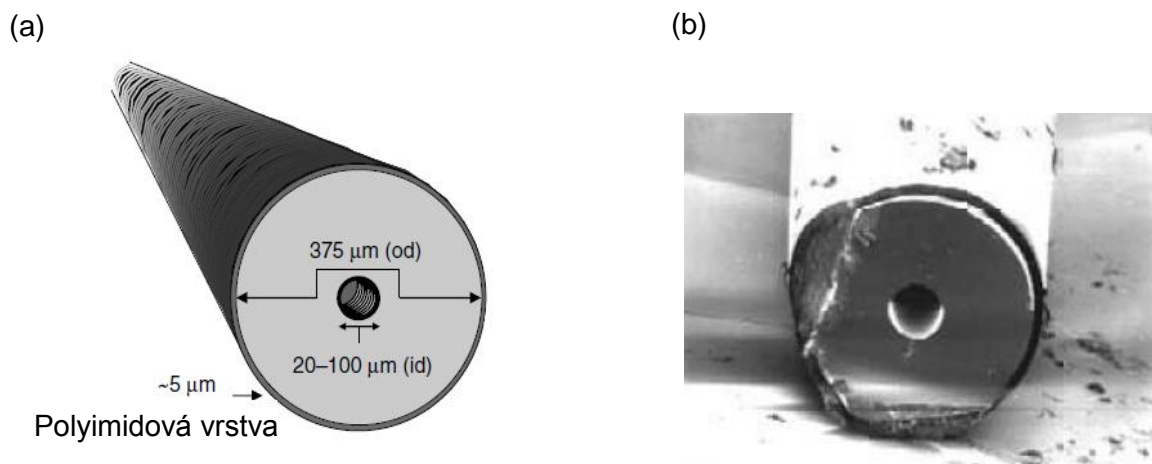
### 2.3.2 Separační kapiláry

Jedná se o hlavní součást instrumentace, ve které probíhá samotná separace. Ideální vlastnosti materiálu pro výrobu kapilár zahrnuje chemickou a elektrickou inertnost, transparentnost pro UV/VIS záření, flexibilitu, robustnost a nízkou výrobní cenu. Většinu těchto parametrů pak splňují křemenné kapiláry. Pro zlepšení mechanické odolnosti

a ohebnosti jsou kapiláry potahované polyimidem. Pro optickou detekci je nutno polyimidovou vrstvu v místě detekce odstranit. Vnitřní průměr kapiláry je nejčastěji 50 - 100  $\mu\text{m}$ , ale komerčně je dostupná celá řada kapilár o různých vnitřních i vnějších rozměrech.

Tyto parametry jsou velmi důležitou charakteristikou, neboť při aplikaci separačního napětí dochází k vzrůstu teploty a vzniká tzv. Joulovo teplo. Toto teplo je generováno průchodem elektrického proudu kapilárou. Teplota uvnitř kapiláry je určena vodivostí pufru a velikostí aplikovaného napětí. Generování Joulovo tepla může být zdrojem problémů, jelikož způsobuje neuniformní teplotní gradient, lokální změny viskozity a následné rozšiřování píků.

Tomuto problému se lze vyhnout vhodně zvolenou kapilárou, jejíž parametry umožní účinně odvádět vznikající teplo. U spektrofotometrické detekce je výhodnější použít kapiláru s větším vnitřním průměrem, protože dle Lambert - Beerova zákona je absorbance přímo úměrná délce optické dráhy. V praxi se větší průměr kapiláry projeví lepší citlivostí detekce, ovšem také může negativně přispět k rozšiřování zón analytu [1]. Schematické znázornění kapiláry a zobrazení reálné kapiláry pomocí elektronového mikroskopu je zobrazen na obr. 5.



Obr. 5 Křemenná kapilára. (a) Znázorňuje konec kapiláry. (b) Sken konce kapiláry pomocí elektronového mikroskopu. Převzato a upraveno z [4].

### **2.3.3 Dávkování vzorku**

Existují dva základní přístupy dávkování vzorku do kapiláry - hydrodynamická nebo elektrokinetická injekce. Nejvíce rozšířená hydrodynamická injekce je založena na tlakových rozdílech mezi konci kapiláry. Tohoto tlakového rozdílu může být dosaženo více způsoby: např. aplikací tlaku na dávkovací konec kapiláry, působením vakua na výstupní konec kapiláry nebo nasáváním vzorku, způsobeným rozdílnou výškou obou zásobníků. S hydrodynamickou injekcí je kvantita nadávkovaného vzorku téměř nezávislá na matici vzorku, pouze přihlédnutím k fyzikálním vlastnostem vzorku (např. viskozita) [2].

Elektrokinetická injekce je zprostředkována nahrazením jednoho zásobníku roztokem vzorku a poté je aplikováno napětí. Napětí je obvykle 3 - 5 krát menší než napětí užívané k separaci. V elektrokinetickém dávkování analyt ve vzorku vstupuje do kapiláry pomocí migrace i s pomocí EOF. Nadávkované množství každého analytu je závislé na elektroforetické mobilitě individuálních složek vzorku. Diskriminace nastává v případě iontových sloučenin, jelikož ionty s vyšší mobilitou jsou dávkovány ve větší míře oproti iontům s nižší mobilitou [1,2].

### **2.3.4 Detektory**

Podstatnou částí instrumentace je detektor separovaných zón analytů. Detektory jsou voleny na základě charakteristických vlastností analyzované látky, aby byla dosažena co nejvyšší citlivost a co nejvíce analytických informací [1]. Přehled běžných detekčních metod pro elektromigrační metody s uvedenými detekčními limity je uveden v Tab. 3.

Tab. 3 Přehled detekčních metod pro CE. Převzato a doplněno z [1,4].

Detekční technika	Limit detekce [mol/l]	Komentář	Reference
UV-Vis absorpce	$10^{-12} - 10^{-15}$	Univerzální; diodové pole nabízí spektrální informace	[8]
Fluorescence	$10^{-15} - 10^{-17}$	Citlivá; většinou vyžaduje derivatizaci vzorku	[9]
Laserem indukovaná fluorescence	$10^{-18} - 10^{-20}$	Velmi citlivá; obvykle vyžaduje derivatizaci vzorku	[10]
Amperometrie	$10^{-18} - 10^{-15}$	Citlivá; selektivní, ale aplikovatelná pouze na elektroaktivní analyty	[11]
Konduktometrie	$10^{-15} - 10^{-16}$	Univerzální	[12]
Hmotnostní spektrometrie	$10^{-16} - 10^{-17}$	Citlivá; poskytuje strukturální informace; komplikovaný interface mezi CE a MS	[13]
Nepřímá UV, amperometrie a fluorescence	10 – 100 krát nižší než přímé metody	Univerzální; nižší citlivost než u přímých metod	[14,15]

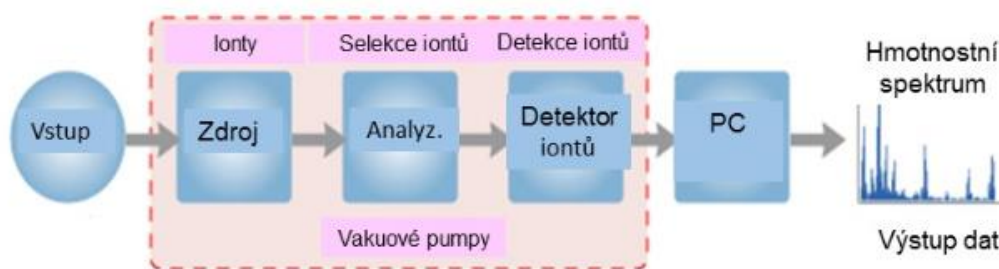
## 2.4 Spojení kapilární zónové elektroforézy a hmotnostní spektrometrie

Při kombinaci CZE s UV-VIS detekcí nelze dosáhnout vysoké citlivosti detekce kvůli velmi krátké délce optické dráze, kterou představuje průměr kapiláry. Analyzované látky navíc nemusí vždy absorbovat v UV-VIS oblasti. Naproti tomu hmotnostní spektrometrie, zejména pak tandemová (MS, resp. MS/MS), poskytuje informace použitelné k určení struktury detekovaných analytů. Navíc je také mnohonásobně citlivější detekční technikou oproti UV-VIS detekci.

Spojení CZE-MS má široký potenciál v separaci, identifikaci a kvantifikaci široké škály analytů v komplexních vzorcích. Omezení jedné techniky je vyváženo vlastnostmi techniky druhé. Například analyty, které mají stejnou hodnotu poměru  $m/z$ , mohou být v MS odlišeny až po jejich separaci pomocí CZE. Opačně, při koeluci analytů v CZE lze tyto analyty odlišit v MS na základě rozdílných hodnot poměru  $m/z$ , případně mohou též poskytovat odlišné fragmenty v tandemové hmotnostní spektrometrii (MS/MS) [1,4].

Hmotnostní spektrometrie je analytická technika využívající různých mechanismů separace a detekce iontů nebo jejich fragmentů dle poměru jejich hmotnosti a náboje ( $m/z$ ).

Hmotnostní spektrometr se skládá z iontového zdroje, iontové optiky, hmotnostního analyzátoru, detektoru a vakuových čerpadel (Obr. 6).



Obr. 6 Obecné uspořádání hmotnostního spektrometru. Převzato a upraveno z [16].

### 2.4.1 Iontový zdroj

Výběr iontového zdroje je nutno volit s ohledem na vlastnosti analytů, které chceme analyzovat (zejména polarita, teplotní stálost a molekulová hmotnost) nebo s ohledem na typ informace, kterou požadujeme. Tvrdé ionizační techniky jsou vhodné pro těžké analyty o relativně nízké molekulové hmotnosti. Např. u ionizace elektronem (EI) dochází k bohaté fragmentaci, čímž získáme informaci o struktuře látky, ale je nutné brát v potaz i riziko tepelné degradace stanovovaných látek. Přehled nejvyužívanějších ionizačních technik je uveden v Tab. 4.



Tab. 4 Přehled ionizačních technik užívaných v hmotnostní spektrometrii. Převzato a upraveno z [18].

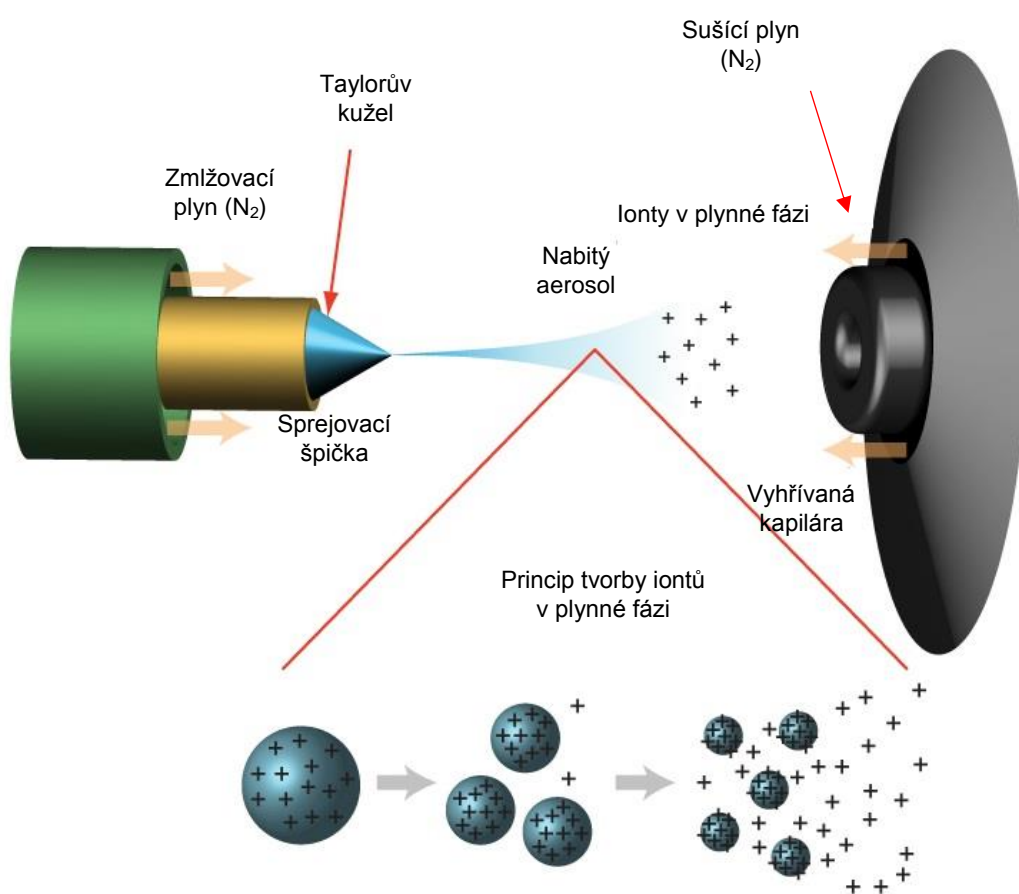
Metoda	Zkratka	Forma analytu	Vlastnosti iontu	Komentář
Elektronová ionizace	EI	Plynná fáze	Lichý počet elektronů (iontové radiály)  Tvrdá ionizace (vysoká vnitřní energie iontu)	Vysoká reprodukovatelnost  Vhodná pro menší organické molekuly ve spojení s plynovou chromatografií
Chemická ionizace	CI (např. APCI)	Plynná fáze	Sudý počet elektronů (adukty iontů)  Měkká ionizace	Dobrá kontrola vnitřní energie  Vhodná pro nepolární molekuly
Ionizace sprejováním	SI (termosprej, elektrosprej, nanosprej)	Kapalná fáze (roztok)	Sudý počet elektronů (adukty iontů)  Měkká ionizace	Nejměkčí dostupná ionizace  Vícenásobně nabitě ionty  Pomocí ESI lze ionizovat větší biomolekuly (např. proteiny)
Ionizace desorpce	DI (SIMS, MALDI, LDI, DESI)	Pevná fáze (povrch)	Sudý počet elektronů (adukty iontů)  Zřídka lichý počet elektronů  Měkká ionizace	Kompatibilní s dávkováním vzorku z povrchu  Aplikovatelná v povrchové analýze a v MALDI zobrazování. Pomocí MALDI lze ionizovat větší biomolekuly (např. proteiny)

Měkké ionizační techniky naopak nabízí menší fragmentaci, spojenou obvykle s omezeným získáním informací o struktuře látky. Pro elektromigrační metody se nejvíce osvědčila ionizace elektrosprejem (ESI). ESI pokrývá možnosti ionizace širokého rozsahu analytů včetně látek netěkavých i tepelně nestálých [17].

#### 2.4.1.1 Ionizace elektrosprejem

ESI je obecně uskutečněno sprejováním roztoku analytu, eluujícího z křemenné separační kapiláry, přes sprejovací špičku po vložení vysokého napětí. Elektrické pole potřebné pro vznik elektrospreje je zprostředkováno mezi špičkou sprejovací kapiláry a protielektrody. Na konci sprejovací kapiláry dochází k tvorbě nabitých kapiček, které mají nadbytek pozitivního nebo negativního náboje (v závislosti na módu sprejování - pozitivní

nebo negativní mód). Ionty ve vzniklých nabitých kapičkách na sebe vzájemně působí elektrostatickou repulzí a při překonání hodnoty povrchového napětí dojde ke vzniku tzv. Taylorova kužele a tím dochází ke sprejování nabitého aerosolu. Následně se nabité kapky aerosolu zmenšují v důsledku odpařování rozpouštědla. Zmenšováním kapek aerosolu se zvyšuje na jeho povrchu hustota náboje a po překročení tzv. Rayleighovy meze stability nastává Coulombická exploze a tím i emise menších vysoce nabitých kapiček, z kterých se uvolňují ionty do plynné fáze [17]. Ilustrace vzniku elektrospreje je zobrazena na Obr. 7.

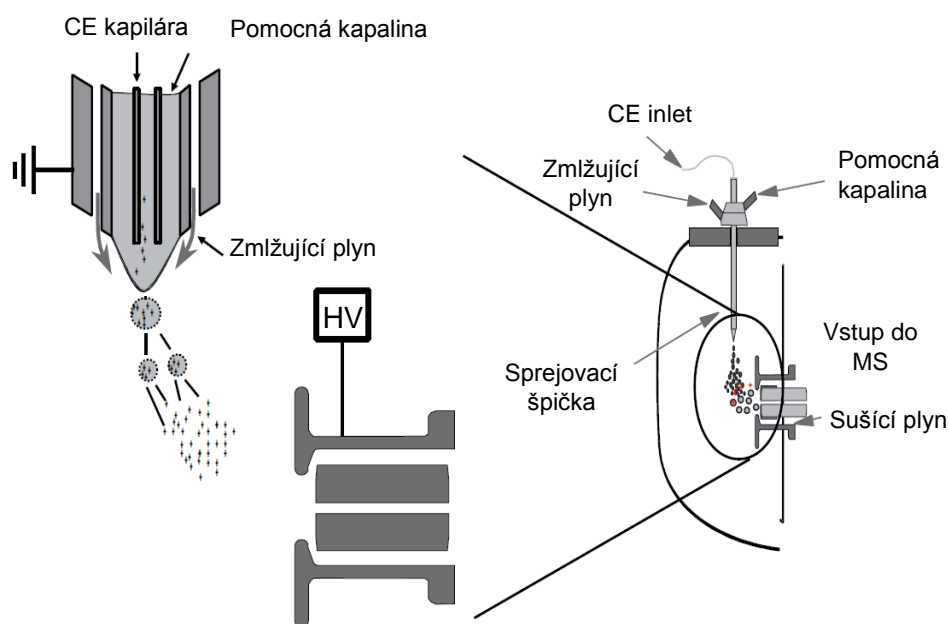


Obr. 7 Schéma ionizace elektrosprejem (ESI). Převzato a upraveno z [19].

Spojení CZE-ESI-MS není triviální a přináší proto několik technických úskalí. Mezi hlavní problémy patří požadavek na uzavřený elektrický obvod pro elektroforetickou separaci a elektrický kontakt pro účinnou ionizaci nejčastěji s pomocí elektrospreje. Pracovní pufrý běžně užívané v CZE, např. fosfátové nebo borátové, jsou kvůli jejich nedostatečné těkavosti nekompatibilní s ESI-MS. Tyto pufrý je nutno nahradit těkavějšími pufrý jako jsou acetátové

nebo formiátové. Nicméně tato změna pufru může mít negativní dopad na kvalitu separace [1,4].

Při spojení elektromigračních metod s ESI-MS je k dosažení stabilního elektrospreje nutná přítomnost pomocné kapaliny - tzv. sheath - flow interface. Rychlost průtoku eluátu z kapiláry je totiž nedostatečná – řádově desítky nl/min. Technicky je možný i tzv. sheathless interface např. pomocí nanoelektrospreje, kterým se lze vyhnout ředění analytu pomocnou kapalinou (dosažení větší citlivosti). Ten však je úzce spjat s daleko náročnější realizací a optimalizací [17]. Nejčastější komerční spojení elektromigračních metod s ESI-MS se dnes uskutečňuje s pomocí ortogonálního uspořádání iontového zdroje, kde je zajištěna největší výtěžnost transferu vzniklých iontů v elektrospreji do hmotnostního analyzátoru (Obr. 8).



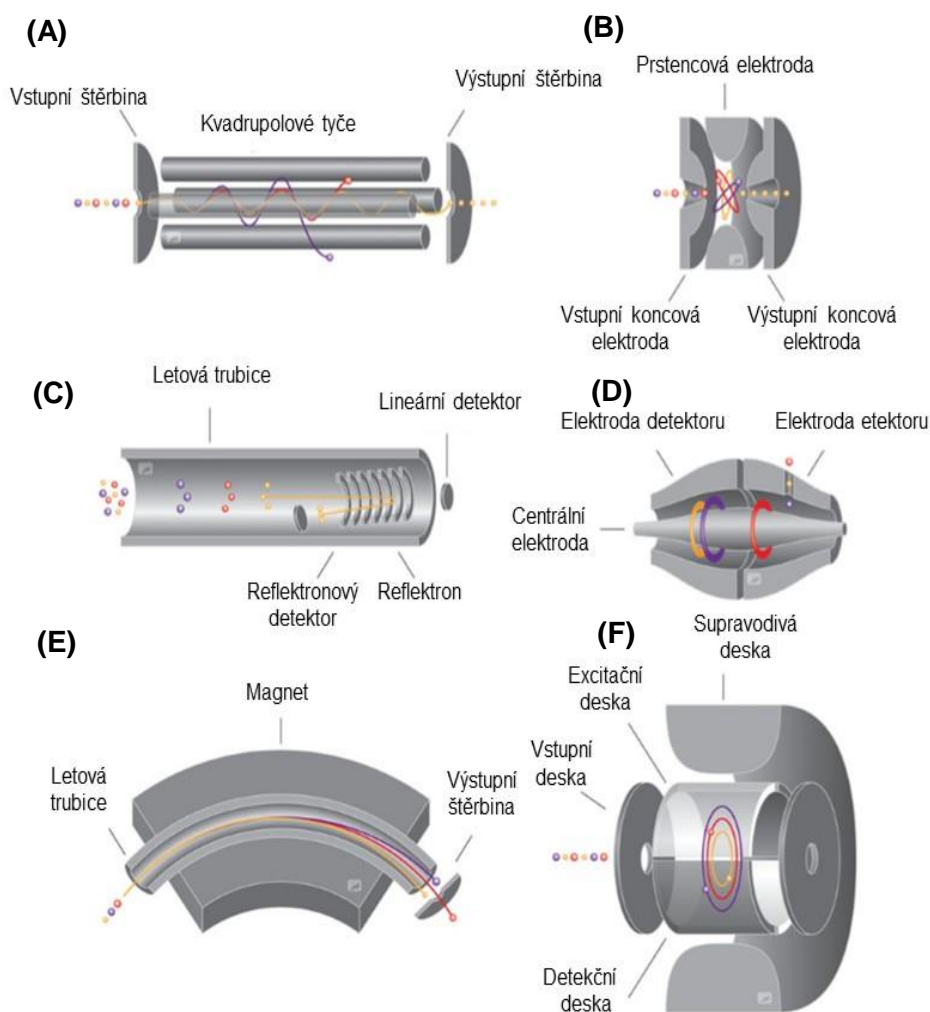
Obr. 8 Ortogonální uspořádání CE-ESI-MS s výhodou odklonění nenabitých balastních látek mimo iontový zdroj. Převzato a upraveno z [20].

## 2.4.2 Hmotnostní analyzátoři

Hmotnostní analyzátoři jsou část instrumentace, která je zodpovědná za separaci iontů vzniklých v iontovém zdroji v plynné fázi za vakua dle jejich poměru  $m/z$ . Na hmotnostní analyzátoři jsou přiváděny ionty vzniklé v iontovém zdroji. Dělení iontů dle poměru  $m/z$  lze dosáhnout na základě různých fyzikálních principů [21]:

- Zakřivení dráhy iontů v magnetickém nebo elektrickém poli (sektorový analyzátor).
- Různá stabilita oscilací iontů kombinací stejnosměrného a vysokofrekvenčního střídavého napětí – kvadrupól (Q), iontová past (IT).
- Rozdílná doba pohybu iontů v definovaném prostoru (analyzátor doby letu - TOF).
- Odlišná frekvence harmonických oscilací (orbitrap).
- Různá absorpce energie při cykloidálním pohybu iontů v homogenním magnetickém poli (iontová cyklotronová rezonance - ICR).

Schématu principů jednotlivých analyzátorů jsou uvedeny na Obr. 9.



Obr. 9 Schematický popis hmotnostních analyzátorů pro hmotnostní spektrometrii, které jsou v současné době dostupné na trhu. **A** Kvadrupól (Q), **B** Iontová past (IT), **C** Průletový analyzátor (TOF), **D** Orbitrap (OT), **E** Sektorový analyzátor (S), **F** Iontová cyklotronová rezonance (ICR). Převzato a upraveno z [18].

### 2.4.2.1 Kvadrupolový analyzátor

Kvadrupolový analyzátor se skládá ze čtyř paralelních tyčí (nejlépe hyperbolického průřezu). Na dvě protilehlé je vloženo kladné stejnosměrné napětí a na zbývající dvě naopak záporné stejnosměrné napětí. Zároveň je na všechny tyče superponováno vysokofrekvenční střídavé napětí [21].

Ionty, z iontového zdroje, jsou vedeny do středu osy kvadrupólu, kde začnou oscilovat. V daný časový okamžik jsou pro určitý poměr hodnot stejnosměrného napětí  $U$  a amplitudy  $V$  stabilní pouze oscilace pro iont s určitou hodnotou poměru  $m/z$ . Tento iont projde kvadrupólem a dostane se na detektor, všechny ostatní ionty jsou vybity na tyčích kvadrupólu. Plynulou změnou hodnot  $U$  a  $V$  (při zachování jejich konstantního poměru) jsou postupně propuštěny na detektor všechny ionty.

V praxi je kvadrupolový analyzátor, navzdory nízké rozlišovací schopnosti, oblíben díky vysoké skenovací rychlosti, jednoduchosti a nízké ceně.

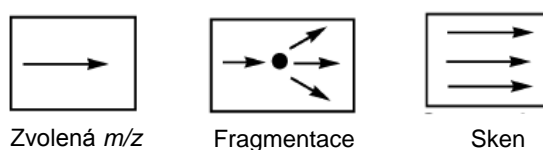
### 2.4.2.2 Tandemová hmotnostní spektrometrie

Tandemová hmotnostní spektrometrie (MS/MS) představuje jednu z možností strukturní analýzy. Principiálně jde o techniku umožňující získání velkého množství strukturních informací o studovaných analytech na základě fragmentace iontů vzniklých v iontovém zdroji. Zahrnuje tři kroky: výběr iontu, aktivace reakce (nejčastěji kolize s plynem) a analýza produktů. Tandemová hmotnostní spektrometrie je dělena na dva typy dle faktu, zda k tandemové analýze dochází v prostoru (jednotlivé děje v různých místech) nebo k ní dochází v čase (všechny děje v jednom místě). Typickou instrumentací pro tandemovou MS v prostoru je trojitý kvadrupól (QqQ), kde první kvadrupól slouží jako selektor prekurzorových iontů ( $Q_1$ ), druhý jako kolizní cela ( $q_2$ ) a třetí slouží k analýze vzniklých fragmentů ( $Q_3$ ). Možné jsou i kombinace kolizní cely s TOF analyzátozem nebo se sektorovými přístroji. Naproti tomu je tandemová analýza v čase možná pouze u analyzátorů, umožňující uchovávání iontů např. iontová past nebo ICR [21]. Dále bude popsán princip trojitého kvadrupólu, vzhledem k tomu, že toto uspořádání MS bylo použito v této práci.

Trojítý kvadrupól umožňuje měření různých typu skenů:

I. Sken produktových iontů:

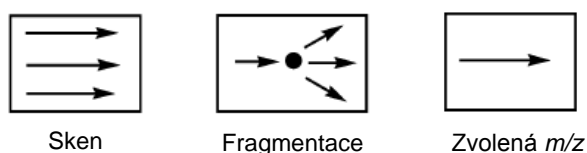
První kvadrupól (Q1) je nastaven k selekci iontu o známém poměru  $m/z$  hmotnosti, tento ion je fragmentován v kolizní cele (q2) a třetí kvadrupól (Q3) skenuje celý  $m/z$  rozsah vzniklých fragmentů. Z informace o fragmentaci lze navrhnout strukturu původního iontu (Obr. 10).



Obr. 10 Schéma skenu produktových iontů. Převzato a upraveno z [22].

II. Sken iontů prekursoru:

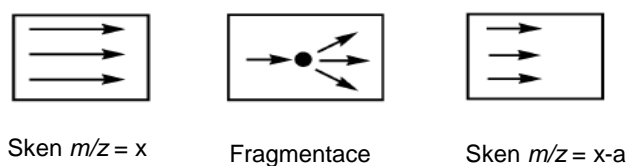
Produktový ion o určitém poměru  $m/z$  je zvolen v Q3 a prekursory, jejichž fragmentací vzniká zvolený produktový ion, jsou skenovány v Q1. Tento sken je selektivní pro ionty se společnou funkční skupinou, odštěpenou v q2 (Obr. 11).



Obr. 11 Schéma skenu iontů prekursoru. Převzato a upraveno z [22].

III. Sken neutrálních ztrát:

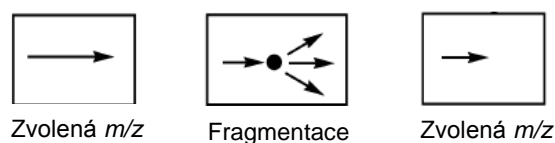
Kvadrupóly Q1 a Q3 skenují společně, ale s konstantním hmotnostním rozdílem. Sken neutrálních ztrát dovoluje selektivní rozlišení iontů, jejichž fragmentace v q2 vede k dané neutrální ztrátě (např.  $H_2O$ ,  $NH_3$ ). Zmíněný typ skenu umožňuje identifikaci blíže příbuzných látek ve směsi (Obr. 12).



Obr. 12 Schéma skenu neutrálních ztrát. Převzato a upraveno z [22].

#### IV. Sken iontových reakcí:

Zvolený fragmentační přechod je skenován v Q1 (mateřský ion) a Q2 (fragmentový ion) – SRM. V Q1 nebo Q2 lze zvolit více než jeden fragmentační přechod – MRM. Tento typ skenu vede ke zvýšení citlivosti a je vhodný pro kvantifikaci (Obr. 13).



Obr. 13 Schéma skenu iontových reakcí. Převzato a upraveno z [22].

#### 2.4.3 Ion-párová činidla v analýze aniontů pomocí MS

Není překvapením, že při analýze aniontů pomocí MS se nejčastěji využívá elektrosprej v negativním módu. Při analýze anorganických a organických aniontů pomocí MS, čelíme obecně známým omezením. Například malé anorganické i organické anionty s molekulovou hmotností menší než 100 většinou není schopen hmotnostní spektrometr měřit s dostatečnou citlivostí, protože spadají do oblasti zvýšeného chemického šumu. Navíc malé a velmi polární analyty mají tendenci být více solvatovány a tím zůstávají v neutrálnějším středu kapiček tvořící elektrosprej, což může vyústit k nižším signálům, než bylo očekáváno. Je také známo, že elektrosprej v negativním módu je více náchylný ke koronovému výboji než elektrosprej v módu pozitivním. Koronový výboj vede ke zvýšení pozadí a ke snížené stabilitě sprejování, kvůli vysokému negativnímu napětí [23,24].

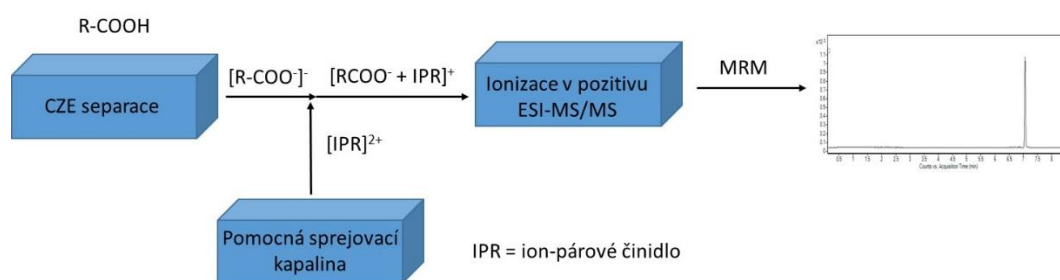
Existují faktory ovlivňující zlepšení ionizace v pozitivním módu, ale značně se liší v módu negativním. Například malé molekuly kyselé povahy, tvořící záporně nabitě ionty v roztoku, se mohou v plynné fázi stát neutrální, díky reakcím se slabě zásaditými rozpouštědly v plynné fázi (např. methanol, voda). Tyto slabé zásady přispívají k protonizaci analytů v pozitivním módu, avšak v negativním módu jejich přítomnost účinnost ionizace snižuje. Důsledkem je užití rozpouštědel s vyšší protonovou afinitou, jako jsou propanol nebo butanol pro ionizaci v negativním módu ESI-MS [23,24]. Je tedy zřejmé, že využití pozitivního módu elektrospreje pro detekci aniontů po jejich převedení na vhodný adukt povede k dosažení vyšší citlivosti detekce těchto aniontů.

Abychom byli schopni detekovat anionty v pozitivním módu, je nutné zajistit interakci aniontů s vhodným ion-párovým činidlem nesoucí kladný náboj (PIESI-MS). Aby vznikl

požadovaný pozitivně nabitý iontový asociát, je nutné, aby ion-párové činidlo mělo vždy o jeden kladný náboj více než analyzovaný aniont (např. při analýze dvoumocných aniontů je třeba pro vznik asociátů použít ion-párové činidlo se třemi kladnými náboji). Interakcí aniontů s ion-párovým činidlem pak vzniká adukt, který má nejméně jeden pozitivní náboj. Adukt má také větší výslednou hodnotu  $m/z$ , což je výhodné u aniontů s nízkou molekulovou hmotností, protože negativní ionizace neposkytuje dostatečnou citlivost. I pro větší anionty vznik aduktu znamená posun  $m/z$  k vyšším hodnotám a tím posun do oblasti menšího šumu pozadí [23,24]. Tento obecný princip je možné využít pro zvýšení citlivosti detekce aniontů pomocí CZE-ESI-MS, kde lze ion-párovou interakci zajistit několika způsoby [25]:

- ion-párové činidlo se smíchá se vzorkem a je nadávkováno do kapiláry společně (pre-column ion-párová interakce),
- ion-párové činidlo je součástí elektrolytu v separační kapiláře (on-column ion-párová interakce),
- ion-párové činidlo je do iontového zdroje přiváděno během sprejování, tj. ion-párové činidlo je mícháno s eluátem těsně před vstupem na sprejovací špičku (post-column ion-párová interakce).

V této práci byla využita metodika post-column ion-párové interakce, kdy ion-párové činidlo je obsaženo v pomocné sprejovací kapalině a je tak kontinuálně přiváděno do iontového zdroje a mícháno s eluátem vystupujícím z kapiláry. Obecné schéma experimentálního uspořádání pro CE-ESI-MS/MS s využitím post-column ion-párové interakce je uvedeno na Obr. 14.



Obr. 14 Schéma experimentálního uspořádání CE-ESI-MS/MS analýzy s využitím post-column ion-párové interakce.

V minulosti bylo publikováno několik prací, zabývajících se využitím kationtových ion-párových činidel různých struktur pro detekci negativně nabitých iontů v pozitivním sprejovacím módu prostřednictvím komplexu aniontu s kationtovým ion-párovým činidlem.



Většina publikovaných prací však tento přístup využívá pro zvýšení citlivosti detekce aniontů ve spojení s LC-ESI-MS technikou, případně technikou přímého nástřiku do ESI-MS. Přehled dosavadních prací, které byly doposud publikovány, je uveden v tabulce 5.

*Tab 5 Přehled dosud publikovaných prací využívající reakci aniontu s ion-párovým činidlem pro detekci aniontů v pozitivním módu ESI-MS(MS)*

<b>Analytická technika</b>	<b>Podmínky separace</b>	<b>Matrice vzorku</b>	<b>Detekovaný analyt</b>	<b>Ion-párové činidlo</b>	<b>Citace</b>
IC-ESI-MS	Dionex IonPac AG16/AS16	Mléko, podzemní voda	Perchlorát	Odvozené od tetraalkylamonia, imidazolu a pyrrolidinia	[26]
ESI-MS	Přímý nástřik	Moč	Metabolity drog (glukuronidové a sulfátové)	Odvozené od trispropylfosfonia, pyrrolidinia a imidazolu	[27]
HPLC-ESI-MS	C18 (50 mm x 2,1 mm)	Potraviny	Dicamba (herbicid)	Odvozené od pyrrolidinia	[28]
HPLC-ESI-MS	C18 (250 mm x 2,1 mm)	Odpadní voda	Pesticidy kyselé povahy	Odvozené od alkylfosfonia, pyrrolidinia a imidazolu	[29]
HPLC-ESI-MS	Microbore Cylcobond I (250 mm x 2,1mm)	Voda	Nitráty, Perchloráty, Thiokyanáty	Odvozené od imidazolu	[26]
ESI-MS	Přímý nástřik	Voda	Aniontové surfaktanty	Odvozené od tetraalkylamonia, imidazolu a pyrrolidinia	[30]
CE-ESI-MS	Nepokrytá kapilára	Standard	Vícenásobně nabitě anionty	Odvozené od alkylfosfonia	[31]
CE-ESI-MS	Nepokrytá kapilára	Standard	Thioslfáty, sulfáty a benzendisulfonáty	Odvozené od alkylbenzenu	[25]

Kromě struktury a velikosti náboje aniontu hraje stěžejní roli při ion-párové interakci i struktura použitého ion-párového činidla. Většinou se jedná o látky kombinující vlastnosti iontových kapalin a povrchově aktivních látek. Přehled dosud použitých ion-párových činidel je uveden v Tab. 6:

Tab. 6 Struktury a hmotnosti vybraných dikationtů. Převzato a upraveno z [32].

Č.	Hmotnost	Struktura	Č.	Hmotnost	Struktura
I	362.6		VIII	228.1	
II	390.6		IX	324.6	
III	446.6		X	188.4	
IV	480.6		XI	286.6	
V	424.8		XII	211.2	
VI	206.3		XIII	289.4	
VII	234.3		XIV	324.4	

Z uvedeného přehledu v tabulce 5 plyne, že práce zabývající se spojením CE-ESI-MS využívající zmíněnou ion-párovou interakci pro detekci aniontů v kladném sprejovacím módu je velmi málo. Přitom je ale nutné zmínit fakt, že elektromigrační techniky v analýze aniontů

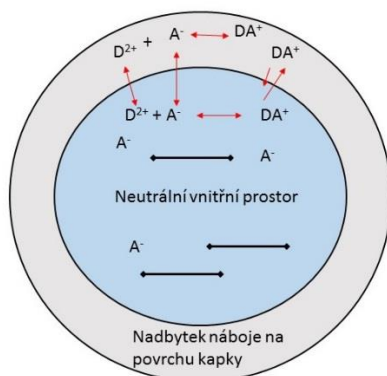
mají oproti chromatografickým metodám několik výhod. Jde zejména o jednoduchý mechanismus separace aniontů, zejména podle jejich efektivních mobilit. Není tedy nutné volit kolony na bázi iontoměničů, či využívat reverzní stacionární fáze, které nejsou primárně pro analýzu nabitých analytů vhodné. Výhodou je také rychlejší optimalizace metody, která se dá velmi jednoduše upravit dle konkrétních požadavků. V neposlední řadě je také nutné zmínit, že analýzu aniontů v CE je možné uskutečnit i z čistě vodného prostředí a voda jako rozpouštědlo zde nebude působit problémy oproti chromatografii na reverzních fázích.

Spojením CZE-ESI-MS s využitím kationtových ion-párových činidel je také dosaženo výrazně nižších limitů detekce aniontů, což nevyžaduje použití matričně silně závislých on-line prekoncentračních technik.

Kromě praktického dopadu, kdy je možné provádět velmi citlivé stanovení zejména nízkomolekulárních aniontů v různých maticích je tuto techniku také možné využít ke studiu interakcí mezi anionty a ion párovými činidly. V této oblasti však zatím nejsou zcela jasné závěry. Mechanismus ion-párové interakce mezi anionty a ion-párovými činidly není zcela objasněn a zatím se poznatky opírají o empirické zjištění z provedených experimentů. V následující kapitole je popsán současný stav poznání mechanismu ion-párové reakce.

#### **2.4.3.1 Mechanismus ion-párové reakce**

Vzhledem k tomu, že vzniklý adukt mezi aniontem a ion-párovým činidlem preferuje rozhraní voda/vzduch, lze uvažovat rovnovážný rozdělovací model (EPM) dle [33]. Tento model považuje elektrosprejem formovanou kapku za dvoufázový systém tvořený povrchem kapky a jejím vnitřkem. Povrch kapky obsahuje přebytek náboje a má tedy větší afinitu k povrchově aktivním látkám. Vnitřek kapičky je polární a tím pádem je preferovanější malými ionty a polárními molekulami. Na fázovém rozhraní dochází k ustavení rozdělovací rovnováhy pro kationtové ion-párové činidlo, anion a vzniklý komplex. Schéma vzniklé rozdělovací rovnováhy je zobrazeno na Obr. 15.



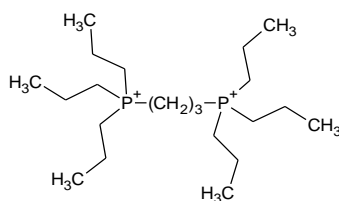
Obr. 15 Rovnovážný rozdělovací model ion-párové interakce v kapce, při ionizaci elektrosprejem.  $D^{2+}$  je dikationtové ion-párové činidlo ( $\blacktriangleleft\blacktriangleright$ ),  $A^-$  je nevázaný anion,  $DA^+$  je komplex mezi ion-párovým činidlem a aniontem. Převzato a upraveno [32].

Dělení IPR, aniontu a komplexu mezi tyto dvě fáze je nastíněno na Obr. 15. Současně s tvorbou komplexu mezi ion-párovým činidlem a aniontem dochází ke zmenšování kapky. Ion-párové činidlo má vyšší afinitu k povrchu kapky a díky jeho hromadění na fázovém rozhraní dochází ke zvýšení účinnosti ionizace. Hromaděním ion-párového činidla na povrchu kapky dochází k porušení rovnováhy ion-párové činidlo – anion a toto porušení rovnováhy vede k další tvorbě komplexu ion-párové činidlo-anion ve vnitřním prostoru kapky, což vede k urychlení tvorby nových komplexů mezi ion-párovým činidlem a aniontem. Kinetika ustavení nové rovnováhy je hnací silou vedoucí k dosažení velmi nízkým detekčních limitů. Tento kinetický proces je hnací silou pro velmi nízké limity detekce těchto systémů [32]. Tento mechanismus ion-párové reakce během sprejování je navíc ještě podpořen skutečností, že více flexibilní ion-párové činidla s větší povrchovou aktivitou poskytují nižší limity detekce při měření vzniklého komplexu mezi ion-párovým činidlem a aniontem [32]. Povrchová aktivita použitého ion-párového činidla tedy hraje zásadní roli pro dosažení co nejnižších limitů detekce aniontů, které s ion-párovým činidlem tvoří komplex. Čím je větší povrchová aktivita ion-párového činidla, tím nižší koncentraci ion-párového činidla je nutné použít, aby nedocházelo k saturaci na povrchu kapky. Závislost odezvy aniontu na vlastnostech ion-párového činidla je zobrazena v Tab. 7

Tab. 7 Závislost signálu aniontu na vlastnostech IPR [34].

Vlastnost	Poznámka
Rigidita bez flexibilního řetězce	Snížení citlivosti detekce, kvůli menší pravděpodobnosti tvorby povrchově aktivního komplexu
Povrchově aktivní IPR	Lépe proniká na povrch ESI kapičky a tím snadněji přechází do plynné fáze
Efektivní koncentrace 1-10 $\mu\text{M}$	Další zvyšování koncentrace vede ke snižování odezvy, protože dochází u povrchu kapky ke kompetici činidla s komplexem anion/kation
Asymetrické IPR	Více povrchově aktivní než symetrické IPR; zvýšení odezvy aniontu

Je také nutné poznamenat, že komerční dostupnost dosud studovaných ion-párových činidel je velmi malá. Většinou se jedná o ion-párové činidla, které jsou syntetizovány a studovány ve vědeckých laboratořích. V této diplomové práci bylo použito zatím jediné komerčně dostupné dikationtové ion-párové činidlo jehož struktura je uvedena na Obr. 16



Obr. 16 Struktura dikationtového ion-párového činidla použitého v této diplomové práci (1,3-propandiyl-bis(triethylfosfonium) difluorid).

## 3 Experimentální část

### 3.1 Materiály a chemikálie

#### 3.1.1 Chemikálie

Hydroxid amonný (Sigma – Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA)

Hydroxid sodný (Merck, Darmstadt, Německo)

Isobutyrová kyselina [ISO] (Sigma – Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA)

Metakrylová kyselina [MET] (Sigma – Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA)

Methanol v čistotě LC-MS (Merck, Darmstadt, Německo)

Mléčná kyselina [LAC] (Sigma – Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA)

Octová kyselina (Sigma – Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA)

Propionová kyselina [PROP] (Sigma – Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA)

Pyrohroznová kyselina [PYR] (Sigma – Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA)

2-bromopropionová kyselina [2-BR] (Sigma – Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA)

2-chloropropionová kyselina [2-CL] (Sigma – Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA)

3-chloropropionová kyselina [3-CL] (Sigma – Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA)

2-hydroxyisobutyrová kyselina [2-OH] (Sigma – Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA)

2-fluoropropionová kyselina [2-F] (Sigma – Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA)

2-fenylpropionová kyselina [2-PH] (Sigma – Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA)

1,3-propandiyl-bis(tripropylfosfonium) difluorid, roztok ve směsi voda:methanol (1:1) (Sigma-Aldrich Corp. St. Louis, MO, USA)

Salicylová kyselina (Sigma – Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA)

L-histidin (Sigma – Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA)

#### 3.1.2 Materiál

Křemenná kapilára o vnitřním průměru 75  $\mu\text{m}$  a celkové délce 85 cm (MicroSolv Technology Eatontown, NJ, USA)

Polyakrylamidem pokrytá křemenná kapilára o vnitřním průměru 50  $\mu\text{m}$ , celkové délce 48,5 cm a efektivní délce 40 cm (MicroSolv Technology Eatontown, NJ, USA)

Mikropipety Eppendorf Research PLUS s nastavitelným objemem v rozsahu 20 – 1000  $\mu\text{m}$  (Eppendorf AG, Hamburg, Německo)

Stříkačky plastové – PP; objem 3 ml (B. Braum Medical Inc. Bethlehem, Melsungen, Germany)

Mikrozkumavky, plastové – PP; objem 1,5 ml (Eppendorf AG, Hamburg, Německo)

Vialky skleněné; objem 2 ml (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA)

Vialky zaklapávací, čirá; objem 10 ml (Merci, Praha, Česká Republika)

Stojan na mikrozkumavky, plastový - PP; 80 pozic (Merci, Praha, Česká Republika)

Syringe filtry, nylonové; 25 mm, 0,45  $\mu\text{m}$  (LABICOM, s.r.o, Olomouc, Česká Republika)

### **3.2 Přístrojové vybavení**

Analytické váhy MS (Mettler Toledo, Greifensee, Švýcarsko)

Centrifuga MR23i (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)

Hmotnostní detektor QqQ Agilent MSD 6460 (Waldbronn, Německo)

LC isokratická pumpa Agilent 1200 a 1260 s děličem toku v poměru 1:100 (Waldbronn, Německo)

Kapilární elektroforéza Agilent 7110 (Waldbronn, Německo)

pH metr inoLab IDS Multi 9310P (WTW GmbH & Co. KG, Weilheim, Německo)

Software Agilent ChemStation, Agilent MassHunter, Microsoft Excel 2010

Výrobník deionizované vody Millipore (Molsheim, Francie), deionizovaná voda měla vodivost 18  $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$ .

Multimetr Inolab 9310 s pH elektrodou SenTix 940 s teplotním čidlem.

### **3.3 Příprava standardů karboxylových kyselin a vzorku vína**

Roztoky standardů jednotlivých karboxylových kyselin byly připraveny navážením příslušného standardu kyseliny a jeho rozpuštěním v deionizované vodě na výslednou koncentraci 1 mg/ml. Nižší koncentrace (kalibrační roztoky jednotlivých kyselin) byly připraveny ředěním standardů příslušné kyseliny na požadovanou koncentraci deionizovanou vodou. V jednom kroku nebylo ředění větší než 100-krát.

Směsný standard studovaných karboxylových kyselin byl připraven smícháním odpovídajícího objemu standardů kyselin o koncentraci 1 mg/ml a jejich ředěním deionizovanou vodou na požadovanou koncentraci.

Bílé víno (Soave, Itálie) bylo nejprve filtrováno přes 0,45  $\mu\text{m}$  filtr a filtrát byl následně 25 krát ředěn deionizovanou vodou. Takto ředěný vzorek vína byl dávkován do kapiláry k CZE-ESI-MS analýze. V případě analýzy vzorku bílého vína s pomocí CZE s nepřímou

UV-VIS detekcí byl vzorek bílého vína filtrován přes 0,45  $\mu\text{m}$  filtr a zředěn deionizovanou vodou (10 x) a dávkován do kapiláry.

### **3.4 Příprava pufru**

Pufr acetát amonný pH 9,5 byl připraven rozpuštěním příslušného množství octové kyseliny v deionizované vodě a pH bylo upraveno titrací zředěným roztokem hydroxidu amonného ve vodě na pH 9,5. Ke kontrole pH při přípravě pufru byl využit pH metr, kalibrovaný na dvě hodnoty pH standardních kalibračních pufrů 7,00 a 10,01. Pufr, který byl použit pro stanovení kyselin metodou CZE s nepřímou UV-VIS detekcí byl připraven navážením a rozpuštěním kyseliny salicylové v definovaném objemu deionizované vody, tak aby vznikl roztok o koncentraci 10 mmol/l. Tento roztok byl poté titrován na pH 4,5 L-histidinem.

### **3.5 Příprava pomocné sprejovací kapaliny**

Pomocná sprejovací kapalina o složení methanol : deionizovaná voda (50:50, v/v) s přídavkem ion-párového činidla (1,3-propandiyl-bis(triethylfosfonium) difluorid) byla připravena smícháním odpovídajících objemů methanolu a deionizované vody. Nakonec byl do této směsi přidán odpovídající objem roztoku ion-párového činidla, aby jeho výsledná koncentrace byla 20, 40, 60, 80 a 100  $\mu\text{mol/l}$ . Pomocná sprejovací kapalina byla připravena každý den čerstvá.



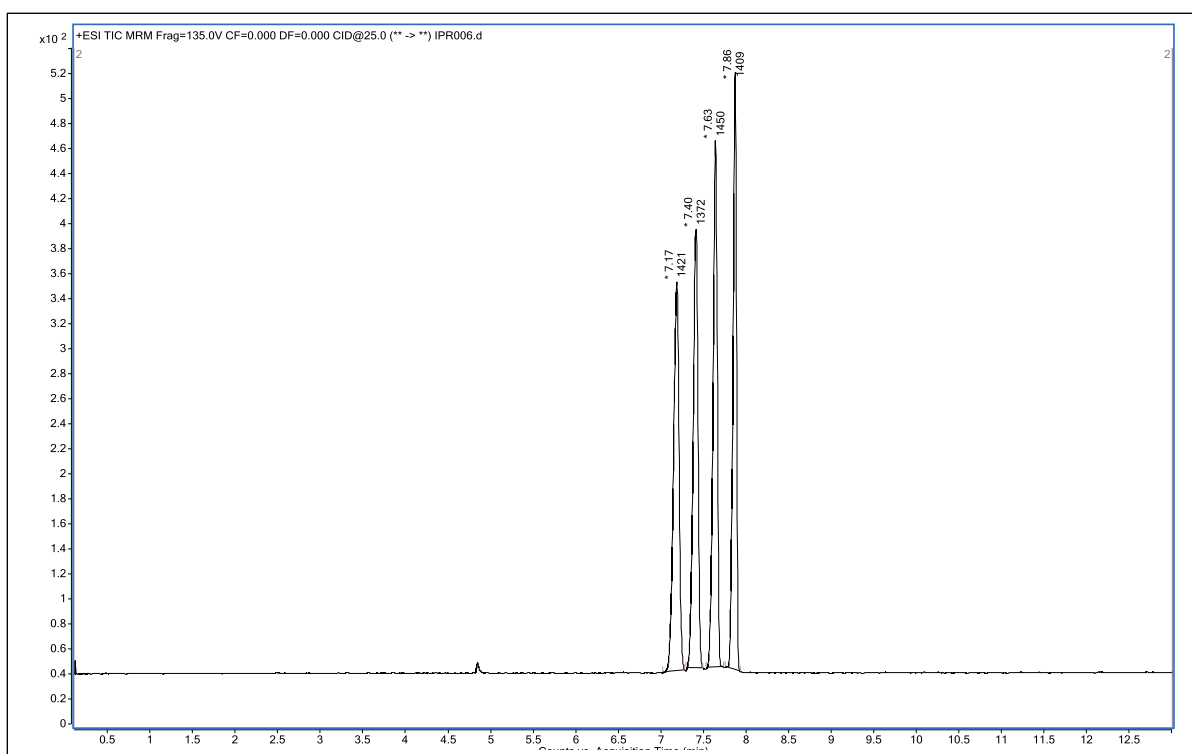
## 4 Výsledky a diskuze

### 4.1 Volba experimentálního přístupu pro nalezení vhodných podmínek ion-párové interakce

Stěžejní vliv na velikost signálu komplexu vzniklého mezi kationtovým ion-párovým činidlem a studovanými anionty má koncentrace ion-párového činidla v pomocné sprejovací kapalině, průtok pomocné sprejovací kapaliny, koncentrace a složení použitého pufru a dále podmínky v hmotnostním analyzátoru zejména kolizní energie. Pro každou studovanou karboxylovou kyselinu byl zvlášť proměřen vliv jednotlivých parametrů na plochu píku. Měření bylo prováděno v SRM módu, přičemž monitorován byl vždy přechod odpovídající fragmentaci vzniklého komplexu mezi IPR a odpovídající karboxylovou kyselinou. Monitorován pak byl poměr  $m/z = 187,1$  odpovídající jednou nabitému fragmentu použitého ion-párového činidla.

Měření bylo provedeno s pomocí postupu, kdy byl za sebou opakovaně 4krát dávkován vzorek obsahující studovanou karboxylovou kyselinu (o koncentraci 10 mg/l) přičemž mezi jednotlivými dávkovanými zónami kyselin byla vždy dávkována zóna pufru. Po nadávkování čtyř zón vzorku bylo vloženo separační napětí. Během jediné analýzy tak byly získány 4 odezvy (píky) pro daný studovaný parametr. Výhodou tohoto přístupu bylo, že výsledky byly získány za konstantních podmínek v krátkém čase. Zejména jde o stabilitu podmínek elektrospreje. Navíc experimentálně bylo zjištěno, že rozdíl mezi dávkováním více zón analytu se vzájemně oddělenými pufrem a opakovanou analýzou analytu není statisticky významný.

Příklad rekonstruovaného elektroferogramu analýzy čtyř po sobě dávkovaných zón metakrylové kyseliny je na Obr. 17.



Obr. 17 Rekonstruovaný SRM elektroferogram separace čtyř nadávkovaných zón kyseliny metakrylové se spacerem pufru. Podmínky měření: Separáční napětí +25 kV, délka kapiláry 85 cm, průměr kapiláry 75  $\mu$ m, dávkování 30 mbar/5s, pomocná kapalina voda/methanol (50:50; v/v) s přidavkem 60  $\mu$ mol IPR, 0,6 mL/min, ESI: tlak pomocného plynu 10 psi, teplota pomocného plynu 200  $^{\circ}$ C, kolizní energie 25 eV, vzorek metakrylové kyseliny 10 mg/l.

#### 4.1.1. Vliv složení pufru na ion-párovou reakci

Pro ionizaci elektrosprejem je nutné, aby použitý pufr pro CZE separaci byl těkavý. V souladu s tímto požadavkem byl jako pufr vybrán acetát amonný pH 9,5. Častá alternativa tohoto pufru ve formě formiátu amonného v tomto případě nemohla být studována, protože formiát komplexuje se studovaným ion-párovým činidlem za tvorby komplexu s větší konstantou stability než acetát. Formiát by tedy hrál roli konkurenčního aniontu a účinnosti ionizace s využitím ion-párové interakce by tak byla výrazně nižší než v případě acetátu [35]. Alkalické pH 9,5 bylo zvoleno s ohledem na podmínky migrace studovaných organických kyselin v nepokryté křemenné kapiláře. Při pH 9,5 je velikost mobility elektroosmotického toku větší než jsou efektivní mobility jednotlivých kyselin a i když kyseliny ve formě aniontů mají tendenci migrovat ke kladně nabitě elektrodě, silnější elektroosmotický tok je unáší směrem k záporně nabitě elektrodě, při které je umístěn iontový zdroj hmotnostního spektrometru.

Vliv iontové síly pufru byl studován v rozmezí koncentrací 5-50 mM acetátu. Nejvyšší účinnosti ionizace a tedy nejvyšší plochy poskytoval acetátový pufr o koncentraci 5 mM. Použití nižší koncentrace pufru také snižuje pravděpodobnost kompetice acetátu s analytem při ionizaci v iontovém zdroji a důsledkem je vyšší intenzita signálu analytu.

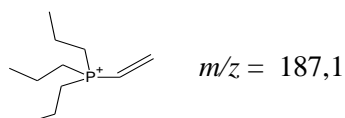
#### 4.1.2 Studium vlivu kolizní energie

Pro každou karboxylovou kyselinu byla optimalizována kolizní energie fragmentačního přechodu v SRM módu (fragmentován byl vždy vzniklý komplex ion-párového činidla s příslušnou kyselinou). Experimentálně bylo zjištěno, že fragment s poměrem  $m/z = 187,1$  je jediným majoritním fragmentem při fragmentaci komplexu kolizí indukovanou disociací (CID). Produktový ion  $m/z = 187,1$  pochází ze štěpení ion-párového činidla. Tento produktový ion je tedy pro všechny studované kyseliny společný. U karboxylových kyselin obsahující jako substituenty Br a Cl (obsahující izotopy) bylo nutné nastavit při skenování v prvním kvadrupólu rozlišení „widest“, tím se rozlišení zvýšilo z 70% FWHM (plná šířka v polovině výšky) na 250% FWHM. Fragmentační přechody spolu s nejlepšími nalezenými kolizními energiemi jsou uvedeny v tabulce 8. Byla vybrána vždy kolizní energie, kdy byla plocha odpovídající fragmentovému iontu  $m/z = 187,1$  nejvyšší.

Tab.8 Fragmentační přechody komplexů kyselin s ion-párovým činidlem a jejich optimalizované kolizní energie.

Kyseliny	Mr	Prekurzor ( $m/z$ ) [M+IPR <sup>+</sup> ]	$t_M$	$t_M$ RSD [%]	A RSD [%]	Produktový ion ( $m/z$ ) <sup>a</sup>	Kolizní energie [eV]
PROP	74,1	435,6	7,0	1,8	2,8		10
PYR	88,1	449,6	8,6	0,5	2,8		20
LAC	90,1	451,5	6,5	1,3	3,2		10
MET	86,1	447,6	6,3	4,1	3,8		10
ISO	88,1	449,6	7,3	0,2	2,9		15
2-OH	104,1	465,7	8,6	0,7	2,8	187,1	10
2-CL	108,5	469,2	7,9	0,9	3,3		10
3-CL	108,5	469,2	8,6	0,5	2,7		15
2-F	92,1	453,6	7,8	2,5	2,2		10
2-BR	152,9	514,5	7,4	1,0	2,5		20
2-PH	150,2	511,7	7,1	0,2	3,0		20

a)



Z uvedených výsledků v tabulce 8 je patrné, že pro fragmentaci většiny vzniklých komplexů mezi studovanými kyselinami a ion-párovým činidlem je postačující kolizní energie 10 eV. Pouze fragmentace vzniklého komplexu mezi pyruvátém, isobutyrátem,

3-chloropropionátem, 2-bromopropionátem a 2-fenylpropionátem s ion-párovým činidlem byla potřeba vyšší kolizní energie. Zajímavým výsledkem je srovnání optimálních kolizních energií pro  $\alpha$ -halogenderiváty propionové kyseliny. Kolizní energie roste v řadě 2-F > 2-Cl > 2-Br. Lze tedy usuzovat, že s klesající elektronegativitou halogenu v alfa poloze roste síla interakce mezi  $\alpha$ -halogenpropionovou kyselinou a použitým ion-párovým činidlem.

#### 4.1.3 Studium vlivu koncentrace ion-párového činidla v pomocné sprejovací kapalině

Vliv koncentrace ion-párového činidla na komplexaci s analytem a tím ovlivnění účinnosti ionizace byl diskutován již dříve. Výsledná koncentrace IPR byla připravována ve směsi voda - methanol (50:50, v/v). Z Tab. 9 plyne, že největší odezvu dává většina studovaných karboxylových kyselin při koncentraci ion-párového činidla 60  $\mu\text{mol/l}$ . U karboxylových kyselin (propionát, laktát a metakrylát), které poskytují větší odezvu při vyšších koncentracích IPR, není rozdíl nikterak markantní. Pro další optimalizaci metody, byla tedy kompromisně zvolena koncentrace 60  $\mu\text{mol/l}$  ion-párového činidla v pomocné kapalině.

Tab. 9 Závislost intenzity signálu vyjádřeného jako plocha píku na koncentraci IPR v pomocné kapalině ( $n = 4$ ).

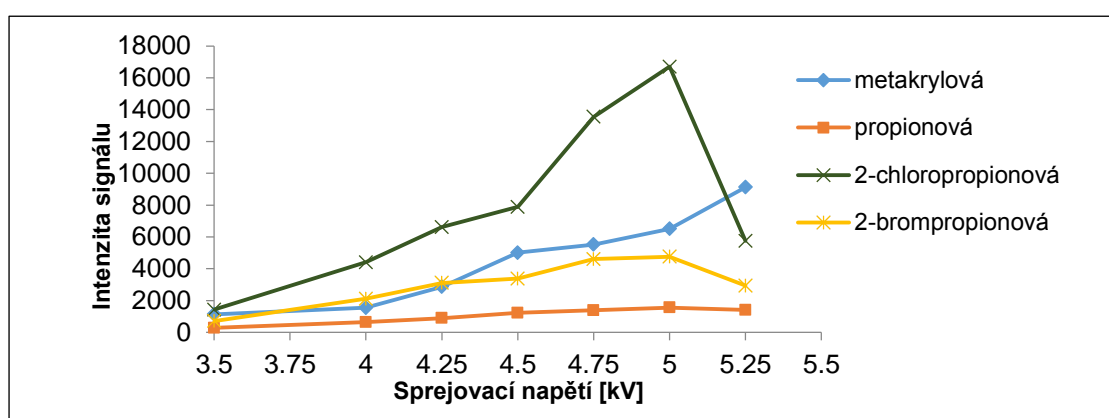
Kyselina	20 [ $\mu\text{mol/l}$ ]		40 [ $\mu\text{mol/l}$ ]		60 [ $\mu\text{mol/L}$ ]		80 [ $\mu\text{mol/L}$ ]		100 [ $\mu\text{mol/L}$ ]	
	Plocha (-)	RSD (%)	Plocha (-)	RSD (%)	Plocha (-)	RSD (%)	Plocha (-)	RSD (%)	Průměr ploch	RSD (%)
PROP	980,0	3,2	1363,0	5,2	1572,4	3,2	<b>1729,5</b>	4,0	1727,5	4,2
PYR	4125,0	8,9	4784,0	6,4	4897,5	6,3	2611,8	6,0	5017,8	9,7
LAC	1656,5	7,1	1668,3	6,2	1829,3	6,9	<b>1839,6</b>	7,3	1808,0	12,1
MET	5995,2	2,7	7797,4	0,6	9028,0	0,9	9098,0	2,2	<b>9578,4</b>	5,3
ISO	1167,6	2,9	2008,2	1,7	<b>2513,2</b>	1,9	2361,4	5,7	3013,2	2,5
2-OH	3486,8	6,1	3112,3	6,5	<b>2966,7</b>	6,2	2966,0	6,3	2752,0	7,6
2-CL	<b>7388,8</b>	7,5	6892,0	6,8	5184,6	8,6	3960,4	9,6	3960,4	9,6
3-CL	7155,8	4,9	<b>7836,5</b>	4,2	5251,0	4,1	5201,0	4,3	6189,0	6,9
2-F	5369,3	7,1	6408,5	5,8	<b>5937,8</b>	6,3	3935,8	7,5	6314,8	8,5
2-BR	3521,0	7,3	3481,8	4,4	2515,8	6,3	2502,8	5,7	<b>6189,0</b>	7,0
2-PH	<b>15527,3</b>	5,4	14416,5	2,9	13752,8	4,1	13501,8	3,8	12803,3	5,3

#### 4.1.4 Studium vlivu teploty a tlaku zmlžujícího plynu

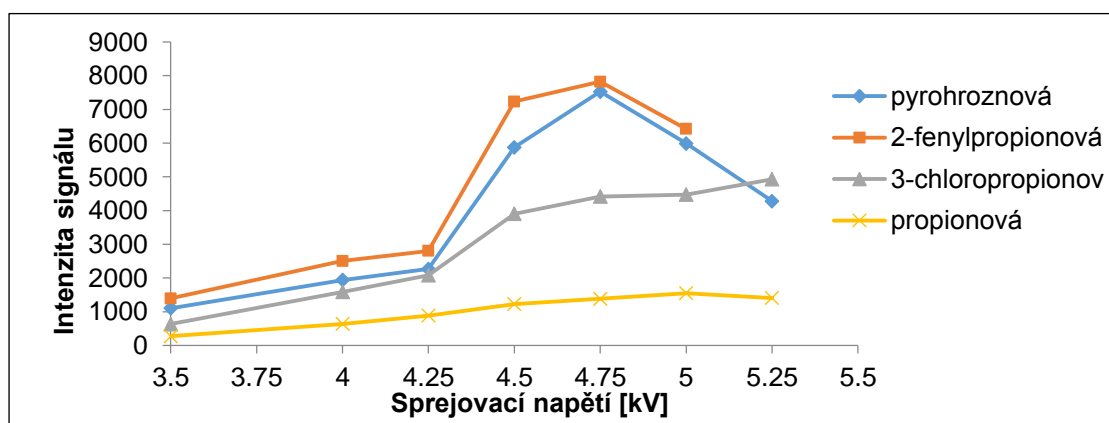
Jako pomocný plyn byl využit dusík, jehož průtok byl nastaven na 10 l/min. Tlak pomocného plynu byl testován v rozmezí 1 – 30 psi (6,894 kPa – 206,842 kPa). Teplota pomocného plynu byla testována od 175 – 275 °C. Ani jeden z parametrů neměl významný vliv na intenzitu signálu v SRM módu. Pro další měření byly tedy zvoleny následující parametry: tlak zmlžujícího plynu – 10 psi a teplota zmlžujícího plynu – 200 °C.

#### 4.1.5 Vliv sprejovacího napětí

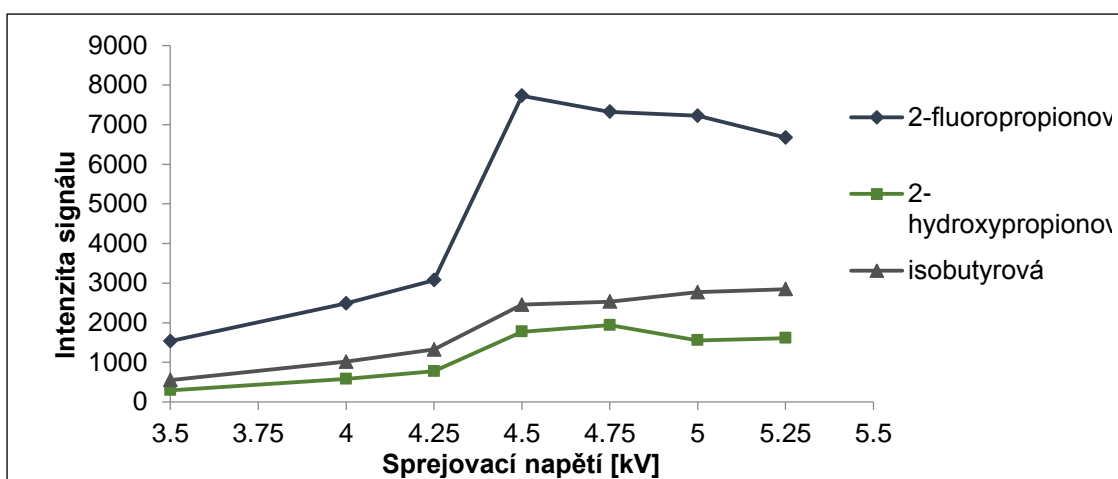
Vliv sprejovacího napětí na intenzitu signálu při ionizaci v pozitivním módu byl sledován v intervalu 3,50 kV – 5,25 kV (napětí bylo vždy zvýšeno o 0,25 kV). Závislosti dokumentující vliv sprejovacího napětí na plochu píku pro studované karboxylové kyseliny jsou na Obr. 18, 19 a 20. Většina karboxylových kyselin měla nejvyšší odezvu (plochu píku) při sprejovacím napětí 4,75 kV a 5 kV. Jelikož získané odezvy při těchto hodnotách jsou velice podobné a při zvážení faktu, že hodnota 5 kV je pro přístroj hraniční, čímž může být negativně ovlivněna životnost iontového zdroje, bylo pro další účely zvoleno sprejovací napětí 4,75 kV. Relativní směrodatné odchylky se pohybovaly v rozmezí 0,23 – 8,26%.



Obr. 18 Závislost intenzity signálu metakrylové, propionové, 2-chloropropionové a 2-bromopropionové kyseliny vyjádřený jako plocha píku na sprejovacím napětí. Podmínky měření: Separáční napětí +25 kV, délka kapiláry 85 cm, průměr kapiláry 75  $\mu$ m, dávkování 30 mbar/5s, pomocná kapalina voda/methanol (50:50; v/v) s přidavkem 60  $\mu$ mol IPR, 0,6 ml/min, ESI: tlak pomocného plynu 10 psi, teplota pomocného plynu 200  $^{\circ}$ C, vzorky příslušných kyselin o c = 10 mg/l



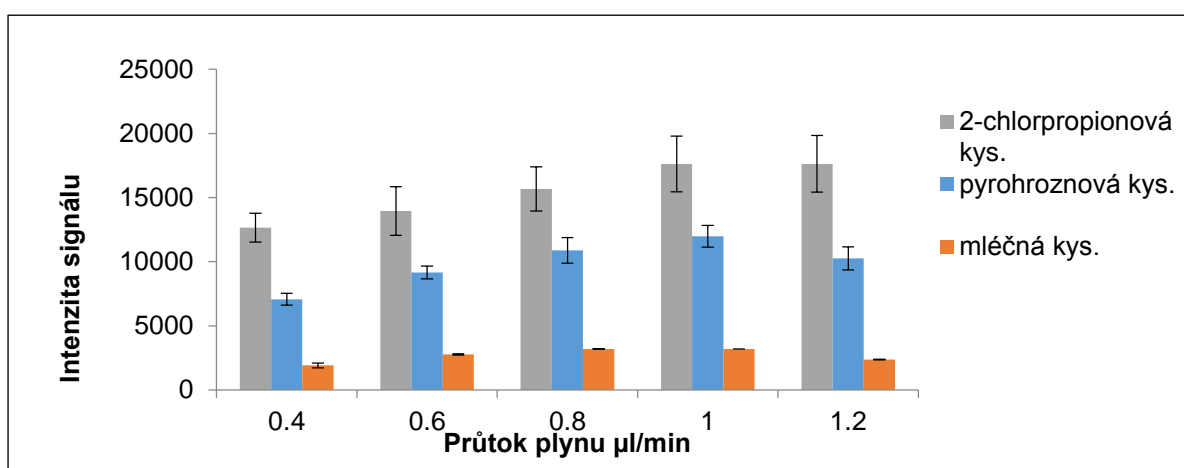
Obr. 19 Závislost intenzity signálu pyrohroznové, 2-fenylpropionové, 3-chloropropionové a propionové kyseliny vyjádřený jako plocha píku na sprejovacím napětí. Podmínky měření: Separáční napětí +25 kV, délka kapiláry 85 cm, průměr kapiláry 75  $\mu$ m, dávkování 30 mbar/5s, ESI: pomocná kapalina voda/methanol (50:50; v/v) s přidavkem 60  $\mu$ mol IPR, 0,6 ml/min, tlak pomocného plynu 10 psi, teplota pomocného plynu 200  $^{\circ}$ C, vzorky příslušných kyselin o c = 10 mg/l.



Obr. 20 Závislost intenzity signálu 2-fluoropropionové, 2-hydroxypropionové a isobutyrové kyseliny vyjádřený jako plocha píku na sprejovacím napětí. Podmínky měření: Separáčnı napětı +25 kV, délka kapiláry 85 cm, průměr kapiláry 75  $\mu$ m, dávkování 30 mbar/5s, ESI: pomocná kapalina voda/methanol (50:50; v/v) s přidavkem 60  $\mu$ mol IPR, 0,6 m/min, tlak pomocného plynu 10 psi, teplota pomocného plynu 200  $^{\circ}$ C, vzorky příslušných kyselin o c = 10 mg/l.

#### 4.1.6 Vliv průtoku pomocné sprejovací kapaliny

Závislost průtoku pomocné kapaliny na intenzitě signálu byla optimalizována s pomocí vybraných kyselin (pyrohroznová k., 2-chlorpropionová k. a mléčná k.). Z Obr. 21 je patrné, že nejvhodnějším průtokem je 1.0  $\mu$ l/min. Hodnoty RSD opakovaných měření pro studované průtoky jsou srovnatelné pro jednotlivé studované kyseliny a daný průtok.



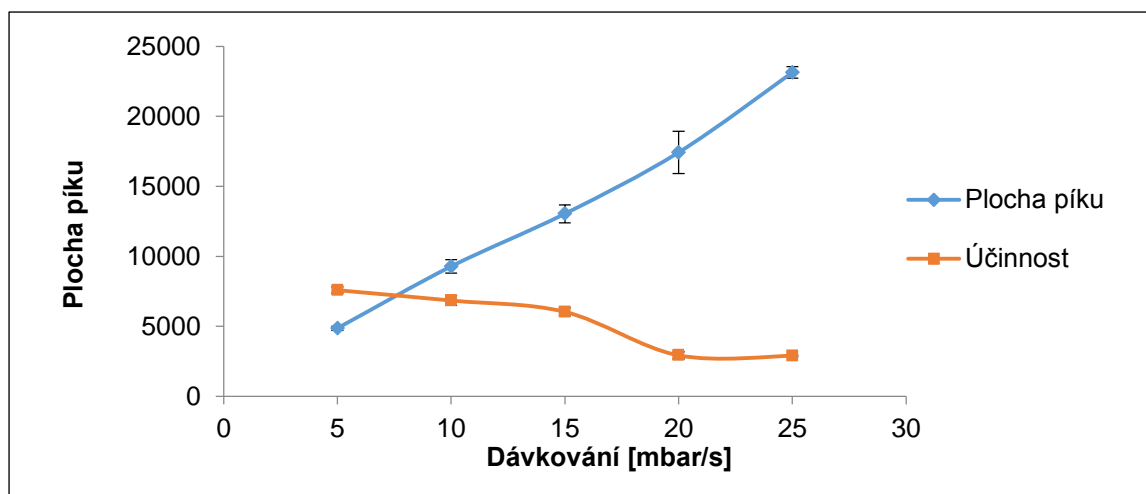
Obr. 21 Závislost intenzity signálu vyjádřený jako plocha píku na průtoku pomocné kapaliny. Podmínky měření: Separáčnı napětı +25 kV, délka kapiláry 85 cm, průměr kapiláry 75  $\mu$ m, dávkování 30 mbar/5s, sprejovací napětı 4,75 kV, pomocná kapalina voda/methanol (50:50; v/v) s přidavkem 60  $\mu$ mol IPR, ESI: tlak pomocného plynu 10 psi, teplota pomocného plynu 200  $^{\circ}$ C, vzorky příslušných kyselin o c = 10 mg/l.

#### 4.1.7 Dávkování vzorku

Vliv dávkování vzorku na účinnost píku studovaných karboxylových kyselin a intenzitu signálu byla testována na kyselině propionové rozpuštěné v deionizované vodě ( $c = 10 \text{ mg/l}$ ). Předpokladem pro tento experiment bylo, že ostatní studované karboxylové kyseliny budou poskytovat podobné výsledky. Z tohoto důvodu byla vybrána propionová kyselina jako modelový analyt. Tab. 10 ukazuje, jak se zvyšujícím se dávkováním roste plocha píku analytu. Tento trend je ale doprovázen snižující se účinností, která souvisí s rozšiřováním zóny analytu (šířka píku při základně). Čím delší zóna vzorku je dávkována, tím nižší je migrační čas kyseliny propionové. Nejvhodnějším dávkováním bylo kompromisně zvoleno 100 mbar/15s. Jak lze vidět na Obr. 22, při tomto dávkování je nejvýhodnější poměr mezi intenzitou signálu a účinností.

Tab. 10 Vliv dávkování na účinnost píku propionové kyseliny a intenzitu signálu vyjádřeného jako plocha píku propionové kyseliny.

Dávkování [mbar/s]	Plocha (-)	Migrační čas (min)	Šířka píku při základně (min)	Účinnost (-)
5	4870	6,75	0,31	7585,85
10	9285	6,62	0,32	6847,56
15	13045	6,41	0,33	6036,82
20	17426	6,09	0,43	2930,42
25	23137	5,79	0,45	2900,95



Obr. 22 Vliv dávkování na účinnost a intenzitu signálu vyjádřeného jako plocha píku. Podmínky měření: Separáční napětí +25 kV, délka kapiláry 85 cm, průměr kapiláry 75  $\mu\text{m}$ , sprejovací napětí 4,75 kV, pomocná kapalina voda/methanol (50:50; v/v) s přidávkem 60  $\mu\text{mol/l}$  IPR, ESI: tlak pomocného plynu 10 psi, teplota pomocného plynu 200  $^{\circ}\text{C}$ , vzorek propionové kyseliny o  $c = 10 \text{ mg/l}$ .

#### 4.1.8 Shrnutí optimálních podmínek

Byly optimalizovány CZE-ESI-MS/MS podmínky pro separaci a hlavně detekci studovaných karboxylových kyselin v pozitivním módu po jejich interakci s dikationtovým ion-párovým činidlem, které bylo přiváděno do nebulizéru jako součást pomocné sprejovací kapaliny. Shrnutí nalezených nejlepších podmínek je uvedeno v Tab. 11.

Tab. 11 Shrnutí optimálních podmínek pro CZE-ESI-MS/MS.

Parametr	Hodnota
Pufr	5 mM acetát amonný o pH 9,5
Dávkování vzorku	100 mbar/15s
Separační napětí	+ 25 kV
Sprejovací napětí	+4,75 kV
Tlak zmlžujícího plynu	10 psi
Teplota zmlžujícího plynu	200 °C
Průtok pomocné kapaliny	1 µL/min
Složení pomocné kapaliny	voda/methanol (50:50; v/v) s přídavkem 60 µmol/l IPR

Detekce negativně nabitých karboxylových kyselin v pozitivním módu ESI-MS/MS je velmi výhodnou alternativou ke konvenčnímu způsobu detekce kyselin v negativním módu, kdy se jako pomocná sprejovací kapalina využívá směs organického rozpouštědla (nejčastěji methanolu nebo isopropanolu) s vodou s přídavkem hydroxidu amonného. Tento způsob detekce, ale poskytuje vyšší detekční limity a představuje tak jisté omezení pro analýzu nízkých koncentrací karboxylových kyselin v různých vzorcích.

Byla provedena částečná validace vyvinuté metody a odhadnuty hodnoty limitů detekcí (LOD) a kvantifikací (LOQ) studovaných karboxylových kyselin. Získané hodnoty LOD

a LOQ pro detekci kyselin v pozitivním módu pak byly srovnány s hodnotami LOD a LOQ pro konvenční negativní mód. Výsledky jsou uvedeny v následující kapitole.

#### 4.2 Částečná validace stanovení karboxylových kyselin v pozitivním ionizačním módu

Stanovení LOD a LOQ analytů bylo provedeno za optimalizovaných podmínek, uvedených výše. Před stanovením LOD a LOQ byl nejprve určen lineární dynamický rozsah pro jednotlivé karboxylové kyseliny.



Lineární dynamické rozsahy pro jednotlivé kyseliny jsou uvedeny v následujícím seznamu:

- (i) mléčná kyselina (0,1-10 mg/l);
- (ii) 2-hydroxyisobutyrová a izobutyrová kyselina (0,025-10 mg/l); metakrylová (0,0125-10);
- (iii) pyrohroznová, 2-fenylpropionová, 3-chloropropionová, 2-bromopropionová, a propionová kyselina (0,01-10 mg/l);
- (iv) 2-fluoropropionová kyselina (0,005-10 mg/l);
- (v) 2-chloropropionová (0,001-10 mg/l).

V pozitivním sprejovacím módu s využitím ion-párového činidla byl LOD stanoven v softwaru Microsoft Excel 2010 z kalibračních křivek analytů s pomocí vztahu (12):

$$LOD = \frac{3s_a}{k} \quad (12)$$

kde  $s_a$  je směrodatná odchylka posunutí kalibrační křivky a  $k$  je směrnice kalibrační křivky.

LOQ pak byl vypočítán podle obdobného vztahu (13):

$$LOQ = \frac{10s_a}{k} \quad (13)$$

Pro srovnání byly v negativním sprejovacím módu stanoveny LOD a LOQ přímou metodou do viditelné odezvy. Podmínky CZE-ESI-MS v negativním módu byly stejné jako při analýze v módu pozitivním s výjimkou: sprejovacího napětí (-3,5 kV), složení pomocné kapaliny (voda + methanol s přídavkem  $\text{NH}_3$  v/v/v; 50/49,5/0,5), měření bylo prováděno v SIM módu a napětí fragmentoru (napětí na protielektrodě při sprejování). Nejvhodnější napětí fragmentoru bylo 50 V.

Při negativní ionizaci nemá smysl měřit v MRM módu, protože většina studovaných kyselin má velmi nízkou molekulovou hmotnost a jejich kolizí indukovanou disociací by vznikaly fragmenty, které při měření v MRM módu spadají do oblasti vysokého chemického šumu a citlivost by se oproti SIM módu nezvýšila.

Tab. 12 Částečná validace ion-párové CE-ESI-MS/MS metody pro stanovení karboxylových kyselin.

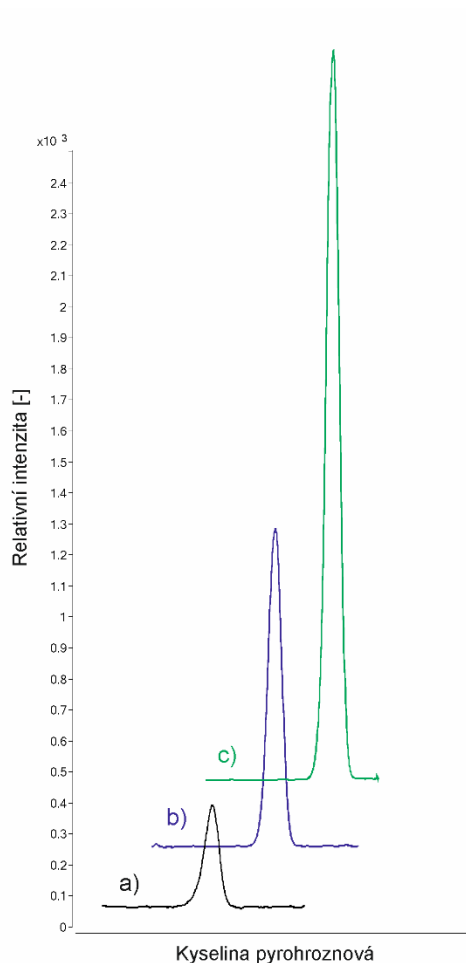
Analyt	Regresní křivka ( $y = ax + b$ )		Korelační koeficient	LOD <sup>a</sup> [ng/mL]	LOQ <sup>a</sup> [ng/mL]	LOD <sup>b</sup> [ng/mL]	LOQ <sup>b</sup> [ng/mL]
	Směrnice	Posunutí					
<b>PROP</b>	1679,44,13±30,58	-5,12±7,84	0,99	14	47	100	333
<b>PYR</b>	10647,13±1600,72	103,18±103,74	0,98	29	97	500	1667
<b>LAC</b>	1970,90±31,38	43,85±20,33	0,99	30	103	500	1667
<b>MET</b>	1655,35±20,31	15,37±5,11	0,99	9	31	50	167
<b>ISO</b>	3251,06±27,75	11,13±7,11	0,99	6	22	100	333
<b>2-OH</b>	2029,74±43,95	-31,52±11,27	0,99	17	56	10	33
<b>2-CL</b>	11347,09±347,12	51,98±17,44	0,99	5	15	250	833
<b>3-CL</b>	3901,98±16,69	11,078±4,23	0,99	3	11	1000	3333
<b>2-F</b>	1656,14±29,55	45,33±6,77	0,99	41	2,5	250	833
<b>2-BR</b>	2468,56±55,14	77,31±12,65	0,99	15	51	250	833
<b>2-PH</b>	5160,05±147,59	3,09±37,81	0,99	22	73	50	167

a) pozitivní mód ESI

b) negativní mód ESI

Z tabulky 12 plyne, že pozitivní mód ionizace karboxylových kyselin s využitím ion-párového činidla při CZE-ESI-MS/MS analýze vede k významně nižším hodnotám LOD. Nejvyšší zlepšení citlivosti bylo dosaženo pro kyselinu 3-chloropropionovou (333krát lepší citlivost oproti negativní ionizaci), což potvrzuje již publikovanou teorii, že nejvyšší afinitu má ion-párové činidlo k molekulám obsahující chlor. Podrobnější diskuze vztahu mezi strukturou karboxylové kyseliny a účinností ionizace vzniklého komplexu s ion-párovým činidlem je uvedena v následující kapitole.

Pro ilustraci zvýšení citlivosti jsou na Obr. 23 zobrazeny rekonstruované elektroforegramy pro pyrohroznovou kyselinu měřenou ve třech různých módech (SIM mód negativní ionizace, SIM mód pozitivní ionizace komplexu pyrohroznová kyselina – ion párové činidlo a SRM komplexu pyrohroznová kyselina – ion párové činidlo v pozitivním módu).



Obr. 23 Rekonstruované elektroferogramy kyseliny pyrohroznové měřené ve třech módech a) negativní ionizace SIM molekulárního iontu  $[M-H]$ , b) pozitivní ionizace SIM komplexu  $[M+IPR]^+$  c) pozitivní ionizace SRM rozpadu komplexu  $[M+IPR]^+$ , kde M představuje pyrohroznovou kyselinu, koncentrace pyrohroznové kyseliny 10 mg/l.

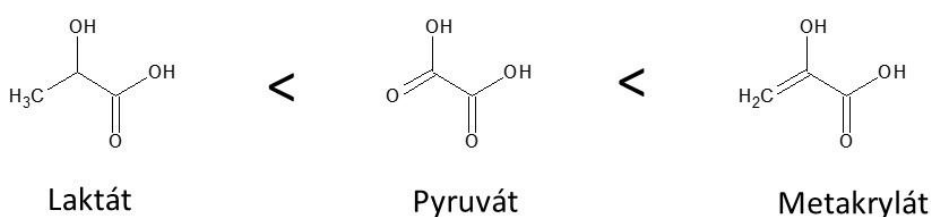
#### 4.3 Vliv substituentů karboxylových kyselin na účinnost ionizace v pozitivním módu

Nejprve je důležité zmínit, že současná literatura neposkytuje bližší náhled na vliv substituentu analytu na ionizaci vzniklého komplexu s ion-párovým činidlem. Uvedené závěry jsou tedy hypotézy a empirické závěry, které vyplývají s dosažených výsledků. Lze předpokládat, že odlišné substituenty mají různý vliv na solvataci analytu a samozřejmě také acidobazickou rovnováhu karboxylové skupiny studovaných kyselin. Solvatace samotné kyseliny a vzniklého komplexu mezi kyselinou a ion-párovým činidlem hraje roli hlavně při sprejování a tedy je nutné vzít do úvahy i děje probíhající v plynné fázi při sprejování. Naproti tomu, komplex mezi studovanou kyselinou a ion-párovým činidlem vzniká už v kapalně fázi, takže na výsledné účinnosti ionizace se podílí děje probíhající jak v kapalně tak v plynné fázi.

Čím je analyt více solvatován (např. obsahuje-li stericky přístupnou hydroxylovou skupinu), tím spíše je zadržován v neutrálnějším středu kapičky při sprejování a jeho ionizace je potlačena. Menší solvatace má opačný efekt a tudíž podporuje ionizaci analytu. Klíčovou roli také hraje povrchová aktivita analytu a hlavně povrchová aktivita vzniklého komplexu mezi ion-párovým činidlem a kyselinou.

Vezme-li v úvahu ionizaci aminokyselin, účinnost ionizace roste ve směru glycin, alanin, fenyloalanin [37]. S rostoucím hydrofobním řetězcem aminokyselin se zvyšuje jejich povrchová aktivita.

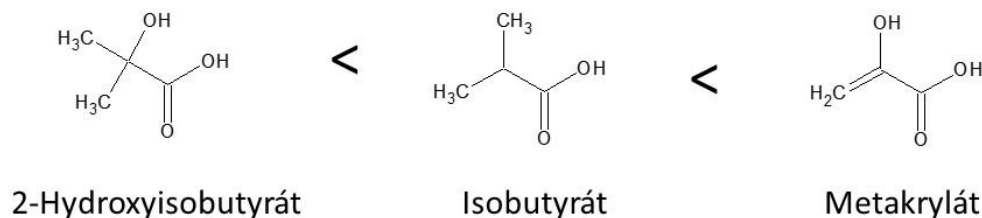
Nejdříve porovnejme účinnosti ionizace laktátu, pyruvátu a metakrylátu (Obr. 24).



Obr. 24 Srovnání účinnosti ionizace (vyjádřená jako plocha píku odpovídající kyseliny) v pozitivním módu s ion-párovým činidlem pro laktát, pyruvát a metakrylát.

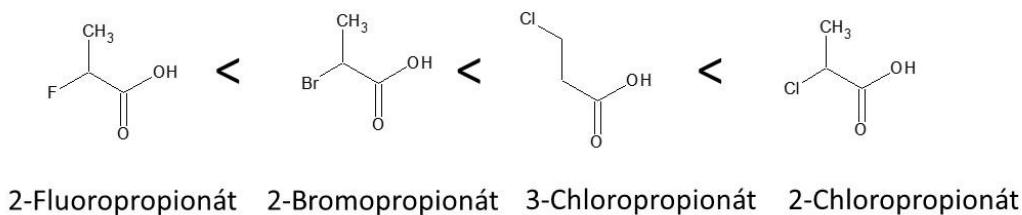
Hydroxylová skupina laktátu je v porovnání s keto- a methylenovou skupinou nejvíce solvatovaná a proto má laktát z uvedené trojice kyselin nejnižší odezvu a tedy nejnižší účinnost ionizace. Pyrohroznová kyselina má keto skupinu v konjugaci s  $-\text{COOH}$ , což způsobuje její menší solvataci a lepší účinnost ionizace. Nejvyšší odezvu má kyselina metakrylová, kde je methylenová skupina také v konjugaci s karboxylovou skupinou, takže dochází ke snížení solvatace. Navíc je zde dvojná vazba mezi uhlíky s menším dipólovým momentem a tím i stupeň solvatace se dále sníží.

Obdobné závěry lze uvést i pro další trojici karboxylových kyselin (Obr. 25).



Obr. 25 Srovnání účinnosti ionizace (vyjádřená jako plocha píku odpovídající kyseliny) v pozitivním módu s ion-párovým činidlem pro 2-hydroxyisobutyrát, isobutyrát a metakrylát.

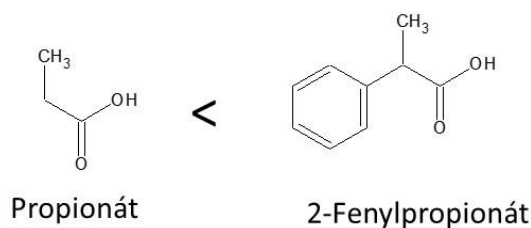
V případě halogen derivátů propionové kyseliny (Obr. 26) hraje roli hustota náboje na jeho povrchu a velikost atomu.



Obr. 26 Srovnání účinnosti ionizace (vyjádřená jako plocha píku odpovídající kyseliny) v pozitivním módu s ion-párovým činidlem pro 2-fluoropropionát, 2-bromopropionát, 3-chloropropionát a 2-chloropropionát.

Fluor má obecně nejvyšší elektronegativitu, na malém povrchu atomu je vysoká hustota náboje. Tento fakt způsobuje značnou solvataci fluoru a proto má nejnižší odezvu. Oproti tomu brom je větší atom, na kterém je náboj lépe rozprostřen a hustota náboje je tedy výrazně menší (menší solvatace). Lze předpokládat, že odezva 2-CL a 3-CL měla být mezi 2-F a 2-BR, ale překvapivě 2-CL má jednoznačně v pozitivním módu nejvyšší odezvu ze všech testovaných karboxylových kyselin. Poloha chloru v 2-CL a 3-CL výrazně ovlivňuje odezvu. 2-CL má oproti 3-CL hydrofobní methylovou skupinu, která zvyšuje povrchově aktivní vlastnost kyseliny (polární a nepolární část).

Posledním případem je přítomnost aromatického kruhu (Obr. 27).



Obr. 27 Srovnání účinnosti ionizace (vyjádřená jako plocha píku odpovídající kyseliny) v pozitivním módu s ion-párovým činidlem pro propionát a 2-fenylpropionát.

Hydrofobní charakter fenylu snižuje solvataci molekuly. 2-Fenyllaktát poskytuje druhou nejvyšší odezvu ze všech karboxylových kyselin.

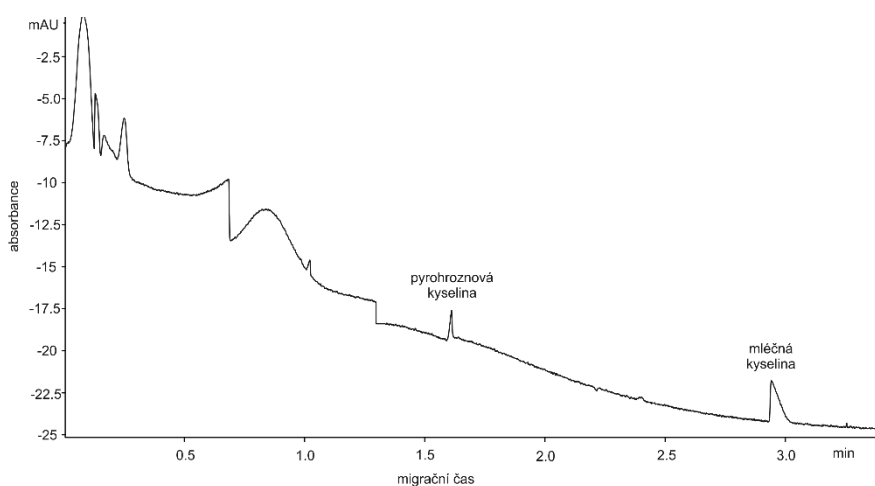
#### 4.4 Aplikace vyvinuté metody na reálný vzorek

Vyvinutá metoda CZE-ESI-MS/MS analýzy karboxylových kyselin s využitím pozitivního sprejovacího módu byla aplikovaná na reálný vzorek bílého vína – stanovené kyseliny mléčné a pyrohroznové. Navíc pro ověření správnosti metody byly získané výsledky porovnány s metodou stanovení mléčné a pyrohroznové kyseliny ve stejném vzorku bílého vína s využitím CZE s nepřímou UV/VIS detekcí.

Podmínky pro stanovení kyseliny mléčné a pyrohroznové s využitím CZE s nepřímou UV/VIS detekcí byly následující:

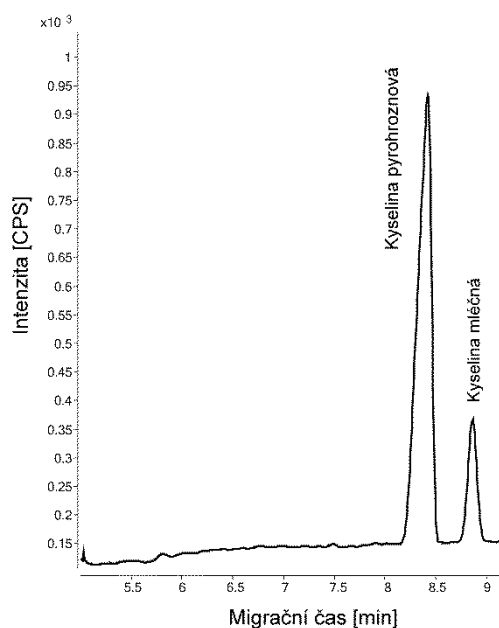
Pracovní elektrolyt 10 mM salicylát/L-HIS pH 4.5, délka kapiláry 33,5 cm; separační napětí -25 kV; polyakrylamidem pokrytá kapilára, dávkování 100 mbar/5s; vlnová délka 238 nm; přístroj Agilent CE 7100. Vzorek vína byl před analýzou filtrován přes 0,45  $\mu\text{m}$  filtr a zředěn deionizovanou vodou (25x). Kvantifikace obou kyselin byla uskutečněna pomocí metody standardního přídávku (celkem tři standardní přídávky). Pokrytá kapilára byla v tomto případě využita pro eliminaci elektroosmotického toku, tak aby separace karboxylových kyselin mohla probíhat v mírně kyselém pH.

Elektroferogram separace pyrohroznové a mléčné kyseliny s využitím CZE s nepřímou UV-VIS detekcí je na Obr. 28



Obr. 28 Elektroferogram separace standardů pyrohroznové a mléčné kyseliny. Podmínky: 10 mM salicylát/L-His, pH 4.5, dávkování 100 mbar/5s,  $U = -25$  kV, koncentrace 50 mg/l.

Stejný vzorek bílého vína byl proměřen i s využitím CZE-ESI-MS/MS metody využívající ion-párovou interakci. Rekonstruovaný MRM elektroferogram je na Obr. 29.



Obr. 29 Rekonstruovaný MRM elektroferogram separace pyrohroznové a mléčné kyseliny. Podmínky analýzy jsou uvedeny v Tab. 11

Výsledky srovnání metody CZE-ESI-MS/MS v pozitivním módu ionizace a CZE s nepřímou UV/VIS detekcí jsou uvedeny v Tab. 13.

Tab. 13 Stanovení kyseliny mléčné a pyrohroznové v bílém víně pomocí CE-ESI-MS/MS a nepřímou CE-UV/VIS.

Analyt	CE-ESI-MS/MS	$A_{RSD}$	Nepřímá	$A_{RSD}$
	[mg/L]	[%]	CE-UV/VIS	[%]
			[mg/L]	
<b>PYR</b>	42,9	2,6	42,3	2,1
<b>LAC</b>	1063,4	3,7	886,9	2,3

Obě metody přinesly, při kvantifikaci kyseliny mléčné a pyrohroznové, obdobné výsledky. Získané hodnoty kyseliny mléčné ve víně korespondují s literaturou [38].

## 5 Závěr

Byla studována možnost využití ion-párového činidla [(1,3-propandiyl-bis(tripropylfosfonium) difluorid] pro ionizaci vybraných karboxylových kyselin v pozitivním módu elektrospreje. Získané závěry a poznatky pak byly využity pro vývoj metody CZE-ESI-MS/MS separace karboxylových kyselin s detekcí v kladném ionizačním módu. Presentovaná metoda umožňuje citlivější stanovení karboxylových kyselin oproti stávajícímu konvenčnímu způsobu analýzy, kde ionizace karboxylových kyselin probíhá v negativním módu. Nejvyšší zlepšení citlivosti bylo dosaženo pro kyselinu 2-chloropropionovou (333 krát nižší LOD oproti negativní ionizaci). Naopak nejméně byla citlivost zvýšena u 2-fluoropropionové kyseliny (2,5 krát nižší LOD oproti negativní ionizaci). S využitím ion-párové interakce a detekce v pozitivní módu se limity detekcí studovaných kyselin pohybovaly v desítkách ng/ml.

Vyvinutá metoda CZE-ESI-MS/MS separace a detekce vybraných karboxylových kyselin byla aplikována na analýzu mléčné a pyrohroznové kyseliny ve vzorku bílého vína. Získané výsledky pak byly navíc porovnány s výsledky získanými metodou CZE s nepřímou UV-VIS detekcí. Obě metody poskytovaly srovnatelné výsledky.

Kromě praktické aplikace vyvinuté metody byla provedena i pilotní studie vlivu struktury karboxylové kyseliny na účinnost ionizace elektrosprejem v pozitivním módu s využitím ion-párového činidla.



## 6 Literatura

1. Rozing P.G., Lauer H.H. (2010): *High Performance Capillary Electrophoresis*. Agilent Technologies, Germany, 174.
2. Khaledi M.G. (1998): *High Performance Capillary Electrophoresis*. John Wiley and Sons, Hoboken, USA, 1013.
3. Jorgenson J.W., Lukacs K.D. (1981): Zone electrophoresis in open-tubular glass capillaries. *Anal. Chem.*, **53**, 1298-1302.
4. Landers P.J. (2008): *Handbook of Capillary and Microchip Electrophoresis and Associated Microtechniques*. 3rd ed., CRC Press, Boca Raton, USA, 1598.
5. Altria D.K. (1996): *Capillary electrophoresis guidebook: Principles, Operation, and Application*. Glaxo Research and Development, Ware, Hertfordshire, UK, 369.
6. Altria D.K., Smith N.W., Turnbull C.H. (1997): A review of the current status of capillary electrochromatography technology and applications. *Chromatographia*, **46**, 664-678.
7. Biology Discussion homepage:  
<http://www.biologydiscussion.com/biochemistry/electrochemical-techniques/top-10-types-of-electrophoretic-techniques-used-in-biochemistry/12669> (5. 1. 2016).
8. Pacáková V., Coufal P., Štulík K. (1999): Capillary electrophoresis of inorganic cations. *Journal of Chromatography A*, **834**, 257-275.
9. Harrison D.J., Manz A., Fan Z., Ludi, Widmer M.H. (1992): Capillary electrophoresis and sample injection systems integrated on a planar glass chip. *Anal. Chem.*, **64**, 1926-1932.
10. Ruiz-Martinez C.M., Berka J., Belenkii A., Foret F., Millner W.A., Karger B.L. (1993): DNA sequencing by capillary electrophoresis with replaceable linear polyacrylamide and laser-induced fluorescence detection. *Anal. Chem.*, **65**, 2851-2858.
11. Colón A.L., Dadoo R., Zare N.R. (1993): Determination of carbohydrates by capillary zone electrophoresis with amperometric detection at a copper microelectrode. *Anal. Chem.*, **65**, 476-481.
12. Zemann J.A., Schnell E., Volgger D., Bonn K.G. (1988): Contactless conductivity detection for capillary electrophoresis. *Anal. Chem.*, **70**, 563-567.
13. Ramautar R., Somsen W.G., Jong de J.G. (2009) CE-MS in metabolomics. *Electrophoresis*, **30**, 276-291.
14. Kuhr G.W., Yeung S.E. (1988): Optimization of sensitivity and separation in capillary zone electrophoresis with indirect fluorescence detection. *Anal. Chem.*, **60**, 2642-2646.
15. Beck W., Engelhardt H. (1992): Capillary electrophoresis of organic and inorganic cations with indirect UV detection. *Chromatographia*, **33**, 7-8.
16. Premier biosoft homepage: [http://www.premierbiosoft.com/tech\\_notes/mass-spectrometry.html](http://www.premierbiosoft.com/tech_notes/mass-spectrometry.html) (10. 1. 2016).

17. Watson J.T., Sparkman O.D. (2007): *Introduction to Mass Spectrometry*. John Wiley and Sons, Hoboken, USA, 819.
18. Pol J., Strohal M., Havlíček V., Volny M. (2010): Molecular mass spectrometry imaging in biomedical and life science research. *Histochemistry and cell biology*, **5**, 423-443.
19. Lamondlab homepage:  
<http://www.lamondlab.com/MSResource/LCMS/MassSpectrometry/electrosprayIonisation.php> (20. 12. 2015).
20. Hewlett-Packard: CE-ESI-MS: an integrated solution. Publikáční číslo 5968-1328E, 1999.
21. Michal Holčapek homepage: <http://holcapek.upce.cz/vyuka-ms-org-anal.php> (10.11.2015).
22. Griffiths J.W., Wang Y. (2009): Mass spectrometry: from proteomics to metabolomics and lipidomics. *Chem. Soc. Rev.*, **38**, 1882-1896.
23. Soukup-Hein J.R., Remsburg W.J., Dasgupta K.P., Armstrong W.D. (2007): A general, positive ion mode ESI-MS approach for the analysis of singly charged inorganic and organic anions using a dicationic reagent. *Anal. Chem.*, **79**, 7346-7352.
24. Remsburg W.J., Soukup-Hein J.R., Crank A., Breitbach S.Z., Payagala T., Armstrong W.D. (2008): Evaluation of dicationic reagents for their use in detection of anions using positive ion mode ESI-MS via gas phase ion association. *J Am Soc Mass Spectrom*, **19**, 261-269.
25. Gerardi A.R., Lin X.L., Breitbach Z.S., Armstrong D.W., Colyer C.L. (2012): CE-ESI-MS separation of divalent organic and inorganic anions using a tricationic complexing reagent. *Electrophoresis*, **33**, 734-740.
26. Soukup-Hein J.R., Remsburg W.J., Dasgupta K.P., Armstrong W.D. (2007): A general, positive ion mode ESI-MS approach for the analysis of singly charged inorganic and organic anions using a dicationic reagent. *Anal. Chem.*, **79**, 7346-7352.
27. Guo H.Y., Dolzan M.D., Spudeit D.A., Xu C.D., Breitbach Z.S., Screenivasan U., Armstrong D.W. (2015): Sensitive detection of anionic metabolites of drugs by positive ion mode HPLC-PIESI-MS. *International journal of mass spectrometry*,
28. Guo H.Y., Riter L.S., Wujcik C.E., Armstrong D.W. (2016) Quantitative analysis of dicamba residues in raw agricultural commodities with the use of ion-pairing reagents in LC-ESI-MS/MS. *Talanta*, **389**, 14-25.
29. Chengdong X., Armstrong D.W. (2013): High-performance liquid chromatography with paired ion electrospray ionization (PIESI) tandem mass spectrometry for the highly sensitive determination of acidic pesticides in water. *Analytica Chimica Acta*, **762**, 1-9.
30. Santos I.C., Guo H.Y., Mesquita R.B.R., Rangel A., Armstrong D.W., Schug K.A. (2015): Paired-ion electrospray ionization-triple quadrupole tandem mass spectrometry for quantification of anionic surfactants in waters. *Talanta*, **143**, 320-327.

31. Feng Q., Wanigasekara E., Breitbach Z.S., Armstrong D.W. (2012): Separation of multiply charged anions by capillary electrophoresis using alkyl phosphonium pairing agents. *Electrophoresis*, **33**, 1153-1161.
32. Remsburg W.J., Soukup-Hein J.R., Crank A., Breitbach S.Z., Payagala T., Armstrong W.D. (2008): Evaluation of dicationic reagents for their use in detection of anions using positive ion mode ESI-MS via gas phase ion association. *J Am Soc Mass Spectrom*, **19**, 261-269.
33. Breitbach Z.S., Wanigasekara E., Dodbiba E., Schug K.A., Armstrong D.W. (2010): Mechanisms of ESI-MS selectivity and sensitivity enhancements when detecting anions in the positive mode using cationic pairing agents. *Analytical chemistry*, **82**, 9066-9073.
34. Xu C.D., Guo H.Y., Breitbach Z.S., Armstrong D.W. (2014): Mechanism and sensitivity of anion detection using rationally designed unsymmetrical dications in paired ion electrospray ionization mass spectrometry. *Analytical chemistry*, **86**, 2665-2672.
35. Breitbach Z.S., Berthold A., Huang K., Armstrong D.W. (2015) Mass spectrometric detection of trace anions: The evolution of paired-ion electrospray ionization (PIESI). *Mass Spectrometry Reviews*, **35**, 201-218.
36. Feng Q., Wanigasekara E., Breitbach Z.S., Armstrong D.W. (2012): Separation of multiply charged anions by capillary electrophoresis using alkyl phosphonium pairing agents. *Electrophoresis*, **33**, 1153-1161.
37. Cech N.B., Enke C.G. (2001) Practical implications of some recent studies in electrospray ionization fundamentals. *Mass Spectrom Rev.*, **20**, 362-387.
38. Goriushkina T.B., Soldatkin A.P., Dzyadevych S.V. (2009) Application of amperometric enzyme biosensors for wine and must analysis. *Procedia Chemistry I*, **16**, 277-280.

## 7 Seznam zkratk

CID	Kolizí indukovaná disociace
CZE	Kapilární zónová elektroforéza
DESI	Desorpční elektrosprej
EOF	Elektroosmotický tok
EPM	Rovnovážný rozdělovací model
EI	Elektronová ionizace
IC	Ionexová chromatografie
ICR	Iontová cyklotronová rezonance
IPR	Ion-párové činidlo
ISO	Isobutyrová kyselina
LAC	Mléčná kyselina
MET	Metakrylová kyselina
PROP	Propiónová kyselina
PYR	Pyrohroznová kyselina
SIMS	Hmotnostní spektrometrie sekundárních iontů
2-Br	2-bromopropiónová kyselina
2-Cl	2-chloropropiónová kyselina
3-Cl	3-chloropropiónová kyselina
2-F	2-fluoropropiónová kyselina
2-OH	2-hydroxyisobutyrová kyselina
2-Ph	2-fenylpropiónová kyselina