

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

**Fakulta přírodovědecká
Katedra analytické chemie**

**ANALÝZA „DESIGNER DRUGS“
KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZOU S HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIÍ**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Fakulta přírodovědecká

Katedra analytické chemie

**STANOVENÍ „DESIGNER DRUGS“
KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZOU S HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIÍ**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor práce:

Bc. Zdeňka Táborská

Studijní obor:

Analytická chemie

Vedoucí diplomové práce:

Doc. RNDr. Vítězslav Maier, PhD.

Olomouc 2014

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, 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

Na tomto místě bych chtěla poděkovat rodině a přátelům za podporu v průběhu studia.

Dále doc. RNDr. Vítězslavu Maierovi, Ph.D., za vedení mé práce, jeho trpělivost, ochotu a cenné připomínky. Mgr. Joanně Znalezioně, Ph.D., za pomoc v laboratoři a nápady k vypracování diplomové práce.

SOUHRN

Tato diplomová práce se zabývá optimalizací podmínek pro stanovení kationů metodou CE-MS, popř. CE-UV s využitím iontové kapaliny jako detergentu.

V teoretické části je popsána skupina syntetických drog, kam kationy spadají, základy kapilární elektroforézy a hmotnostní spektrometrie včetně jejich instrumentace, část je věnována dosud publikovaným metodám studia kationů.

Experimentální část je zaměřena na optimalizaci podmínek separace CE-ESI-MS, především pH a složení elektrolytu. Část věnovaná metodě CE-UV je zaměřena na složení elektrolytu a koncentraci použité iontové kapaliny.

SUMMARY

This diploma thesis deals with an optimization of condition for determination of cathinones via the CE-MS, or CE-UV method, using an ion liquid as a selectivity agent.

The theoretical part talks about deal a with physico-chemical properties of studied group of synthetic drugs, which includes cathinones, the basics of capillary electrophoresis and the mass spectrometry, including their instrumentation. The his part also deals with already published methods of studying cathinones

The experimental part focuses on the optimization of conditions of separation of selected cathinones using CE-ESI-MS. The optimization of both CE and MS parameters were done mainly on pH, and the composition of the electrolyte and ESI sprayer conditions. The part dedicated to the CE-UV method focuses on the composition of the electrolyte and the concentration of the ionic liquid.

OBSAH

1	ÚVOD.....	8
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	9
2.1	Catha edulis	9
2.2	Přírodní katinony	10
2.3	Syntetické katinony	11
2.3.1	Mefedron	12
2.3.2	Metylon.....	13
2.3.3	MDPV.....	13
2.4	Práce zabývající se stanovením katinonů	13
2.5	Kapilární elektroforéza	16
2.5.1	Historie	16
2.5.2	Princip.....	16
2.5.3	Migrace a elektroosmotický tok	16
2.5.4	Micelární elektrokinetická chromatografie	19
2.5.5	Vlastnosti vzorku.....	20
2.5.6	Přístrojové vybavení	20
2.5.6.1	Separační kapiláry a separační napětí.....	21
2.5.6.2	Dávkování vzorku	22
2.5.6.3	Detektory	23
2.6	Spojení kapilární elektroforézy a hmotnostní spektrometrie.....	24
2.6.1	Princip.....	24
2.6.2	Iontový zdroj	25
2.6.2.1	Ionizace elektrosprejem	25
2.6.3	Hmotnostní analyzátor.....	27
2.6.3.1	Kvadrupólový analyzátor	28
2.6.3.2	Analyzátor z doby letu (TOF)	29
2.6.3.3	Iontová past (IT)	30
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	31
3.1	Přístrojové vybavení	31
3.2	Chemikálie.....	31
3.3	Příprava pufrů	32
3.3.1	Borátový pufr.....	32
3.3.2	Acetátový pufr	32
3.3.3	Mravenčanový pufr.....	33
4	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	34
4.1	CE-MS	34
4.2	CE-UV	38
5	ZÁVĚR.....	43
	ZDROJE	44

1 ÚVOD

Nic není objeveno a zároveň hned dokonalé.

(Marcus Tullius Cicero)

Kapilární elektroforéza je analytická elektromigrační metoda. Svůj rozmach zaznamenala na počátku 21. století, kdy byla využita v projektu mapování lidského genomu. Má široký rozsah využití – od analýzy jednoduchých organických a anorganických iontů až po biomakromolekuly jako proteiny či DNA. Oproti jiným separačním metodám má řadu výhod – nízká spotřeba vzorku a činidel nutných k separaci, krátká doba analýzy, možnost pracovat s rozličnými detektory, vysoká účinnost a rozlišovací schopnost. Mezi její nevýhody lze zahrnout zejména nízkou koncentrační citlivost a malou robustnost. V současné době je to nejlepší technika na trhu při porovnání separační účinnosti a nákladů s metodou spjatých. Je účinným nástrojem, jehož potenciál na poli toxikologie je teprve objeven.

Cílem této práce bylo vyvinutí metody separace alkaloidů rostliny *Catha edulis* Forsk., známých jako katinony. Ty se v drogové sféře vyskytují nejen v přírodní, ale i modifikované formě, tzv. „designer drugs“ nebo též „legal highs“.

„Nové syntetické drogy jsou výsledkem snahy ilegálních výrobců obejít zákony, v ČR zákon č. 167/1998 Sb. ve znění pozdějších předpisů, a vyrobit psychoaktivní látku, která není na seznamu ilegálních látek, nebo jejíž prekurzory nepatří mezi monitorované substance [1]. Prostřednictvím systému včasného varování je v současné době sledováno více než 15 syntetických katinonů [2]. Držení více než 80 g katy jedlé (nebo více než 4 g katinonu) je v ČR trestným činem, stejně jako držení více než 0,8 g efedrinu“ [3].

Výskyt těchto drog na trhu a zvýšená poptávka po nich si vyžádala vyvinutí dostatečně citlivých analytických technik jak pro identifikaci, tak jejich kvantifikaci v různých maticích.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 *Catha edulis*

Nejstarší dochovaná literární zmínka o této rostlině pochází z arabského rukopisu datovaného do 1. poloviny 14. století, který uvádí, že král Ifatu, Sabr Ad-Din, nechal khat vysadit ve městě Marad pro muslimy. Khat zůstal neznámým vědeckému světu do konce 18. století, kdy během své výpravy, která byla pořádána králem Frederickem V., shromažďoval finský biolog Peter Forskål se svými kolegy rostliny Arábie a narazil i na khat. Tuto rostlinu pojmenoval *Catha edulis* a její popis byl poprvé uveden v knize *Flora Aegyptiaco-Arabica*, která byla vydána posmrtně r. 1775 jediným přeživším kolegou Carstenem Niebuhrem, který ji pojmenoval *Catha edulis* Forsk [2, 3].

„*Catha edulis* patří do rodiny *Celastraceae*. Jedná se o stále zelený keř nebo nízký strom dosahující výšky až 5 m. Listy jsou 4 – 8 cm dlouhé, na okrajích pilovitě vroubkované. Kvete drobným bílým květem, který má 5 okvětních lístků“ [4].



Obrázek 1. *Catha edulis*, převzato z [5]

V některých částech země, jako východní Afrika, je tato rostlina pěstována na plantážích a její čerstvé listy žvýkány pro své psychostimulační účinky podobné amfetaminu. Pro muslimy je náhražkou alkoholu, který mají zakázáno Koránem konzumovat. Naopak jim je umožněno užívat byliny, které jsou léčivé či jinak prospěšné jejich organismu.

„Na trhu se vyskytuje khat ve dvou různých formách, a to „shrub-drug“ nebo též „leaf-drug“ a „tree-drug“. „Shrub-drug“ obsahuje listy khatu, zatímco „tree-drug“ obsahuje zejména výhonky s malým množstvím listů“ [6]. Khat se prodává ve svazcích dlouhých 40

cm, o přibližné hmotnosti 0,5 kg. Je balen do banánového listu, čímž si zachovává dlouhodobější trvanlivost (Obrázek 2). Nejčastěji se žvýká, ale v oblibě jsou i tzv. somálské čaje.



Obrázek 2. Khat na trhu, přejato z [7]

2.2 Přírodní katinony

Listy khatu jsou bohaté na doprovodné látky, obsahují třísloviny, silice, apod. Toxikologicky a farmakologicky nejvýznamnější jsou však obsažené alkaloidy. Ty jsou však účinné pouze v čerstvých rostlinách, max. pár dní po jejich sklizni.

Hlavním alkaloidem působícím na CNS je *S*-(-)- α -aminopropiofenon (katinon). Tento alkaloid byl poprvé izolován a identifikován r. 1975, na čemž mají zásluhu vědci z laboratoře pro narkotika OSN. Tento alkaloid je nestálý a v rostlině jej doprovázejí degradační produkty (viz. Schéma 1), kterými jsou *S,S*-(+)-norpseudoefedrinem (katin), který vykazuje menší psychoaktivní účinek, a *R,S*-(-)-norefedrinem, nemající žádný psychoaktivní účinek.

Rovněž mohou být přítomny „fenylpentenylaminy *S*-(+)-merukatinon, *R,S*-(+)-merukatin a *S,S*-(-)-pseudomerukatin, které jsou psychoaktivní, ale jejich množství v khatu je malé, <0,1 do 56 mg/100 g sušené rostliny. Celkové množství fenylalkylaminů v khatu se pohybuje mezi 20 a 960 mg/100 g sušeného khatu a katinonu mezi 9 a 330 mg/100 g. Obsah katinu a norefedrinu je v rozmezí 5 – 750 mg/100 g, resp. 0,7 – 80 mg/100 g“ [8].

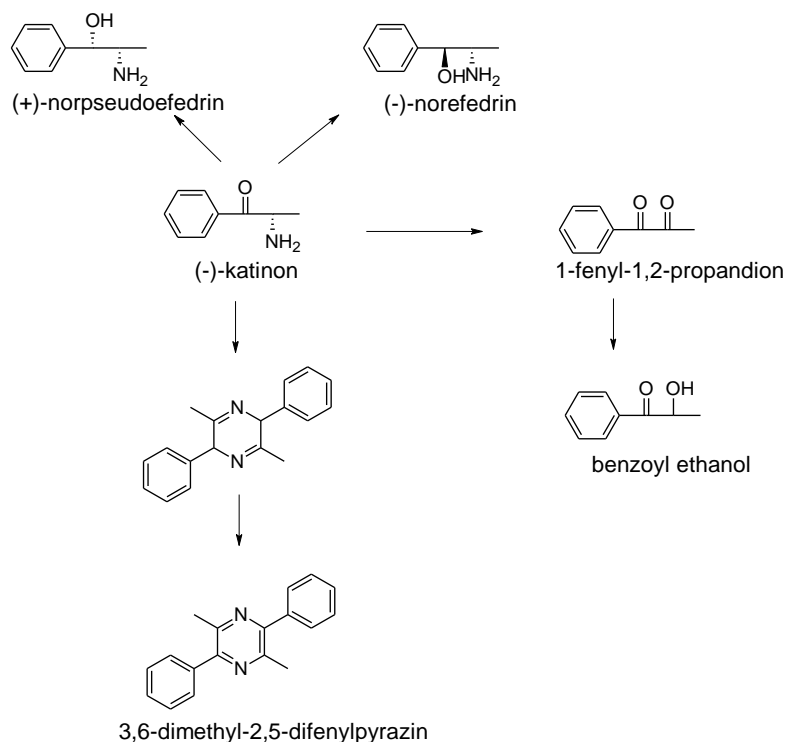


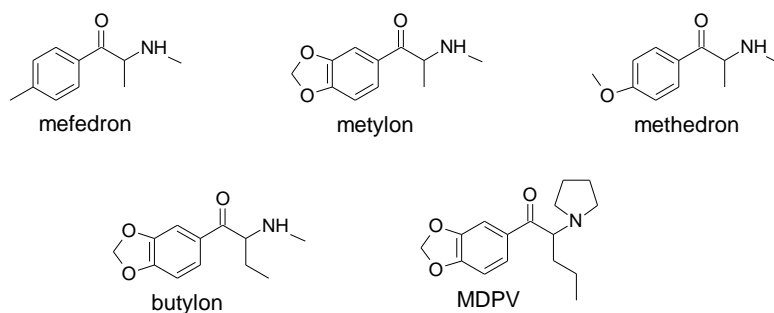
Schéma 1. Degradační produkty katinonu, převzato z [9]

2.3 Syntetické katinony

Syntetické katinony patří do skupiny β -ketoamfetaminů, které jsou odvozeny od přírodních katinonů. Tato skupina zahrnuje mefedron, methedron metylon, methylenedioxyprovaleron (MDPV), butylon a další. Strukturální vzorce těchto látek jsou zobrazeny na obrázku 3 [10].

Některé z těchto látek sloužily k lékařským účelům, např. bupropion k léčbě deprese, provaleron k léčbě obezity [11]. Tyto drogy jsou dostupné např. na internetu v tzv. headshopech s označením „Produkt je určen pouze pro technické užití, je zdraví škodlivý a není určen ke konzumaci lidmi.“ ve formě koupelových solí, ev. hnojiv pro rostliny.

Jsou aplikovány orálně v případě tablet, u prášku je to intravenózně do žíly nebo šňupáním. Během krátkého okamžiku se dostavuje pocit nadměrné energie, hovornost, euforie. Tyto látky snižují chuť k jídlu, způsobují rozšíření zorniček, mají vliv na kardiovaskulární systém, mohou být příčinou halucinací. Na těchto látkách si lze vypěstovat psychickou závislost.



Obrázek 3. Některé syntetické katinony

2.3.1 Mefedron

Syntéza mefedronu byla poprvé popsána Saemem de Burnagem Sanchezem roku 1929 [12]. Tato droga je známa mezi uživateli především jako „mňau mňau“, má však řadu dalších názvů, např. „M-Cat, Miaow, MeF“.

Ceny v českých head-shopech se pohybují v rozmezí 600–650 Kč/g, při odběru většího množství jsou často poskytovány slevy.

Uživatelé udávají, že po kouření, ev. šňupání se dostavuje účinek po 10–20 min s trváním 1–2 hod, při intravenózním podání nastupuje účinek po 10–15 min na cca 30 min, po orálním podání se účinek dostavuje po 15–45 min s dobou působení 2–4 hod [11].

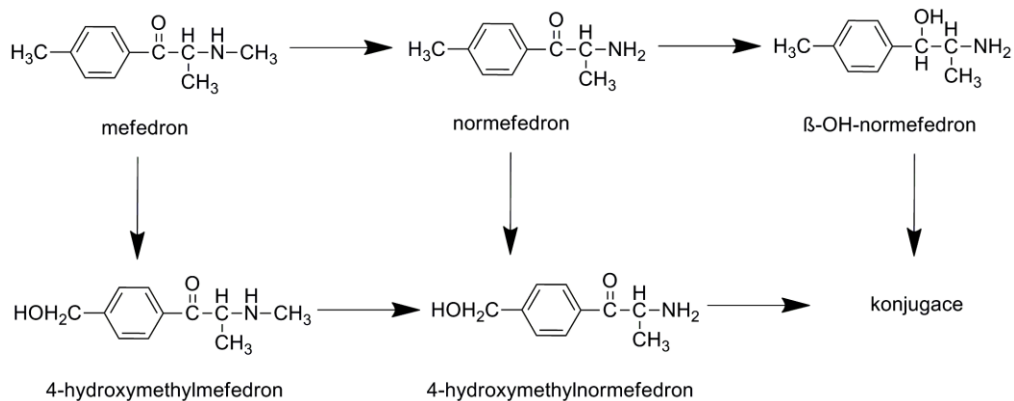


Schéma 2. Metabolismus mefedronu [13 – 16]

2.3.2 Metylon

Metabolismus metylonu je zobrazen na schématu 3.

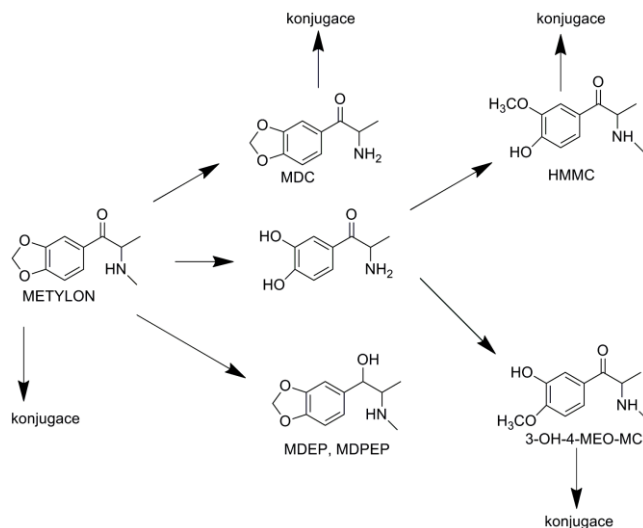


Schéma 3. Metabolismus metylonu, převzato z [17]

2.3.3 MDPV

MDPV byl syntetizován Boehringerem Ingelheimem. K jeho patentování došlo roku 1969. Jde o hnědý či žlutozelený (volná bazická forma), bílý (ve formě hydrochloridu) nebo šedý (evropská forma) amorfni, resp. krystalický prášek. Hlavními metabolity jsou katechol a methylkatechol pyrovaleron [18].

2.4 Práce zabývající se stanovením kationů

Pro analýzu alkaloidů obsažených v rostlině *Catha Edulis*, i těch syntetických, jsou s výhodou využívány separační metody – plynová chromatografie (GC) a kapalinová chromatografie (LC) – pro svou jednoduchost a rychlost ve spojení s hmotnostní spektrometrií nebo jinými dostatečně citlivými detektory.

Analýze na plynovém chromatografu je předřazen derivatizační krok, který slouží k převedení analytu na těžavější sloučeninu, která je pro vlastní analýzu vhodnější. V literatuře je nejčastěji uváděna methylace působením vhodného organického činidla.

Pro stanovení kationu je možno použít i jiné metody, např. UV-VIS spektrofotometrii, jak uvádí práce Al-Obaidse a kol. [19].

Tabulka 1. Metody stanovení přírodních katinonů

Technika	Analyzované látky	Materiál pro extrakci	Izolace	Detekce	Citace
HPLC	fenylalkylaminy khatu	listy khatu	L–L extrakce, ultrazvuk, SPE	DAD	[8]
TLC	fenylalkylaminy khatu	listy khatu	L–L extrakce, ultrazvuk	UV–Vis 205 nm a 254 nm	[8]
GC-MS	katinon, katin, norefedrin	listy khatu	L-L extrakce	MS	[9]
GC-MS	katinon, katin a fenylpropanolamin	listy khatu	macerace methanolem, L-L extrakce, derivatizace anhydridem kyseliny trifluorooctové a nebo N-methyl-N-trimethylsilyl-trifluoroacetamidem	MS	[20]
GC-MS	katinon, katin a fenylpropanolamin	moč	SPE extrakce, derivatizace MBHFBA	MS	[21]
GC-MS	katinon, katin	listy khatu	sonifikace, L–L extrakce, derivatizace anhydridy, ev. TPC	MS	[22]
GC-MS	efedrin, norefedrin	standardy	extrakce, derivatizace MTPA	MS	[23]
Chirální separace CE s CDs	katinon, katin, norefedrin, merukatinon, merukatin, pseudomerukatin	listy khatu	modifikace cit. [18]	UV–Vis 210 nm	[24]
LC-ESI-MS/MS	katinony, efedrin	krev	centrifugace	MS/MS	[25]

Tabulka 2. Metody stanovení syntetických katinonů

Technika	Analyzované látky	Materiál pro extrakci	Izolace	Detekce	Citace
GC-MS	mefedron, butylon, metylon	moč	SPE extrakce, derivatizace methylací, acetylací ev. kombinací obou	MS	[15]
GC-MS	metylon, mefedron	standardy	derivatizace MSTFA	MS	[26]
GC-MS	mefedron	moč	hydrolýza, L-L extrakce, derivatizace anhydridem TFA + ethylacetát	MS	[27]
LC-MS	mefedron	moč	hydrolýza, deproteinace methanolem	MS	[27]
LC-MS/MS	mefedron	moč	hydrolýza, deproteinace methanolem	MS/MS	[27]
LC-MS/MS	mefedron + metabolity (4-methylefedrin, 4-methylnorefedrin)	vlasy	dekontaminace dichlormethanem, rozklad NaOH ev. enzymaticky, L-L extrakce	MS/MS	[28]
LC	mefedron	standardy	sonifikace	UV-Vis (232 nm)	[29]

2.5 Kapilární elektroforéza

2.5.1 Historie

Roku 1892 byl popsán pohyb anorganických částic v elektrickém poli koloidního roztoku. První experimenty s využitím elektroforézy započaly již v 19. století, ale s kapilární elektroforézou se setkáváme poprvé roku 1967, kdy Hjertén uskutečnil elektroforézu v rotující kapiláře. Metoda nese název „volná zónová elektroforéza“. Toto uspořádání s horizontálně uloženou kapilárou v průběhu elektroforézy, která rotuje podle podélné osy, má za cíl potlačit rušivé vlivy konvekce. Požadovaná část vzorku se nadávkuje do kapiláry s elektrolytem a je-li hustota složek vzorku větší než použitého elektrolytu, pohybuje se směrem dolů. Následně dojde k synchronizaci pohybu vzorku s kapilárou, čímž je dosaženo stabilizace. Detekce je stejná jako u současné elektroforézy [30].

Od té doby pokusů kapilární elektroforézy přibývalo. Prováděly se v kapilárách rozličných materiálů, ale i průměrů. Roku 1989 bylo na trh uvedeno první zařízení pro kapilární zónovou elektroforézu firmy Beckman.

2.5.2 Princip

Elektroforéza je založena na migraci nabitých částic ve stejnosměrném elektrickém poli. Rychlost jednotlivých částic je závislá na velikosti molekuly a náboji, který nesou. Z toho je zřejmé, že různě velké molekuly nesoucí rozdílný náboj se budou pohybovat jinou rychlostí, tudíž mohou být od sebe separovány.

2.5.3 Migrace a elektroosmotický tok

Na pohyb částic v elektrolytu mají vliv dvě síly – síla elektrického pole, vztah (1), která je kompenzována opačně směřující viskozitní silou, která se řídí Stokesovým zákonem, vztah (2).

$$F_e = q \cdot E \quad (1)$$

$$F_v = 6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r \cdot v \quad (2)$$

V rovnováze se tyto síly vyrovnají a získáváme vztah (3) pro rychlost pohybu částice v elektrickém poli, v němž vystupuje elektroforetická pohyblivost μ_e , která je definovaná jako

rychlost pohybu elektricky nabitých částic umístěných ve stejnosměrném poli jednotkové intenzity.

$$v = \mu_e \cdot E = \frac{q}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r} \cdot E \quad (3)$$

μ_e pohyblivost iontu v $\text{m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$

q náboj v C

η dynamická viskozita rozpouštědla v $\text{Pa} \cdot \text{s}$

r hydrodynamický poloměr iontu v m, tj. poloměr iontu včetně solvatačního obalu

v rychlost pohybu částice v $\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$

E intenzita elektrického pole v $\text{V} \cdot \text{m}^{-1}$

Směr pohybu částice v elektrickém poli, opomineme-li elektroosmotický tok, závisí na znaménku neseného náboje a polaritě vloženého napětí. Jeho rychlost je dle rovnice (3) přímo úměrná velikosti náboje a nepřímo úměrná intenzitě vkládaného elektrického pole a odporu elektrolytu.

Kromě elektroforetické pohyblivosti na částice v roztoku působí elektroosmotický tok (EOF). Nyní si představme křemennou kapiláru. Její vnitřní povrch je tvořen silanolovými skupinami ($-\text{SiOH}$), které jsou při $\text{pH} > 2$ ionizovány. Na vnitřní stěně se tak vytvoří záporný náboj, ke kterému jsou přitažlivými silami poutány volné kationty, čímž vzniká elektrická dvojvrstva (obrázek 4). Kationty směřují ke katodě, ale pro malý průřez kapiláry s sebou strhávají ostatní ionty. Za účasti EOF je tedy možné separovat kationty i anionty současně. Tyto částice jsou za přítomnosti EOF charakterizovány zdánlivou pohyblivostí podle vztahu (4):

$$\mu_A = \mu_E + \mu_{\text{EOF}} = \frac{l \cdot L}{t \cdot U} \quad (4)$$

μ_A zdánlivá pohyblivost v $\text{m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$

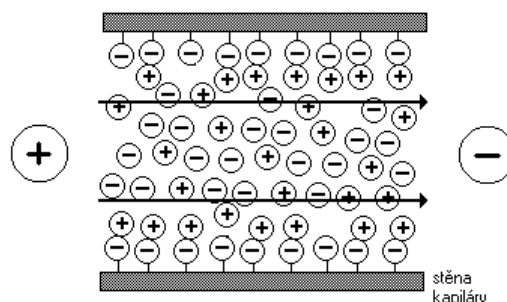
l délka kapiláry k detektoru v m

L délka kapiláry v m

U napětí ve V

t migrační čas v s

Elektrickou dvojrstvu charakterizuje tzv. ζ potenciál. Ten popisuje potenciálový rozdíl mezi vnitřní stěnou kapiláry, která je nabitá a okolním elektrolytem.



Obrázek 4. Elektroosmotický tok v křemenné kapiláře, převzato z [31]

EOF ovlivňuje průběh separace, v některých případech může být výhodné jej potlačit, ev. obrátit, což lze učinit řadou způsobů, jak ukazuje tabulka 3.

Tabulka 3. Změna separačních podmínek a vliv na EOF, převzato a upraveno [32]

Proměnný faktor	Běžné rozmezí	Vliv na EOF při zvýšení proměnného faktoru
pokrytí kapiláry	různé	opačný
pH	1,5 – 11,5	zvýšení
tenzidy v MECC	10 – 200 mM	snížení
organické rozpouštědlo	1 – 30 %(v/v)	snížení (výjimka ACN)
CDs	1 – 100 mM	snížení
viskozita	různá	snížení
koncentrace elektrolytu	5 – 200 mM	zvýšení

Velikost EOF lze vyjádřit jako pohyblivost pomocí rovnice (5):

$$\mu_{\text{EOF}} = \frac{\varepsilon \cdot \zeta}{\eta} \quad (5)$$

ε permitivita základního elektrolytu v $\text{F} \cdot \text{m}^{-1}$

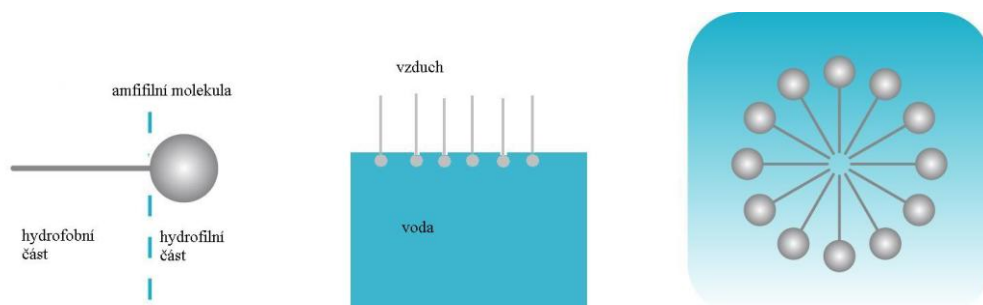
ζ zeta potenciál ve V

η dynamická viskozita rozpouštědla v $\text{Pa} \cdot \text{s}$

2.5.4 Micelární elektrokinetická chromatografie

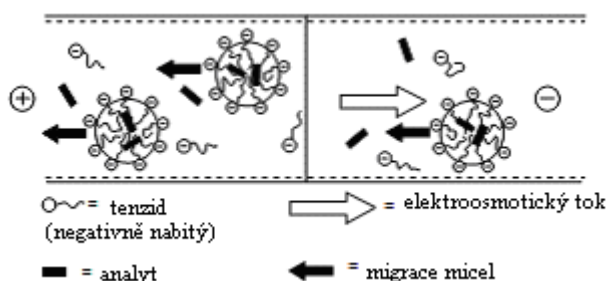
Micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC) patří mezi elektroforetické techniky. První práci pojednávající o této metodě publikoval Shigeru Terabe s kolektivem roku 1984 [33].

Mechanismus separace pomocí MEKC je založen na rozdělování analytu mezi mobilní a pseudo-stacionární fázi, která je vytvořena přidáním vhodného tenzidu k pracovnímu elektrolytu. Tenzidem rozumíme amfifilní látku, má hydrofobní i hydrofilní charakter, a je schopna tvořit ve vodných prostředích micely (obrázek 5). Může mít aniontový, kationový, příp. neiontový charakter. Schopnost tvořit micely je dána hodnotou kritické micelární koncentrace (CMC).



Obrázek 5. Amfifilní charakter tenzidu a jeho schopnost tvořit micely, převzato a upraveno [34]

Nejběžněji užívaným tenzidem je dodecylsírán sodný (SDS) aniontové povahy. MEKC s použitím SDS je znázorněna na obrázku 6. Micely s hydrofilní částí na povrchu, které nesou negativní náboj, mají tendenci migrovat k anodě. Zesílíme-li dostatečně EOF, docílíme toho, že micely budou migrovat ke katodě, kde se nachází detektor.



Obrázek 6. MEKC s využitím SDS jako tenzidu, převzato a upraveno z [35]

2.5.5 Vlastnosti vzorku

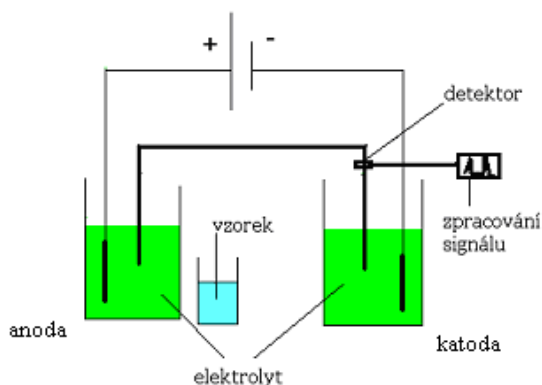
Před vlastní analýzou je třeba zjistit některá data o analyzované látce – vhodné rozpouštědlo, rozpustnost ve vodě v závislosti na pH, pK_a a v neposlední řadě UV informace. Dalším krokem je volba vhodného pracovního elektrolytu a napětí. Přehled nejčastěji užívaných elektrolytů je uveden v tabulce 4.

Tabulka 4. Nejběžnější pracovní elektrolyty, převzato z [32]

elektrolyt	pK_a příslušné kyseliny
fosfátový	2,12 pK_{a1}
	7,21 pK_{a2}
	12,32 pK_{a3}
citrátový	3,06 pK_{a1}
	5,40 pK_{a2}
acetátový	4,75
MES	6,15
PIPES	6,80
ACES	6,90
MOPSO	6,90
MOPS	7,20
HEPES	7,55
tris	8,30
borátový	9,24
CHES	9,50
CAPS	10,40

2.5.6 Přístrojové vybavení

Na obrázku 7 je znázorněno schéma kapilární elektroforézy. Základem instrumentace je systém dvou elektrod, na které vkládáme napětí, nádoby se základním elektrolytem a vzorkem, separační kapilára, detektor a software pro zpracování signálu. Jednotlivé části budou probrány níže.



Obrázek 7. Zařízení pro kapilární elektroforézu

2.5.6.1 Separační kapiláry a separační napětí

Při kapilární elektroforéze probíhá separace nejčastěji v křemenné kapiláře, která může být dlouhá 50 až 100 cm a její vnitřní průměr dosahuje 10 až 100 μm . Aby zůstala zachována její pružnost, pokrývají se vrstvičkou polyimidu. Na kapiláru je přiváděno z vnějšího zdroje stejnosměrné napětí.

V průběhu aplikace napětí dochází k zahřívání kapiláry, poněvadž se uvolňuje tzv. Jouleovo teplo, které je přímo úměrné vkládanému napětí, vztah (6).

$$Q = U \cdot I \cdot t \quad (6)$$

Q ... uvolněné teplo v J

U vkládané napětí ve V

I proud v A

t čas v s

Vysoké hodnoty Joulova tepla mají za následek vznik bublinek v průběhu separace, ev. změnu viskozity použitého pufru, což se projeví na výsledcích analýzy.

2.5.6.2 Dávkování vzorku

Vzorky mohou být v CE dávkovány třemi rozdílnými mechanismy:

- Na základě rozdílných tlaků (hydrodynamicky)

Jeden konec kapiláry je ponořen do vzorku. Na tuto sestavu působíme tlakem, např. vakuem, čímž dojde k nadávkování vzorku do kapiláry. Množství dávkovaného vzorku lze vyjádřit rovnicí (7):

$$V = \frac{\Delta P \cdot d^4 \cdot \pi \cdot t}{128 \eta \cdot L} \quad (7)$$

ΔP rozdíl tlaků na koncích kapiláry v mbar

d průměr kapiláry v μm

t dávkovací čas v s

η viskozita pufru v Pa·s

L celková délka kapiláry v m

Dávkovaný objem je závislý na teplotě, která ovlivňuje viskozitu. K popisu závislosti viskozity na teplotě se užívá vztah (8), z něhož je patrné, že s rostoucí teplotou klesá viskozita.

$$\log \eta = A + \frac{B}{T} \quad (8)$$

A, B konstanty charakterizující daný solut

T teplota v K

η viskozita v Pa·s

- Gravitační silou

Konec kapiláry je ponořen do roztoku pufru. Druhý konec před ponořením do vzorku zvedneme do výšky nad roztok pufru a nasajeme vzorek. Běžně se užívá zvednutí o 5 cm po dobu 10 s.

Dávkované množství lze vypočítat dle rovnice (9):

$$V = \frac{\rho \cdot g \cdot \Delta H \cdot d^4 \cdot \pi \cdot t}{128\eta \cdot L} \quad (9)$$

ρ hustota kapaliny v $\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$

g gravitační konstanta

ΔH rozdíl výšek hladin v cm

d průměr kapiláry v μm

t dávkovací čas v s

η viskozita pufru v Pa·s

L celková délka kapiláry v m

- Elektrokineticky

V tomto případě se konec kapiláry vkládá spolu s elektrodou do roztoku vzorku a vloží se napětí. Tím dojde k nadávkování vzorku do kapiláry na základě elektroforetické migrace a EOF. Tímto způsobem se nadávkují přednostně větší nabitě ionty, dochází k určité diskriminaci.

2.5.6.3 Detektory

Poslední neméně podstatnou částí kapilární elektroforézy je detektor. Volí se tak, aby měl pro daný analyt co nejlepší citlivost. Limity detekce vybraných detektorů jsou uvedeny v Tabulce 5.

Tabulka 5. Vybrané detekční principy s uvedenými limity detekce, převzato z [36]

detekční princip	limit detekce LOD (mol)
UV	$10^{-13} - 10^{-12}$
fluorescence	$5 \cdot 10^{-17}$
Raman	$2 \cdot 10^{-15}$
MS	$1 \cdot 10^{-17}$
konduktivita	$1 \cdot 10^{-16}$
ampérometrie	$7 \cdot 10^{-19}$

Nejvyužívanějším detektorem ve spojení s CE je optický absorpční detektor, který je založen na absorpci záření vzorkem v UV-Vis oblasti elektromagnetického záření. Řídí se Lambert-Beerovým zákonem (vztah 10), podle kterého je absorbance přímo úměrná délce absorbující vrstvy l , koncentraci analytu c a molárnímu absorpčnímu koeficientu ε .

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l \quad (10)$$

Dalšími využívanými detektory jsou elektrochemické detektory, které registrují signál vyvolaný elektrochemickou reakcí, zejména oxidačně-redukčními procesy nebo měřením elektrických vlastností analytu, a hmotnostní detektor.

2.6 Spojení kapilární elektroforézy a hmotnostní spektrometrie

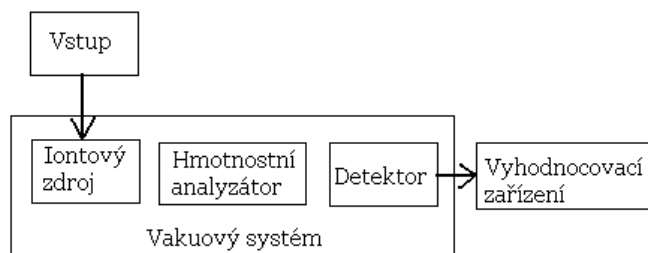
Kapilární elektroforéza umožňuje separovat nízké koncentrace analytů. Spojení CE s hmotnostní spektrometrií kombinuje separační účinnost CE s citlivou detekcí.

Hmotnostní spektrometrie je vysoce citlivá separační metoda, která převádí vzorek na plynnou fázi, která je ionizována, a vzniklé ionty separuje podle hodnoty poměru hmotnosti k náboji m/z [34]. Jedná se o metodu destruktivní, spotřeba vzorku se pohybuje v řádech pikogramů. Touto technikou je možné určit primární strukturu látky, molekulovou hmotnost či izotopické zastoupení prvků ve vzorku.

2.6.1 Princip

Postup při této technice:

- převedení analytů do plynné fáze
- ionizace analytů
- separace iontů v hmotnostním analyzátoru
- detekce iontů



Obrázek 8. Blokové schéma hmotnostního spektrometru, převzato a upraveno [37]

Běžně dostupný hmotnostní spektrometr obsahuje části zobrazené na obrázku 8. Vstup vzorku umožňuje převedení vzorku z vnějšího prostředí do prostředí iontového zdroje, který se používá k převedení vzorku do ionizovaného stavu. Hmotnostní analyzátor slouží jako disperzní prvek, který umožňuje rozdělit směs iontů o různých m/z . Detektor poskytuje záznam úměrný počtu dopadajících iontů. Tento signál je převeden do počítače a vhodným softwarem převeden do formy hmotnostního spektra. Protože pracuje za nízkých tlaků, je jeho součástí vakuový čerpací systém [37 – 39].

2.6.2 Iontový zdroj

V běžné praxi je CE spojováno výhradně s elektrospejovou ionizací (ESI). Za méně běžné lze považovat fotoionizaci za atmosférického tlaku (APPI) a chemickou ionizaci za atmosférického tlaku (APCI). Pro proteomické studie je CE spojováno s desorpcí/ionizací laserem v přítomnosti matrice, tzv. MALDI technika.

2.6.2.1 Ionizace elektrosprejem

Za vývoj elektrospreje byla r. 2002 udělena Nobelova cena v oboru chemie Johnu B. Fennovi (obrázek 9).



Obrázek 9. Jeden z nositelů Nobelovy ceny v oboru chemie za rok 2002 John B. Fenn [40]

Ionizace elektrosprejem patří mezi tzv. měkké ionizační techniky. Jelikož jsou v CE užívány malé objemy dávkovaných vzorků, čímž je dosahováno nízkých průtoků, které jsou pro ionizaci elektrosprejem nedostačující, je podstatná přítomnost pomocné stínící kapaliny (SL), tzv. *sheath liquid* (Obrázek 10).

Princip ESI (Obrázek 11) je založen na tvorbě nabitých kapiček na sprejovací kapiláře, na níž je vloženo vysoké napětí, kolem 5 kV. Ionty v kapičce vzniklé na konci kapiláry se vzájemně odpuzují, čímž vzniká v kapce napětí. Je-li toto napětí větší než povrchové napětí kapaliny, dochází k tvorbě Taylorova kužele, z něhož se jednotlivé kapičky uvolňují tzv. Coulombickou explozí. Následuje zmenšování povrchu kapičky prostým vypařováním. Limit celkového náboje, který kapička unese, se nazývá Rayleighův limit (rovnice 11).

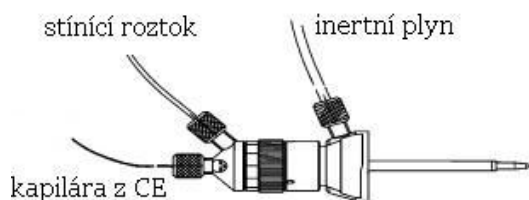
$$Q = 8\pi \cdot (\varepsilon_0 \cdot \gamma \cdot R^3)^{1/2} \quad (11)$$

Qcelkový náboj, který kapička nese

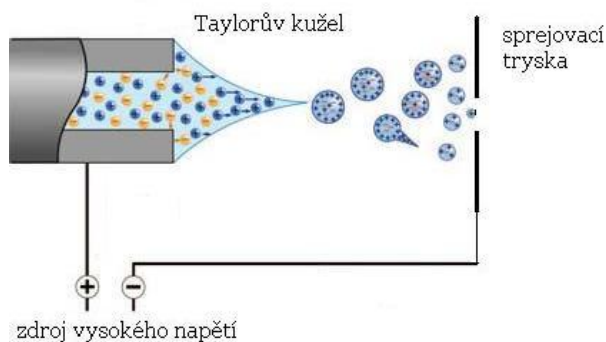
R poloměr kapky

ε_0 permitivita vakua

γ povrchové napětí

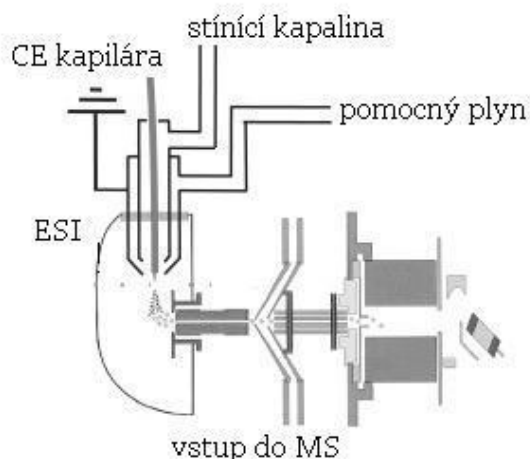


Obrázek 10. Spojení CE-ESI se stínící kapalinou, převzato a upraveno [41]



Obrázek 11. Schéma tvorby nabitých kapiček v elektrospreji, převzato a upraveno [42]

Z uvedených schémat je patrná lineární konstrukce CE-ESI-MS. Nevýhoda tohoto spojení spočívá ve větším zanesení iontového zdroje složkami pufry nebo stínící kapaliny. Z tohoto důvodu je výhodnější tzv. orthogonální uspořádání, kdy je sprejovací špička ESI a vstup do MS posunut o určitý úhel, nejčastěji 90° (obrázek 12).



Obrázek 12. Orthogonální uspořádání CE-ESI-MS, převzato a upraveno z [43]

2.6.3 Hmotnostní analyzátor

Je nejdůležitější částí hmotnostního spektrometru, kde dochází k samotné separaci iontů na základě m/z . Kvalitu rozdělení jednotlivých iontů vyjadřuje rozlišovací schopnost (vztah 12). V tomto případě zastává analyzátor funkci disperzního prvku. Existuje řada hmotnostních analyzátorů, které fungují na rozličných fyzikálních principech. Faktory, které mají vliv na výběr analyzátoru jsou jeho cenová dostupnost a účel, za kterým jej pořizujeme.

$$R = \frac{m}{\Delta m} \quad (12)$$

m hmotnost iontu

Δm šířka píku v polovině výšky

Nejčastěji užívané analyzátory se svými charakteristikami jsou zveřejněny na následující straně v tabulce 6, str. 28.

Tabulka 6. Charakteristiky nejčastěji užívaných hmotnostních analyzátorů [44]

druh analyzátoru	m/z rozsah	rozlišení	dynamický rozsah
sektorový	10^4	10^5	10^7
TOF	10^6	10^3-10^4	10^4
ICR	10^5	10^6	10^4
IT	10^4	10^4	10^4
kvadrupólový	10^3-10^4	10^3-10^4	10^5

2.6.3.1 Kvadrupólový analyzátor

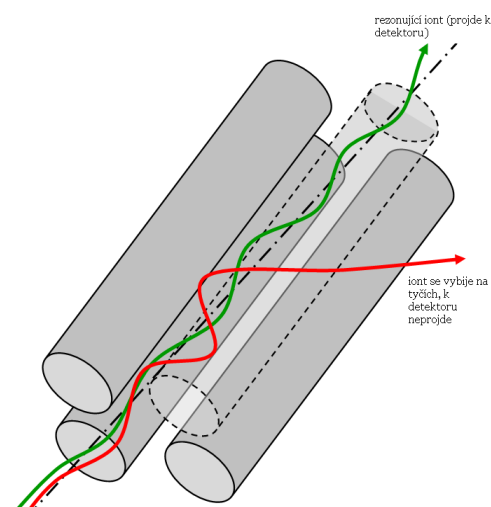
„Kvadrupólový analyzátor je zařízení, které využívá rozdílné stability trajektorií iontů v oscilujícím elektrickém poli“ [45].

Skládá se ze čtyř tyčí (obrázek 13), kdy na dvě protilehlé je vkládáno napětí se stejnosměrnou a střídavou složkou. Ionty jsou ovlivňovány oscilujícím elektrickým polem a směřují k detektoru. Jejich trajektorie je dána Mathieuvou rovnicí (vztah 13):

$$\frac{d^2u}{d\xi^2} + (a_u - 2q_u \cdot \cos 2\xi)u = 0 \quad (13)$$

kde u zastává souřadnice x , y . Výsledkem řešení jsou parametry q_u a a_u , při jejichž vhodné kombinaci dojde k průchodu iontu k detektoru. Ostatní ionty se vybijí na tyčích.

Kvadrupólový analyzátor patří mezi relativně levné analyzátor, který je vhodný pro spojení se separačními technikami jako GC-MS, LC-MS apod.



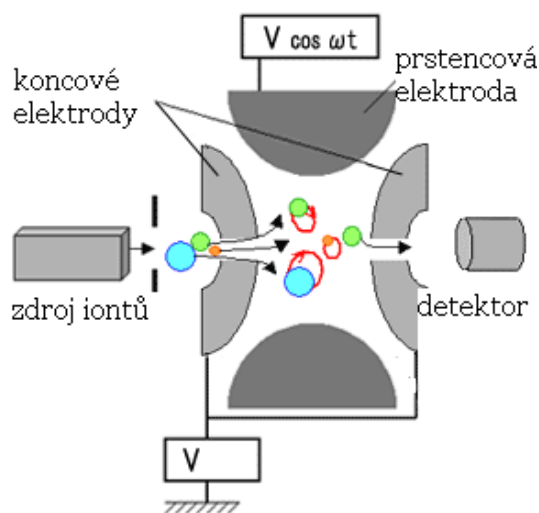
Obrázek 13. Schéma kvadrupólového analyzátoru s vyznačenou prostupností iontů k detektoru, převzato a upraveno z [46]

Jak již bylo uvedeno, používá se TOF ve spojení s pulzními technikami, ve spojení se separačními technikami méně často, přesto se ve spojení s CE uplatňuje také a byly publikovány články [48].

2.6.3.3 Iontová past (IT)

Tento analyzátor sestává ze série elektrod, z nichž dvě koncové jsou uzemněné a třetí je prstencová, všechny hyperbolického tvaru (obrázek 15). Dochází k hromadění iontů v RF poli, jejich následnému postupnému vypuzování z analyzátoru a detekci.

Jedná se o poměrně častý způsob spojení se separačními metodami, CE nevyjímaje. V publikacích byly popsány aplikace, kdy je možné tohoto spojení využít [49 -51].



Obrázek 15. Schéma iontové pasti, převzato a upraveno z [52]

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Přístrojové vybavení

Úprava pufrů na požadované pH byla prováděna pomocí pH-metru inolab_IDS, Multi 9310P s kombinovanou elektrodou SenTix 940.

Přídavek iontové kapaliny byl rozpuštěn v ultrazvuku firmy Elma, Elmasonic S 60 H.

Separace modelových analytů – kationů byla prováděna kapilární elektroforézou Agilent 7100 s UV detekcí. Dávkování probíhalo hydrodynamicky při 50 mbar po dobu 10 s. Data byla zpracována softwarem 3D-CE ChemStation od Agilent Technologies. Pro měření byla použita křemenná kapilára firmy Polymicro Technologies od zprostředkovatele Labicom, s.r.o. o vnitřním průměru 50 μm . Celková délka kapiláry byla 48,5 cm, efektivní délka (délka kapiláry k detektoru) 40 cm. Kapilára byla před prvním měřením promyta 0,1 M hydroxidem sodným po dobu 30 min, deionizovanou vodou 20 min a pracovním elektrolytem (BGE) po dobu 10 min. Stejný postup následoval při změně BGE.

Hmotnostní spektra byla získána kapilární elektroforézou Agilent 7100 s kvadrupólovým detektorem Triple Quadrupole Agilent 6460. Měření probíhalo v nepokryté křemenné kapiláře délky 90 cm o vnitřním průměru 50 μm firmy Polymicro Technologies. Při spojení CE-MS je celková délka kapiláry totožná s efektivní délkou. Kapilára byla před prvním měřením promyta 0,1 M NaOH po dobu 30 minut a deionizovanou vodou 30 minut. Pomocná kapalina (SL) byla dávkována izokratickou pumpou LC Agilent 1200 Infinity. Data byla shromažďována pomocí softwaru Mass Hunter 6.0.

3.2 Chemikálie

Na přípravu pufrů byly využity:

deionizovaná voda (Milli-Q systém, rezistence při 25 °C byla 18,2 $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$),

kyselina boritá (Sigma-Aldrich),

85% kyselina fosforečná (Sigma-Aldrich),

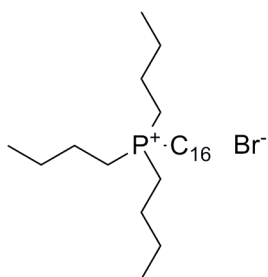
acetát amonný (Sigma-Aldrich),

hydroxid sodný (Sigma-Aldrich),

amoniak (Sigma-Aldrich).

Jako modelové analyty byly zvoleny kationy, které byly zakoupeny u firmy Lipomed, Arlesheim, Švýcarsko. Standardní roztoky těchto látek o koncentraci $1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ byly připraveny navážením 1 mg každého standardu zvlášť a jeho rozpuštěním v 1 ml methanolu. Pro analýzu byl připraven směsný roztok výše uvedených analytů o koncentracích $0,1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Iontovou kapalinu poskytl ve formě bílého prášku prof. Armstrong z Texas University at Arlington, USA. Pro analýzu byl připraven 20 mM roztok této kapaliny, další koncentrace vznikly následným ředěním.



Obrázek 16. Iontová kapalina

3.3 Příprava pufřů

Pro analýzu byly připraveny následující pufry.

3.3.1 Borátový pufř

Borátový pufř byl připraven o koncentracích 20 a 100 mM navážením příslušného množství kyseliny a jejím rozpuštěním v deionizované vodě. Pomocí 50% roztoku hydroxidu sodného bylo pH upraveno na hodnotu 9,0.

3.3.2 Acetátový pufř

Tento pufř byl připraven o koncentraci 20 a 100 mM navážením příslušného množství soli a jejím rozpuštěním v deionizované vodě. Pomocí amoniaku bylo pH roztoku upraveno na hodnotu 4,0.

3.3.3 Mravenčanový pufr

Mravenčanový pufr byl připraven o koncentraci 20 mM navážením daného množství soli a jejím rozpuštěním v deionizované vodě. Pro úpravu pH na požadované hodnoty byl použit amoniak.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 CE-MS

Byl sledován vliv složení elektrolytu a pH na separaci 21 analytů z řady kationů. Využité analyty, včetně m/z jejich protonovaných molekul znázorňuje tabulka 7.

Tabulka 7. Analyty kationů a jejich m/z protonovaných molekul

m/z [M+H] ⁺	Analyt
150.20	CAT
164.21	MET
178.24	MABP, 3-MMC,
180.22	MDA, PMMA
182.21	3-FMC,4-FMC, 2C-H,
192.27	4-MEC
194.24	bk-PMMA, BDB
208.22	bk-MDMA, MDE
222.25	bk-MBDB, MDEC,
242.35	2-C-T-2
261.28	2-C-B
276.35	MDPV
282.39	NRG-1
308.13	2-C-I

V rámci optimalizace separace s pomocí CE a detekce s využitím MS je nutné studovat nejen složení pracovního elektrolytu a jeho pH, ale také parametry pro sprejování a detekci pomocí hmotnostního spektrometru.

Spojení CE-ESI-MS vyžaduje využití těkavých pracovních elektrolytů. Z tohoto důvodu je optimalizace elektrolytu pro CE separaci omezena pouze na využití elektrolytů na bázi mravenčí a octové kyseliny a amoniaku.

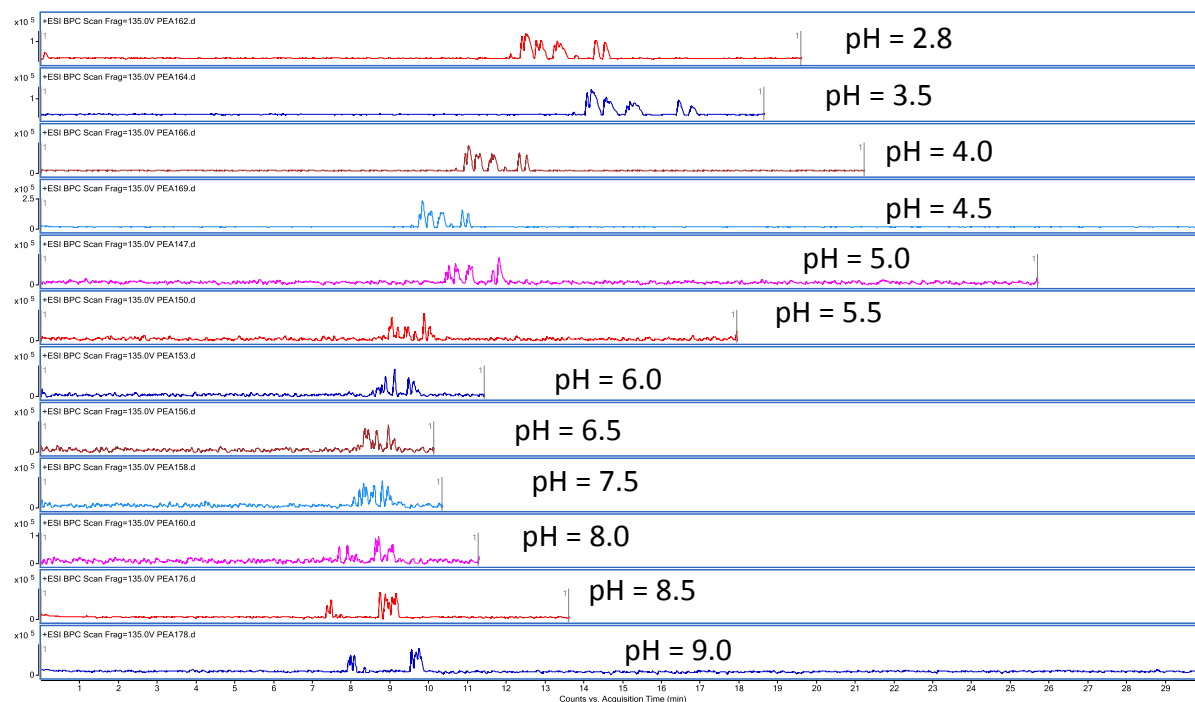
Na straně MS byly pak optimalizovány následující parametry: sprejovací napětí, průtok sprejovacího plynu (dusíku), tlak dusíku v nebulizéru, teplota sprejovacího plynu, složení a průtok pomocné sprejovací kapaliny. Sledována byla velikost poměru signálu k šumu S/N při změnách jednotlivých optimalizovaných parametrů. Konečné podmínky pro MS detekci jednotlivých analytů jsou uvedeny v tabulce 8.

Tabulka 8. Konečné parametry MS detekce kationů

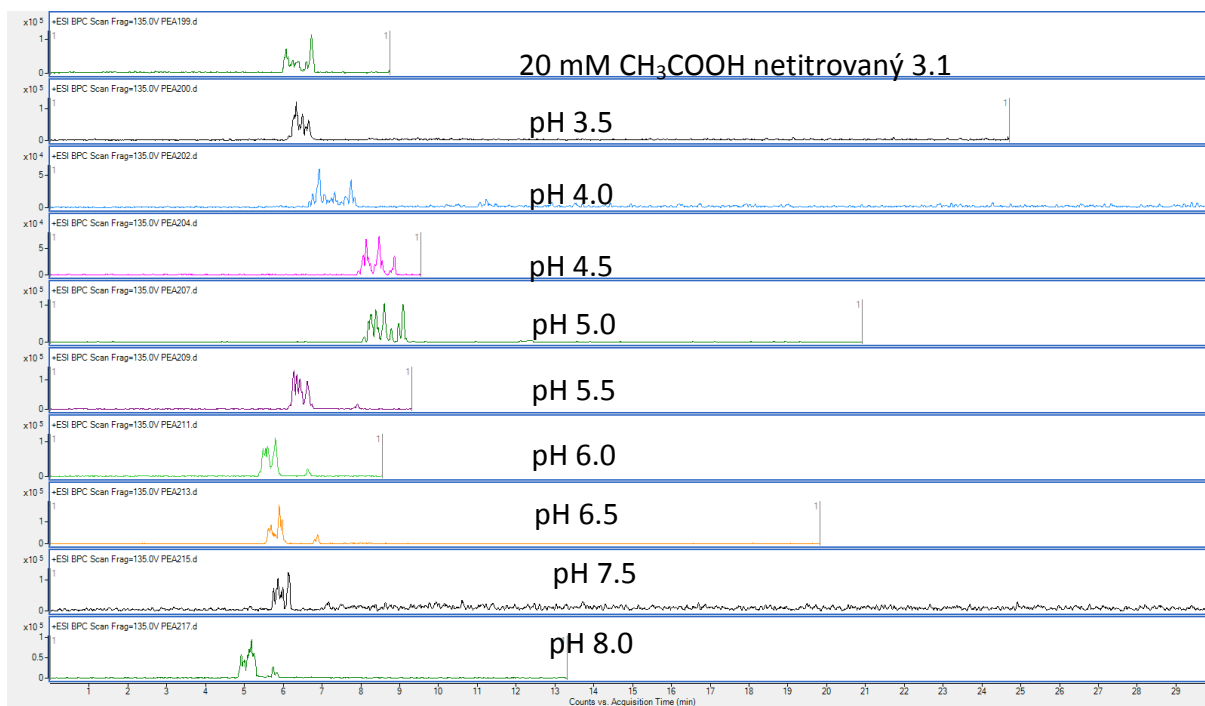
Parametr	Podmínky
Sprejovací napětí	+ 3,5 kV
Průtok sprejovacího plynu	10 l/min
Tlak plynu v nebulizéru	10 psig
Teplota sprejovacího plynu	185 °C
Průtok pomocné kapaliny	4 µl/min
Složení pomocné kapaliny	MeOH:W:HCOOH 50:49,5:0,5 (v/v/v)

Pozn.: 1 psig = 6,895 kPa

a)

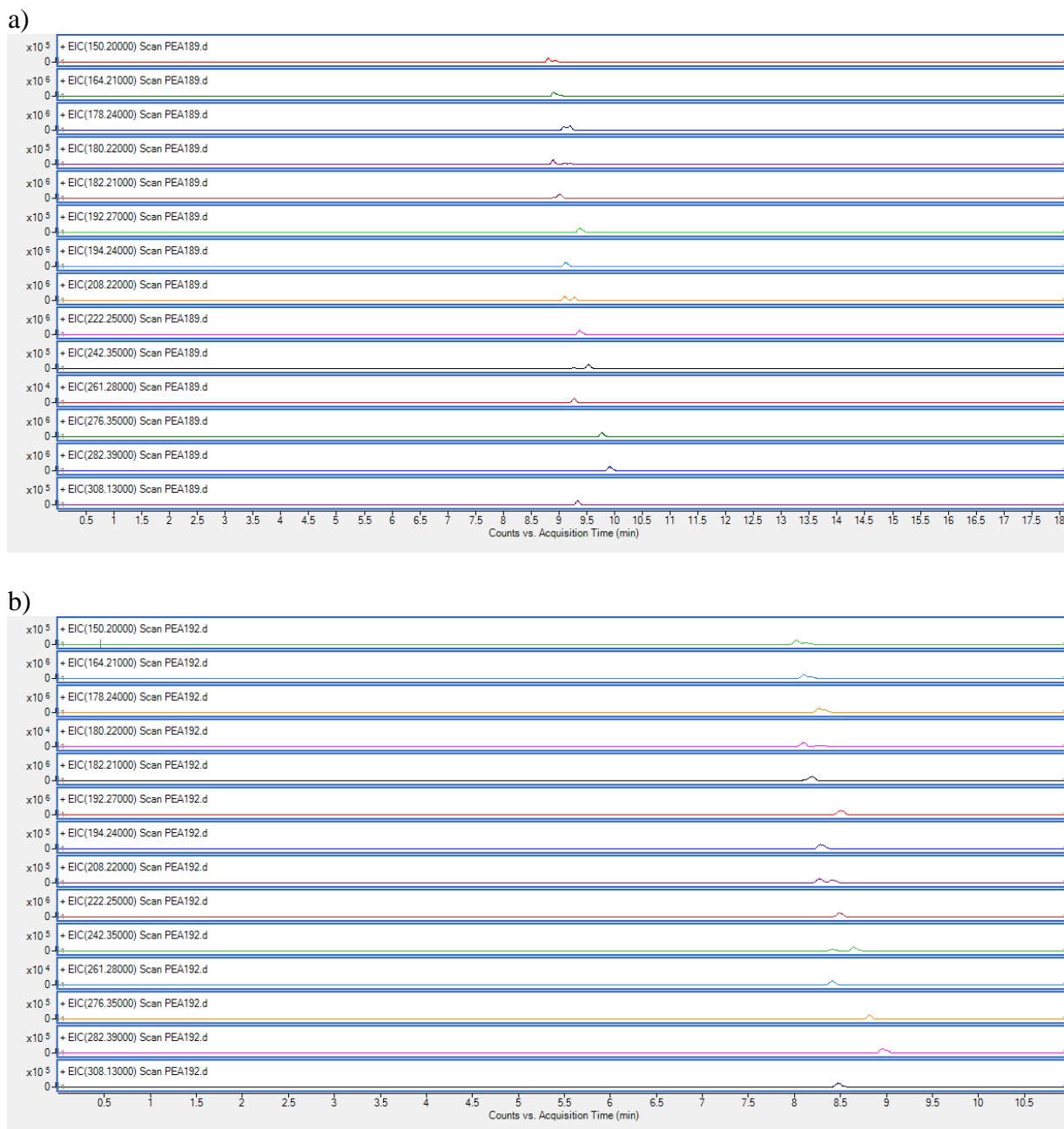


b)



Obrázek 17. BPC elektroferogramy analytů

Podmínky měření: BGE – a) formiát amonný, b) acetát amonný. Separáční napětí 20 kV; dávkování 50 mbar/5s; koncentrace jednotlivých analytů 5 mg/L. $U_{\text{ESI}} = 3,5$ kV; průtok sprejovacího plynu $\text{N}_2 = 5$ l/min, 10 psig; $U_{\text{fragmentor}} = 135$ V; $T = 185$ °C. SL: MeOH:W:HCOOH 50:49,5:0,5 (v/v/v)



Obrázek 18. EIC elektroferogramy – a) 20 mM acetátový pufr, b) 20 mM formiátový pufr, oba bez úpravy pH

Podmínky separace viz. obrázek 17, str. 36

Jak plyne z uvedených elektroferogramů, v žádném ze studovaných pracovních elektrolytů nebylo dosaženo dostatečného rozlišení pro separaci všech kationů. Rozdíly efektivních mobilit jednotlivých analytů nejsou dostatečné. Spojení CE-ESI-MS přináší několik omezení, zejména pak nemožnost použít konvenční elektrolyty jako je borát k separaci z důvodu jejich nízké těkavosti. V tabulce 9 jsou uvedeny počty separovaných

analytů. Vždy je menší než 21 (celkový počet kationů ve směsi). Z toho vyplývá nutnost další optimalizace podmínek.

Byly studovány přídavky metanolu a acetonitrilu v rozmezí 0 až 30 % (obj.). Ani tyto přídavky však nevedly k dosažení požadovaného rozlišení.

Tabulka 9. Počty rozeznatelných píků v závislosti na složení elektrolytu a pH

pH	počet rozeznatelných píků	
	20mM formiát amonný	20mM acetát amonný
2,8 resp. 3,1*	12	8
3,5	11	7
4,0	11	8
4,5	9	5
5,0	10	9
5,5	8	6
6,0	9	6
6,5	6	6
7,5	9	6

pH 2,8 pro formiát amonný. Hodnota 3,1 pro acetát amonný

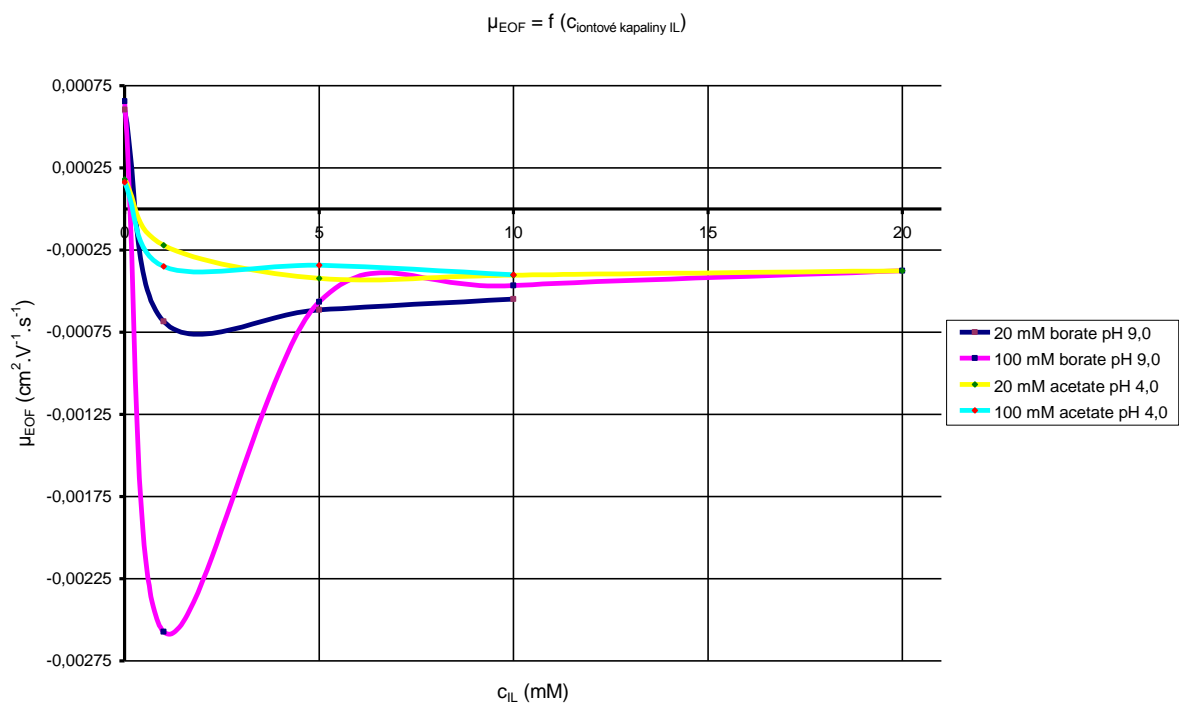
4.2 CE-UV

Vzhledem k tomu, že nebylo dosaženo uspokojivých výsledků pro separaci všech 21 kationů, byla dále studována iontová kapalina pro ovlivnění selektivity separace.

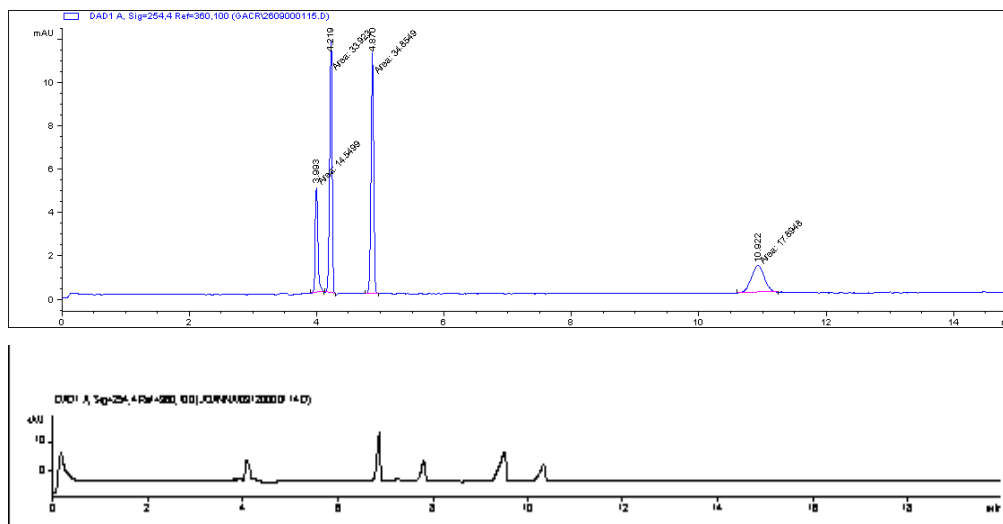
V této části práce se pracovalo pouze s 5 kationy – efedron, 4-MEC, kation, metylon a nafyron.

Byl studován vliv iontové síly a koncentrace iontové kapaliny ve 2 pracovních elektrolytech (borátovém a acetátovém). Z obr. 19 plyne, že již při malé koncentraci iontové kapaliny ve všech studovaných pracovních elektrolytech dochází k obrácení směru pohybu elektroosmotického toku (anodický elektroosmotický tok). S dalšími přídavky iontové kapaliny ale nedochází k významnému zvyšování mobility pozorovaného anodického elektroosmotického toku.

Anodický elektroosmotický tok směřující od $- \rightarrow +$ směřuje opačným směrem než je směr migrace separovaných vybraných kationů, které migrují jako kationty ke katodě. Protisměrná migrace EOF a analytů by mohla vést ke zvýšení rozlišení jednotlivých separovaných analytů.



Obrázek 19. Vliv koncentrace iontové kapaliny na EOF různých elektrolytů o různé iontové síle



Obrázek 20. Srovnání separace CAT u 100 mM borátového (horní elektroferogram) a 20 mM acetátového pufru (dolní elektroferogram)

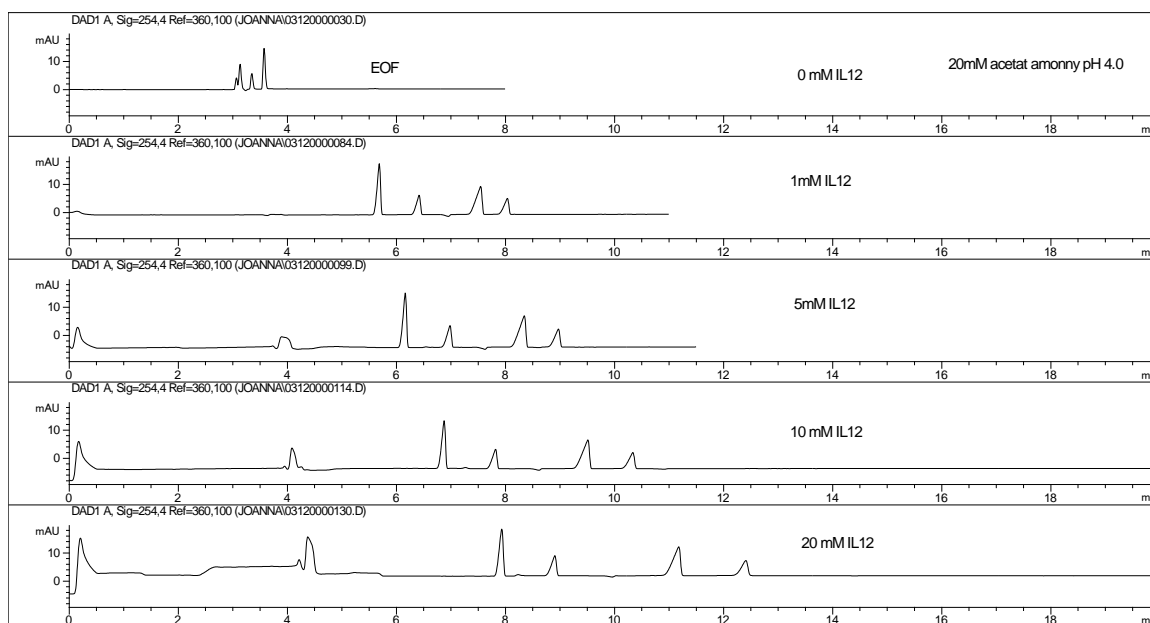
Lepší separace bylo dosaženo v acetátovém pufru.

Tabulka 10. Vypočtené RSD (%) pro jednotlivé elektrolyty

c _{IL} (mM)	RSD (%)			
	100 mM borát pH 9,0	20 mM borát pH 9,0	100 mM acetát pH 4,0	20 mM acetát pH 4,0
0	0,5251	0,3263	3,4299	0,2013
1	x	-0,5684	-151,0342	-105,6202
5	-0,223	-0,6508	-152,3197	-0,4887
10	-0,1425	-0,425	-157,2204	-1,8584
20	-1,4175	x	x	-7,7105

Tabulka 11. Naměřené proudy pro a) 20mM a b) 100mM acetátový pufr

c IL	proud ^a μA	proud ^b μA
0mM	16,5	88
1mM	20,8	95
5mM	22,5	220
10mM	21,6	127
20mM	24,2	nestabilní

**Obrázek 21.** 20mM acetátový pufr s přidavky různých koncentrací IL

Podmínky měření: $l = 48,5$ cm; $l_{ef} = 40$ cm. Separáční napětí -20 kV (u 0mM IL $+20$ kV).

Dávkování 50 mbar/10 s.

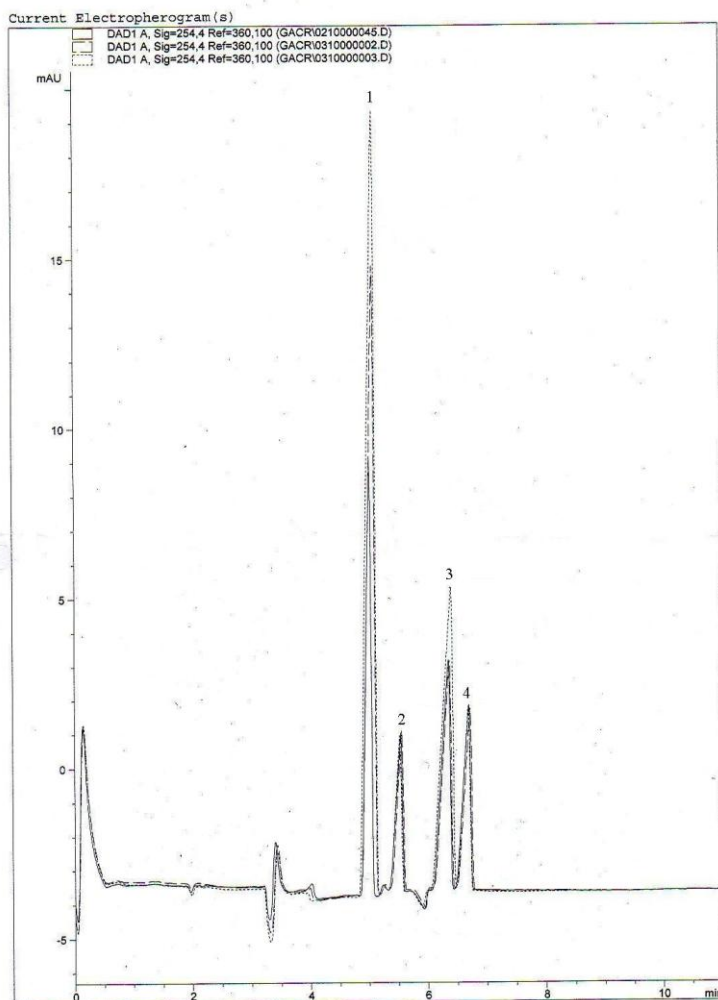
S ohledem na proudy, kterých bylo dosaženo při analýzách (tabulka 11), a tím Joulovo teplo, je vhodnější 20 mM acetátový pufr před 100 mM pufrem téhož složení. Při přidavku 5mM IL došlo k separaci analytů.

Je patrné, že s vyšším přidavkem IL se doba analýzy prodlužuje, což je zapříčiněno možnou interakcí analytů s IL. Další roli na prodloužení separačního času hraje také zvyšování viskozity pracovního elektrolytu s rostoucí koncentrací IL.

Ze struktury IL (obrázek 16, str. 32) - obsahuje dlouhý alifatický řetězec hydrofobní povahy, není vyloučeno, že IL může tvořit micely, které interagují s analyty. To není možné potvrdit vzhledem k neznalosti CMC této látky.

Bylo provedeno spikování vzorku (obrázek 22) v 20 mM acetátovém pufru s přidavkem 5 mM IL. V případě, kdy v roztoku žádná IL nebude, je toto pořadí opačné.

Z tohoto faktu lze usuzovat, že na separační mechanismus má vliv přidavek IL.



Obrázek 22. Spikování kationů

1: Nafyron; 2: 4-MEC; 3: Efedron; 4: Kation

Podmínky analýzy: $l = 48,5$ cm; $l_{ef} = 40$ cm. BGE 20mM acetát + 5mM IL. Separační napětí -20 kV. Dávkování 50 mbar/10 s.

Studovaná iontová kapalina byla také využita pro separaci studovaných kationů s pomocí CE-ESI-MS. Vzhledem k tomu, že IL je permanentní kation, dojde ale ke snížení účinnosti ionizace. Oproti pracovnímu elektrolytu bez přídavku IL se snížší účinnost ionizace o asi 26 % (měřeno s využitím kationu jako modelového analytu).

Pro dosažení úplné separace všech kationů za současného zachování citlivé MS detekce bude nutné hledat další aditiva do pracovního elektrolytu, která umožní jejich úplnou separaci a také citlivou detekci.

ZÁVĚR

Potenciál kapilární elektroforézy na poli toxikologických aplikací je teprve objevován. Lze ji využít pro stanovení drog jako jsou katinony.

Byl studován vliv experimentálních podmínek pro jejich separaci CE-ESI-MS, ale nebylo dosaženo separace všech analytů, proto bylo přistoupeno k CE-UV, kde byl zkoumán vliv iontové kapaliny, složení a iontová síla elektrolytu. Pro separaci se ukázal vhodnější acetátový pufr o nižší iontové síle s přídatkem iontové kapaliny od koncentrace 5 mM, kde došlo k úplné separaci všech 5 analytů.

ZDROJE

- [1] Páleníček T., Kubů P., Mravčík V.: Nové syntetické drogy – charakteristika a hlavní rizika, Úřad vlády ČR, 2004
- [2] <http://www.emcdda.europa.eu> – 6. 10. 2012 v 23:11
- [3] <http://www.magazin-legalizace.cz> – staženo 6. 10. 2012 v 23:42
- [2] Editorial: Bull. Narcotics **4** (003), 6 – 12, 1956
- [3] Alles G. A., Fairchild M. D., Jensen M.: J. Med. Pharm. Chem. **3** (2), 323 – 352, 1961
- [4] <http://www.biotox.cz> – staženo 18. 9. 2012 v 19:47
- [5] <http://etc.usf.edu> – 17. 9. 2012 v 23:20
- [6] Laussmann T., Meier-Giebing S.: Forensic Sci. Int. **195**, 180 – 184 (2010)
- [7] <http://www.tri-force.com> – staženo 18. 9. 2012 v 21:10
- [8] Mathys K., Brenneisen R.: Pharmaceutica Acta Helvetiae **68**, 121 – 128 (1993)
- [9] Ripani L., Schiavone S., Garofano L.: Forensic Sci. Int. **78**, 39 – 46 (1996)
- [10] Gibbons S., Zloh M.: Bioorg. Med. Chem. Lett. **20**, 4135 – 4139 (2010)
- [11] Prosser J. M., Nelson L. S.: J. Med. Toxicol. **8**, 33 – 42 (2012)
- [12] Schifano F., Albanese A., Fergus S., Stair J. L., Deluca P., Corazza O., Davey Z., Corkery J., Siemann H., Scherbaum N., Farre´ M., Torrem M., Demetrovics Z., Ghodse A. H.: Psychopharm. **214**, 593 – 602 (2011)
- [13] Dickson A. J., Vorce S. P., Levine B., Past M. R.: J. Anal. Tox. **34**, 162 – 168 (2010)
- [14] Gustavsson G., Escher C.: Lakartidningen **106**, 2769 – 2771 (2009)
- [15] Meyer M. R., Wilhelm J., Peters F. T., Maurer H. H.: Anal. Bioanal. Chem. **397**, 1225 – 1233 (2010)
- [16] Wood D. M., Davies S., Puchnarewicz M. et al: Clin. Tox. **47**, 733 (2009)
- [17] Katagi M., Zaitso K., Shima N., Kamata H., Kamata T., Nakanishi K., Nishioka H., Miki A., Tsuchihashi H.: TIAFT Bull. **40** (1), 30 – 33 (2010)
- [18] Coppola M., Mondola R.: Toxicol. Lett. **208**, 12 – 15 (2012)
- [19] Al-Obaids A. M., Al-Tamrah S. A., Aly F. A., Arwarthan A. A.: J. Pharm. Biomed. Anal. **17**, 321 – 326 (1998)
- [20] Gambaro V., Arnoldi S., Colombo M. L., Dell´Acqua L., Guerrini K., Roda G.: Forensic Sci. Int. **217**, 897 – 92 (2012)
- [21] Toennes S. W. a Kaubert G. F.: Clin. Chem. **48**:10, 1715 – 1719 (2002)

- [22] LeBelle M. J., Lauriault G., Laboie A.: *Forensic Sci. Int.* **61**, 53 – 64 (1993)
- [23] Wang S.-M., Lewis R. J., Canfield D., Li T. -L., Chen Ch.Y., Liu R. H.: *J. Chromatogr. B* **823**, 88– 93 (2003)
- [24] Lurle I. S. a Klein F. X.: *Anal. Chem.* **66**, 4019 – 4026 (1994)
- [25] Sorensen L. K.: *J. Chromatogr. B* **879**, 727 – 736 (2011)
- [26] Maheux Ch. R., Copeland C. R., Pollard M. M.: *Microgram J.* **7** (2), 42 – 49 (2010)
- [27] Zaitso K., Katagi M., Shima N., Kamata H., Kamata T., Shima N., Miki A., Tsuchihashi H. Mori Y.: *Forensic Sci. Int.* **188**, 131 – 139 (2009)
- [28] Shah S. A. B., Deshmukh N. I. K., Barker J., Petróczi A., Cross P., Archer R., Naughton D. P.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* **61**, 64 – 69 (2012)
- [29] Rambabu C., Rao S. V., Ramu G., Babu A. B.: *Rasayan J. Chem.* **3** (4), 796 – 799 (2010)
- [30] Gaál Ö., Medgyesi G. A., Vereczkey L.: *Electrophoresis in the separation of biological macromolecules*, Akadémiai Kiadó, Budapest, 1980
- [31] <http://biochemie.sweb.cz> – staženo 18. 11. 2012 v 21:30
- [32] Altria K. D.: *Capillary electrophoresis guidebook: Principles, operations and applications*, Humana Press, United States of America, 1996
- [33] Terabe S., Otsuka K., Ichikawa K., Tsuchiya A. a Ando T.: *Anal. Chem.* **56**, 111 – 113 (1984)
- [34] <http://www.attension.com> – staženo 11. 10. 2013 v 19:13
- [35] Terabe S.: *Micellar Electrokinetic Chromatography*, Backman
- [36] Xu Y.: *Tutorial: Capillary electrophoresis*, *The chemical educator* **1** (2), Verlag Elsevier 1 – 14 (1996)
- [37] Kupcová R.: *Separace enantiomerů kyseliny mléčné metodou kapilární elektroforézy s hmotnostní spektrometrií*, diplomová práce, UP Olomouc, Olomouc 2010
- [38] Štulík K. a kol.: *Analytické separační metody*, Karolinum UK v Praze, Praha 2004
- [39] Vřeštil J.: *Hmotnostní spektrometrie*, Masarykova univerzita v Brně, Brno 2000
- [40] <http://www.nobelprize.org> – staženo 19. 1. 2013 v 20:27
- [41] Somsen G. W., Mol R., Jong de G. J.: *J. Chromatogr. A* **1217** (25), 3978 – 3991 (2010)
- [42] <http://www.waters.com> – staženo 21. 1. 2013 v 20:42
- [43] Schappler J., Veuthey J.-L., Rudaz S.: *Separation Science and Technology* **9**, 477 – 521 (2008)

- [44] Wong P. S. H., Cooks R.G.: Ion Trap Mass Spectrometry, *Bioanalytical Systems* **16**, 1 – 8 (1997)
- [45] Švidrnoch M.: Analýza ethylglukuronidu pomocí kapilární elektroforézy s hmotnostní spektrometrií, diplomová práce, UP Olomouc, Olomouc 2012
- [46] <http://www-mtl.mit.edu> – staženo 22. 1. 2013 v 15:06
- [47] <http://www.anagnostec.eu> – staženo 22. 1. 2013 v 21:34
- [48] Staub A., Schappler J, Rudaz S., Veuthey J.-L.: *Electrophoresis* **30** (10), 1610 – 1623 (2009)
- [49] Chen Q., Zhang J., Zhag W., Chen Z.: *J. Sep. Sci.* **36** (2), 341 – 349, 2013
- [50] Caslavská, J., Jung B., Thormann W.: *Electrophoresis* **32** (13), 1760 – 1764 (2011)
- [51] da Costa J. L., Tonin F. G., Zanolli L. A., Chasin A. A., Tavares M. F.: *Electrophoresis* **30** (12), 2238 – 2244 (2009)
- [52] <http://www.shimadzu.com> – staženo 22. 1. 2013 v 23:31

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ACES	N-(2-Acetamido)-2-aminoethanesulfonová kyselina
ACN	acetonitril
APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku
APPI	fotoionizace za atmosférického tlaku
BGE	pracovní elektrolyt
BPC	z angl. based peak chromatogram
CAPS	N-cyclohexyl-3-aminopropanesulfonová kyselina
CE	kapilární elektroforéza
CHES	N-Cyclohexyl-2-aminoethanesulfonová kyselina
CMC	kritická micelární koncentrace
CNS	centrální nervová soustava
EIC	extrahovaný iontový chromatogram
EOF	elektroosmotický tok
ESI	ionizace elektrosprejem
GC	plynová chromatografie
HEPES	2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonová kyselina
HMMC	4-hydroxy-3-metoxymethkatinon
ICR	iontová cyklotronová rezonance
IL	iontová kapalina
IT	iontová past
LC	kapalinová chromatografie
L-L extrakce	extrakce z kapaliny do kapaliny
MALDI	desorpce a ionizace za účasti matrice
MBHFBA	N-methyl-bis(heptafluorobutyramid)
MDC	3,4-metylendioxykatinon
MDPV	metylendioxyprovaleron
MES	2-(N-morpholino)ethanesulfonová kyselina
MEKC	micelární elektrokinetická chromatografie
MOPS	3-(N-morpholino)propanesulfonová kyselina
MOPSO	3-Morpholino-2-hydroxypropanesulfonová kyselina
MS	hmotnostní spektrometrie

MTPA	α -methoxy- α -trifluoromethylphenyloctová kyselina
MTSFA	N-methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamid
PIPES	piperazine-N,N'-bis(2-ethanesulfonová kyselina)
PD	z angl. post decay
SDS	dodecylsírán sodný
SL	pomocná kapalina
SPE	extrakce na pevné fázi
TFA	trifluoroctová kyselina
TOF	analyzátor z doby letu
TPC	N-trifluoroacetyl-prolyl chlorid
tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan