

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE

Diplomová práce

STUDIUM VHODNOSTI α -BROMFENYLOCTOVÉ
KYSELINY JAKO MODELOVÉHO ANALYTU PRO CHIRÁLNÍ
SEPARACE S VYUŽITÍM KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZY II

Školitel diplomové práce: PharmDr. Pavel Jáč, Ph.D.

HRADEC KRÁLOVÉ, 2019

Zuzana Bubáková

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové dne 13. 5. 2019

Zuzana Bubáková

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala PharmDr. Pavlu Jáčovi, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost, cenné rady a vstřícnost při vypracovávání diplomové práce. Poděkování patří Davidovi Moreno-Gonzálezovi, Ph.D. za značnou pomoc a rady nejen při CE-MS experimentech. Děkuji také panu doc. RNDr. Miroslavovi Poláškov, CSc. za poskytnuté rady a připomínky při konečném zpracování práce.

Na závěr děkuji pracovníkům katedry analytické chemie za ochotu a vstřícnost při práci v laboratoři.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Zuzana Bubáková

Školitel: PharmDr. Pavel Jáč, Ph.D.

Název diplomové práce: Studium vhodnosti α -bromfenyloctové kyseliny jako modelového analytu pro chirální separace s využitím kapilární elektroforézy II

V publikaci od Rizviho a Shamsiho (Rizvi S.A.A., Shamsi S. A. Anal. Chem. 2006, 78(19), 7061-7069) byla α -bromfenyloctová kyselina (BPAA), rozpuštěná v 50% methanolu (v/v), použita jako modelový analyt pro chirální separace za využití kapilární elektroforézy (CE). Stabilita BPAA ve vodném methanolickém rozpouštědle je však diskutabilní (Kováčová G. 2018. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta). Cílem této práce bylo určení řádu rozkladné reakce BPAA ($c = 0,47 \text{ mM}$) v 50% methanolu (v/v). Studie reakční kinetiky byla provedena pomocí kapilární elektroforézy v kapiláře pokryté polyvinylalkoholem (50 μm vnitřní průměr; 30 cm/24,5 cm). BPAA a produkty nukleofilní substituce (kyselina mandlová, kyselina α -methoxyfenyloctová a Br^-) byly analyzovány v 60 mM mravenčanovém pufru (pH 3,0) při -30 kV; λ UV detekce byla 200 nm. Kinetika prvního řádu byla pro tuto rozkladnou reakci potvrzena metodou lineární a nelineární regrese, s hodnotami rychlostních konstant $1,52 \times 10^{-4} \pm 2,76 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ a $7,89 \times 10^{-5} \pm 5,02 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$. BPAA rozpuštěná ve 100% methanolu byla analyzována v 60 mM mravenčanovém pufru (pH 3,0) a 50 mM fosfátovém pufru (pH 7,5); reakce vykazovala mnohem pomalejší průběh degradace než v 50% MeOH (v/v). Identita rozkladných produktů byla potvrzena pomocí CE s hmotnostně spektrometrickou detekcí (MS). CE-MS separace v 60 mM mravenčanovém pufru (pH 3,0) a 60 mM octanovém pufru (pH 5,0) korespondovala s výsledky získanými pomocí CE-UV. Tato práce dokládá důkazy o nestabilitě BPAA v 50% vodném roztoku methanolu, což poukazuje na nevhodnost jejího použití jako modelového analytu pro chirální separace.

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical Chemistry

Candidate: Zuzana Bubáková

Supervisor: PharmDr. Pavel Jáč, Ph.D.

Title of diploma thesis: Study of α -bromophenylacetic acid suitability as a model analyte for chiral separations using capillary electrophoresis as a separation technique II

Rizvi and Shamsi (Rizvi S.A.A., Shamsi S. A. Anal. Chem. 2006, 78(19), 7061-7069) reported the employment of α -bromophenylacetic acid (BPAA) dissolved in water/methanol mixture (1:1, v/v) as a model analyte for chiral separations in capillary electrophoresis (CE). However, the stability of BPAA in aqueous methanol is questionable (Kováčová G. 2018. Diploma thesis. Charles University, Faculty of Pharmacy). The aim of this work was to determine the reaction order of the decomposition of BPAA ($c = 0.47 \text{ mM}$) in 50% aqueous methanol. The reaction kinetic study was performed by capillary electrophoresis in $50 \text{ }\mu\text{m}$ (i.d.) poly(vinyl alcohol)-coated capillary (30 cm/24.5 cm) with UV detection. The BPAA and products of nucleophilic substitution (mandelic acid, α -methoxyphenylacetic acid, and Br^-) were separated in 60 mM formate buffer (pH 3.0) at -30 kV; the detection λ was 200 nm. The first order reaction kinetics was confirmed by linear and non-linear regression, yielding the rate constant $1.52 \times 10^{-4} \pm 2.76 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ and $7.89 \times 10^{-5} \pm 5.02 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$, respectively. Additionally, the BPAA dissolved in 100% methanol separated in 60 mM formate buffer (pH 3.0) and 50 mM phosphate buffer (pH 7.5) showed a slower course of degradation. The identity of the degradation products was confirmed by CE coupled to mass spectrometric (MS) detection. The CE-MS separations carried out in 60 mM formate buffer (pH 3.0) and in 60 mM acetate buffer (pH 5.0) confirmed the results obtained by CE with UV detection. Results of this work provide strong evidence of the instability of BPAA in 50% aqueous methanol indicating that it is not suitable as a model analyte for chiral separations.

OBSAH

Seznam zkratek	9
1. Úvod.....	11
2. Cíl a zadání práce	12
3. Teoretická část.....	13
3.1. Kapilární elektroforéza	13
3.1.1. Instrumentace.....	13
3.1.2. Elektroosmotický tok (EOF)	14
3.1.3. Elektroforetická pohyblivost.....	16
3.1.4. Módy separace v CE.....	17
3.2. CE-MS	18
3.2.1. Spojení s přídavným tokem kapaliny	19
3.2.2. Spojení bez přídavné kapaliny	21
3.3. Reakční kinetika a řád reakce.....	22
3.3.1. Určení řádu reakce a rychlostní konstanty	23
3.3.2. Reakce prvního řádu....	24
3.3.3. Reakce druhého řádu.....	24
3.4. Substituce nukleofilní.....	25
3.4.1. Substituce nukleofilní monomolekulární.....	25
3.4.2. Substituce nukleofilní bimolekulární	26
4. Experimentální část	28
4.1. Použité přístroje a pomůcky	28
4.2. Použité chemikálie	28
4.2.1. Chemikálie na přípravu základních elektrolytů	28
4.2.2. Standardy.....	29
4.3. Příprava roztoků a podmínky CZE-UV analýzy v PVA kapiláře	29

4.3.1.	Příprava roztoků základních elektrolytů	29
4.3.2.	Příprava zásobních roztoků standardů	30
4.3.3.	Příprava zásobních roztoků vnitřních standardů	30
4.3.4.	Příprava pracovních roztoků pro ověření linearitu	30
4.3.5.	Podmínky pro kvantifikaci rozkladných produktů a určení linearitu	31
4.3.6.	Kvantifikace rozkladných produktů a určení linearitu a kinetiky reakce ..	31
4.4.	Příprava roztoků a podmínky pro CZE-UV analýzy v křemenné kapiláře.....	33
4.4.1.	Příprava 50 mM fosfátového pufru o pH 7,5	33
4.4.2.	Příprava 25 mM fosfátového pufru o pH 7,5 s 30 mM SDS.....	33
4.4.3.	Příprava pracovních roztoků	33
4.4.4.	Parametry měření	33
4.5.	Příprava roztoků a podmínky analýzy pro CE-MS	34
4.5.1.	Příprava 60 mM mravenčanového pufru o pH 3,0	34
4.5.2.	Příprava 60 mM octanového pufru o pH 5,0	34
4.5.3.	Příprava pracovních roztoků	34
4.5.4.	Podmínky měření	35
4.6.	Výpočty.....	36
4.6.1.	Poměr signálu k šumu	36
4.6.2.	Limit detekce (LOD) a limit kvantifikace (LOQ).....	36
4.6.3.	Rozlišení	36
4.6.4.	Opakovatelnost	36
5.	Výsledky a diskuze	38
5.1.	CZE-UV analýza v PVA kapiláře.....	38
5.1.1.	Výběr vnitřního standardu.....	38
5.1.2.	Kalibrační závislost pro rozkladné produkty rozpuštěné ve 100% methanolu.....	38

5.1.3.	Kalibrační závislost pro rozkladné produkty rozpuštěné v 50% methanolu.....	41
5.2.	Rozklad α -bromfenyloctové kyseliny	45
5.2.1.	Určení řádu a rychlostních konstant reakcí	49
5.3.	Analýza α -bromfenyloctové kyseliny v 50 mM fosfátovém pufru.....	51
5.3.1.	Analýza α -bromfenyloctové kyseliny v 25 mM fosfátovém pufru pH 7,5 s přídavkem 30 mM SDS.....	53
5.4.	Ověření totožnosti rozkladných produktů pomocí CE-MS.....	56
5.4.1.	BPAA v 60 mM octanovém pufru, pH 5,0	58
5.4.2.	BPAA v 60 mM mravenčanovém pufru, pH 3,0	61
6.	Závěr	63
7.	Zdroje.....	64

SEZNAM ZKRATEK

AA	octanový pufr
APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku
APPI	fotoionizace za atmosférického tlaku
BGE	základní elektrolyt
BPAA	α -bromfenyloctová kyselina
CE	kapilární elektroforéza
CEC	kapilární elektrochromatografie
CGE	kapilární gelová elektroforéza
CIEF	kapilární izoelektrická fokusace
CITP	kapilární izotachoforéza
CZE	kapilární zónová elektroforéza
EOF	elektroosmotický tok
ESI	ionizace elektrosprejem
FA	mravenčanový pufr
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IL	iontová kapalina
IS1	vnitřní standard 1 (Acesulfam K)
IS2	vnitřní standard 2 (Salicylová kyselina)
LC	kapalinová chromatografie
LIF	laserem indukovaná fluorescence
LOD	limit detekce
LOQ	limit kvantifikace

L-UCLB	undecenoxykarbonyl- <i>L</i> -leucinol bromid
MA	mandlová kyselina
MALDI	ionizace laserem za účasti matrice
MEKC	micelární elektrokinetická chromatografie
MeOH	methanol
MPAA	α -methoxyfenyloctová kyselina
MRM	mód monitorování více fragmentových hmot (multiple reaction monitoring)
MS	hmotnostní spektrometrie
PVA	polyvinylalkohol
RSD	relativní směrodatná odchylka
SDS	dodecylsírán sodný
SRM	mód monitorování vybrané reakce (single reaction monitoring)
UV	ultrafialové záření
VIS	viditelné záření

1. ÚVOD

Tato diplomová práce se zabývá studiem vhodnosti α -bromfenyloctové kyseliny (BPAA) jako modelového analytu pro chirální separace s využitím kapilární elektroforézy (CE). Tato kyselina byla spolu s 2-(2-chlorfenoxy)propanovou kyselinou použita pro demonstraci úspěšné chirální separace pomocí chirálních iontových kapalin (IL) s využitím CE [1]. Kationické surfaktanty undecenoxykarbonyl-L-leucinol bromid a undecenocy-karbonyl-L-pyrolidiol bromid a jejich polymery byly v koncentraci 25 mM přidány k 50 mM fosfátovému pufru o pH 7,5. V těchto základních elektrolytech bylo dle Rizviho a Shamsiho dosaženo úspěšné chirální separace BPAA na dva enantiomery s rozlišením o hodnotách od 1,7 do 5 [1].

V diplomové práci Gabriely Kováčové [2] byl popsán rozklad BPAA v 50% methanolu (v/v), který byl použit jako rozpouštědlo v uvedeném článku [1]. Obdobné chování bylo pozorováno i při použití 100% methanolu jako rozpouštědla [2].

Tato práce se zabývá detailnějším popisem chování BPAA v 50% (v/v) a ve 100% methanolu. Ke studiu stability BPAA byla použita metoda kapilární elektroforézy v mravenčanovém a fosfátovém pufru. Pomocí kapilární elektroforézy s hmotnostně spektrometrickou detekcí (CE-MS) byla následně potvrzena identita rozkladných produktů a byly tak potvrzeny výsledky získané pomocí UV detekce z předchozí diplomové práce [2].

2. CÍL A ZADÁNÍ PRÁCE

1. Validace CE metody v mravenčanovém pufru (rozsah, linearity, LOQ, přesnost)
2. Určení řádu reakce, rychlostní konstanty a poločasu reakce v prostředí 50% methanolu (v/v) pomocí validované CE metody v mravenčanovém pufru
3. Ověření stability BPAA v základních elektrolytech o vyšším pH
4. MEKC analýza BPAA a jejích rozkladných produktů
5. CE-MS analýza v mravenčanovém a octanovém pufru pro ověření identity rozkladných produktů

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1. *Kapilární elektroforéza*

Kapilární elektroforéza je analytická technika patřící mezi separační metody umožňující rychlou a účinnou separaci nabitých analytů v elektrickém poli. Separace je založena na odlišné elektroforetické pohyblivosti iontů v prostředí pufru uvnitř kapiláry [3].

Mezi přednosti CE patří vysoká účinnost separace, která je ve srovnání s HPLC vyšší, dále jednoduchá instrumentace a mnoho separačních módů. Separace navíc probíhá velmi rychle, a spotřeba rozpouštědel a vzorku je minimální [4].

Jednou z dalších výhod CE je její široké spektrum použití. Původně byla určena pouze na analýzy biologických makromolekul, osvědčila se však i v separaci sloučenin jako jsou aminokyseliny, chirální léčiva, vitaminy, organické kyseliny, sacharidy či anorganické ionty [5].

3.1.1. Instrumentace

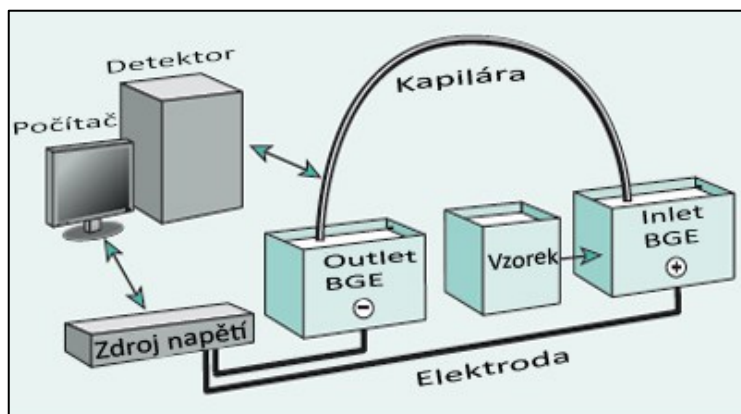
Nejdůležitější částí, ve které probíhá separace, je kapilára naplněná elektrolytem, jejíž konce jsou ponořeny do dvou rezervoárů s roztokem základního elektrolytu (BGE). Separační kapiláry bývají zpravidla vyrobeny z taveného křemene a pro zvýšení mechanické stability bývají potažené tenkou vrstvou polyimidu. Vnitřní průměr kapilár bývá okolo 20-100 μm , délka kapilár se pohybuje od 10 cm do 100 cm [3].

Na kapiláru je vkládáno napětí z vysokonapěťového zdroje pomocí dvou elektrod, taktéž ponořených do nádobek s BGE [3] (Obrázek 1).

Vzorek je dávkován výměnou rezervoáru s pufrem za vialku se vzorkem a aplikováním vnějšího tlaku (hydrodynamicky) nebo elektrického pole (elektrokineticky). Následně se vialka s pufrem vrátí na původní místo a na kapiláru je aplikováno vysoké napětí a začne probíhat separace [5].

Detektor bývá umístěn zpravidla na outletovém konci kapiláry. Nejčastěji je používán UV-VIS detektor. Z dalších detekčních metod je používána vodivostní, amperometrická

či fluorescenční detekce. Mezi citlivější metody pak patří laserem indukovaná fluorescence či hmotnostní spektrometrie [5].



Obrázek 1 Instrumentace CE, převzato a upraveno z [5]

3.1.2. Elektroosmotický tok (EOF)

Kapiláry jsou nejčastěji vyrobeny z taveného křemene, jehož vnitřní povrch je tvořen silanolovými skupinami. Za přítomnosti elektrolytu mohou být ionizovány. Takto vzniknou jednotlivé vrstvy: záporně nabitá silanolová vrstva, na ní navazuje vždy nepohyblivá tzv. Sternova vrstva a nejbližší středu kapiláry se nachází difuzní pohyblivá vrstva kationtů nazývána jako vnější Helmholtzova vrstva [3].

Ionizované silanolové skupiny na vnitřní stěně kapiláry přitahují kationty z prostředí pufru. Pokud se na kapiláru vloží napětí, začnou solvatované kationty ve vnější difuzní vrstvě migrovat směrem ke katodě a svým pohybem unášejí pomocí vodíkových můstků i celý roztok elektrolytu. Tento jev je označován jako elektroosmotický tok, který představuje hlavní hnací sílu kapilární elektroforézy. EOF působí jako pumpa pro všechny molekuly, ať jsou neutrální, kladně či záporně nabité. Ty jsou pomocí EOF unášeny k detektoru, zatímco se rozdělují podle svých odlišných efektivních pohyblivostí [4].

Za normálních podmínek, kdy je vnitřní povrch kapiláry záporně nabit, směřuje EOF ke katodě. Kationty se pohybují rychleji než EOF, protože migrují ke katodě a EOF je zároveň ve stejném směru urychluje. Neutrální analyty jsou unášeny spolu s EOF, ale v průběhu

analýzy nejsou rozděleny. Anionty jsou nejpomalejší, protože migrují k anodě, nicméně jsou díky existenci EOF unášeny ke katodě [4].

Za podmínek, kdy je EOF dostatečně silný, se budou oddělovat jednotlivé zóny analytů podle elektroforetické pohyblivosti. Pokud by byl EOF nízký, mohlo by se vyskytnout rozšiřování píků jednotlivých analytů a pokud by byl až příliš slabý, některé analyty by se za čas analýzy nedostaly k detektoru. Příliš výrazný EOF by naopak způsobil nedostatečné rozdělení analytů. S vlivem EOF je tedy nutno při analýzách počítat a popřípadě jeho vliv upravit pokrytím kapiláry či změnou pH [4].

Mezi ionty tvořící difuzní vrstvu a ionty Sternovy vrstvy existuje rozdíl potenciálu. Ten se nazývá zeta potenciál. Hodnota zeta potenciálu je ovlivněna povrchovým nábojem stěny kapiláry. Tento náboj je závislý na hodnotě pH elektrolytu, následkem toho se síla EOF mění s pH. Je zřejmé, že hodnota pH elektrolytu ovlivní, jaká část silanolových skupin bude ionizována. Při vysokém pH, kdy jsou silanolové skupiny deprotonovány, je EOF výrazně vyšší než při nízkém pH [5].

Zeta potenciál je také závislý na iontové síle pufru. Zvýšená iontová síla vede k oslabení dvojvrstvy, nižšímu zeta potenciálu a sníženému EOF. Obvyklá koncentrace pufru použitých při elektroforéze se pohybuje od 10 do 50 mM, ačkoliv bylo popsáno využití i 100 až 500 mM pufrů [5].

Unikátní vlastností EOF je plochý profil průtoku. Síla elektrického pole je rovnoměrně rozprostřena skrze kapiláru, což je výhodné z hlediska menšího rozšiřování zón, a následně vyšší separační účinnosti [5].

3.1.3. Elektroforetická pohyblivost

Separace v elektroforéze je založena na různé rychlosti pohybu nabitých částic v elektrickém poli. Rychlost pohybu iontu může být vyjádřena součinem pohyblivosti a intenzity elektrického pole:

$$v = \mu_e E \quad (1)$$

v - rychlost pohybu iontu; μ_e - elektroforetická pohyblivost; E - intenzita elektrického pole (to je vyjádřeno jako poměr aplikovaného napětí ve voltech a celkové délky kapiláry, tj. U/L) [5].

Z Rovnice 2 vyplývá, že je elektroforetická pohyblivost přímo úměrná náboji iontu a nepřímo úměrná poloměru iontu a viskozitě separačního média. Proto malé, hodně nabité entity budou mít vysokou elektroforetickou mobilitu, zatímco velké a málo nabité ionty budou vykazovat nízkou hodnotu elektroforetické pohyblivosti [5]:

$$\mu_e = \frac{q}{6\pi\eta r} \quad (2)$$

q - náboj iontu; η - viskozita roztoku; r - poloměr iontu.

Elektroforetická pohyblivost (někdy označována jako iontová pohyblivost), kterou můžeme najít v literatuře, je vztažena na úplně ionizované molekuly v nekonečně zředěném roztoku. Experimentálně získaná pohyblivost, tzv. efektivní elektroforetická pohyblivost, je závislá na pH použitého pufru (Rovnice 3) a dosahuje obvykle nižších hodnot než μ_e [5].

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

μ_{eff} - efektivní elektroforetická pohyblivost; α_i - stupeň ionizace (disociace) molekuly.

Další parametr charakterizující migraci analytu je zdánlivá elektroforetická pohyblivost μ_a s jednotkou $\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{V}^{-1}$. Tato veličina charakterizuje vzdálenost, kterou analyt urazí za daný časový úsek v elektrickém poli:

$$\mu_a = \frac{l}{tE} = \frac{lL}{tU} \quad (4)$$

l - efektivní délka kapiláry (vzdálenost od místa nástřiku k místu detekce; cm);
 t - migrační čas (s); E - intenzita elektrického pole ($\text{V} \cdot \text{cm}^{-1}$); L - celková délka kapiláry (vzdálenost mezi dvěma elektrodami; cm); U - napětí mezi elektrodami (V) [6].

3.1.4. Módy separace v CE

V CE lze provádět separace v různých modifikacích lišících se separačním mechanismem. Mezi hlavní módy patří kapilární zónová elektroforéza (CZE), kapilární gelová elektroforéza (CGE), micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC), kapilární elektrochromatografie (CEC), kapilární isoelektrická fokusace (CIEF) a kapilární isotachoforéza (CITP) [4].

CZE je z nich nejjednodušší a zároveň asi nejvíce používaná metoda. Separace je založena na rozdílných elektroforetických mobilitách analytů, které pak mají v prostředí BGE za přítomnosti elektrického pole různý migrační čas. Separace je založena hlavně na různé velikosti iontu a velikosti jeho náboje při dané hodnotě pH základního elektrolytu. Rozdělit lze však pouze anionty a kationty, neutrální částice jsou nerozděleny unášeny EOF do místa detekce [3].

Přidání speciálních reagentů do základního elektrolytu umožní na stejném přístroji vykonávat jiný mód a využít tak jiný princip separace.

V MEKC je separačním mechanismem rozdělování analytu mezi micelární a elektrolytovou fází. Tato technika umožňuje separovat i neutrální analyty, které by se v CZE nesePARovaly a pohybovaly se společně s EOF. Micely jsou vytvořeny, když je do roztoku základního elektrolytu přidán surfaktant o koncentraci převyšující kritickou micelární koncentraci. Nejčastěji používaný je anionický surfaktant dodecylsulfát sodný (SDS). Při použití SDS jsou micely podobné olejovým kapkám s velmi polárním, záporně nabitým povrchem a nepolárním vnitřkem. I když jsou tyto anionické micely přitahovány

k anodě, v nepokryté kapiláře jsou unášeny pomocí EOF ke katodě. Neutrální molekuly se dělí mezi pseudostacionární fázi tvořenou micelami a roztokem pufru v závislosti na své hydrofobicitě [5].

Micely mohou být také nahrazeny jiným aditivem, které interaguje s analyty a ovlivní tak jejich rychlost průchodu skrz kapiláru a tím umožní nový způsob separace. Přidávány jsou například cyklodextriny (pak hovoříme o elektrokinetické chromatografii), síťovací činidla (CGE) či amfolyty (CIEF) [3].

3.2. CE-MS

Spojení CE s hmotnostní spektrometrií bylo poprvé představeno v roce 1987. Tato kombinace přináší další možnosti a výhody mezi které patří zejména zvýšení citlivosti a selektivity v porovnání s nejčastěji používaným UV-VIS detektorem. MS dokáže rozlišit analyty migrující ve stejný čas díky různým MS spektrům a je tak možné identifikovat a potvrdit totožnost neznámých molekul [7].

Pro spojení CE s MS bývají využity měkké ionizační techniky: ionizace elektrosprejem (ESI), chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI), fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI) a ionizace laserem za účasti matrice (MALDI). Pro online CE-MS spojení je nejčastěji využívána ESI, a to z důvodu jednoduššího spojení s CE a širokému využití v analýze malých molekul i proteinů [8].

Připojení CE k MS není tak jednoduché, jak je tomu při UV či LIF detekci probíhající přímo na kapiláře. Aby bylo spojení proveditelné, je nutné zajistit stálé elektrické pole pro elektroforetickou separaci. Koncová strana kapiláry musí být umístěna v iontovém zdroji, na rozdíl od klasického provedení CE, kdy je kapilára ponořena do roztoku BGE. Analyt je transportován z outletové strany kapiláry přímo do iontového zdroje. Elektrický obvod pro elektroforetickou separaci a ESI musí být uzavřen a kontakt na konci CE kapiláry a ESI dostatečně stabilní [9]. Pro účinnou ionizaci je nutno zvolit vhodnou geometrii a pozici kapiláry v emitteru [8].

Při MS detekci musí být zvolen vhodný základní elektrolyt, který je kompatibilní s MS detektorem a zároveň poskytuje dobrou separaci. Kompatibilní BGE jsou těkavé, tuto podmínku splňuje kupříkladu mravenčanový či octanový pufr, jejichž pH je upraveno

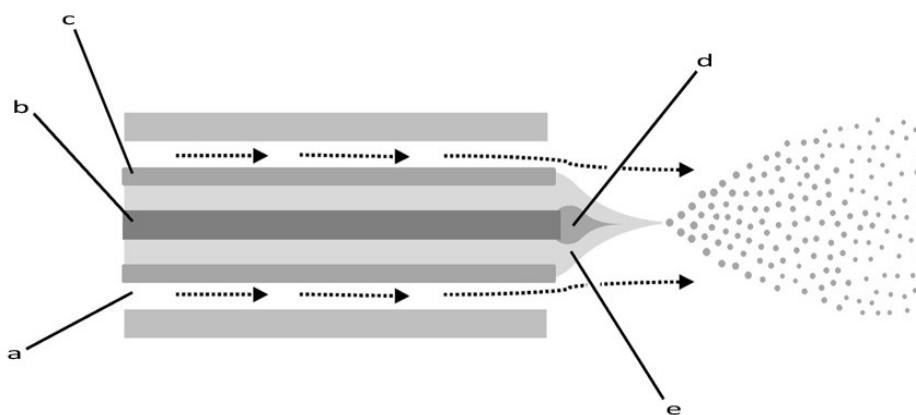
vodným roztokem amoniaku. Netěkavé BGE by způsobily zanesení iontového zdroje a MS přístroje, zeslabení signálu analytu v MS a tím i vyšší signál pozadí [10].

V první publikaci představující spojení CE-MS byl konec CE kapiláry pokryt nerezovou ocelí, což uzavřelo elektrický obvod CE s ESI. Na tento konec bylo aplikováno napětí a bylo dosaženo stabilního elektrického pole [11]. Dnes můžeme rozhraní spojující CE-MS rozdělit na skupinu, kde je využíváno přídavku kapaliny pro uzavření obvodu, tzv. spojení s přídavným tokem kapaliny a rozhraní, kde je tato kapalina nahrazena jiným způsobem kontaktu, tzv. spojení bez přídavné kapaliny.

3.2.1. Spojení s přídavným tokem kapaliny

Koaxiální spojení bylo navrženo v roce 1988 [12] a od té doby se stalo populárním, zejména díky jeho jednoduchosti a komerční dostupnosti. Spojení je realizováno dvěma kocoentrickými trubicemi (Obrázek 2). Vnitřní trubice zhotovená většinou z nerezové oceli či platiny obklopuje výstupní konec kapiláry. Přivádí přídavnou kapalinu, která zprostředkovává elektrický kontakt mezi výstupním koncem kapiláry a BGE, navýší průtok pro stabilní funkci elektrospreje, a podpoří svým složením ionizaci analytů. Samotný kontakt je tvořen tenkou vrstvičkou přídavné kapaliny, tekoucí přes okraj kapiláry k BGE. Kapilára musí přibližně o 0,2 mm přesahovat tuto kovovou trubici, jedině tak bude spojení účinné a sníží se mrtvý objem téměř na nulu a elektrosprej bude stabilní [8].

Vnější trubice poté přivádí zmlžovací plyn, který napomáhá nebulizaci BGE smíšeného s přídavnou kapalinou. Je to jeden z klíčových parametrů, který stabilizuje ESI proud a zvýší intenzitu signálu. Výsledná separační účinnost se však může snížit kvůli přítomnému sacímu efektu na konci kapiláry, kdy se podtlakem změní plochý profil průtoku na parabolický [8].



Obrázek 2 Spojení s přídavným tokem kapaliny , převzato z [7], a- zmlžující plyn, b- CE kapilára, c-vodivá vnitřní trubice, d- obsah CE kapiláry , e- přídavná kapalina

Přídavná kapalina musí být vodivá, aby byl uzavřen elektrický obvod s CE elektrodami. Její složení by mělo pozitivně ovlivňovat ionizaci a odpařování BGE. Vhodné složení přídavné kapaliny se pro různé analyzované látky liší a proto je nutno tento parametr pečlivě optimalizovat. Složení nemusí být vždy stejného charakteru jako je BGE a lze tak využít možnosti ovlivnit separaci a kompatibilitu s MS. Vyšší množství organických rozpouštědel v přídavné kapalině například zvýší těkavost, přítomnost slabé kyseliny se používá pro zvýšení protonizace analytů i při alkalickém pH BGE [13].

Jako často používané složení přídavné kapaliny může být methanol s vodou (50/50, v/v) s malým přídavkem BGE. Dále například roztok s acetonitrilem, propanolem, methanolem o dostatečné iontové síle, aby byla zajištěna vodivost [12].

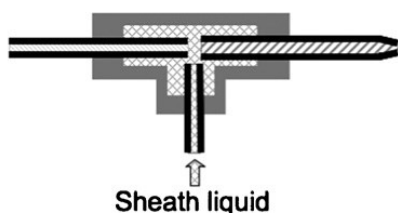
Výhodou spojení pomocí přídavné kapaliny jsou na sobě téměř nezávislé procesy v CE a zvláště v MS, kdy je umožněno využívat širokou škálu BGE se standardními kapilárami bez jakýchkoliv dalších úprav. Kapiláry jsou tak jednoduše vyměnitelné. Toto spojení je robustní díky konstantnímu a vyššímu průtoku, který zajišťuje stabilní funkci elektrospreje. Průtok přídavné kapaliny bývá nastaven na hodnoty v rozmezí 2-30 $\mu\text{l}/\text{min}$. Další výhodou je také téměř nulový mrtvý objem [8].

Zásadním nedostatkem tohoto spojení je naředění analytů přídavnou kapalinou. Spolu s analyty do elektrospreje vstupují jak nabitě, tak i neutrální molekuly, které spolu soutěží o získání náboje v ESI, a tak snižují maximální citlivost, bránící plnému využití

potenciálu MS. Kvůli sacímu efektu z přívodu plynu se může vyskytnout rozšiřování píků, fluktuace migračních časů a snižování separační účinnosti [8].

Z těchto důvodů jsou vyvíjena další inovativní spojení CE-MS. Skupina Normana Dovichiho například přišla s tzv. „sheath flow CE-nanoESI-MS“, kdy je snížení průtoku přídavné kapaliny doprovázeno 50 až 100 krát zvýšenou intenzitou signálu v MS v porovnání s konvenčním spojením využívajícím přídavnou kapalinu [13].

Spojení pomocí kapalného spoje (anglicky liquid junction) je další typ CE-MS spojení, který využívá přídavnou kapalinu (Obrázek 3). Bylo vyvinuto za účelem snížení nežádoucího naředění vzorku u spojení s přídavnou kapalinou a zároveň pro zachování veškerých jeho výhod. Tok kapaliny je přidáván k CE toku skrze 20-200 μm mezeru mezi koncem kapiláry a sprejovací jehlou [8]. Tímto se výrazně sníží naředění analytu. Konec CE kapiláry je připojen k elektrospreji pomocí jednotky tvaru T. Úzká štěrbina je naplněna kapalinou tak, aby byl uzavřen elektrický obvod. Toto spojení zachová citlivost a robustnost [7]. Náročnější je zde seřízení průtoku přídavné kapaliny a spojení separační kapiláry se sprejovací kapilárou do správné geometrické pozice. To může způsobit nižší separační účinnost a citlivost. Koaxiální spojení je proto využíváno více.



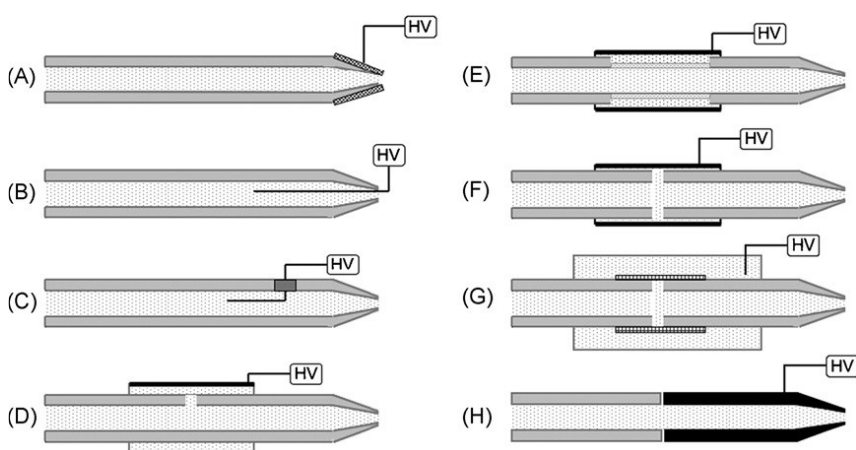
Obrázek 3 CE-MS spojení pomocí kapalného spoje (liquid junction), převzato z [14]

3.2.2. Spojení bez přídavné kapaliny

V prvním popsaném spojení poskytuje elektrický kontakt přídavná kapalina. Tento kontakt lze také zajistit pomocí přidání vodivého komponentu. Toto spojení bez přídavné kapaliny, tzv. sheatless, poskytuje až desetinásobně vyšší citlivost [9] díky absenci naředění analytu přidávaným objemem kapaliny. Výběr vhodného BGE, který by sám o sobě poskytoval dostatečnou ionizaci, je náročnější, protože je přiváděn přímo k ESI bez dalších modifikací jeho vlastností [8].

Elektrický kontakt u spojení bez přídavné kapaliny lze vytvořit mnoha způsoby ukázanými na Obrázku 4. Toto spojení může být koncipováno pomocí speciální kapiláry, která svým koncem zastupuje nanosprej. Dále pak může být kapilára potažena kovem [15], či se do ní vloží vodivý drátek [16], nebo se skrz její stěnu u výstupní strany vytvoří póry [17].

Potíží tohoto spojení je obecně nižší robustnost, horší stabilita elektrospreje z důvodu nižšího průtoku a taky dlouhodobá nestabilita tohoto spojení [18].



Obrázek 4 Metody dosažení elektrického kontaktu u spojení bez přídavné kapaliny, převzato z [14], A- vodivé pokrytí špičky emitteru, B- vložený vodivý drátek, C- vodivý drátek skrz stěnu kapiláry, D- „Split-flow“ s kovovým proužkem, E- porézní stěny kapiláry v kovovém krytu, F- spojení skrz kapiláru s kovovým krytem, G- mikrodialyzační spojení, H- spojení s oddělitelnou vodivou špičkou emitteru

3.3. Reakční kinetika a řád reakce

Rychlostní rovnice vyjadřuje vztah mezi rychlostí a složením reakční směsi. Pro rychlost reakce typu $A+B \rightarrow \text{produkty}$, byl formulován Gouldberg-Waagův zákon popisující, že okamžitá rychlost reakce v je úměrná součinu okamžitých koncentrací výchozích látek umocněnými dílčími reakčními řády [19]:

$$v = k \cdot [A]^a [B]^b \quad (5)$$

v - rychlost reakce; k - rychlostní konstanta; $[A]$, $[B]$ - okamžité koncentrace látek A a B; a, b - dílčí řád reakce

Exponenty koncentrací určují dílčí řády reakce, mohou, ale nemusí být shodné se stechiometrickými koeficienty. Součet těchto exponentů dává dohromady celkový řád reakce [19].

Dalším důležitým pojmem v kinetice je rychlostní konstanta k . Udává, jak rychle reakce probíhá při jednotkové koncentraci všech výchozích látek. Je tedy vhodnou kinetickou veličinou pro porovnávání rychlostí jednotlivých reakcí. Hodnota rychlostní konstanty závisí na charakteru látek, které jsou reaktanty, a na dalších vnějších podmínkách, jako je teplota či přítomnost katalyzátorů. Vyšší hodnota rychlostní konstanty znamená rychlejší průběh [20].

Jinou veličinou vyjadřující rychlost reakce je poločas reakce $\tau_{1/2}$, neboli doba, za kterou klesne koncentrace výchozí látky přesně na polovinu [20].

3.3.1. Určení řádu reakce a rychlostní konstanty

Jedním z mnoha možných způsobů určení řádu reakce je grafické vynesení různých funkcí koncentrace na čas. Podle vynesené funkce, ve které je závislost lineární, určíme reakční řád. Pro nultý řád reakce je to okamžitá koncentrace (c), pro první řád logaritmus koncentrace ($\ln c$) a pro druhý řád převrácená hodnota koncentrace ($1/c$) [19].

Rychlostní konstantu k pak určíme ze směrnice získané přímky.

Jiným přístupem pro určení konstanty je nelineární regrese, při které se vynese závislost stoupající koncentrace produktu na čas. Tato závislost odpovídá exponenciální funkci (Rovnice 6), z které je možné určit hodnotu k .

$$y = a(1 - e^{-bx}) \quad (6)$$

y - koncentrace produktu; a - počáteční koncentrace reaktantu; b - rychlostní konstanta k ;
 x - čas t .

3.3.2. Reakce prvního řádu [19]

Rychlost reakce, probíhající podle rovnice $A \rightarrow \text{produkty}$, je úměrná koncentraci výchozí látky a platí pro ni:

$$v = \frac{dc_a}{dt} = kc_a \quad (7)$$

c_a - okamžitá koncentrace látky A; t - čas.

Integrací pak získáme vztah:

$$\ln c_a = \ln c_{a,0} - kt \quad (8)$$

$c_{a,0}$ - počáteční koncentrace látky A.

Rychlostní konstantu lze dle této rovnice určit ze směrnice lineární závislosti $\ln c_a$ na čase t .

Po úpravě tohoto vztahu získáme:

$$c = c_0 \cdot e^{-kt} \quad (9)$$

Poločas reakce se u kinetiky prvního řádu v průběhu reakce nemění. Jeho určení lze provést z grafické závislosti koncentrace výchozí látky na čase a to v bodě, kdy koncentrace klesne právě na polovinu své počáteční hodnoty. Početně pak ze znalosti rychlostní konstanty:

$$\tau_{1/2} = \frac{\ln 2}{k} \quad (10)$$

$\tau_{1/2}$ - poločas reakce.

3.3.3. Reakce druhého řádu [19]

Reakci druhého řádu je možno popsat rovnicí $A + B \rightarrow \text{produkty}$ a její rychlostní rovnice má tvar:

$$v = kc_a c_b = -\frac{dc_a}{dt} \quad (11)$$

c_b - okamžitá koncentrace látky B.

Po úpravě, kdy uvažujeme, že látky A a B jsou přítomny v poměru 1:1, získáme lineární závislost převrácené hodnoty okamžité koncentrace na čase:

$$\frac{1}{c_a} = \frac{1}{c_{a,0}} + kt \quad (12)$$

Vynesením tohoto vztahu vznikne přímka, jejíž směrnice odpovídá rychlostní konstantě.

Poločas reakce druhého řádu je nepřímo úměrný počáteční koncentraci výchozí látky a v průběhu reakce se jeho hodnota zvětšuje.

$$\tau_{1/2} = \frac{1}{kc_{a,0}} \quad (13)$$

3.4. Substituce nukleofilní

Kyselina BPAA obsahuje vazbu uhlík-halogen, která je polarizována. V důsledku toho bude mít sklon reagovat s nukleofilními činidly. Při reakci dojde k nahrazení halogenu nukleofilem, jedná se tedy o nukleofilní substituci [21].

Nukleofilní činidlo mající negativní náboj, funkční skupinu obsahující elektronový pár, nebo negativně polarizovanou funkční skupinu, reaguje s halogenovými sloučeninami za vzniku neutrální molekuly a odstupujícího halogenidového aniontu [22].

K náhradě odstupující skupiny dochází dvěma způsoby. Jedním z nich je substituce nukleofilní monomolekulární (SN₁), kdy je rozštěpena vazba C-X a vytvořen karbocation, který je následně napaden nukleofilem. Při druhé variantě vznik nové vazby mezi nukleofilem a reaktantem a zánik staré vazby mezi odstupující skupinou a zbytkem molekuly reaktantu probíhá současně. V tomto případě se jedná o substituci nukleofilní bimolekulární (SN₂) [22].

3.4.1. Substituce nukleofilní monomolekulární

SN₁ probíhá ve dvou krocích. Disociace odstupující skupiny je rychlost určující krok, který nastává před přiblížením nukleofilu. Jako meziproduct vzniká kladně nabitý karbocation. Čím je karbocation vznikající v první fázi reakce stabilnější, tím proběhne reakce rychleji.

Karbokation reaguje s nukleofilem v dalším rychlém reakčním kroku za vytvoření nové vazby [23].

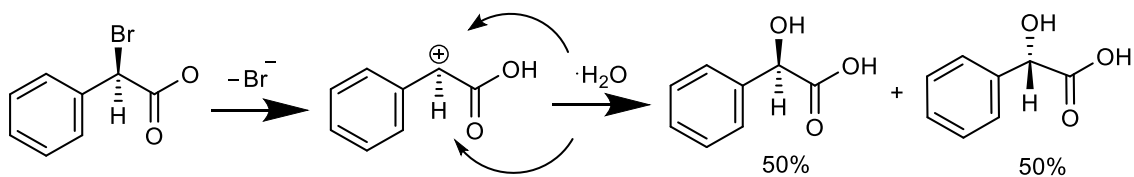
Kinetika monomolekulární substituční reakce odpovídá reakci prvního řádu. Reakční rychlost nezávisí na koncentraci nukleofilu, ale pouze na počáteční koncentraci reaktantu [23].

$$v = k \cdot [RX] \quad (14)$$

$[RX]$ – koncentrace reaktantu.

SN_1 probíhá mnohem rychleji v polárních rozpouštědlech, karbokation vznikající při tomto mechanismu je lépe solvatován polárním rozpouštědlem a aktivační energie je tak snížena [23].

Přeměna konfigurace enantiomeru R na S a opačně u SN_1 reakcí nenastává, karbokation je achirální, v sp^2 hybridizaci. Tento karbokation může být napaden nukleofilem z obou stran, vzniká proto směs enantiomerů v teoretickém poměru 50:50 [22] (Obrázek 5).

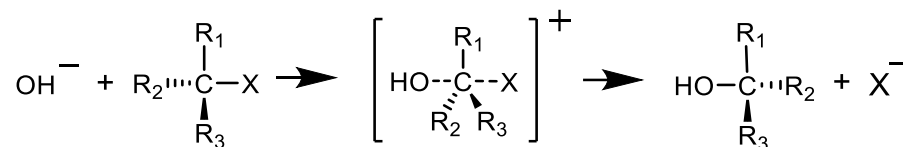


Obrázek 5 Průběh SN_1 reakce ukázán na příkladu reakce BPAA při reakci s nukleofilem H_2O , produkt MA je racemizován

3.4.2. Substituce nukleofilní bimolekulární

SN_2 probíhá v jediném kroku při kterém se netvoří meziproduct. Nukleofil atakuje substrát z protilehlého směru odstupující skupiny. Tím dochází ke změně konfigurace. Nukleofil využívá elektrony volných elektronových párů k ataku atomu uhlíku nesoucího halogen. Vznikne přechodový stav s částečně vytvořenou vazbou C-OH a částečně zaniklou C-X.

K inverzi dojde po úplném vytvoření vazby C-OH. Z enantiomeru R vznikne isomer v S konfiguraci a naopak [22] (Obrázek 6).



Obrázek 6 Inverze konfigurace při $\text{S}_{\text{N}}2$ reakci, převzato a upraveno z [22]

Rychlost reakce se u nukleofilní substituce zdvojnásobí, zdvojnásobíme-li koncentraci reaktantu či nukleofilu. Rychlost je závislá na koncentraci obou reagujících složek a odpovídá kinetické rovnici druhého řádu. Matematické vyjádření její rychlostní rovnice je následující [23]:

$$v = k [\text{RX}][\text{Nu}^-] \quad (15)$$

$[\text{Nu}^-]$ – koncentrace nukleofilu

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. *Použité přístroje a pomůcky*

- Elektroforetický analyzátor CE 7100, Agilent Technologies, Waldbronn, Německo
- Hmotnostní spektrometr trojitý kvadrupól Agilent 6495 s Agilent Jet Stream ESI zdrojem, Agilent Technologies, Waldbronn, Německo
- MicroSolv Window Maker, MicroSolv Technology Corporation, USA
- Kapilára pokrytá polyvinylalkoholem, průměr 50 μm , celková délka 33 cm, efektivní délka 24,5 cm, Agilent Technologies, Waldbronn, Německo
- Křemenná kapilára, průměr 50 μm , celková délka 48,5 cm, efektivní délka 40 cm, Agilent Technologies, Waldbronn, Německo
- pH metr Sentron SI 400, pH elektroda Sentron SI (rozsah 0-14); Sentron SI, Holandsko
- Stříkačkové nylonové filtry Captiva Econofilter, 0,45 μm , Agilent Technologies, Waldbronn, Německo

4.2. *Použité chemikálie*

4.2.1. **Chemikálie na přípravu základních elektrolytů**

- Kyselina mravenčí, $\geq 98\%$, Sigma-Aldrich, USA
- Kyselina mravenčí pro LC-MS, $\geq 99\%$, VWR Chemicals, USA
- Dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát, $\geq 99,0\%$, Sigma-Aldrich, USA
- Amoniak vodný roztok, 25-29% p.a., Penta, ČR
- Amoniak vodný roztok 25% pro LC-MS, Merck, Německo
- Hydroxid sodný, Merck, Německo
- Kyselina fosforečná, 85%, Merck, Německo
- Kyselina octová, $\geq 99,7\%$; Sigma-Aldrich, USA
- Kyselina octová pro LC-MS, $\geq 99\%$; VWR Chemicals, USA
- Methanol, Chromasolv (pro HPLC), $\geq 99,9\%$, Sigma-Aldrich, USA
- Ultračistá voda, produkována systémem Milli-Q, Milipore, USA

4.2.2. Standardy

- α -bromfenyloctová kyselina, 98%, Sigma Aldrich, #STBF9755V
- Mandlová kyselina, $\geq 99,0\%$, Sigma Aldrich, #BCBF9033V
- α -methoxyfenyloctová kyselina, 99%, Sigma Aldrich, #BCBT8707
- Bromid draselný, $\geq 99,0\%$, Sigma Aldrich, #MKBX2670V
- Acesulfam K, $\geq 99\%$, Fluka, #1207707
- Salicylová kyselina, 99%, Sigma Aldrich, #10630EA

4.3. Příprava roztoků a podmínky CZE-UV analýzy v PVA kapiláře

4.3.1. Příprava roztoků základních elektrolytů

Všechny roztoky elektrolytů použitých v této práci byly před použitím přefiltrovány do vialek pomocí nylonového filtru s velikostí pórů $0,45 \mu\text{m}$ a poté 5 minut odplyněny na ultrazvukové lázni.

4.3.1.1. Příprava 60 mM mravenčanového pufru o pH 3,0

Do kádinky s přibližně 30 ml vody bylo napipetováno 231 μl 98% kyseliny mravenčí. Následně bylo pH upraveno pomocí 1M NaOH na hodnotu 3,0. Obsah kádinky byl kvantitativně převeden do 100 ml odměrné baňky a doplněn vodou po rysku.

4.3.1.2. Příprava 60 mM mravenčanového pufru o pH 3,0 s přidavkem 5% methanolu

Pufř byl pro některé analýzy upraven přidavkem 5% methanolu (v/v). Postup přípravy byl stejný jako v předchozím bodě 4.3.1.1. Po úpravě hodnoty pH a převedení obsahu do 100 ml odměrné baňky bylo přidáno 5,00 ml methanolu, následně byl objem doplněn vodou po rysku.

4.3.2. Příprava zásobních roztoků standardů

Zásobní roztoky α -methoxyfenyloctové kyseliny a mandlové kyseliny byly připraveny rozpuštěním přibližně 25 mg v 25 ml odměrné baňce a doplněním po rysku. Pro zásobní roztok bromidu bylo naváženo přibližně 37,4 mg KBr. K rozpuštění byl dle potřeby použit buď 50% (v/v) roztok methanolu ve vodě (dále jen 50% MeOH), nebo 100% (v/v) methanol (dále jen 100% MeOH). Výsledná koncentrace činila přibližně 1 mg/ml.

Zásobní roztok α -bromfenyloctové kyseliny (1 mg/ml) byl připravován stejným způsobem vždy těsně před analýzou.

Všechny roztoky byly uchovávány v lednici při teplotě 5-8°C.

4.3.3. Příprava zásobních roztoků vnitřních standardů

Jako vnitřní standardy byly vybrány acesulfam K (IS1) a salicylová kyselina (IS2). Potřebné množství bylo naváženo a rozpuštěno v odměrné baňce v 50% či 100% methanolu tak, aby vznikly zásobní roztoky o koncentraci 1 mg/ml. Koncentrace IS1 a IS2 v pracovních roztocích byla 100 a 10 μ g/ml.

4.3.4. Příprava pracovních roztoků pro ověření linearity

Ze zásobních roztoků byly dle Tabulky 1 pipetovány příslušné objemy standardů a vnitřních standardů do mikrozku mávek Eppendorf, doplněny 50% či 100% methanolem do výsledného objemu 1,00 ml.

Tabulka 1 Příprava pracovních roztoků pro ověření linearity

Koncentrace analytu [μ g/ml]	5	10	15	20	40	60	80	100
Br ⁻ [μ l]	5	10	15	20	40	60	80	100
MA [μ l]	5	10	15	20	40	60	80	100
MPAA [μ l]	5	10	15	20	40	60	80	100
100% / 50% MeOH [μ l]	875	860	845	830	770	710	650	590
IS1 [μ l]	100							
IS2 [μ l]	10							

4.3.5. Podmínky pro kvantifikaci rozkladných produktů a určení linearitu

Následující podmínky separace byly převzaty z diplomové práce Gabriely Kováčové [2].

Separace pro ověření lineární závislosti a kvantifikaci rozkladných produktů byla provedena v PVA kapiláře s vnitřním průměrem 50 μm , celkové délce 33 cm a efektivní délce 24,5 cm.

Před první analýzou byla kapilára kondicionována 10 minut 10 mM kyselinou fosforečnou, 10 minut vodou a 10 minut příslušným elektrolytem.

Kapilára byla denně před prvním měřením promyta 10 minut vodou a 10 minut příslušným elektrolytem, po posledním měření 10 minut 10 mM kyselinou fosforečnou a 10 minut vodou.

Před jednotlivými analýzami byla kapilára promyta 3 minuty vodou a 3 minuty příslušným elektrolytem.

Veškeré promývání bylo provedeno při tlaku 1000 mbar. Vzorek byl dávkován hydrodynamicky po dobu 5 sekund tlakem 50 mbar. Napětí na kapiláře bylo -30 kV a UV detekce probíhala při vlnové délce 200 nm na anodickém konci. Kapilára byla temperována na 25°C.

4.3.6. Kvantifikace rozkladných produktů, určení linearitu a kinetiky reakce

Kalibrační závislost byla ověřena celkem čtyřikrát v průběhu různých dnů pro roztoky analytů rozpuštěných jak v 50% methanolu, tak i ve 100% methanolu. Pro jednotlivé standardy bylo připraveno osm koncentračních hladin v rozsahu 5 $\mu\text{g/ml}$ až 100 $\mu\text{g/ml}$ (Tabulka 1). Každý kalibrační roztok byl analyzován třikrát. Pro analýzy byly použity kapiláry dvou různých šarží v 50% i 100% methanolu.

Plochy píků byly korigovány svými migračními časy. Výsledný poměr korigovaných ploch byl vypočítán jako poměr korigované plochy analytu a korigované plochy příslušného vnitřního standardu:

$$A = \frac{\frac{A_{ST}}{t_{ST}}}{\frac{A_{IS}}{t_{IS}}} \quad (16)$$

A – poměr korigovaných ploch; A_{ST} , A_{IS} - plochy standardu a vnitřního standardu; t_{ST} , t_{IS} – migrační časy standardu a vnitřního standardu.

Vyhodnocení lineární závislosti poměrů korigovaných ploch vypočítaných dle Rovnice 16 na koncentraci analytu bylo provedeno metodou lineární regrese, podle Rovnice 17.

$$y = kx + q \quad (17)$$

k - směrnice přímky; q – absolutní člen.

Kvantifikace rozkladných produktů byla provedena analogickým způsobem, plochy rozkladných produktů byly korigovány svými migračními časy a plochou vnitřního standardu (Rovnice 16). Výsledné poměry korigovaných ploch byly dosazeny za hodnotu y příslušné rovnice kalibrační přímky. Hodnota x odpovídala koncentraci produktu v $\mu\text{g/ml}$ (Rovnice 18). Pro potřeby určení kinetiky reakce byla koncentrace převedena na mol/l .

$$x = \frac{y - q}{k} \quad (18)$$

Určení řádu a konstanty reakce bylo provedeno graficky pro rozklad v 50% methanolu, a to za pomoci lineární a nelineární regrese. Linearizace závislostí $\ln c$ BPAA na čase pro jednotlivé analýzy rozkladu a nelineární regrese byly provedeny v programu *Origin Pro* (Verze 9.0; OriginLab Corporation).

Aktuální koncentrace BPAA pro lineární regresi byla vypočtena jako rozdíl počáteční koncentrace BPAA (cca 0,470 mol/l) a sumy koncentrací vzniklých produktů MA a MPAA:

$$c_{BPAA} = c_{BPAA, t,0} - (c_{MPAA} + c_{MA}) \quad (19)$$

4.4. Příprava roztoků a podmínky pro CZE-UV analýzy v křemenné kapiláře

4.4.1. Příprava 50 mM fosfátového pufru o pH 7,5

Do kádinky bylo naváženo 780 mg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ a rozpuštěno v přibližně 30 ml vody. Následně bylo pH upraveno pomocí 1M NaOH na hodnotu 7,5. Obsah kádinky byl kvantitativně převeden do 100 ml odměrné baňky a doplněn vodou po rysku.

4.4.2. Příprava 25 mM fosfátového pufru o pH 7,5 s 30 mM SDS

Do kádinky bylo naváženo 390 mg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ a rozpuštěno v přibližně 30 ml vody. Následně bylo pH upraveno pomocí 1M NaOH na hodnotu 7,5. Obsah kádinky byl kvantitativně převeden do 100 ml odměrné baňky a doplněn vodou po rysku.

Do další kádinky bylo naváženo 0,216 g SDS a rozpuštěno v připraveném pufru. Následně byl roztok kvantitativně převeden do 25 ml odměrné baňky a doplněn pufrém po rysku.

4.4.3. Příprava pracovních roztoků

Pracovní roztoky MA, MPAA a BPAA byly připraveny ředěním zásobních roztoků (připravených podle kapitoly 4.3.2.) na požadovanou koncentraci, zpravidla v rozmezí 50–100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Potřebný objem konkrétního zásobního roztoku byl pipetován do mikrozkuřavky Eppendorf a následně bylo pipetováno zbylé množství 50% či 100% methanolu tak, aby byl výsledný objem 1,00 ml.

4.4.4. Parametry měření

Pro měření byly použity křemenné kapiláry, s vnitřním průměrem 50 μm , celkové délce 48,5 cm a efektivní délce 40 cm.

Před první analýzou byla kapilára kondicionována 10 minut 0,1 M kyselinou fosforečnou, 20 minut 1 M NaOH, 20 minut 0,1 M NaOH, 10 minut vodou a 10 minut příslušným elektrolytem.

Kapilára byla denně před prvním a po posledním měření promyta 10 minut 1 M NaOH, 10 minut 0,1 M NaOH a 10 minut vodou. V případě prvního měření následovalo navíc promytí po dobu 10 minut příslušným elektrolytem.

Mezi jednotlivými analýzami bylo nastaveno promývání 3 minuty 1 M NaOH, 3 minuty 0,1 M NaOH, 3 minuty vodou a 3 minuty elektrolytem.

Vzorek byl dávkován hydrodynamicky po dobu 5 s při tlaku 50 mbar. Na kapiláru bylo vkládáno napětí +20 kV. UV detekce probíhala při vlnové délce 200 nm. Kapilára byla temperována na 25°C.

4.5. Příprava roztoků a podmínky analýzy pro CE-MS

Při přípravě roztoků pro CE-MS analýzy byly vždy použity reagenty v odpovídající, tedy LC-MS čistotě.

4.5.1. Příprava 60 mM mravenčanového pufru o pH 3,0

Pufry byly připraveny analogickým způsobem jako v kapitole 4.3.1.1, avšak pH bylo upraveno pomocí 1M NH_3 kvůli zajištění kompatibility BGE s hmotnostně spektrometrickou detekcí.

4.5.2. Příprava 60 mM octanového pufru o pH 5,0

Do kádinky bylo napipetováno 346 μl 99% CH_3COOH a rozpuštěno v přibližně 30 ml vody. Následně bylo pH upraveno pomocí 1M NH_3 na hodnotu 5,0. Obsah kádinky byl kvantitativně převeden do 100 ml odměrné baňky a doplněn vodou po rysku.

4.5.3. Příprava pracovních roztoků

Pracovní roztoky byly připraveny ředěním zásobních roztoků (viz kapitola 4.3.2) na koncentraci 100 $\mu\text{g/ml}$ pomocí 100% či 50% methanolu.

4.5.4. Parametry měření

K měření byla použita křemenná kapilára s vnitřním průměrem 50 μm o délce 75 cm.

Kapilára byla denně před prvním a po posledním měření promyta 10 minut vodou.

Mezi jednotlivými analýzami bylo nastaveno promývání 200 sekund použitým elektrolytem.

Vzorek byl dávkován hydrodynamicky po dobu 10 s při tlaku 50 mbar. Pouze v případě analýz za použití 100% methanolu s mravenčanovým pufrům bylo nutno zkrátit dobu dávkování na 5 s z důvodu stability elektrického proudu. Na kapiláru bylo vkládáno napětí +30 kV v případě octanového pufru a -30 kV při použití mravenčanového pufru. Na kapiláru byl během separací vkládán nízký tlak 50 mbar. Kapilára byla temperována na 25°C.

Jako nejvhodnější přídavná kapalina pro CE-MS spojení byl použit roztok složený z 80% methanolu, 20% vody s přídavkem 0,5% HCOOH. Průtok byl nastaven na 1,5 ml/min, split průtoku (MS : odpad) byl 1:100.

Parametry na iontovém zdroji Agilent Jet Stream ESI byly nastaveny dle hodnot uvedených v Tabulce 2, ionizace probíhala v negativním módu.

Tabulka 2 Parametry měření v CE-MS

Parametr	Hodnota
Teplota plynu (N ₂)	290 °C
Průtok plynu	15 l/min
Tlak zmlžujícího plynu	12 psi
Teplota přídavného plynu	200 °C
Průtok přídavného plynu	8 l/min
Napětí na ESI kapiláře	-1500 V
Napětí fragmentoru	380 V
Napětí na trysce	-500 V

Analyty byly vyhodnoceny v módu monitorování vybrané reakce (single reaction monitoring SRM) a skenování více fragmentových hmot (multiple reaction monitoring MRM). Jednotlivé sledované přechody m/z a optimalizované kolizní energie jsou uvedeny v Tabulce 3.

Tabulka 3 Sledované m/z přechody

Analyt	Prekursorový ion [m/z]	Produktový ion [m/z]	Kolizní energie [eV]
BPAA	212,9	168,9	4
		78,9	16
MPAA	165,1	121,1	0
MA	150,9	107,0	8

4.6. Výpočty

4.6.1. Poměr signálu k šumu [24]

$$\frac{S}{N} = \frac{2H}{h} \quad (20)$$

H - výška píku v polovině jeho šířky, h - rozpětí šumu pozadí

4.6.2. Limit detekce (LOD) a limit kvantifikace (LOQ) [24]

$$LOD = 3 \times \frac{S}{N} \quad (21)$$

$$LOQ = 10 \times \frac{S}{N} \quad (22)$$

4.6.3. Rozlišení [24]

$$RS = \frac{1.18 \times (t_{r2} - t_{r1})}{w_{h1} + w_{h2}} \quad (23)$$

$t_{R2} > t_{R1}$, t_{R1} , t_{R2} – migrační časy [s], w_{h1} , w_{h2} – šířka píku v polovině jeho výšky

4.6.4. Opakovatelnost [24]

Aritmetický průměr:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \quad (24)$$

n - počet jednotlivých měření, x_i - hodnota jednotlivých měření

Směrodatná odchylka:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad (25)$$

Relativní směrodatná odchylka:

$$RSD = 100 \times \frac{SD}{\bar{x}} \quad (26)$$

5. VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1. CZE-UV analýza v PVA kapiláře

Metoda CZE v 60 mM mravenčanovém pufru s UV detekcí, která byla popsána v diplomové práci Gabriely Kováčové [2], byla převedena do PVA kapiláry. Tato metoda byla validována a následně byla použita ke kvantifikaci rozkladných produktů BPAA jak v 50% methanolu, tak i ve 100% methanolu.

5.1.1. Výběr vnitřního standardu

Pro výběr vnitřního standardu (IS) byla sledována tato kritéria: sloučenina musí být v daném pH použitého pufru ionizována a migrační čas IS by měl být mezi migračními časy jednotlivých analytů. Jako potenciální vnitřní standardy byly vyzkoušeny acesulfam K, kyselina salicylová a kyselina acetylsalicylová. Vzhledem k rozdílné migraci a tvaru píků Br^- a ostatních standardů, byly pro vyšší přesnost použity dva vnitřní standardy. Acesulfam K (IS1), s migračním časem mezi Br^- a BPAA, byl i díky podobnosti migračních časů obou píků zvolen jako vhodný vnitřní standard pro Br^- . Kyselina salicylová (IS2), která migrovala za BPAA, byla vybrána jako vnitřní standard pro kvantifikaci MA a MPAA.

5.1.2. Kalibrační závislost pro rozkladné produkty rozpuštěné ve 100% methanolu

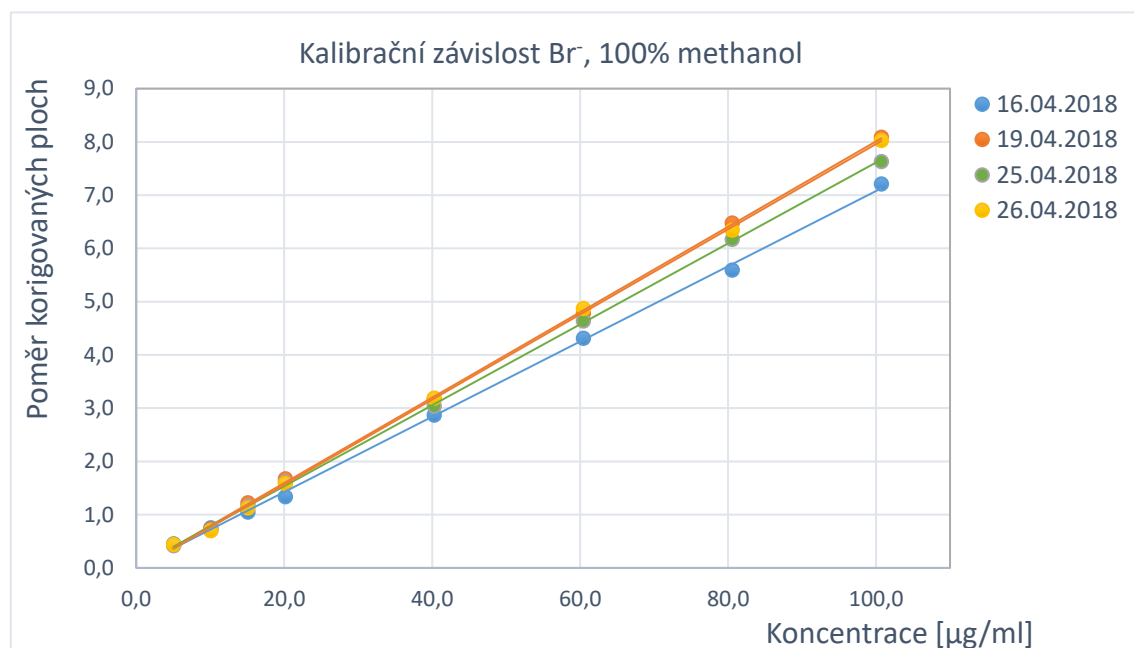
Pro analýzy ve 100% methanolu byl použit 60 mM mravenčanový pufr s přídavkem 5 % (v/v) methanolu. Zabránilo se tak nežádoucímu jevu, kdy byl vzorek rozpuštěný ve 100% methanolu dávkován do prostředí zcela vodného pufru, a pravděpodobně vznikající bublinky vzduchu měly negativní vliv na stabilitu proudu v průběhu analýz.

Vzhledem k tomu, že MA ve 100% methanolu při použití mravenčanového pufru nevzniká, nebyla vyhodnocena lineární závislost pro tento analyt.

5.1.2.1. Kalibrační závislost bromidových iontů

Linearita pro Br^- byla stanovena podle postupu v 4.3.6. Koeficient korelace byl u každé křivky větší než 0,999 (Tabulka 4). Přímkou s průměrnou hodnotou směrnice

0,077 ± 0,004 (Tabulka 5, Obrázek 7) měly podobný sklon. Tímto také byla prokázána akceptovatelná mezidenní přesnost stanovení (n=4).



Obrázek 7 Kalibrační závislost bromidových iontů ve 100% methanolu

Tabulka 4 Výsledky měření kalibrační závislosti pro bromidové ionty, 100% methanol

Kalibrační křivka	Rovnice přímky	k	q	r ²
16.4.2018	y = 0,071x + 0,012	0,071 ± 0,0009	0,012 ± 0,046	0,9991
19.4.2018	y = 0,080x - 0,011	0,080 ± 0,0006	-0,011 ± 0,030	0,9997
25.4.2018	y = 0,076x + 0,015	0,076 ± 0,0005	0,015 ± 0,029	0,9997
26.4.2018	y = 0,079x - 0,038	0,079 ± 0,0007	-0,038 ± 0,035	0,9996

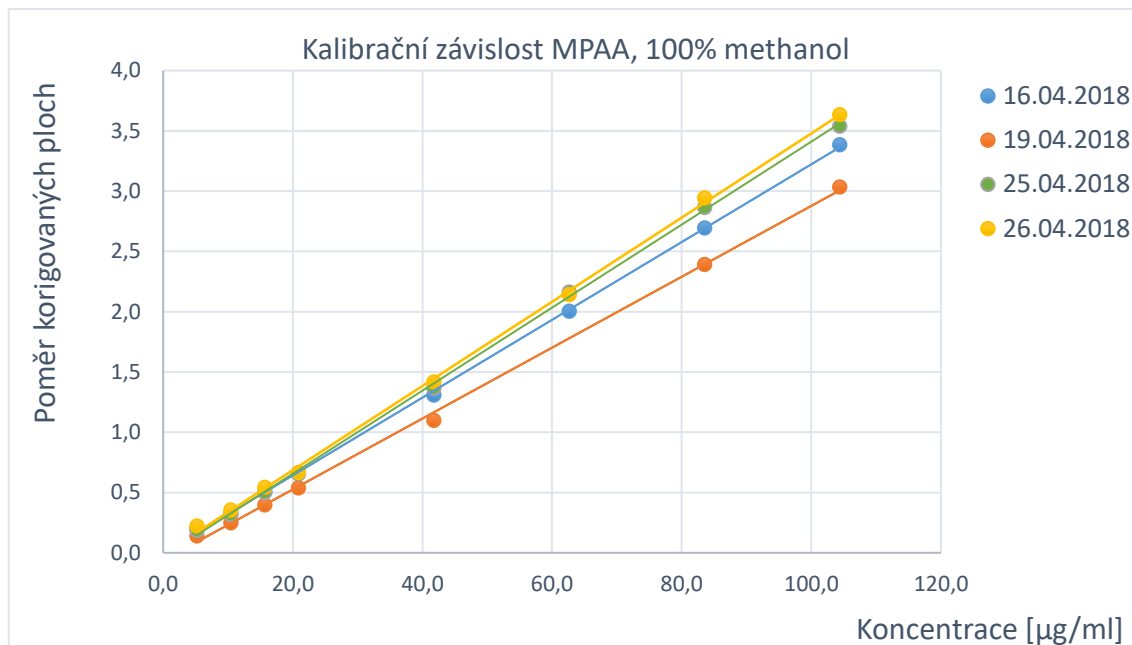
Tabulka 5 Porovnání sklonů kalibračních křivek bromidových iontů ve 100% methanolu

k (16.4.)	k (19.4.)	k (25.4.)	k (26.4.)	Průměr	SD	RSD %
0,071	0,080	0,076	0,080	0,077	0,004	5,81

5.1.2.2. Kalibrační závislost α-methoxyfenyloctové kyseliny

Linearita byla určena taktéž podle 4.3.6 s výjimkou kalibrační závislosti z dne 19.4.2018. Pro vyhodnocení z tohoto dne bylo vybráno pouze 7 bodů kalibrační řady, protože bod

na koncentrační hladině 60 µg/ml byl vyhodnocen jako odlehlá hodnota. Koeficient determinace byl u všech čtyř křivek alespoň 0,999 (Tabulka 6). Jejich sklon byl podobný ($0,032 \pm 0,002$; $n=4$) jak je patrné z údajů v Tabulce 7 a Obrázku 8.



Obrázek 8 Kalibrační závislost α -metoxyfenyloctové kyseliny ve 100% methanolu

Tabulka 6 Výsledky měření kalibrační závislosti pro α -metoxyfenyloctovou kyselinu, 100% methanol

Kalibrační křivka	Rovnice přímky	k	q	r^2
16.4.2018	$y = 0,032x - 0,003$	$0,032 \pm 0,0003$	$-0,003 \pm 0,014$	0,9996
19.4.2018	$y = 0,029x - 0,062$	$0,029 \pm 0,0003$	$-0,062 \pm 0,021$	0,9990
25.4.2018	$y = 0,034x - 0,032$	$0,034 \pm 0,0003$	$-0,032 \pm 0,018$	0,9995
26.4.2018	$y = 0,035x - 0,012$	$0,035 \pm 0,0004$	$-0,012 \pm 0,022$	0,9992

Tabulka 7 Porovnání sklonů kalibračních křivek α -metoxyfenyloctové kyseliny ve 100% methanolu

k (16.4.)	k (19.4.)	k (25.4.)	k (26.4.)	Průměr	SD	RSD %
0,032	0,029	0,034	0,035	0,032	0,002	6,97

5.1.2.3. Mezidenní přesnost migračních časů

Mezidenní přesnost migračních časů byla hodnocena na třech koncentračních hladinách (5, 40, 100 µg/ml). Každý bod byl proměřen třikrát během čtyř různých dnů. Zahrnuta je změna kapiláry stejného typu s rozdílnou šarží, kdy na každé z nich byla měřena právě polovina hodnot. Průměr migračních časů byl vypočítán z 12 hodnot.

Na první kapiláře proběhlo přibližně 450 analýz, což mělo i přes PVA pokrytí za následek změnu charakteru stěny kapiláry. Ačkoliv pořadí migrace analytů zůstávalo stejné, bylo zřejmé, že dochází k prodlužování migračních časů. Tato změna byla výrazná u kyseliny α -methoxyfenyloctové, kdy se migrační čas posunul z nejnižší hodnoty t_m 3,25 min až na maximální hodnotu 4,27 min. Naproti tomu migrační čas Br^- byl kondicí stěny kapiláry ovlivněn méně. V Tabulce 8 jsou patrné vyšší hodnoty RSD jak pro Br^- , tak zejména pro MPAA.

Tabulka 8 Mezidenní přesnost migračních časů ve 100% methanolu

Br^-	Průměr t_m [min]	SD	RSD [%]
Koncentrace 5 µg/ml	0,68	0,03	3,80
Koncentrace 40 µg/ml	0,68	0,03	5,13
Koncentrace 100 µg/ml	0,69	0,04	5,92

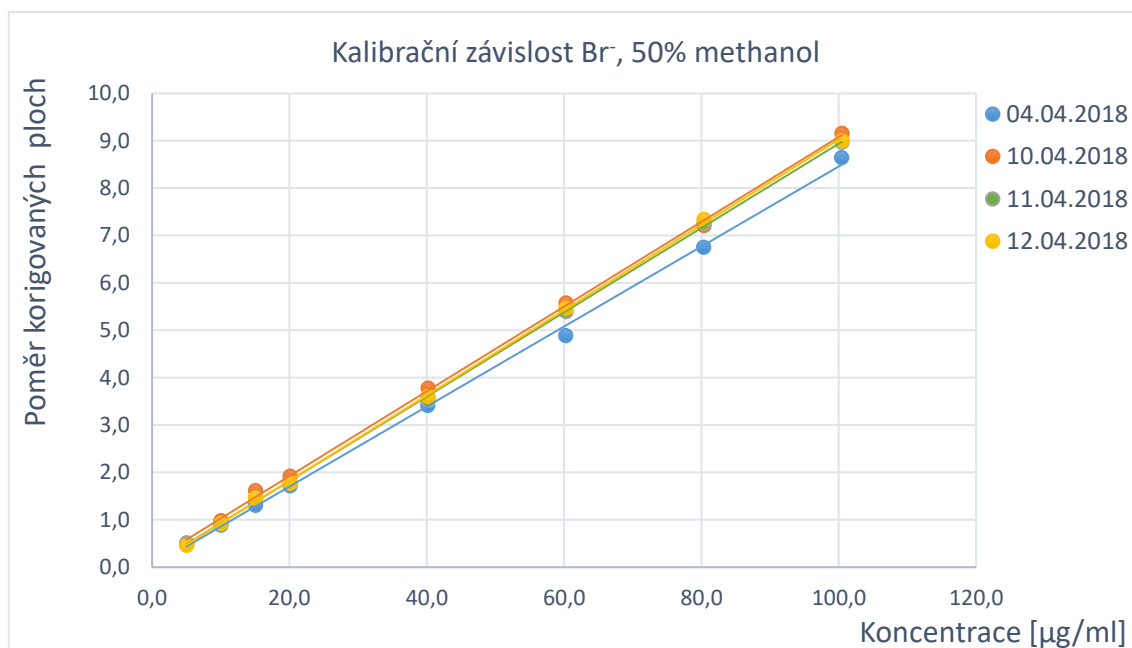
MPAA	Průměr t_m [min]	SD	RSD [%]
Koncentrace 5 µg/ml	3,65	0,36	9,96
Koncentrace 40 µg/ml	3,53	0,37	10,40
Koncentrace 100 µg/ml	3,55	0,38	10,78

5.1.3. Kalibrační závislost pro rozkladné produkty rozpuštěné v 50% methanolu

Kalibrační závislost byla určena dle 4.3.6. během čtyř různých dnů. Jako BGE byl použit 60 mM mravenčanový pufr o pH 3,0.

5.1.3.1. Kalibrační závislost bromidových iontů

Koeficient determinace u vyhodnocení lineární závislosti dosahoval hodnoty alespoň 0,9988 (Tabulka 9). Sklon přímek byl velice podobný s průměrem směrnice $k = 0,088 \pm 0,003$ (Tabulka 10 a Obrázek 9) ($n=4$).



Obrázek 9 Kalibrační závislost bromidových iontů v 50% methanolu

Tabulka 9 Výsledky měření kalibrační závislosti pro bromidové ionty v 50% methanolu

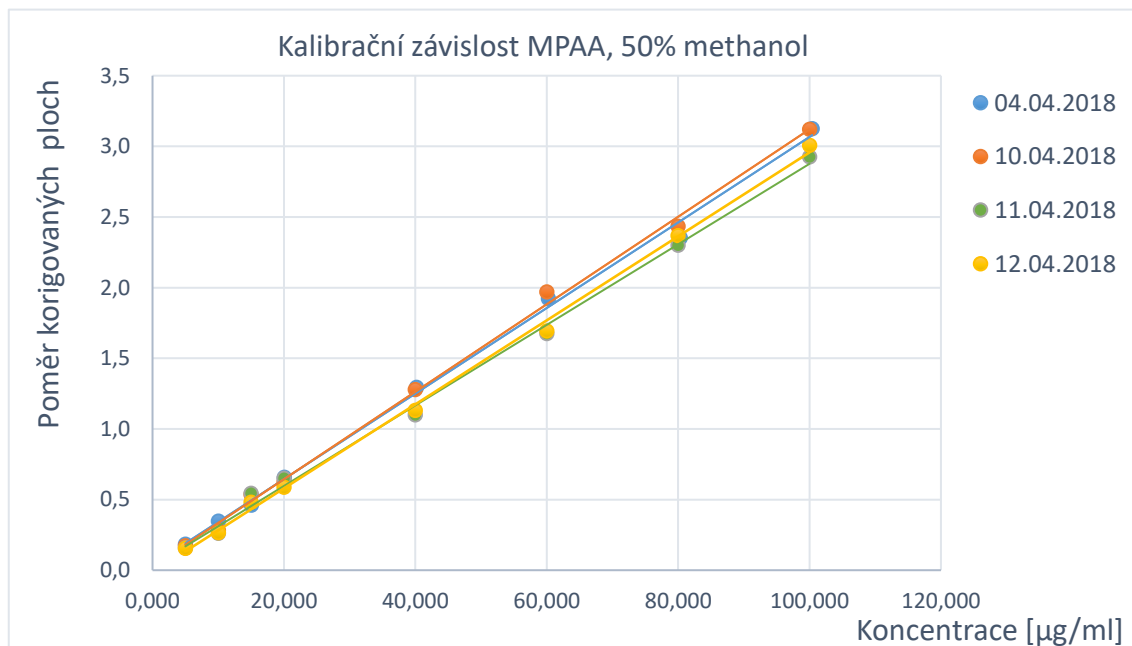
Kalibrační křivka	Rovnice přímk	k	q	r ²
04.04.2018	$y = 0,084x + 0,014$	$0,084 \pm 0,0012$	$0,014 \pm 0,063$	0,9988
10.04.2018	$y = 0,090x + 0,135$	$0,090 \pm 0,0010$	$0,135 \pm 0,052$	0,9993
11.04.2018	$y = 0,089x + 0,041$	$0,089 \pm 0,0007$	$0,041 \pm 0,036$	0,9997
12.04.2018	$y = 0,090x + 0,025$	$0,090 \pm 0,0007$	$0,025 \pm 0,035$	0,9997

Tabulka 10 Porovnání sklonů kalibračních křivek bromidových iontů v 50% methanolu

k (5.4.)	k (10.4.)	k (11.4.)	k (12.4.)	Průměr	SD	RSD %
0,084	0,090	0,089	0,090	0,088	0,003	2,93

5.1.3.2. Kalibrační závislost α -methoxyfenyloctové kyseliny

Lineární závislost byla prokázána neboť hodnoty r^2 dosahovaly alespoň 0,996 (Tabulka 11). Směrnice všech čtyř přímek byla v průměru $k = 0,030 \pm 0,001$ (Tabulka 12), jejich sklon byl tedy velice podobný (Obrázek 10), což potvrzuje dobrou mezidení přesnost stanovení s hodnotou RSD 3,90 % (n=4) (Tabulka 12).



Obrázek 10 Kalibrační závislost MPAA v 50% methanolu

Tabulka 11 Výsledky měření kalibrační závislosti pro MPAA v 50% methanolu

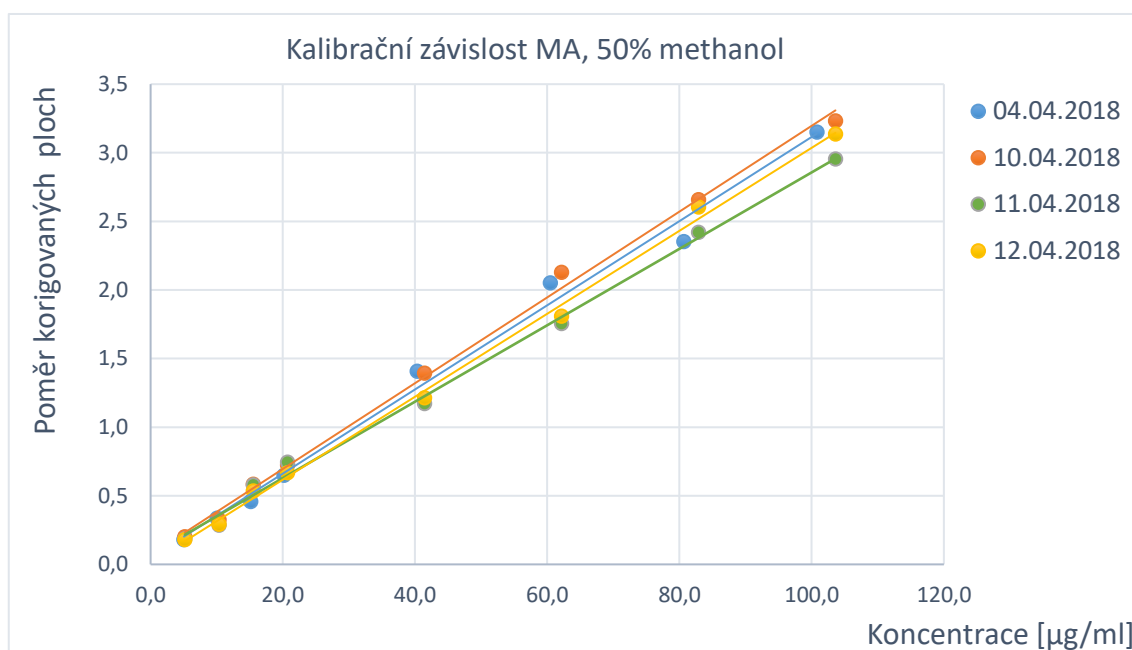
Kalibrační křivka	Rovnice přímky	k	q	r^2
04.04.2018	$y = 0,030x + 0,0391$	$0,030 \pm 0,0007$	$0,039 \pm 0,035$	0,9972
10.04.2018	$y = 0,031x + 0,0248$	$0,031 \pm 0,0006$	$0,025 \pm 0,031$	0,9979
11.04.2018	$y = 0,029x + 0,0261$	$0,029 \pm 0,0007$	$0,026 \pm 0,036$	0,9966
12.04.2018	$y = 0,030x - 0,0151$	$0,030 \pm 0,0005$	$-0,015 \pm 0,027$	0,9983

Tabulka 12 Porovnání sklonů kalibračních křivek MPAA v 50% methanolu

k (5.4.)	k (10.4.)	k (11.4.)	k (12.4.)	Průměr	SD	RSD %
0,030	0,031	0,029	0,030	0,030	0,001	3,90

5.1.3.3. Kalibrační závislost mandlové kyseliny

Hodnoty r^2 byly u kalibrační závislosti MA poněkud horší než u předchozích analytů. Nejnižší hodnota byla 0,9917 (Tabulka 13). Sklon kalibračních křivek byl však podobný s $k = 0,030 \pm 0,001$ s hodnotou RSD 4,95 % (Tabulka 14, Obrázek 11; $n=4$).



Obrázek 11 Kalibrační závislost MA v 50% methanolu

Tabulka 13 Výsledky měření kalibrační závislosti pro MA v 50% methanolu

Kalibrační křivka	Rovnice přímky	k	q	r^2
04.04.2018	$y = 0,031x + 0,048$	$0,031 \pm 0,0011$	$0,048 \pm 0,061$	0,9917
10.04.2018	$y = 0,031x + 0,070$	$0,031 \pm 0,0007$	$0,070 \pm 0,038$	0,9971
11.04.2018	$y = 0,028x + 0,072$	$0,028 \pm 0,0007$	$0,072 \pm 0,039$	0,9962
12.04.2018	$y = 0,030x + 0,012$	$0,030 \pm 0,0006$	$0,012 \pm 0,034$	0,9974

Tabulka 14 Porovnání sklonů kalibračních křivek MA v 50% methanolu

k (5.4.)	k (10.4.)	k (11.4.)	K (12.4.)	Průměr	SD	RSD %
0,031	0,031	0,028	0,030	0,030	0,001	4,95

5.1.3.4. Mezdenní přesnost migračních časů

Přesnost byla získána z analýzy na třech koncentračních hladinách (5, 40, 100 µg/ml). Každý bod byl proměřen třikrát v průběhu čtyř různých dnů, bez změny kapiláry. Průměr migračních časů byl vypočítán vždy z 12 hodnot. Z výsledků v Tabulce 15 je patrné, že migrační časy byly poměrně stabilní, přičemž nejvyšší hodnota RSD byla 3,72 %.

Tabulka 15 Mezdenní přesnost migračních časů, 50% methanol

Br⁻	Průměr t_m [min]	SD	RSD [%]
Koncentrace 5 µg/ml	0,64	0,02	3,69
Koncentrace 40 µg/ml	0,64	0,02	2,92
Koncentrace 100 µg/ml	0,65	0,01	1,03

MA	Průměr t_m [min]	SD	RSD [%]
Koncentrace 5 µg/ml	3,73	0,14	3,72
Koncentrace 40 µg/ml	3,73	0,14	3,68
Koncentrace 100 µg/ml	3,65	0,08	2,26

MPAA	Průměr t_m [min]	SD	RSD [%]
Koncentrace 5 µg/ml	3,18	0,11	3,58
Koncentrace 40 µg/ml	3,17	0,09	2,73
Koncentrace 100 µg/ml	3,12	0,06	1,93

5.2. Rozklad α -bromfenyloctové kyseliny

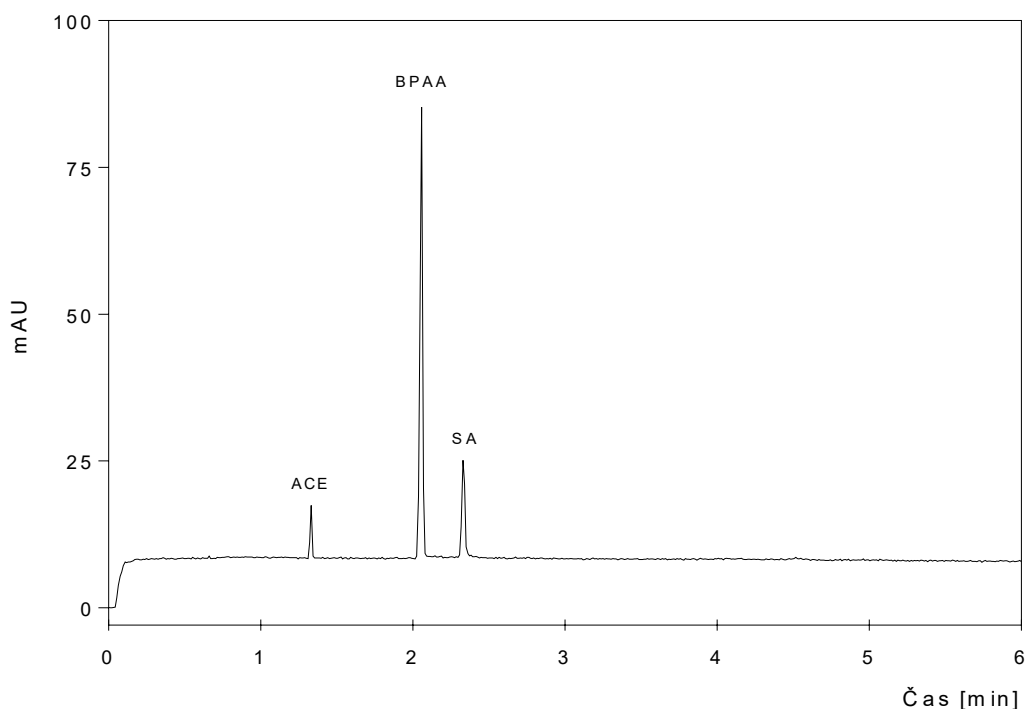
Po ověření linearity následovala vždy sekvence analýz pro kvantifikaci rozkladných produktů BPAA (podle kapitoly 4.3.6) a určení rychlostní konstanty rozkladu BPAA.

Rozklad BPAA ve 100% methanolu byl sledován po dobu 11 hodin od rozpuštění. Produkty reakce byly Br⁻ a MPAA [2]. Za uplynulý čas pozorování vzniklo v průměru 0,165 mmol/l Br⁻ a 0.160 mmol/l MPAA (n=3). Plocha píku BPAA o počáteční koncentraci 0,470 mol/l se snížila o 30 %.

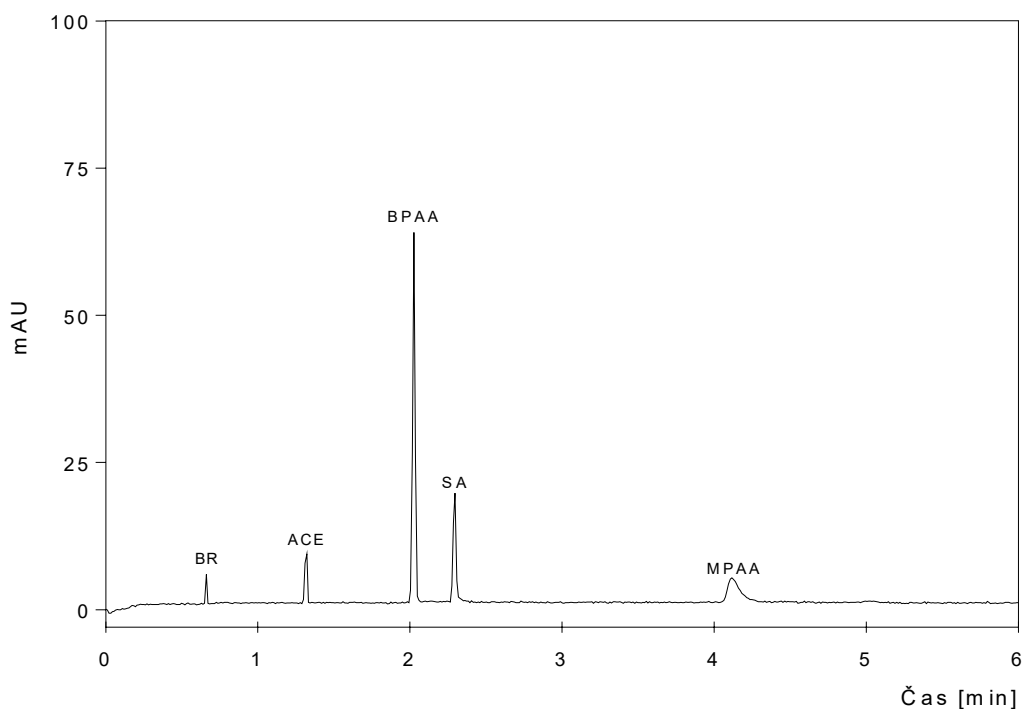
Během prvního pokusu o pozorování rozkladu BPAA ve 100% methanolu byla na elektroferogramu po 2 hodinách rozpoznána překvapivě i MA, což neodpovídalo

výsledkům z diplomové práce Gabriely Kováčové [2] ani teoretickým předpokladům [23]. Při této první analýze byl vzorek BPAA umístěn ve vialce s celkovým objemem 150 μl . V takto malém objemu vialky byl patrný vliv kontaminace vzorku vodným BGE, který v malém množství ulpěl na inletové elektrodě a tak kontaminoval čistě methanolický roztok vzorku stopami vody z BGE. Při dalších analýzách bylo pipetováno 1000 μl vzorku do vialky o objemu 2000 μl . MA během těchto analýz již nevznikala. Zkoušen byl i vliv oplachu inletové elektrody methanolem před samotným dávkováním vzorku. Tento oplach ale již neměl vliv na průběh reakce ve velkém objemu vzorku (1000 μl), a proto byly analýzy provedeny bez oplachu inletové elektrody.

V průběhu prvních analýz nebyly rozkladné produkty patrné (Obrázek 12). Přibližně po 1 hodině bylo možné produkty detekovat. Na Obrázku 13 je zřetelný vzniklý pík Br⁻ a poslední pík náležící MPAA.



Obrázek 12 Elektroferogram reakční směsi při sledování rozkladu α -bromfenyloctové kyseliny ve 100% methanolu, 23 minut od rozpuštění



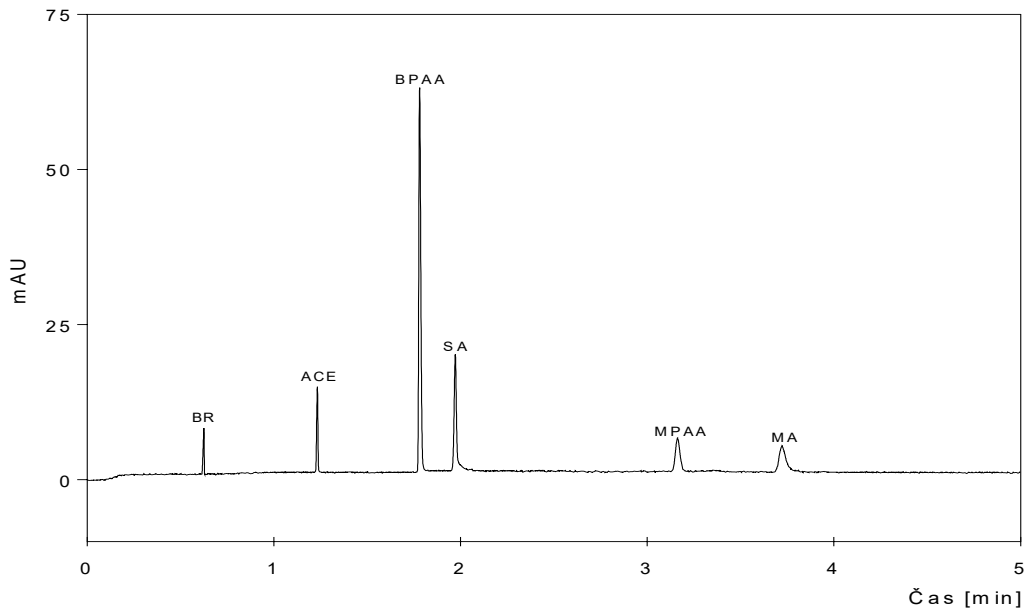
Obrázek 13 Elektroferogram reakční směsi při sledování rozkladu α -bromfenyloctové kyseliny ve 100% methanolu, 11 hodin a 20 minut od rozpuštění

V 50% methanolu byl rozklad BPAA sledován v časovém úseku přibližně 6 hodin. V 50% methanolu vznikaly jako produkty Br^- a MPAA a kvůli přítomnosti vody i MA [2]. Rozklad v 50% methanolu probíhal výrazně rychleji než v čistě methanolickeém prostředí. Již 15 minut po rozpuštění byly patrné píky všech tří produktů. Na Obrázku 14 je vyobrazen výsledek analýzy 1 hodinu a 12 minut od rozpuštění.

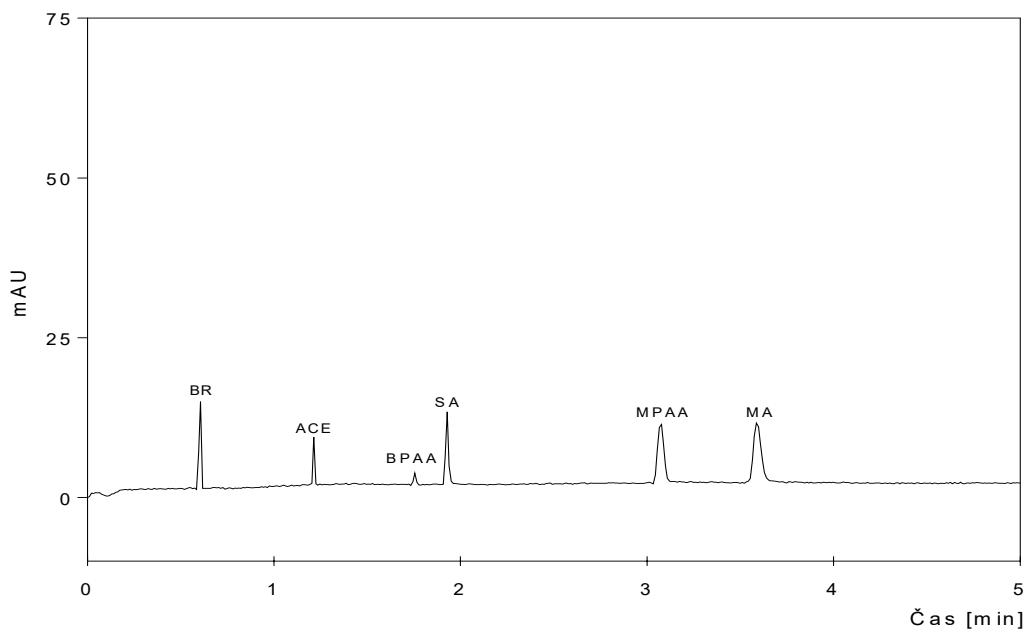
Za uplynulou dobu 6 hodin klesla plocha BPAA na pouhých 2 % své počáteční plochy, byla tedy téměř rozložena (Obrázek 15).

Množství vzniklých produktů bylo v průměru ze tří experimentů 0,515 mmol/l Br^- , 0,212 mmol/l MPAA a 0,240 mmol/l MA. Množství vzniklého Br^- je vyšší než vstupní koncentrace BPAA (0,470 mmol/l). Lze tedy konstatovat, že tato metoda neumožňuje správnou kvantifikaci Br^- iontů (bylo nalezeno cca o 9,57 % bromidových iontů více, než mělo teoreticky vzniknout). To může být způsobeno i nízkou selektivitou metody, protože chloridové či jodidové ionty vykazují v daném BGE velmi podobnou pohyblivost.

Z tohoto důvodu byla pro určení řádu reakce a výpočet rychlostní konstanty brána v úvahu jen kvantifikace MA a MPAA (viz Kapitola 5.2), jelikož součet jejich koncentrací po téměř úplném rozkladu BPAA (cca 6 hodin) odpovídal 0,452 mmol/l, což je 97,2 % výchozí koncentrace BPAA .



Obrázek 14 Elektroferogram reakční směsi při sledování rozkladu α -bromfenyloctové kyseliny v 50% methanolu, 1 hodina a 12 minut od rozpuštění

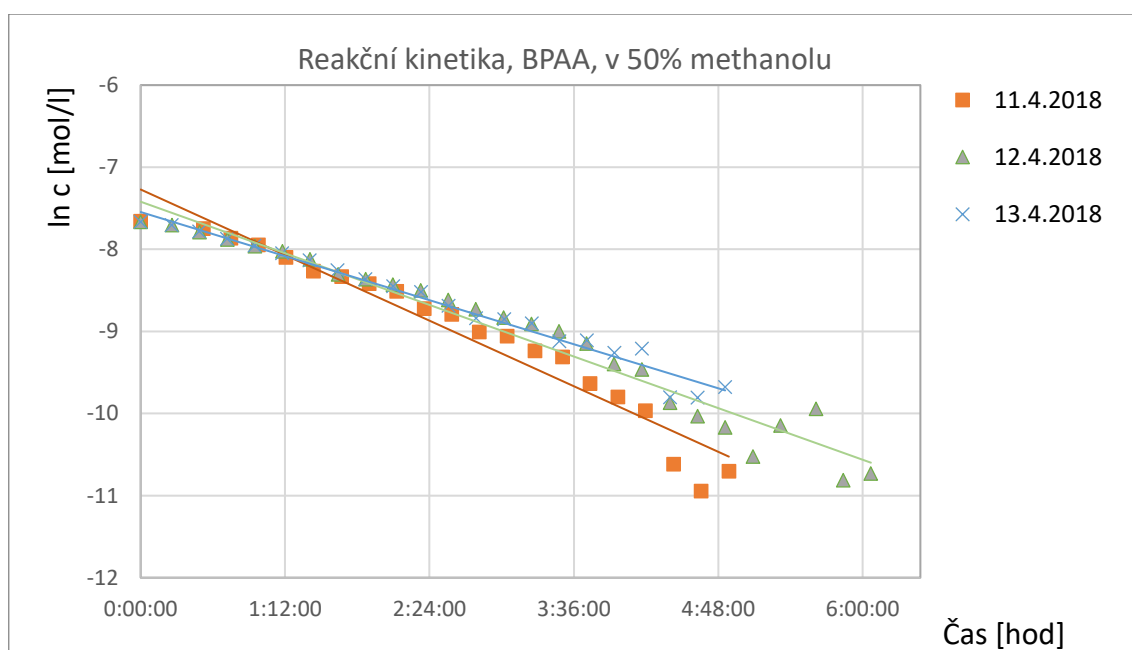


Obrázek 15 Elektroferogram reakční směsi při sledování rozkladu α -bromfenyloctové kyseliny v 50% methanolu, 6 hodin od rozpuštění

5.2.1. Určení řádu a rychlostních konstant reakcí

Pro určení řádu reakce byla hledána závislost, která je pro dané hodnoty lineární. Vynášením funkcí okamžité koncentrace BPAA (c) či převrácené hodnoty koncentrace BPAA ($1/c$) na čase nevznikla lineární závislost.

Závislost přirozeného logaritmu klesající koncentrace BPAA (vypočtena z Rovnice 19) na čase byla lineární a tím bylo prokázáno, že rozklad BPAA v 50% MeOH probíhá kinetikou 1. řádu (Rovnice 8). Ze směrnice této přímky (k) pak byla určena rychlostní konstanta (Obrázek 16) a z té byl následně vypočten poločas reakce ($\tau_{1/2}$) pomocí Rovnice 10.



Obrázek 16 Graf závislosti logaritmu koncentrace BPAA na čase. Koncentrace BPAA byla vypočtena dle rovnice 19.

Vlivem experimentální variability byly vypočtené koncentrace BPAA u křivky 11. 4. v čase přesahujícím 5 hodin záporné, a proto tyto hodnoty nebyly použity. Výsledky z 13.4. byly měřeny pouze po dobu 5 hodin.

V Tabulce 16 jsou uvedeny získané hodnoty rychlostní konstanty a poločasu reakce. Průměrná hodnota k vypočtená lineární regrese byla $1,52 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ s poločasem reakce 1 hodina a 18 minut.

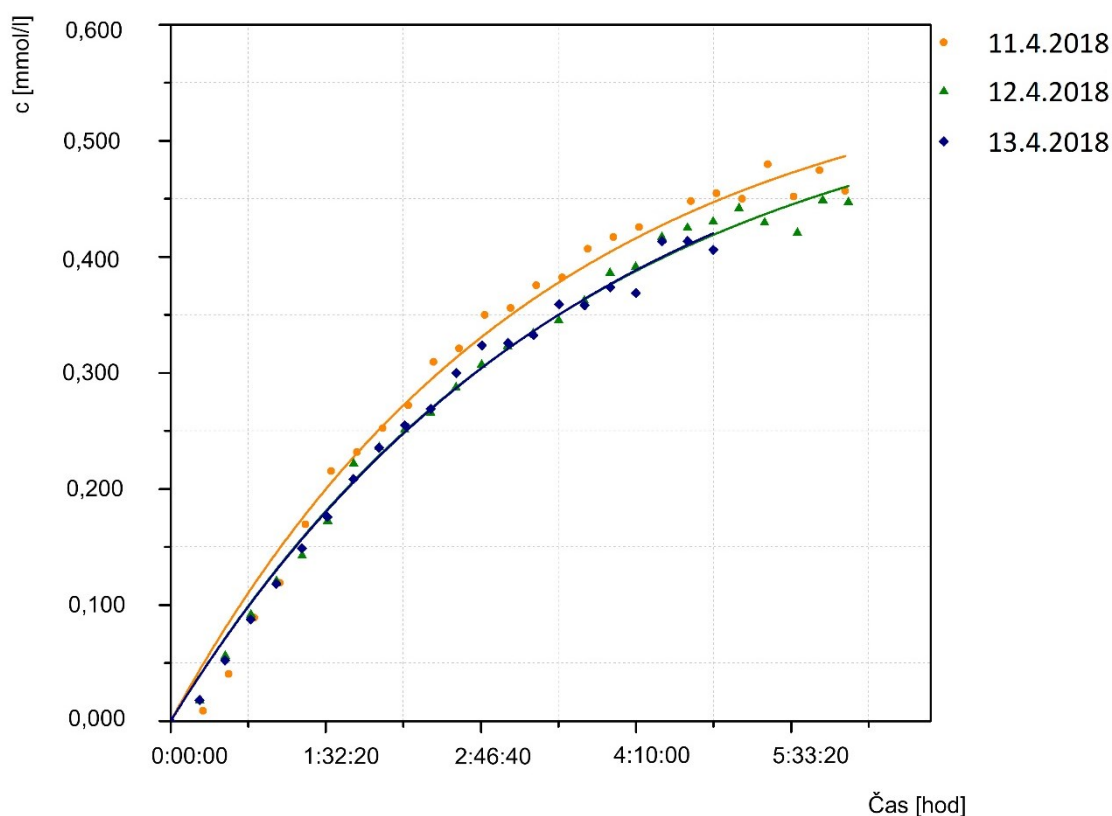
Tabulka 16 Rychlostní konstanta a poločas reakce v 50% MeOH, lineární regrese. Koncentrace BPAA byla vypočtena dle rovnice 19.

	11.4.	12.4.	13.4.	Průměr	SD	RSD %
$k [s^{-1}]$	$1,80 \times 10^{-4}$	$1,50 \times 10^{-4}$	$1,25 \times 10^{-4}$	$1,52 \times 10^{-4}$	$2,763 \times 10^{-5}$	18,22
$\tau_{1/2} [\text{hod}]$	1:04:09	1:16:58	1:32:30	1:17:52	0:14:12	18,23
r^2	0,9608	0,9644	0,9771			

Hodnoty rychlostní konstanty byly pro srovnání určeny také metodou nelineární regrese, vynesemím sumy okamžité koncentrace produktů MA+MPAA v závislosti na čase (Obrázek 17). Tato závislost byla proložena křivkou odpovídající Rovnici 27.

$$c_B = c_{a,0}(1 - e^{-kt}) \quad (27)$$

c_B -okamžitá koncentrace MA+MPAA; $c_{a,0}$ - počáteční koncentrace BPAA.



Obrázek 17 Graf závislosti koncentrace MA+MPAA na čase, nelineární regrese

Koeficienty determinace r^2 , které byly získány nelineární regresí (Tabulka 17) ukazují, že je závislost správnější než při linearizaci a proto i hodnotu k lze považovat za správnější. Zároveň i přesnost stanovení rychlostní konstanty k je u nelineární regrese znatelně lepší

(RSD = 6,37 %) než v případě použití lineární regrese (RSD = 18,22 %). Průměrná hodnota k získaná nelineární regresí byla $7,89 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ a poločas reakce činil 2 hodiny a 27 minut ($n = 3$). Data vypočtená nelineární regresí ukazují na pomalejší průběh reakce než data získaná lineární regresí. Jistý nesoulad a nepřesnost mezi daty je způsoben nejen různými numerickými metodami, ale s velkou pravděpodobností i chybějící kontrolou teploty autosampleru v průběhu experimentů (všechny analýzy probíhaly při teplotě místnosti 25°C).

Tabulka 17 Rychlostní konstanta a poločas reakce v 50% MeOH, nelineární regrese. Nárůst koncentrace MA a MPAA

	11.4.	12.4.	13.4.	Průměr	SD	RSD %
$k \text{ [s}^{-1}\text{]}$	$8,46 \times 10^{-5}$	$7,68 \times 10^{-5}$	$7,52 \times 10^{-5}$	$7,89 \times 10^{-5}$	$5,02 \times 10^{-6}$	6,37
$\tau_{1/2} \text{ [hod]}$	2:16:32	2:30:20	2:33:37	2:26:50	0:09:04	6,17
r^2	0,9853	0,9929	0,9921			

Stanovení rychlostní konstanty pro rozklad BPAA ve 100% methanolu nebylo bohužel možné grafickými metodami určit. I když byla doba, po kterou byl rozklad sledován, výrazně delší než pro reakci v 50% methanolu (11 hodin oproti 6 hodinám), nestačil tento čas ani k dosažení poločasu reakce. Pro 100% methanol by bylo nutné tento experiment koncipovat jiným způsobem, kdy by byl rozklad sledován v delších pravidelných časových intervalech (například každých 8-12 hodin) po výrazně delší dobu (například 5-7 dní).

5.3. Analýza α -bromfenyloctové kyseliny v 50 mM fosfátovém pufru

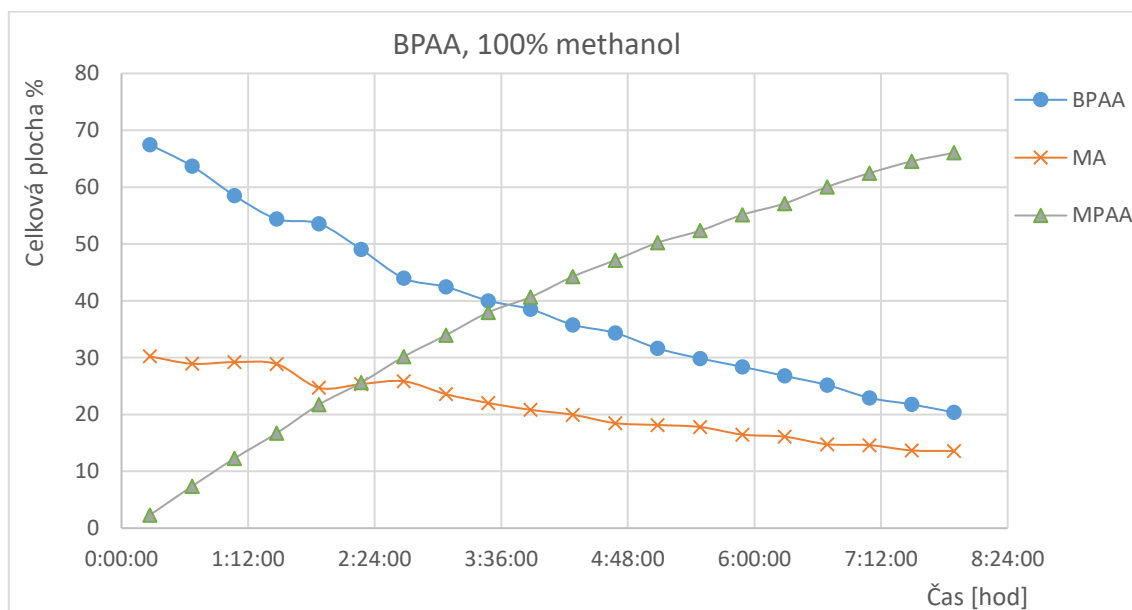
V této části práce je navázáno na diplomovou práci G. Kováčové [2], kdy byl pozorován rozklad BPAA nejen v roztoku vzorku, ale pravděpodobně i ve fosfátovém pufru v průběhu separace. Moje práce se zde soustředí na podrobnější časový popis chování BPAA.

V článku [1] byl pro analýzy použit 50 mM fosfátový pufr o pH 7,5. Stejný pufr byl použit i při následně uvedených analýzách v této práci. Ve fosfátovém pufru nebylo dosaženo dostatečného rozlišení BPAA od MA, zatímco MPAA je od píku BPAA dostatečně oddělena. Výsledný elektroferogram je zobrazen na Obrázku 19. Pořadí migrace bylo

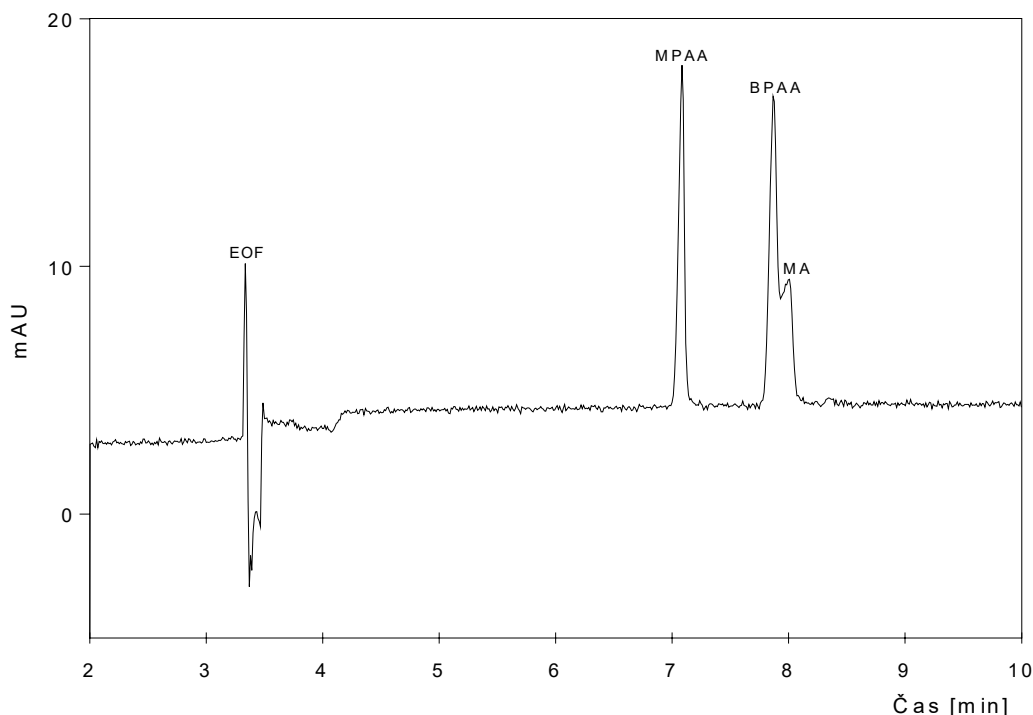
odlišné od separace v mravenčanovém pufru, jako první migrovala MPAA, po ní následoval pík BPAA s nedostatečně rozděleným píkem MA.

Při analýze BPAA v 50% methanolickeém roztoku byl pozorován podobně jako v předchozích experimentech vznik MA a MPAA. Jelikož tyto výsledky byly v souladu s předchozí diplomovou prací [2], tato práce se tímto experimentem dále nezabývá.

Oproti teoretickým předpokladům byl v průběhu analýzy BPAA rozpuštěné ve 100% methanolu pozorován vznik MA. Tento produkt vzniká s největší pravděpodobností během analýzy přímo v kapiláře. Za pozorování po dobu 8 hodin plocha MA klesla z 30,22 % celkové plochy na 13,58 % a přibližně kopírovala tvar křivky BPAA, jejíž celková plocha klesla z 67,46 % na 20,37 %. Naproti tomu plocha MPAA prudce v čase rostla z 2,32 % na 66,05 %. Tato data lze interpretovat tak, že MPAA vzniká z BPAA ve vialce, zatímco MA vzniká velmi rychlým rozkladem BPAA přímo v kapiláře v průběhu separace.



Obrázek 18 Rozklad BPAA, 100% methanol, BGE: 50 mM fosfátový pufr, pH 7,5



Obrázek 19 Elektroferogram reakční směsi při sledování rozkladu α -bromfenyloctové kyseliny ve 100% methanolu, čas od rozpuštění 3 hodiny 25 minut, BGE: 50 mM fosfátový pufr, pH 7,5

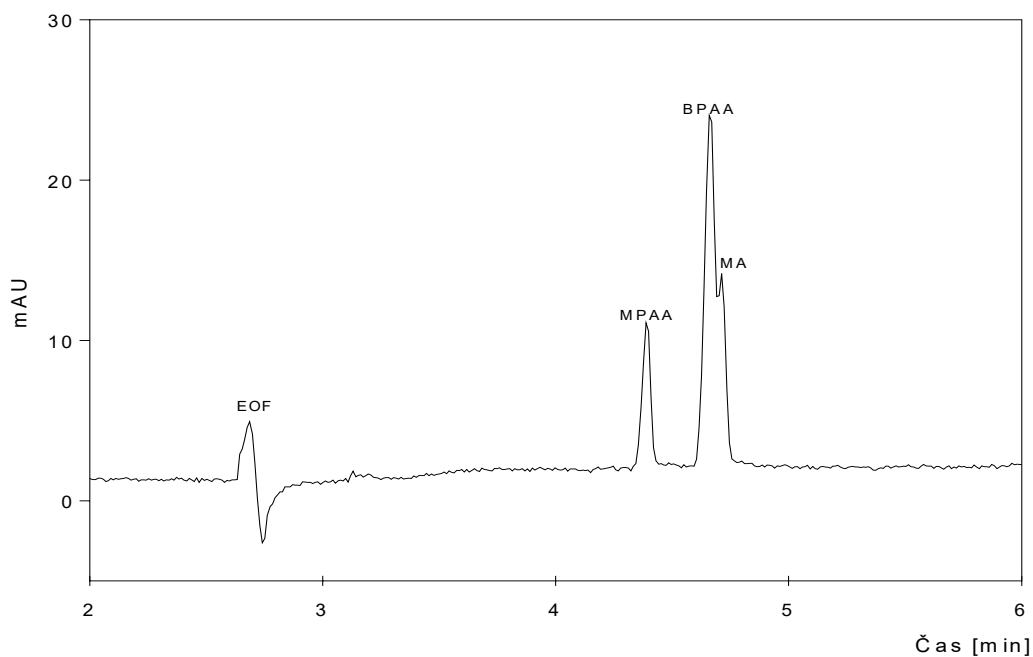
5.3.1. Analýza α -bromfenyloctové kyseliny v 25 mM fosfátovém pufru pH 7,5 s přidavkem 30 mM SDS

V samotném fosfátovém pufru od sebe nebyly píky BPAA a vznikající MA dostatečně odděleny. Jelikož neúplně oddělené píky měly odlišná UV spektra, bylo zřejmé, že se jedná o píky dvou různých sloučenin. Přidání aniontového surfaktantu SDS (dodecylsírán sodný) o koncentraci 30 mM k 25 mM fosfátovému pufru bylo snahou o zlepšení rozlišení těchto dvou píků pomocí MEKC.

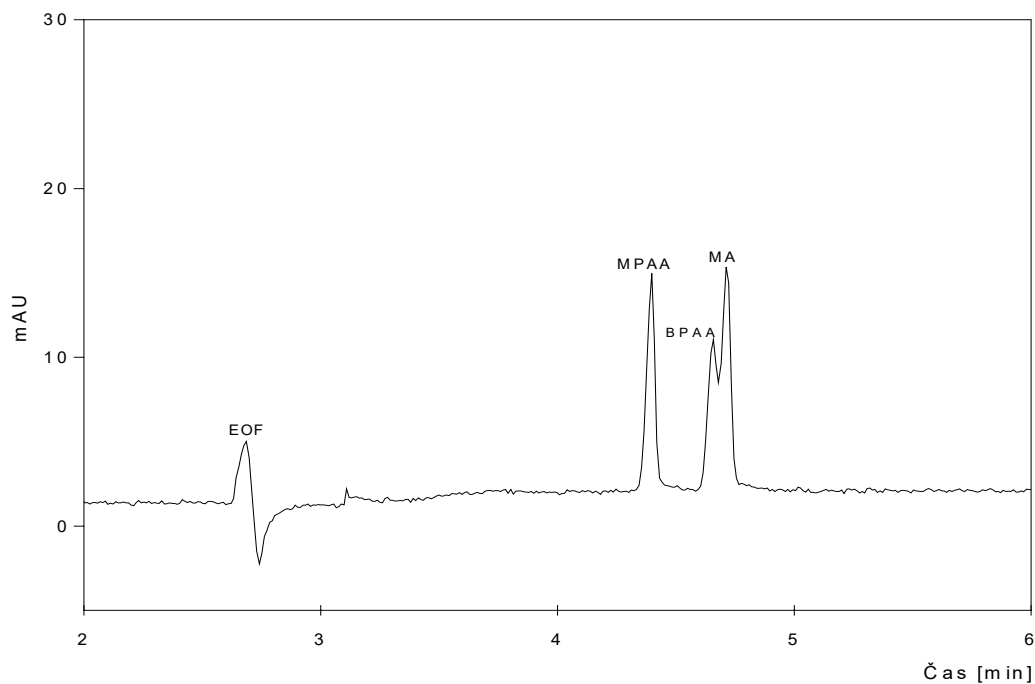
Přídavek 30 mM SDS neměl bohužel vliv na selektivitu separace, pořadí migrace analytů zůstalo prakticky nezměněno - první migrovala MPAA následována píkem, který byl tvořen BPAA a MA.

Analýza BPAA rozpuštěné v 50% methanolu probíhala po dobu 7 a půl hodin. Pro rozpouštění byl zvolen 50% methanol stejně jako v článku Rizviho a Shamsiho [1].

Po první analýze byly patrné pouze dva píky MPAA a BPAA, od třetí analýzy (tj. po 1 hodině) se z píku BPAA začal oddělovat pík MA, pouze s rozlišením 0,68 (Obrázek 20). Až do 3. hodiny bylo možno sledovat, jak se pík, který tvořila zpočátku BPAA, postupně mění na pík tvořený jen MA (Obrázek 21).



Obrázek 20 Elektroferogram reakční směsi při sledování rozkladu α -bromfenyloctové kyseliny v 50% MeOH, čas od rozpuštění 1 hodina, BGE: 25 mM fosfátový pufr, pH 7,5, 30 mM SDS

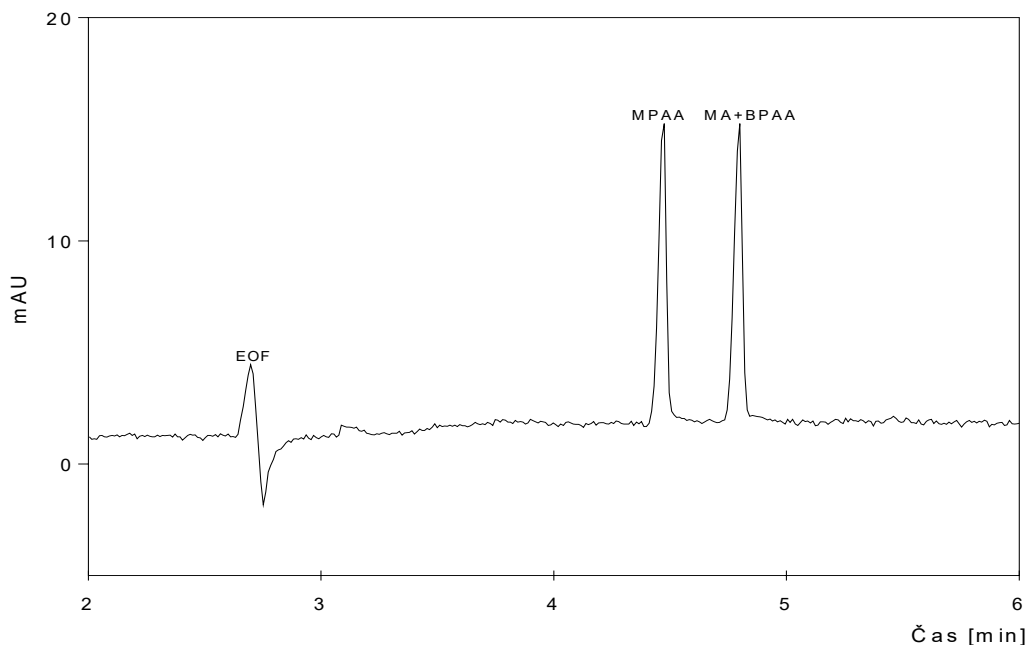


Obrázek 21 Elektroferogram reakční směsi při sledování rozkladu α -bromfenyloctové kyseliny, čas od rozpuštění 2 hodiny, BGE: 25 mM fosfátový pufr, pH 7,5 + 30 mM SDS

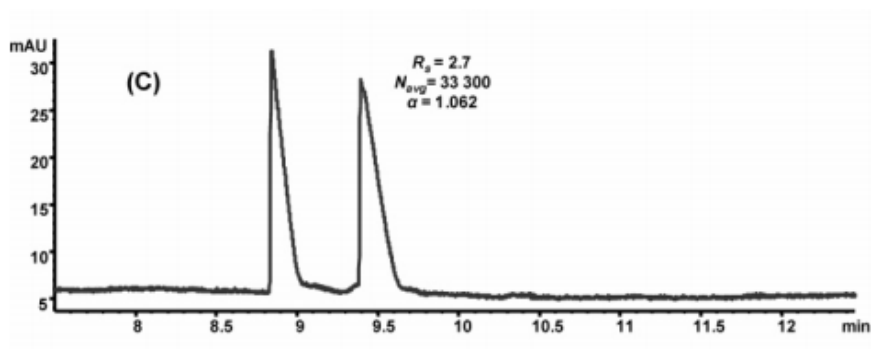
Po třetí hodině byly na elektroferogramu znatelné jen dva, svou plochou i tvarem téměř zaměnitelné, píky s rozlišením 4,9. Ty odpovídají MPAA a kyselině mandlové s minimálním množstvím BPAA (Obrázek 22). Identita MA a BPAA byla ověřena pomocí UV spekter.

Toto pozorování by mohlo vysvětlovat, proč v článku [1] při chirální separaci pomocí IL byly přítomny pouze dva píky, místo tří, které se dají za daných podmínek očekávat. Použité SDS je anionickým surfaktantem, je tedy jiného charakteru než IL (kvarterní amoniová sůl). Výsledky s použitím IL mohou být odlišné, ale nedostatečné rozdělení MA od BPAA za přítomnosti tenzidu poukazuje na možnost vzniku chybné interpretace výsledků.

Při neznalosti stability BPAA v 50% MeOH a snaze o chirální separaci enantiomerů BPAA mohou dva přítomné píky o shodné velikosti potenciálně náležet dvěma enantiomerům, jak se domnívají autoři Shamsi a Rizvi [1], viz Obrázek 23. Z důvodu nedostupnosti IL testovaných Rizvim a Shamshim lze těžko ověřit, zda dva píky na Obrázku 23 jsou opravdu enantiomery BPAA či píky rozkladných produktů MPAA a MA.



Obrázek 22 Elektroferogram reakční směsi při sledování rozkladu α -bromfenyloctové kyseliny, čas od rozpuštění 7 hodin a 30 minut, BGE: 25 mM fosfátový pufr pH 7,5, 30 mM SDS



Obrázek 23 Analýza (\pm)-BPAA rozpuštěné v 50% MeOH dle článku [1], MEKC podmínky: 50 mM fosfátový pufr, pH 7,5, 25 mM undecenoxy karbonyl-L-leucinol bromid (L-UCLB). Obrázek převzat ze zdroje [1].

5.4. Ověření totožnosti rozkladných produktů pomocí CE-MS

V předchozí diplomové práci byla totožnost produktů vznikajících rozkladem BPAA potvrzena pouze pomocí metody standardního přídávku [2]. Proto bylo potřeba identitu MA a MPAA potvrdit i pomocí CE-MS. Rozkladné produkty BPAA byly separovány v 60 mM mravenčanovém pufru o pH 3,0 a v 60 mM octanovém pufru o pH 5,0. Fosfátový pufr nebyl použit z důvodu nekompatibility s MS, poněvadž není těkavý

a snižuje ionizaci v ESI. BPAA byla rozpuštěna ve 100% či 50% methanolu, koncentrace použitých vzorků činila vždy 100 µg/ml. Ty byly následně dvacetkrát za sebou analyzovány.

Pro optimalizaci metody bylo potřeba nejprve zvolit vhodnou přídavnou kapalinu pro CE-MS spojení. První variantou byl 10 krát zředěný BGE s methanolem v poměru 1:1 (v/v), který neposkytl dostatečnou citlivost. Jako další a zároveň i konečné složení přídavné kapaliny byl použit methanol s vodou v poměru 80:20 s přídatkem 0,5% mravenčí kyseliny. Tato přídavná kapalina poskytla dostatečnou ionizaci analytů. Průtok přídavné kapaliny byl testován v rozmezí od 0,5 ml/min až po 2 ml/min. Jako nejvhodnější se jevila hodnota 1,5 ml/min se splitem průtoku 1:100 (MS : odpad).

Dále byly optimalizovány následující parametry: ESI napětí, napětí na trysce, průtok a teplota sušícího plynu, průtok a teplota přídavného plynu, tlak zmlžujícího plynu a čas prodlevy měření iontů. Optimální kolizní energie byly pro sledované analyty určeny experimentálně (Tabulka 3).

Při analýzách vzorku bylo pozorováno, že intenzita píku vznikající MPAA je nižší než MA, ačkoliv by dle předchozích experimentů s UV detekcí měly oba rozkladné produkty vznikat v poměru zhruba 1:1. Toto bylo následně ověřeno i CE-MS analýzou standardů MA a MPAA o stejné koncentraci. MPAA za optimálních CE-MS podmínek hůře ionizovala, a proto byla intenzita signálu nižší.

Pro úpravu této odchylky bylo nutné určit korekční faktor. Ten byl vypočítán ze dvou či šesti měření standardů MA a MPAA o koncentraci 100 µg/ml v octanovém i mravenčanovém pufru (Tabulka 18). Při výpočtu korekčního faktoru byly zohledněny odlišné molární koncentrace obou látek.

Faktor (F) byl vypočten jako poměr ploch korigovaných migračním časem (CA) vynásobený poměrem molárních koncentrací (Rovnice 28):

$$F = \frac{CA_{MA}}{CA_{MPAA}} \times \frac{c_{MA}}{c_{MPAA}} \quad (28)$$

$CA_{MA,MPAA}$ - plocha korigovaná migračním časem; $c_{MA,MPAA}$ - molární koncentrace

Tabulka 18 Hodnoty korekčních faktorů, FA- 60 mM mravenčanový pufr, pH 3,0, AA- 60 mM octanový pufr, pH 5,0

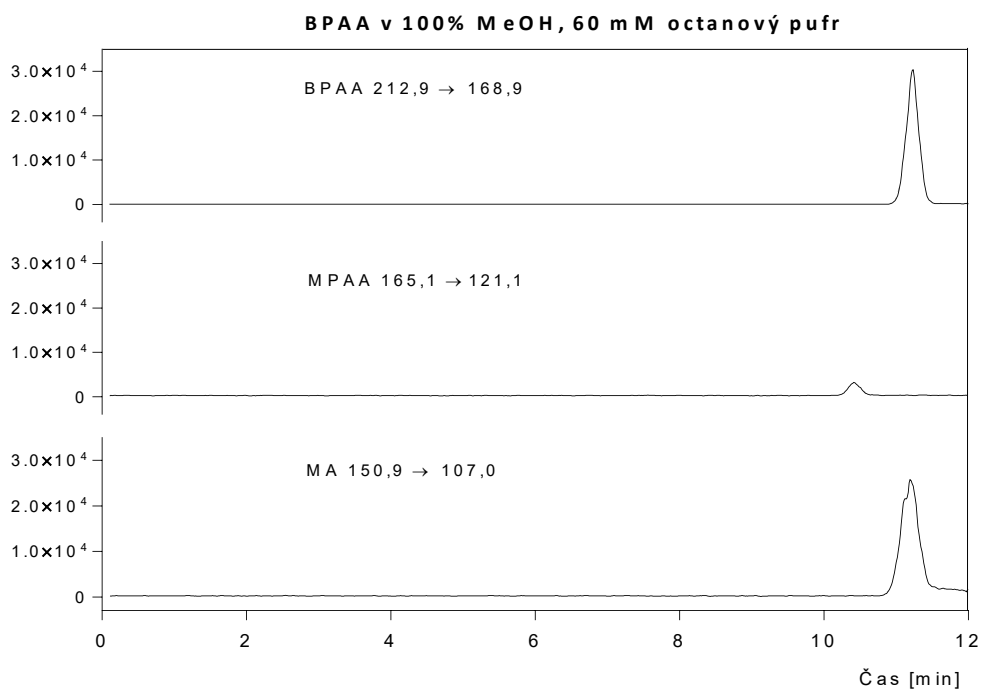
	n	Korekční faktor	SD
FA 100% MeOH	6	4,47	0,13
FA 50% MeOH	6	4,32	0,09
AA 100% MeOH	2	3,47	0,10
AA 50% MeOH	6	3,52	0,10

Výsledným průměrným faktorem byly vynásobeny plochy MPAA vzniklé ve vzorku BPAA. Korekční faktory u každého z pufrů dosahovaly podobných hodnot bez ohledu na použité rozpouštědlo. Pro konečný výpočet plochy MPAA byly použity korekční faktory určené pouze z analýz standardů rozpuštěných v 50% methanolu .

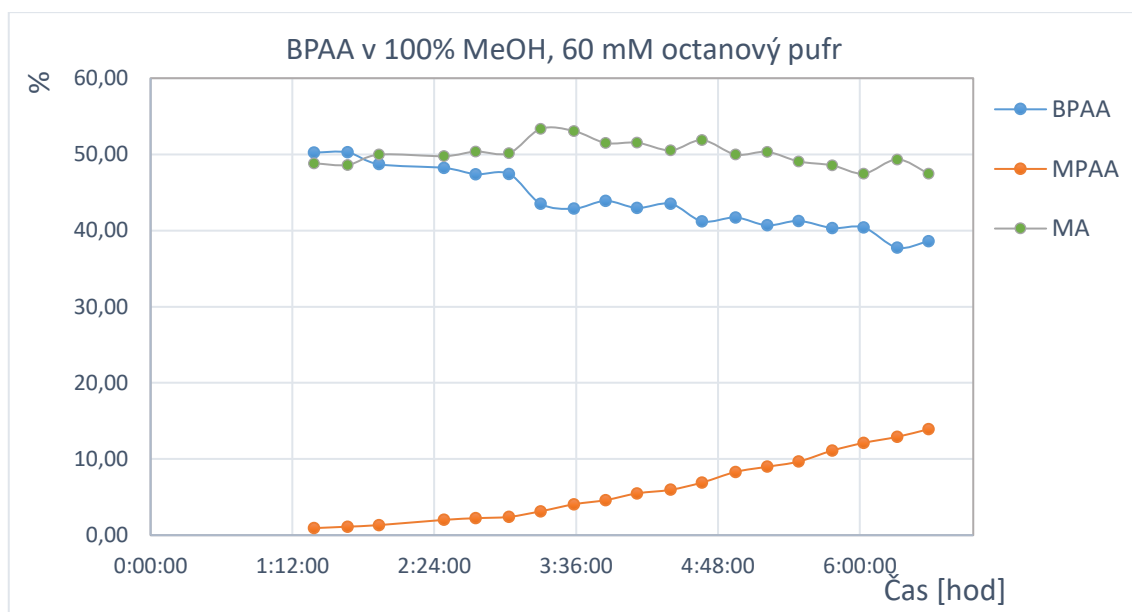
5.4.1. Analýza BPAA v 60 mM octanovém pufru, pH 5,0

Ve 100% methanolu by neměla vznikat žádná MA. Avšak při analýze tohoto roztoku BPAA v 60 mM octanovém pufru o pH 5,0 MA vzniká [2]. Protože BPAA a MA nejsou od sebe při použití octanového pufru dostatečně odděleny a jejich píky se překrývají, nebylo možné určit pomocí spektrofotometrického detektoru přesný nárůst ploch produktů. Toto chování je analogické i ve fosfátovém pufru (viz kapitola 5.3) Identita rozkladných produktů byla potvrzena i SRM přechody (Obrázek 24) kde MPAA (165,1→121,1) migruje před píkem tvořeným dvěma sloučeninami, a to BPAA (212,9→168,9) a MA (150,9→107,0).

Po vynesení závislosti změny ploch v čase (Obrázek 25) je zřejmé, že plocha MPAA pomalu narůstá z nulové hodnoty. Oproti tomu plocha MA byla od první analýzy cca 49 % celkové plochy a její změna v čase kopírovala změnu plochy BPAA. To potvrzuje předpoklad, že MA nevzniká přímo ve vialce se vzorkem, ale až při analýze BPAA v kapiláře vlivem kontaktu s vodným elektrolytem.

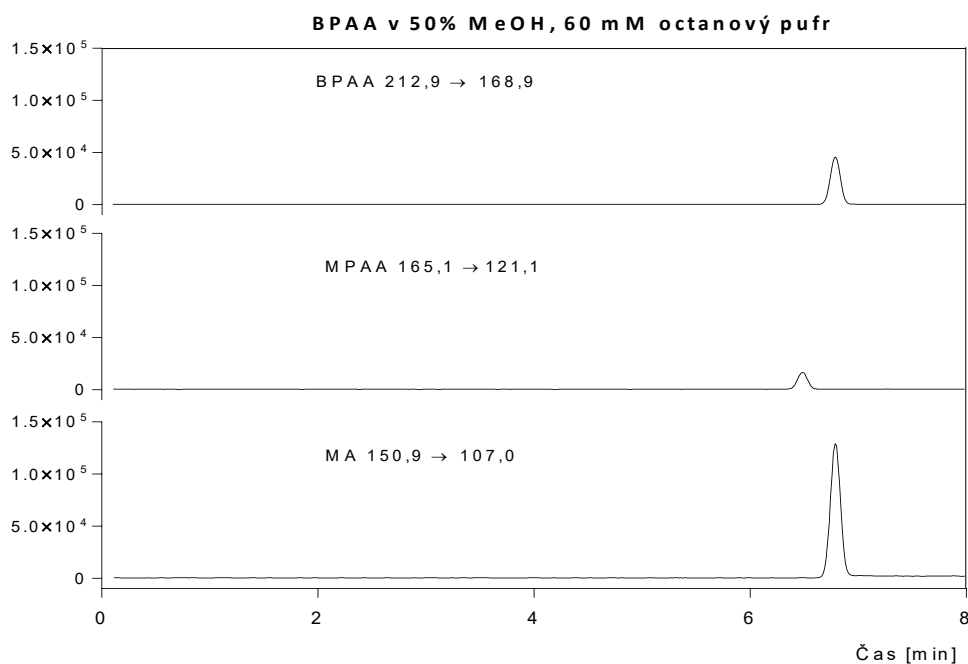


Obrázek 24 Analýza BPAA ve 100% MeOH, čas od rozpuštění 6 hodin 35 minut, BGE: 60 mM octanový pufr, pH 5,0

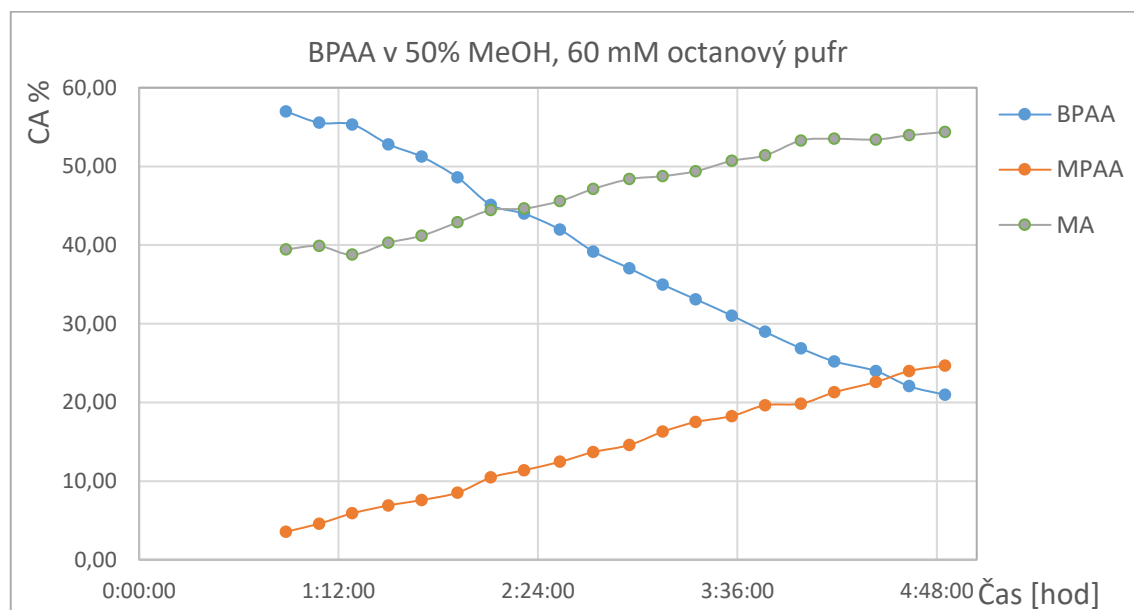


Obrázek 25 Graf rozkladu BPAA ve 100% MeOH, BGE: 60 mM octanový pufr, pH 5,0, CA % pro MPAA jsou korigovány korekčním faktorem 3,52

V 50% methanolu opět vznikají oba dva produkty. Plocha odpovídající MA je už od první analýzy výrazně vyšší než MPAA, kvůli probíhající reakci v kapiláře. Tento rozdíl odpovídá zhruba 33 procentním bodům plochy, který podobu dalších analýz výrazně neměnil. MA i MPAA vznikají ve vialce podobnou rychlostí (Obrázek 27).



Obrázek 26 Analýza BPAA v 50% MeOH, čas od rozpuštění 4 hodiny 51 minut, BGE: 60 mM octanový pufr, pH 5,0

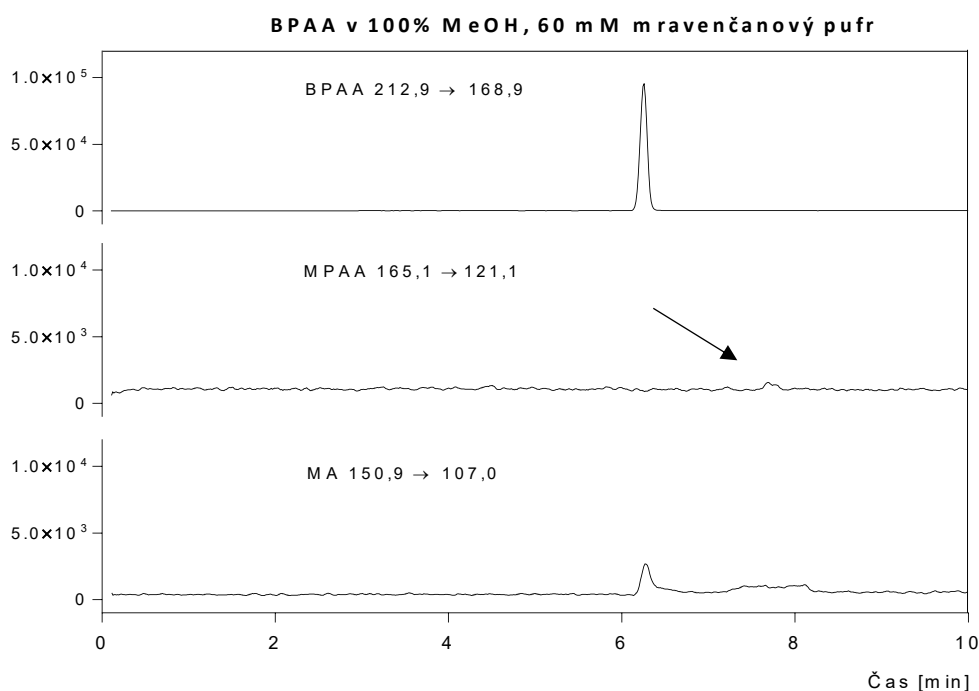


Obrázek 27 Graf rozkladu BPAA v 50% MeOH, BGE: 60 mM octanový pufr, pH 5,0, CA % pro MPAA jsou korigovány korekčním faktorem 3,52

5.4.2. Analýza BPAA v 60 mM mravenčanovém pufru, pH 3,0

V mravenčanovém pufru jsou od sebe všechny tři analyty dostatečně odděleny. Ve 100% methanolu samozřejmě žádná MA nevzniká, nepatrný pík ve stejném migračním čase jako BPAA je pouze jedna z cest fragmentace BPAA (212,9→107,0).

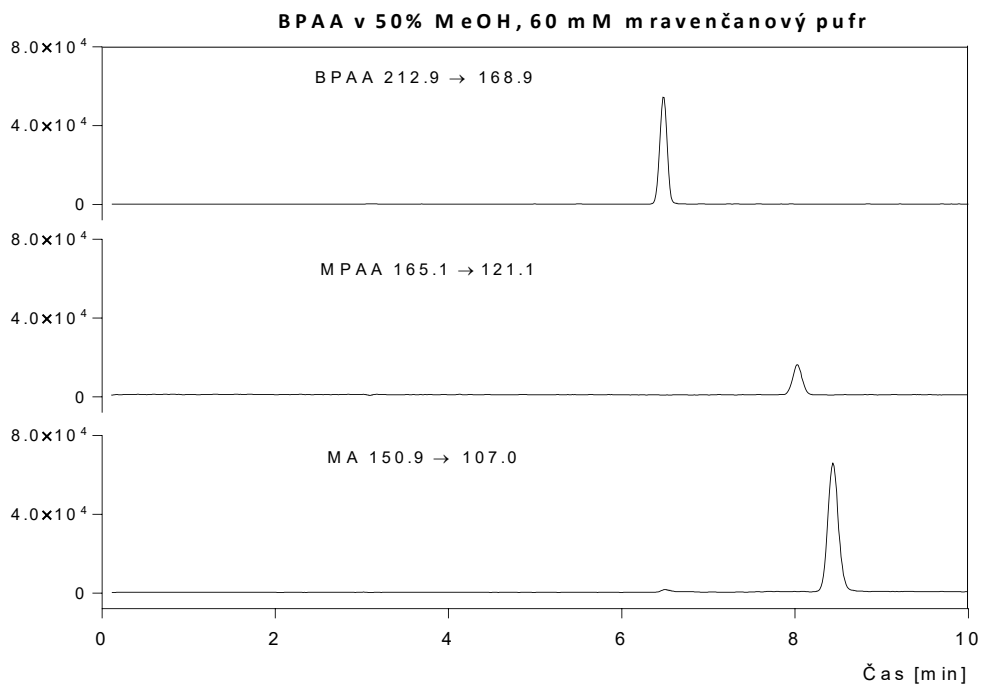
Pík MPAA nebyl detekován, i když byl průběh rozkladu sledován po dobu 6 hodin (při UV detekci byl patrný po cca 1 hodině). U píku v odpovídajícím migračním čase nešlo jednoznačně určit, zda se jedná skutečně o pík či jen o šum základní linie (vyznačený šipkou na Obrázku 28). Předpokládáme, že pík MPAA nebyl pomocí CE-MS detekován během 6 hodin rozkladu z důvodů nedostatečné ionizace MPAA v daných CE-MS podmínkách a také proto, že rozklad ve 100% methanolu probíhá výrazně pomaleji (Obrázek 28).



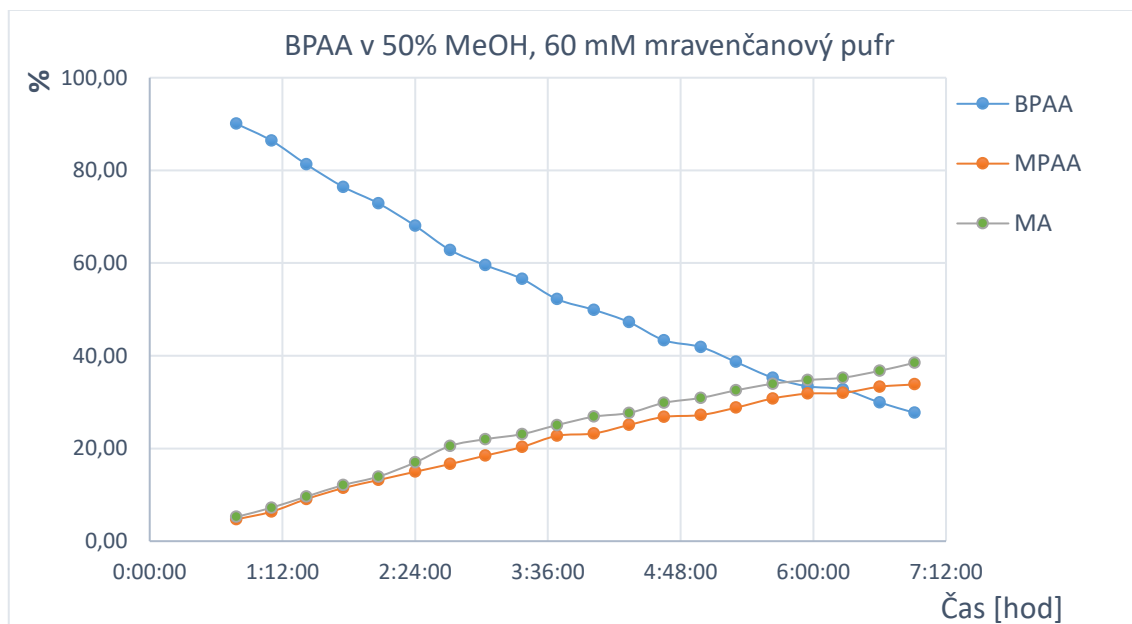
Obrázek 28 Analýza BPAA ve 100% MeOH, čas od rozpuštění 6 hodin 2 minuty, BGE: 60 mM mravenčanový pufr, pH 3,0

V 50% methanolu opět vznikají oba dva rozkladné produkty (Obrázek 29). Vznik produktů můžeme pozorovat přímo od počátku rozkladu, není zde zkreslení vlivem probíhající reakce v kapiláře jako v octanovém pufru. Oba dva produkty vznikají přibližně

stejně rychle (Obrázek 30), což odpovídá předchozímu pozorování pomocí CE s UV detekcí.



Obrázek 29 Analýza BPAA v 50% MeOH, čas od rozpuštění 6 hodin 55 minut, BGE: 60 mM mravenčanový pufr, pH 3,0



Obrázek 30 Graf rozkladu BPAA v 50% MeOH, BGE: 60 mM mravenčanový pufr, pH 3,0, CA % pro MPAA jsou korigovány korekčním faktorem 4,32

6. ZÁVĚR

V této diplomové práci bylo potvrzeno, že BPAA není vhodná jako modelový analyt pro chirální separace, jestliže je rozpuštěna v 50% či 100% methanolu. V těchto rozpouštědlech dochází k nukleofilní substituci za vzniku rozkladných produktů – MA a MPAA, jejichž identita byla potvrzena i pomocí CE-MS analýz.

Pozorován byl rozklad BPAA v 50% i 100% methanolu a množství vzniklých produktů bylo kvantifikováno pomocí CE-UV v 60 mM mravenčanovém pufru o pH 3,0. Z těchto výsledků bylo určeno, že reakce rozkladu BPAA v 50% MeOH probíhá kinetikou prvního řádu. Hodnota rychlostních konstant byla vyhodnocena pomocí lineární ($1,52 \times 10^{-4} \pm 2,76 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$) i nelineární ($7,89 \times 10^{-5} \pm 5,02 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$) regrese. Hodnotu získanou nelineární regresí lze považovat za správnější z důvodu vyšší hodnoty r (nejméně 0,9853) a nižší hodnoty RSD (6,37 %) ze tří provedených stanovení. Ve 100% methanolu je rozklad BPAA výrazně pomalejší a proto nebyl řád reakce pro tuto reakci stanoven.

Při analýze ve fosfátovém pufru (použit jako složka BGE v článku od Rizviiho a Shamsiho [1]) nebylo dosaženo dostatečného rozdělení vznikajících produktů. Snahou o dosažení vyššího rozlišení bylo přidání SDS do BGE a provedení separace pomocí MEKC. Rozdělení nebylo i tak dostatečné, nastínilo ale možnost, jakým způsobem by mohlo dojít k přehlednutí rozkladu BPAA při snaze o chirální separaci v prostředí chirálních iontových kapalin.

Pomocí CE-UV ve fosfátovém pufru byla sledována stabilita BPAA ve 100% methanolu. Překvapivě za těchto podmínek byla detekována i MA, která vznikala přímo v kapiláře během analýzy. Stejně chování bylo ověřeno pomocí CE-MS experimentů v octanovém pufru o pH 5,0. Výsledky ukazují, že k rozkladu BPAA může dojít i v průběhu separace v BGE o slabě kyselém či neutrálním pH. Při CE analýzách BPAA (rozpuštěné ve 100% methanolu) nebyl pozorován vznik MA pokud byl k separaci použit mravenčanový pufr o silně kyselém pH 3,0.

Nevhodné použití modelového analytu [1] poukazuje na nutnost ověření stability analytu a to nejen v roztoku vzorku, ale i v průběhu separace.

7. ZDROJE

- [1] Rizvi, S. A. A. a Shamsi S. A. Synthesis, Characterization, and Application of Chiral Ionic Liquids and Their Polymers in Micellar Electrokinetic Chromatography. *Analytical Chemistry*. 2006, 78(19), 7061-7069. DOI: 10.1021/ac060878u.
- [2] Kováčová, G. Studium vhodnosti α -brómfenyloctovej kyseliny jako modelového analytu pro chirální separace s využitím kapilární elektroforézy. Hradec Králové, 2018. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta.
- [3] Li, S. F. Y. Capillary electrophoresis: principles, practice and applications. Amsterdam: Elsevier, 1993. *Journal of chromatography library*, vol. 52. ISBN 04-448-1590-2.
- [4] Landers, J. P. Handbook of capillary and microchip electrophoresis and associated microtechniques. 3. vydání. Boca Raton: CRC Press, 2008. ISBN 08-493-3329-6.
- [5] Lauer, J. H., Rozing, G. P. High Performance Capillary Electrophoresis. 2nd ed. Germany: Agilent Technologies, 2014. ISBN 5990-3777EN.
- [6] Cohen, A. S., Paulus A., Karger B. L. High-performance capillary electrophoresis using open tubes and gels. *Chromatographia*. 1987, 24(1), 15-24. DOI: 10.1007/BF02688463.
- [7] Bonvin, G., J. Schappler a S. Rudaz. Capillary electrophoresis–electrospray ionization-mass spectrometry interfaces: Fundamental concepts and technical developments. *Journal of Chromatography A*. 2012, 1267, 17-31. DOI: 10.1016/j.chroma.2012.07.019.
- [8] Zhong, X., Z. Zhang, S. Jiang, L. Li. Recent advances in coupling capillary electrophoresis-based separation techniques to ESI and MALDI-MS. *ELECTROPHORESIS*. 2014, 35(9), 1214-1225. DOI: 10.1002/elps.201300451.
- [9] Issaq, H. J., G. M. Janini, K. C. Chan a T. D. Veenstra. Sheathless electrospray ionization interfaces for capillary electrophoresis–mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*. 2004, 1053(1-2), 37-42. DOI: 10.1016/j.chroma.2004.08.116.

- [10] Týčová, A., V. Ledvina a K. Klepárník. Recent advances in CE-MS coupling: Instrumentation, methodology, and applications. *ELECTROPHORESIS*. 2017, 38(1), 115-134. DOI: 10.1002/elps.201600366.
- [11] Olivares, J. A., Nguyen N. T., Yonker C. R., Smith R. D. On-line mass spectrometric detection for capillary zone electrophoresis. *Analytical Chemistry*. 2002, 59(8), 1230-1232. DOI: 10.1021/ac00135a034.
- [12] Smith, R. D., Barinaga Ch. J., Udseth H. R. Improved electrospray ionization interface for capillary zone electrophoresis-mass spectrometry. *Analytical Chemistry*. 2002, 60(18), 1948-1952. DOI: 10.1021/ac00169a022.
- [13] Gahoual R., Leize-Wagner E., Houzé P., François Y. Revealing the potential of capillary electrophoresis/mass spectrometry: the tipping point. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2018. DOI: 10.1002/rcm.8238.
- [14] Maxwell, E. J., Chen D. D.Y. Twenty years of interface development for capillary electrophoresis–electrospray ionization–mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. 2008, 627(1), 25-33. DOI: 10.1016/j.aca.2008.06.034.
- [15] Wahl, J. H., Gale D. C., Smith R. D. Sheathless capillary electrophoresis–electrospray ionization mass spectrometry using 10 µm I.D. capillaries: Analyses of tryptic digests of cytochrome c. *Journal of Chromatography A*. 1994, 659(1), 217-222. DOI: 10.1016/0021-9673(94)85026-7.
- [16] Cao P., Moini M. A novel sheathless interface for capillary electrophoresis/electrospray ionization mass spectrometry using an in-capillary electrode. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 1997, 8(5), 561-564. DOI: 10.1016/S1044-0305(97)00015-9.
- [17] Moini, M. Simplifying CE–MS Operation. 2. Interfacing Low-Flow Separation Techniques to Mass Spectrometry Using a Porous Tip. *Analytical Chemistry*. 2007, 79(11), 4241-4246. DOI: 10.1021/ac0704560.
- [18] Klampfl, Ch. W. CE with MS detection: A rapidly developing hyphenated technique. *ELECTROPHORESIS*. 2009, 30(S1), S83-S91. DOI: 10.1002/elps.200900088.
- [19] Lázníčková, A., Kubíček V. *Základy fyzikální chemie: vybrané kapitoly pro posluchače Farmaceutické fakulty*. 3. vyd. Praha: Karolinum, 2014. ISBN 978-80-246-2791-5.

- [20] Bartovská, L. Chemická kinetika. 1. vyd. Praha: VŠCHT Praha, 2008. ISBN 978-80-7080-670-8.
- [21] Svoboda, J. Organická chemie I. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2005. ISBN 978-80-7080-561-9.
- [22] Sykes, P. A guidebook to mechanism in organic chemistry. 5th ed. New York: Longman, 1981. ISBN 05-824-4121-8.
- [23] McMurry, J. Organická chemie. Brno: Vysoké učení technické v Brně, nakladatelství VUTIUM, 2015. Překlady vysokoškolských učebnic. ISBN 978-802-1447-691.
- [24] Český lékopis 2017 : Pharmacopea bohemica MMXVII : (Ph. B. MMXVII):. Praha: Grada, 2017. ISBN 978-80-271-0500-7.