

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta

Katedra fyzikální a makromolekulární chemie

Doktorský studijní program: Fyzikální chemie

Autoreferát disertační práce



**Hmotnostní spektrometrie v proudové trubici s vybranými ionty,
SIFT-MS**

Kristýna Sovová

Školitel: prof. Patrik Španěl
Školitel-konzultant: prof. Eva Tesařová

Praha 2013

Charles University in Prague, Faculty of Science

Department of physical and macromolecular chemistry

Ph.D. study program: Physical chemistry

Summary of the Ph.D. Thesis



Selected ion flow tube mass spectrometry, SIFT-MS

Kristýna Sovová

Supervisor: prof. Patrik Španěl
Supervisor-consultant: prof. Eva Tesařová

Prague 2013

Abstrakt

Tato práce shrnuje experimenty, na nichž jsem pracovala během svého postgraduálního studia zaměřeného na aplikaci hmotnostní spektrometrie v proudové trubici s vybranými ionty (SIFT-MS) v interdisciplinárním výzkumu. SIFT-MS je metoda, která v reálném čase umožňuje stanovení stopových koncentrací plyných látek a par v okolní atmosféře a lidském dechu.

Disertace je rozdělena do několika částí. Úvodní dvě kapitoly stručně shrnují historii hmotnostní spektrometrie a vymezují kvantitativní metody PTR-MS a SIFT-MS. Třetí část práce se detailně věnuje historii vzniku SIFT-MS počínaje principy techniky proudové trubice (SIFT), která byla používána ke studiu reakcí iontů s molekulami v plynné fázi a která rovněž tvoří základ metody SIFT-MS. V následující kapitole jsou shrnuty základy iontové chemie tří prekurzorů H_3O^+ , NO^+ a O_2^{+} , které jsou používány k ionizaci neutrálních molekul vzorku v hmotnostním spektrometru *Profile 3* SIFT-MS. Čtvrtá kapitola je zaměřena na těkavé organické látky a jejich různorodý původ: bakteriální, rostlinný a metabolity lidského dechu, jež mohou být analyzovány v reálném čase pomocí SIFT-MS.

Kapitola “Výsledky a Diskuse” je rozdělena do několika podkapitol, které jsou koncipovány jako komentáře již publikovaných výsledků v impaktovaných časopisech. První podkapitola se detailně věnuje iontové chemii, výpočtu rychlostních konstant reakcí prekurzorových iontů H_3O^+ , NO^+ a O_2^{+} s neutrálními molekulami vzorku - fytogenními estery a sedmi izomery hexanolu. Další dvě sekce se již věnují aplikaci SIFT-MS v oblasti klinické diagnostiky. Jedná se především o hledání vhodných biomarkerů onemocnění cystické fibrózy a zánětlivých střevních onemocnění. Studium populační dynamiky tří bakteriálních druhů prostřednictvím monitorování těkavých látek, které tyto bakterie uvolňují do svého okolí se zabývá další podkapitola. SIFT-MS metoda byla rovněž použita v problematice rostlinné fyziologie. Látky, které rostliny uvolňují do svého okolí přirozeně nebo v procesu fytovolatilizace byly sledovány v reálném čase. Posledním tématem celé práce je studium plyných povýbuchových reziduí vysoce energetického materiálu FOX-7.

Abstract

This thesis describes research that has been carried out during the years 2009-2013 as a part of my PhD project related to the method of selected ion flow tube mass spectrometry (SIFT-MS) and its application in interdisciplinary areas of research. SIFT-MS is a method that allows accurate quantification of trace gases and vapours presented in humid air with the focus on human breath; without any sample preparation and in real time.

The thesis is divided into several parts. The first part reviews the history of mass spectrometry as a background for the quantitative analytical methods as PTR-MS and SIFT-MS. The second part discusses the detailed history of development of SIFT-MS, starting from principles of selected ion flow tube (SIFT) technique that has been used for study of ion-molecule reactions in the gas phase and forms the basis of SIFT-MS. The next part discusses volatile organic compounds of different biological origin: bacterial, plant and human breath metabolites that can be analyzed in real time using SIFT-MS.

The main part "Results and Discussion" is divided into several subsections that serve as commentaries to the enclosed research papers published in peer reviewed journals. The first is a detailed step by step overview of the kinetics of ion molecule reactions which is the basis of SIFT-MS including the determination of rate constants and product branching ratio for several ion-molecule reactions of H_3O^+ , NO^+ and O_2^{+*} precursor ions with six phytogetic esters and seven isomers of hexanol. Other two sections concern the application of SIFT-MS in the discovery of biomarkers for clinical diagnostic of inflammatory bowel disease and infections complicating cystic fibrosis. Next section covers a study of population dynamics of three different bacterial species based on their volatile signatures. The theme of plant physiology and the volatiles that are released by plants in the process of phytovolatilization is discussed in the following section. The final section discusses an application of SIFT-MS in the field of security research for the study of decomposition of a highly energetic explosive FOX-7.

1. Úvod

Okamžité stanovení stopových plynů přítomných ve směsi vzduchu, vydechovaného lidského dechu či headspace biologických vzorků představuje náročný úkol, který dosud nebyl plně vyřešen [1]. V mnoha vědních oborech [2] jakými jsou potravinářství, životní prostředí, bezpečnost a ochrana zdraví a v neposlední řadě lékařství roste zájem o okamžitou kvantifikaci těchto látek v reálném čase. Analýza těkavých organických (VOCs) [3] v lidském dechu představuje možnost neinvazivní diagnostiky onemocnění. Předpokládá se, že některé látky mohou sloužit jako tzv. biomarkery nebo indokátory různých nemocí.

Metody běžně užívané v analýze VOCs a anorganických plynů jsou založeny především na principech hmotnostní spektrometrie a různých forem spektroskopie. Spektroskopické techniky (jako např. optická spektroskopie) nejsou vhodné pro velké molekuly, které jsou přítomny v koncentracích objemových miliardtin (ppbv). Odběr vzorků plynu se tradičně provádí pomocí sáčků, kovových kanistrů nebo se látky sorbují na pevné sorbenty [4, 5]. K zakoncentrování vzorků se v posledních letech využívá metod extrakce na tuhou (SPME) a termální desorpce (TD), které předcházejí vlastní analýze pomocí plynové chromatografie s hmotnostní detekcí (GC/MS).

2. Cíle práce

Cíl, který jsem si vytyčila na počátku svého postgraduálního studia byl:

“ Vyvinout nová reakční schémata a metodologii, jež by umožnily použití metody hmotnostní spektrometrie v proudové trubici s vybranými ionty (SIFT-MS) v interdisciplinárním výzkumu včetně oblasti životního prostředí, mikrobiologie, detekce výbušnin a analýzy dechu pro klinickou diagnostiku a monitorování terapie.”

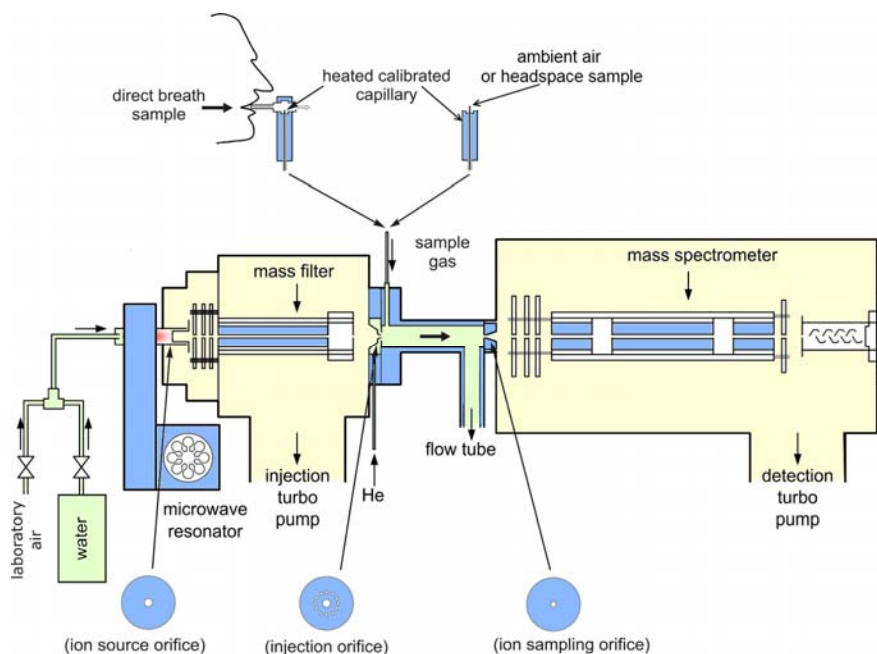
Věřím, že jsem ve své práci dosáhla vytyčeného cíle a během experimentální práce získala mnoho zajímavých a originálních výsledků.

3. Materiál a metodika

Hmotnostní spektrometrie v proudové trubici s vybranými ionty, SIFT-MS. Vznik SIFT-MS je spojen s technikou rychlé proudové trubice, SIFT, která v 70. letech sloužila ke studiu kinetiky reakcí iontů s molekulami v plynné fázi. Na základě rozsáhlé databáze dat, která vzešla z výzkumu prováděného pomocí SIFT techniky, vyvinuli v roce 1995 D. Smith a P. Španěl metodu SIFT-MS, která umožňuje stanovení stopových plynů v koncentracích ppbv v okolním vzduchu a především pak v lidském dechu. SIFT-MS je založena na principu chemické ionizace pomocí vybraných iontů, tzv. prekurzorů, které reagují s neutrálními molekulami vzorku. Volba této “měkké“ ionizační techniky minimalizuje vznik fragmentů a tím zjednodušuje výsledné hmotnostní spektrum [6].

Na obrázku 1 je znázorněno schéma a princip přístroje **Profile 3**, který byl použit ve všech experimentech diskutovaných v této disertaci. Kladně nabitě ionty jsou vytvářeny v mikrovlnném výboji ze směsi vody a vzduchu [7] o celkovém tlaku 0,3 mbar. Z této směsi je pomocí hmotnostního filtru vybrán ion s určitým poměrem m/z . Jeden z vybraných iontů, H_3O^+ , NO^+ or O_2^+ , je následně vstříknut do proudu nosného plynu helia pomocí otvoru O_2 a veden podél proudové trubice (o průměru 1 cm a délce 5 cm). Vzorek plynu je do proudové trubice zaveden pomocí kalibrované kapiláry kontinuálním průtokem 20-30 mL/min při standardním atmosferickém tlaku a teplotě. Kapilára a další spojky vyrobené z materiálu PEEK (polyether ether ketone) jsou vyhřívány na teplotu 80 °C, aby se zamezilo kondenzaci vodní páry a paměťovému efektu. Prekurzor reaguje se vzorkem plynu během **přesně definovaného reakčního času** (0,6 ms), který je dán rychlostí průtoku nosného plynu a délkou reakční zóny v proudové trubici. Reakcemi prekurzorových iontů a neutrálních

molekul vzorku v nosném plynu vznikají charakteristické iontové produkty. Tyto iontové produkty jsou analyzovány pomocí kvadrupólového hmotnostního spektrometru a počítány elektronovým násobičem. Takto získané iontové signály jsou dále použity k výpočtu koncentrací těkavých látek v reálném čase.



Obrázek 1 Schéma Profíle 3 SIFT-MS přístroje znázorňující mikrovlnný iontový zdroj, hmotnostní filtr a kvadrupólový hmotnostní spektrometr. Tři kovové disky umožňují měřit iontový proud pomocí otvorů O_1 , O_2 and O_3 , skrz které ionty proudí z iontového zdroje do hmotnostního filtru. Vybrané ionty vstupují do proudové trubice a skrz O_3 jsou analyzovány kvadrupólovým hmotnostním spektrometrem. Přímá analýza dechu a vzorkování ze sáčku je rovněž znázorněno [8.]

Absolutní kvantifikace. Absolutní kvantifikace stopových plynů v reálném čase vychází z reakční kinetiky prvního řádu. Absolutní koncentrace je vypočítaná ze známých rychlostních konstant, poměrů iontových signálů prekurzorů a výsledných iontových produktů a z reakční doby. Jen pro upřesnění, technika SIFT byla používána především k určování neznámé rychlostní konstanty k určité reakce. Když byla k dané reakce určena, mohla být posléze použita k výpočtu koncentrace analytu pomocí SIFT-MS.

Pro ilustraci je uvedena reakce H_3O^+ : za předpokladu reakce pouze jedné látky, M ; reakce probíhá přenosem protonu za vzniku jednoho iontového produktu MH^+ .



Reakce probíhá během přesně definovaného času t_r (typicky 0,6 ms) s rychlostní konstantou k . MH^+ je tedy jediný produkt a pokud je $[H_3O^+] \gg [MH^+]$, pak může být reakce vyjádřena následující kinetickou rovnicí (hranaté závorky [] představují iontový signál):

$$[MH^+] = k[M][H_3O^+]t_r \quad (2)$$

Vyjádření $[M]$ z rovnice:

$$[M] = \frac{1}{t_r} \cdot \frac{[MH^+]}{k[H_3O^+]} \quad (3)$$

Iontový signál je přímo úměrný koncentraci iontů. Měření **poměru signálů** iontových produktů a prekursoru $\text{MH}^+/\text{H}_3\text{O}^+$ pomocí hmotnostního spektrometru tedy umožňuje absolutní kvantifikaci M.

Pokud je však reakční schéma složitější a zahrnuje klastry [9, 10], pak je k výpočtu koncentrace [M] použita obecná rovnice:

$$[M] = \frac{1}{t_r} \cdot \frac{f_{p1}I_{p1}/D_{ep1} + f_{p2}I_{p2}/D_{ep2} + \dots}{f_{i1}I_{i1}k_1 + f_{i2}I_{i2}[(k_1 + k_2)/2]/D_{ei2} + \dots} \quad (4)$$

kde I_{p1}, I_{p2} etc. jsou signály iontových produktů, I_{i1}, I_{i2} etc. jsou signály prekursoru (např. H_3O^+ , $\text{H}_3\text{O}^+(\text{H}_2\text{O})$), $k_{1,2}$ jsou rychlostní konstanty reakcí mezi prekuzorem a neutrální molekulou [M]. $D_{ep1}, D_{ep2}, D_{ei2}$ etc. jsou difuzní koeficienty iontových produktů a iontů prekursoru.

Pokud reaguje větší množství [M] (typicky více než 10 ppmv), může docházet ke vzniku sekundárních reakcí iontových produktů. V takovém případě je mnohem přesnější rozšířit rovnici (4) a použít logaritmickou formu:

$$[M] = \frac{1}{k_1 t_r} \ln \left(1 + k_1 \frac{f_{p1}I_{p1}/D_{ep1} + f_{p2}I_{p2}/D_{ep2} + \dots}{f_{i1}I_{i1}k_1 + f_{i2}I_{i2}[(k_1 + k_2)/2]/D_{ei2} + \dots} \right) \quad (5)$$

Absolutní koncentrace [M] v proudové trubici může být převedena na relativní koncentraci molekuly ve vzorku plynu, p_M/p_0 , na základě porovnání kontinuálního ředění vzorku (průtok, Φ_a) v nosném plynu (průtok, Φ_c):

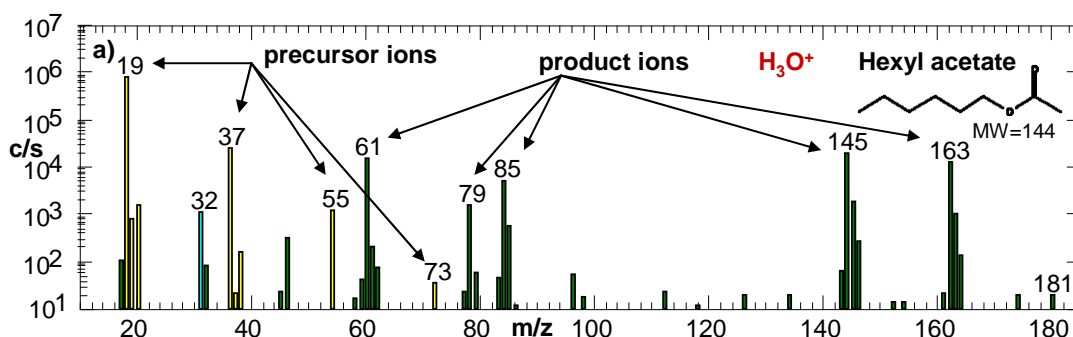
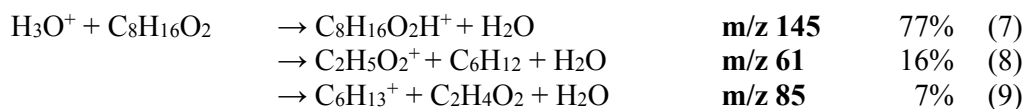
$$\frac{p_M}{p_0} = \frac{[M]p_0}{n_0 p_g} \frac{T_g}{T_0} \frac{\Phi_c + \Phi_a}{\Phi_a} \quad (6)$$

Zde, $n_0 = 2.687 \times 10^{19} \text{ cm}^{-3}$ je fyzikální konstanta: Loschmidtovo číslo, což je referenční hodnota koncentrace za standardního atmosferického tlaku, $p_0 = 760 \text{ Torr}$ a teploty $T_0 = 273.15 \text{ K}$ [10]. Poměr parciálních tlaků p_M/p_0 je poté vyjádřen v jednotkách ppbv vynásobených 10^9 .

4. Výsledky a diskuse

4.1 Určení rychlostní konstanty a % poměrů iontových produktů. V této sekci jsou uvedeny detaily experimentálních studií, které se týkají iontové chemie skupiny šesti esterů a sedmi izomerních forem hexanolu. Krok za krokem je zde popsána celá metodika studia iontové chemie těchto látek počínaje získáním hmotnostního spektra a identifikací primárních iontových produktů ion-molekulárních reakcí a nakonec určením rychlostní konstanty dané reakce. V práci je zahrnut převážně ten materiál, který nebyl diskutován v článcích publikovaných v impaktovaných časopisech, které jsou přiloženy formou apendixů A[11] a B[12]. Tato kapitola tedy spíše doplňuje již publikované výsledky.

Pro přehled jsem zvolila jeden příklad, a to reakci hexylacetátu s H_3O^+ . Přenosem protonu a vzniká protonovaná molekula, MH^+ . Částečná fragmentace nascentního MH^+ vede ke vzniku $\text{C}_2\text{H}_5\text{O}_2^+$ (m/z 61) iontu a $\text{C}_6\text{H}_{13}^+$ (m/z 85) iontu (výsledné spektrum je znázorněno na obrázku 2):



Obrázek 2 SIFT-MS spektrum hexylacetátu po reakci s H_3O^+ . Šipky indikují vzniklé primární produkty reakce. Na ose y signál iontů c/s na ose x poměr hmoty ku náboji m/z .

Formát kinetické knihovny, kterou SIFT-MS software používá pro stanovení koncentrace v reálném čase je následující (Tabulka 1): za jménem látky a použitého prekursoru v závorce je počet prekursorů, na další řádce je jejich m/z následováno rychlostní konstantou v jednotkách cm^3s^{-1} pro jejich reakci se stopovým plynem (v tomto případě hexylacetátem) a faktor, f_i , jak je naznačeno v rovnici (4). Tyto faktory jsou jednoduše použity k vynásobení získaných iontových signálů iontu o daném m/z . Obecně jsou používány hodnoty faktorů f_i 1,0. Nicméně, v případě kdy dochází například k překryvům s jinými ionty přítomnými ve vzorku, lze použít hodnoty jiné než 1,0 a optimalizovat výpočet, který vyloučí příspěvek jiných iontů (viz appendix A).

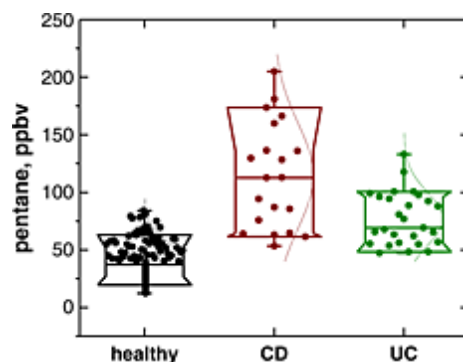
Tabulka 1 SIFT-MS kinetická knihovna ve formátu, který používá software pro on-line výpočet koncentrace třech vybraných esterů.

látka(ion)	Hexylacetát (H_3O^+)	Benzylacetate (H_3O^+)	Methylbenzoate (H_3O^+)
Počet prekursorů	4 precursors	4 precursors	4 precursors
	19 3.2e-9 1.0	19 3.4e-9 1.0	19 3.3e-9 1.0
m/z k f_i	37 2.4e-9 1.0	37 2.5e-9 1.0	37 2.5e-9 1.0
	55 2.1e-9 1.0	55 2.2e-9 1.0	55 2.2e-9 1.0
	73 1.9e-9 1.0	73 2.0e-9 1.0	73 2.0e-9 1.0
Počet produktů	5 products	3 products	3 products
	61 1.0	91 1.38	137 1.236
m/z k f_p	79 1.0	151 -0.86	155 1.088
	85 1.066	169 -0.86	153 -0.16
	145 1.088		
	163 1.088		

4.2 Zánětlivá střevní onemocnění. Zánětlivá střevní onemocnění (IBD) zahrnují skupinu chronických poruch trávicího traktu, které způsobují poškození a záněty ve střevech a rektu. Primárně se jedná o **ulcerativní kolitidu** (UC) a **Crohnovu nemoc** (CD). Příčina vzniku těchto chorob nebyla doposud objasněna, ale vše nasvědčuje tomu, že jde o autoimunitní onemocnění. IBD postihuje především věkovou skupinu 15 – 30 let. Odhadovaný výskyt v české populaci je kolem 0,3 %, ale přesná epidemiologická data nejsou dostupná. Současná léčba IBD (farmakologická nebo chirurgická) pouze zmírňuje symptomy, jako je bolest břicha, ztráta hmotnosti a krvavý průjem, avšak zatím neexistuje žádná léčebná terapie. Diagnostika IBD spočívá v endoskopie, CT a MRI.

Analýza dechu pomocí SIFT-MS představuje možnost neinvazivní diagnostiky nebo monitorování nasazené léčebné terapie této choroby. Jedním z faktorů, jež způsobuje zánět jsou volné radikály. Tyto molekuly reagují s polynenasycenými mastnými kyselinami fosfolipidů, tedy hlavními složkami buněčných membrán, což má za následek peroxidaci lipidů. Při tomto procesu dochází ke vzniku jednoduchých uhlovodíků jakými jsou pentan ethan [13, 14][15]. Schéma tohoto procesu je presentováno v publikaci (apendix C), které bylo převzato z práce Spitteler *et al* [16].

Cílem této studie bylo vyvinout metodu kvantifikace **pentanu**, jakožto **biomarkeru IBD**, v lidském dechu v reálném čase. Metoda byla následně testována v pilotní studii, kdy byl analyzován dech skupiny pacientů, kteří trpí CD a UC. **Můj podíl** na tomto výzkumu spočíval ve studiu iontové chemie pentanu a rovněž jsem se účastnila klinické studie v nemocnici.



Obrázek 3 Box-and-whisker graf koncentrace pentanu v lidském dechu v ppbv pro skupinu zdravých, pacientů s CD a pacientů s UC.

4.3 Cystická fibróza. Cystická fibróza (CF) je dědičné, geneticky podmíněné onemocnění. Navzdory všem pokrokům dnešní medicíny je toto onemocnění nevléčitelné. CF postihuje především dýchací a trávicí systém. Plíce zdravých jedinců jsou pokryty tenkou vrstvou hlenu (mucusu), který usnadňuje stahování dýchacích cest a umožňuje odkašlávání. U pacientů s CF dochází k nadprodukci tohoto hlenu a tím dochází ke stížení dýchání. Dalším následkem abnormální tvorby hlenu je nebezpečí vzniku **bakteriální infekce**, jelikož plíce se tak stávají bohatou živnou půdou pro bakterie [17, 18]. [17, 18]. Pro zdravé jedince nejsou tyto bakterie nebezpečné, avšak u nemocných CF tyto bakterie přetrvávají a způsobují tak chronické respirační infekce. Opakovanými infekcemi dochází k poškození plic, které poté selhávají.

Plíce nemocných CF jsou často kolonizovány bakterií *Pseudomonas aeruginosa* (PA) [19], jež je hlavní příčinou morbidity a mortality společně s *Burkholderia cepacia*. Analýza dechu nabízí možnost neinvazivní diagnostiky PA infekce. Analýzou VOCs uvolňovaných z PA lze objevit těkavé biomarkery PA infekce plic [20]. Pomocí SIFT-MS byl již detegován HCN z *in vitro* kultur PA a byl rovněž nalezen v dechu pacientů s CF [20, 21]. V pilotním experimentu, který byl řešen v laboratoři pod vedením Patrika Španěla ve spolupráci s mikrobiology ze Státního zdravotního ústavu, byl metodou SPME-GC/MS identifikován methylthiokyanát v PA kulturách (Apendix D). Mým úkolem v tomto výzkumu bylo opět studium iontové chemie methylthiokyanátu, tedy popis kinetiky reakcí s prekurzory H_3O^+ , NO^+ and O_2^{+} a vyvinout metodu, která by umožnila kvantifikovat tuto látku pomocí SIFT-MS v reálném čase.

Iontová chemie methylthiokyanátu je poměrně jednoduchá (Obrázek 4): H_3O^+ reaguje s touto látkou jen přenosem protonu a vzniká produkt o m/z 74 CH_3SCNH^+ . Tato protonovaná molekula asociuje s molekulou H_2O a dochází k tvorbě klastrů o m/z 92, 110, 128.

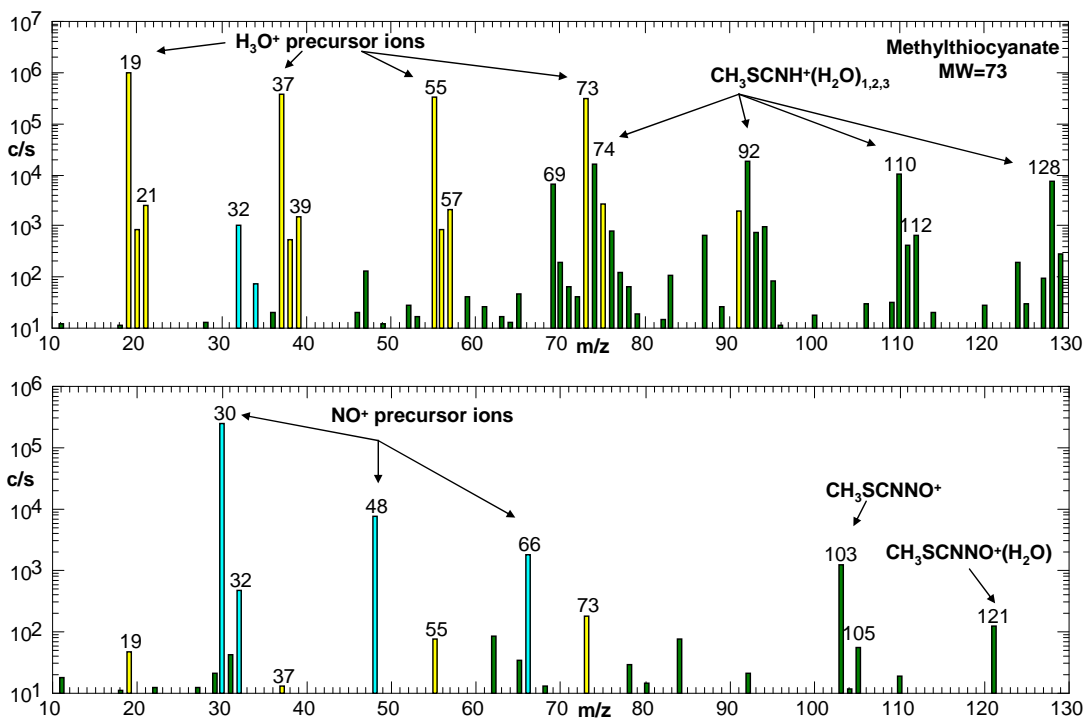
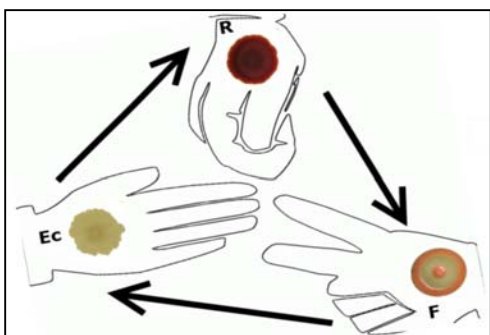


Figure 4 SIFT-MS spektra methylthiokyanátu. Headspace kapalného vzorku bylo vneseno do proudové trubice pomocí kapiláry. Na ose y iontový signál v c/s, na ose x hmota ku náboji, m/z. V těchto dvou spektrech jsou znázorněny hlavní produkty reakce CH_3SCN s H_3O^+ a NO^+ . Protonovaná molekula a její vodní klustry na H_3O^+ spektru a adukt na NO^+ spektru.

Rychlostní konstanta vzniku protonovaného iontového produktu CH_3SCNH^+ je $4,6 \times 10^{-9} \text{cm}^3 \text{s}^{-1}$ a byla vypočítána pomocí teorie parametrizované trajektorie [23] a ze známých hodnot polarizovatelnosti a dipólového momentu CH_3SCN ($a=7,62 \times 10^{-24} \text{cm}^3$ a $m=3,56 \text{D}$).

4.4 Populační dynamika bakteriálních kultur. Ačkoliv bakterie nedisponují žádnými smyslovými orgány, přesto bylo pozorováno, že jsou schopny rozpoznat, co se kolem nich děje. V literatuře se hovoří o jejich schopnosti komunikovat pomocí chemických signálů. Ke studiu této schopnosti byl vybrán modelový systém bakteriálních kolonií *Serratia rubidaea* (R, červené, hladké), *Serratia marcescens* (F, fontánkovité kolonie) a *Escherichia coli* (Ec), které byly kultivovány v tekutých živných mediích. VOCs, které tyto bakterie uvolňují do svého okolí během svého růstu byly monitorovány v čase. Tyto tři organismy, pokud jsou umístěny do jednoho společného media, tvoří velmi zajímavý ekosystém, ve kterém dochází k boji o prostor a živiny. Zbůsob, kterým spolu tyto organismy interagují lze přirovnat ke známé dětské hře “kámen-nůžky-papír”. Konečný výsledek takové interakce (populační dynamiky) je možné zjistit pouze po spočítání přeživších kolonií. V tomto projektu byly populace bakterií sledovány v reálném čase, a to pomocí těkavých látek, které uvolňují. Cílem této studie bylo identifikovat tyto těkavé látky a sledovat jejich vývoj v čase. Na základě výsledků pak odhadovat poměr jednotlivých bakterií ve směsi.



Tyto tři organismy, pokud jsou umístěny do jednoho společného media, tvoří velmi zajímavý ekosystém, ve kterém dochází k boji o prostor a živiny. Zbůsob, kterým spolu tyto organismy interagují lze přirovnat ke známé dětské hře “kámen-nůžky-papír”. Konečný výsledek takové interakce (populační dynamiky) je možné zjistit pouze po spočítání přeživších kolonií. V tomto projektu byly populace bakterií sledovány v reálném čase, a to pomocí těkavých látek, které uvolňují. Cílem této studie bylo identifikovat tyto těkavé látky a sledovat jejich vývoj v čase. Na základě výsledků pak odhadovat poměr jednotlivých bakterií ve směsi.

Bylo připraveno šest různých vzorků bakt. kultur: monokultury R, Ec, F, a binární systémy REc, FEc, RF. SIFT-MS skenoval hmoty v rozmezí 10 – 100 m/z , chemická ionizace probíhala postupně se všemi prekurzory. Jeden sken trval 120 s. Headspace každého vzorku byla analyzována po dobu 24 hodin, typicky bylo získáno 273 hmotnostních spekter (apendix E). Získaná data byla vyhodnocena pomocí analýzy hlavních komponent (PCA). Bylo identifikováno a kvantifikováno 8 látek v headspace bakterií (amoniak, aceton, acetoin, acetaldehyd, kyselina octová, etanol a propanol).

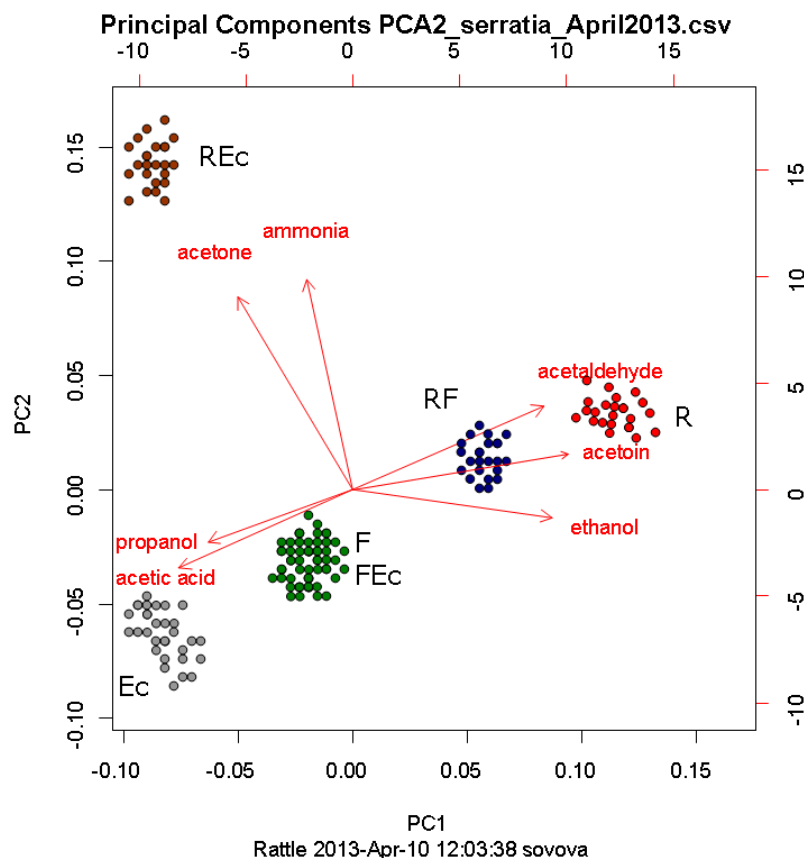


Figure 5 PCA analýza tří bakteriálních druhů a jejich binárních směsí. Červené šipky znázorňují směr, ve kterém roste koncentrace proměnných: amoniak, aceton, acetoin, acetaldehyd, kyselina octová, etanol a propanol. Kolonie F a binární směs FEc jsou lokalizované zhruba veprostřed digramu, což znamená, že v jejich případě jsou koncentrace látek průměrné. Pro populaci Ec je charakteristická vysoká koncentrace propanolu a kyseliny octové, u R dominuje acetoin, acetaldehyd a ethanol. RF leží ve směru, který je blízký monokultuře R. Binární systém REc (redukce v koncentraci propanolu) je charakterizován acetonem a amoniakem.

SIFT-MS metoda byla úspěšně použita pro nedestruktivní a kvantitativní sledování dynamiky bakteriální populace v reálném čase. Další motivací pro tento pilotní výzkum byla možnost využití těchto poznatků pro monitorování a diagnostiku výskytu a vývoje bakteriální infekce. SIFT-MS může být potenciálně využita ke sledování rizikových skupin pacientů, odhalit tak infekci v samém počátku a nasadit vhodnou léčbu.

4.5 Fytovolatilizace selenu. Cílem studie bylo vyvinout metodu pro stanovení těkavé formy selenu (Se) v reálném čase. Těkavé formy Se vznikají procesem fytovolatilizace účinkem zelených rostlin (Obrázek 6). Některé rostliny jsou schopny akumulovat vysoké dávky anorganického selenu v půdě, jedná se o tzv. hyperakumulátory [24]. V půdě či vodě je selen převážně ve formě anorganických solí selenanů (SeO_4^{2-}) či seleničitanů (SeO_3^{2-}). Tyto ionty

jsou vstřebávány pomocí sirných přenašečů a enzymů a jsou transformovány do těkavých forem jakými jsou dimethylselenid, $(\text{CH}_3)_2\text{Se}$ nebo dimethyldiselenid, $(\text{CH}_3)_2\text{Se}_2$ [25].

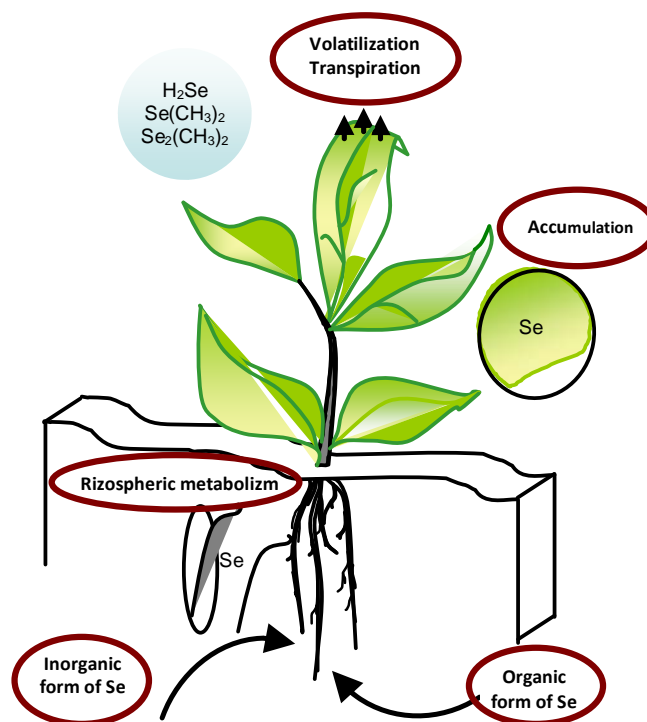
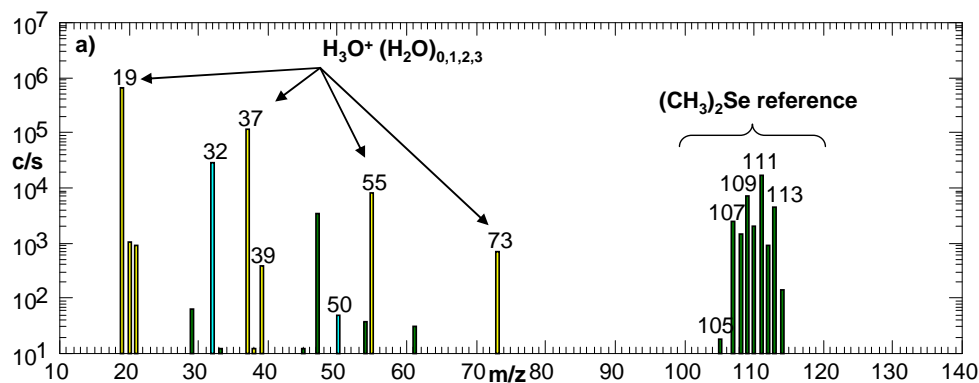


Figure 6 Na schématu je znázorněn příjem Se, jeho transport, akumulace v kořenech a stoncích a jeho transpirace v podobě těkavé formy.

Reakcí $(\text{CH}_3)_2\text{Se}$ s H_3O^+ vzniká protonovaný iontový produkt o m/z 107-109-111-113, hmoty představují izotopické složení selenu: ^{76}Se (9,02 %), ^{78}Se (23,52 %), ^{80}Se (49,82 %) a ^{82}Se (9,19 %). Pro identifikaci nějaké z těkavých forem selenu ve směsi je izotopické složení velice užitečné, usnadňuje identifikaci takové látky.



Obrázek 7 SIFT-MS spektrum standardní kapalně směsi dimethylselenidu (Sigma Aldrich), vzorkováno bylo headspace směsí. Šípky označují ionty prekurzoru a výsledný iontový produkt.

V dalším kroku byly pěstovány rostlinky kukuřice (*Zea mays*) v mediu obohaceném Se solemi (20 μM). Vznik $(\text{CH}_3)_2\text{Se}$ byl monitorován pomocí SIFT-MS. Absolutní koncentrace DMSe $(\text{CH}_3)_2\text{Se}$ byla vypočítána z kinetických dat v knihovně (Tabulka 2) z iontových signálů m/z 107 a 109 vynásobených f koeficientem 3,0 (příspěvek ostatních

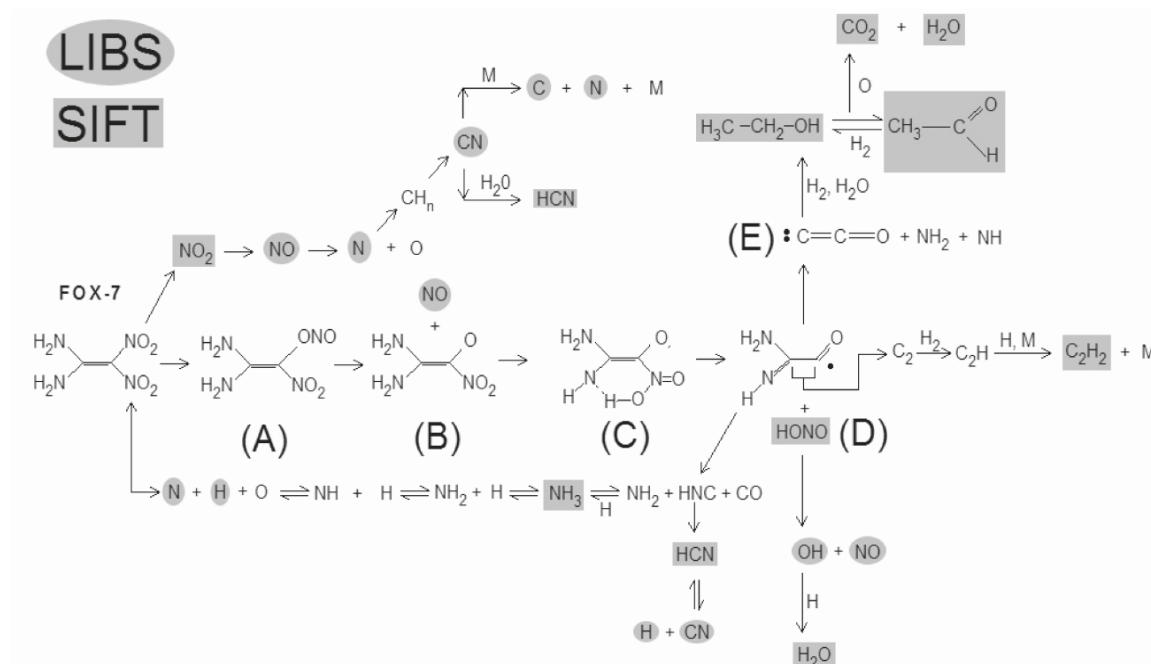
izotopů $1/(0.0902 + 0.2352)$), tak aby bylo zamezeno překryvům etanolu na hmotách m/z 83 - 111.

Tabulka 2 Optimalizovaná kinetická knihovna ve formátu, který používá SIFT-MS software.

DMSe (H_3O^+)	DMSe 107,109only (H_3O^+)	DMSe (NO^+)	DMSe (O_2^+)
4 precursors	4 precursors	3 precursors	1 precursor
19 2.6e-9 1.0	19 2.6e-9 1.0	30 2.0e-9 1.0	32 2.3e-9 1.0
37 2.0e-9 1.0	37 2.0e-9 1.0	48 1.8e-9 1.0	3 products
55 1.8e-9 1.0	55 1.8e-9 1.0	66 1.7e-9 1.0	106 1.075
73 1.6e-9 1.0	73 1.6e-9 1.0	2 products	108 1.307
3 products	2 products	108 1.307	110 2.0
107 1.075	107 3.0	110 2.0	
109 1.307	109 3.0		
111 2.0			

4.6 Výbušniny. Ve spolupráci s Explosii a.s v Pardubicích a Ústavem fyzikální chemie J. Heyrovského byl řešen výzkumný projekt "TANDEM". Projekt byl financován Ministerstvem obchodu a průmyslu. Cílem bylo studium vysoce energetických materiálů, jejich dekompozičních produktů a především pak prototypu, který by byl schopen detekovat výbušniny.

V první etapě výzkumu byly zkoumány spalné produkty výbušnin kombinací dvou technik, spektroskopie laserem indukovaného plazmatu (LIBS) a SIFT-MS. Kombinace těchto dvou metod umožnila studium a charakterizaci produktů exploze s použitím mikroskopických množství vzorků. Nebylo tedy nutné iniciovat vzorky o hmotnosti až několika gramů i více. Na obrázku 8 je znázorněno schéma vzniku stabilních produktů identifikovaných SIFT-MS a radikálů identifikovaných pomocí UV-Vis spektroskopie po inicializaci laserovým pulzem (Obrázek 8).



Obrázek 8 A reaction scheme for the decomposition of FOX-7 and the formation of the final stable products.

5. Shrnutí

Tato disertace shrnuje výsledky dosažené během mého PhD studia. Metodou SIFT-MS byla zkoumána fundamentální iontová chemie, která je základem této metody. Byly vytvořeny nové analytické metodologie, které umožnily použití SIFT-MS nejen v analýze dechu ale i v jiných oblastech výzkumu včetně mikrobiologie, fyziologie rostlin či výbušnin. Při studiu populační dynamiky bakteriálních kultur jsem měla možnost seznámit se s pokročilejšími metodami statistické analýzy.

Zde je stručně popsáno několik konkrétních výsledků mé práce:

1. Kinetická data pro reakce iontů H_3O^+ , NO^+ a O_2^+ se skupinou esterů a izomerů hexanolu. Výsledky pro téměř 40 reakcí, včetně rychlostních konstant a kinetických knihoven pro výpočet absolutních koncentrací v reálném čase byly publikovány v impaktovaných časopisech (apendix A a B). Postup, který popisuje jednu z možností optimalizace kinetické knihovny, tak aby se předešlo překryvům mezi isobarními látkami byl publikován viz. apendix A.
2. Nová metoda pro selektivní měření těkavých forem selenu (dimethylselenid, dimethyldiselenid, selenovodík a methyl selenol) uvolňovaných v procesu fytovolatilizace zelenými rostlinami (viz apendix F).
3. Studium iontové chemie pentanu a methylthiokyanátu – biomarkerů idiopatických střevních onemocnění a cystické fibrózy, jež by mohly umožnit diagnostiku těchto chorob z lidského dechu (apendix C a D).
4. Studium těkavých metabolitů třech bakteriálních kultur a jejich využití pro nedestruktivní a neinvasivní studium populační dynamiky těchto mikroorganismů. Výsledky jsou shrnuty v apendixu E.
5. Navržení reakčního schématu dekompozice vysoce energetického materiálu FOX-7 na základě SIFT-MS analýzy jeho zplodin (apendix G).

1. Introduction

Immediate measurement of the concentrations of trace amounts of various gases and vapours of volatile organic compounds, VOCs, presented in the matrix of humid air, exemplified by the ambient atmosphere, air containing VOC emissions from biological samples and exhaled human breath, represents a challenge that still has not been fully addressed [1]. The fields of science [2] where interest in such measurements is greatest include food science, environmental monitoring, occupational health and safety and last, but not least, medicine. The medical interest in analysis of VOCs [3] and other gaseous analytes is largely centred on non-invasive breath analysis. The hypothesis is that some of these compounds can serve as biomarkers or indicators of various diseases.

The methods widely used for the analysis of trace VOCs and inorganic gases are chiefly based on principles of mass spectrometry and different forms of spectroscopy. Spectroscopic techniques (such as optical spectroscopy) are not currently suitable for larger molecules that are presented at concentrations in parts-per-billion by volume (ppbv) in air. Analysis of the kind outlined above is traditionally carried out by sampling the gases into bags, metal canisters or by collecting VOCs on solid adsorbents [4, 5]. For sample preconcentration the methods of solid phase micro extraction (SPME) and thermal desorption (TD) are often used in preparation for analyses using gas chromatography mass spectrometry (GC-MS).

2. Aims of the study

The aim of my PhD project as formulated at the onset of my postgraduate study was:

“To develop new reaction schemes and methodology for the use of Selected Ion Flow Tube Mass Spectrometry (SIFT-MS) in interdisciplinary areas of research, including environmental science, microbiology, explosive detection and breath analysis for clinical diagnostics and therapeutic monitoring.”

This dissertation shows that I have achieved this aim and obtained some interesting and original results during the experimental work directed towards this goal.

3. Material and methods

Selected ion flow tube mass spectrometry, SIFT-MS. The SIFT technique formed a basis of a new method for accurate quantification of trace gases using the knowledge of kinetics of ion-molecule reactions. Thus, in 1995 D. Smith and P. Španěl developed the SIFT-MS method for the analysis of trace gases at ppbv concentrations in atmospheric air, with the focus on the detection and quantification of trace gases in human breath. The SIFT-MS method is based on chemical ionization, in which the ionization of neutral molecules is achieved by “soft ionization“ using a selected species of precursor ions. This approach minimizes fragmentation of product ions of reactions and thus simplifies the analytical mass spectrum [6].

A schematic diagram of the **Profile 3** instrument that was used for all studies discussed in this dissertation is given in Figure 1. Positive ions are created in a microwave glow discharge ion source from a mixture of water vapour and air [7] maintained at total pressure of 0.3 mbar. From the mixture of ion species extracted through the orifice O_1 a current of ions of a given mass-to-charge ratio, m/z , is selected using a quadrupole mass filter. Note that this filter can be scanned and the current measured at the electrode surrounding the injection orifice O_2 can be used to plot a crude spectrum of the reagent ions, a so called injection scan. A current of selected precursor ions, H_3O^+ , NO^+ or O_2^+ , is then injected into a fast-flowing helium carrier gas via the orifice O_2 and convected along the flow tube (diameter of 1 cm and 5 cm long). A continuous flow of the gas sample (typically 20 to 30 mL/min at standard atmospheric

pressure and temperature) can be introduced into the flow tube via a calibrated capillary. The capillary and the connecting tubes (all made from polyether ether ketone, PEEK) are all heated to about 80°C to prevent memory effect. The precursor ions react with sample gases during a **defined reaction time** (0.6 ms) which is determined by the carrier gas flow rate and the reaction length. The reactions of the precursor ions with trace gases in the sample diluted in the carrier gas form the product ions that are characteristic of each trace gas compound. The product ions are analysed using the detection (analytical) quadrupole mass spectrometer and are counted by a channeltron multiplier/pulse counting system. The count rates thus obtained are used in calculation of the concentrations of volatile compounds.

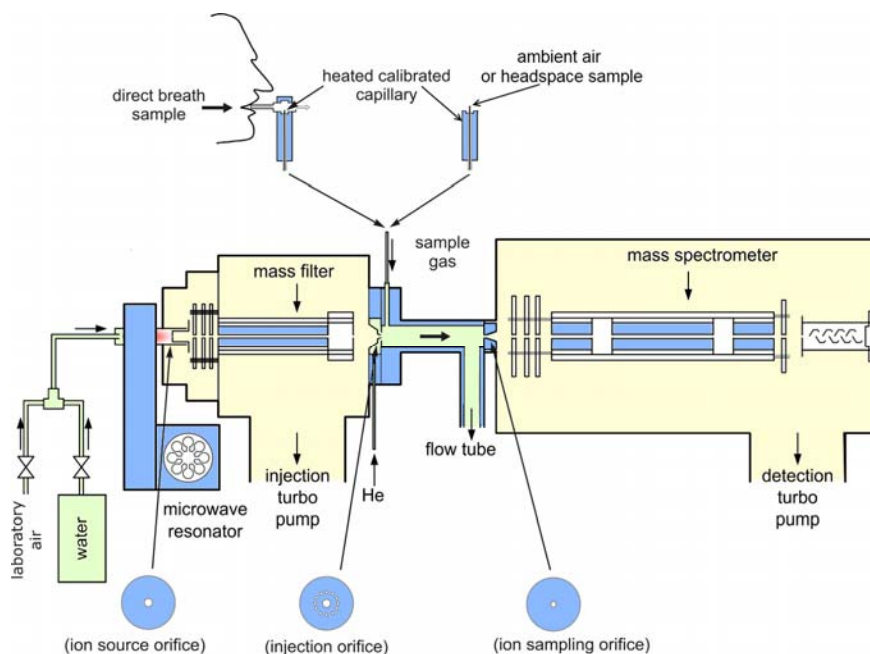
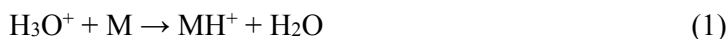


Figure 1 Schematic diagram of the Profile 3 SIFT-MS instrument showing the microwave discharge ion source, injection mass filter and the detection quadrupole mass spectrometer and the three metal discs to which ion current can be measured and which support the orifices O₁, O₂ and O₃ through which, respectively, ions pass from the ion source into the injection mass filter, mass selected ions enter the flow tube and via which ions are sampled into the analytical quadrupole mass spectrometer. Both direct breath sampling into the instrument and sampling from bag samples are illustrated [8].

Absolute quantification. The theoretical background of absolute trace gas quantification in real time is based on first order kinetics. The absolute concentrations are calculated from the known rate constants, count rates of precursor ions and product ions and the known reaction time. Note that the main original use of SIFT was to determine an unknown k for a specific reaction. Once k has been measured for the reaction of a particular analyte gas, this rate constant can then be used in the quantification of that gas using SIFT-MS.

The H₃O⁺ reaction can be used as an illustrative example: when only one compound, M, reacts through proton transfer with precursor ion producing one MH⁺ product ion.



the reaction proceeds during a well-defined reaction time t_r (being typically 0.6 ms) with the rate constant k . MH⁺ is assumed to be the only product ion and if [H₃O⁺] >> [MH⁺], then the kinetics can be approximated by the following simple equation (note the [] brackets represent count rate):

$$[MH^+] = k[M][H_3O^+]t_r \quad (2)$$

From this, [M] can be expressed as:

$$[M] = \frac{1}{t_r} \cdot \frac{[MH^+]}{k[H_3O^+]} \quad (3)$$

The measured ion signals are proportional to the ion concentrations and then the measurement of the MH^+/H_3O^+ **signal ratio** analysed by the mass spectrometer allow the absolute quantification of M.

However, if the reaction scheme is more complicated and involves ion clusters [9, 10] the general equation is used to calculate the concentration of the trace gas molecule [M]:

$$[M] = \frac{1}{t_r} \cdot \frac{f_{p1}I_{p1}/D_{ep1} + f_{p2}I_{p2}/D_{ep2} + \dots}{f_{i1}I_{i1}k_1 + f_{i2}I_{i2}[(k_1 + k_2)/2]/D_{ei2} + \dots} \quad (4)$$

where I_{p1}, I_{p2} etc. are product ion signals (count rates are corrected for the detector dead time and for mass discrimination in the downstream quadrupole mass spectrometer [10]), I_{i1}, I_{i2} etc. are precursor ions signals (e.g. H_3O^+ , $H_3O^+(H_2O)$, again corrected for mass discrimination and dead time), $k_{1,2}$ are rate constants of ion-molecular reactions between precursor ions and neutral molecule [M]. $D_{ep1}, D_{ep2}, D_{ei2}$ etc. are differential diffusion coefficients of ion products and precursor ions.

If a sufficiently large concentration of [M] is present (typically more than 10 ppmv), secondary reactions of the product ions may occur. In this case it is more accurate to expand equation (4) to a logarithmic form:

$$[M] = \frac{1}{k_1 t_r} \ln \left(1 + k_1 \frac{f_{p1}I_{p1}/D_{ep1} + f_{p2}I_{p2}/D_{ep2} + \dots}{f_{i1}I_{i1}k_1 + f_{i2}I_{i2}[(k_1 + k_2)/2]/D_{ei2} + \dots} \right) \quad (5)$$

The absolute concentration of [M] in the flow tube can be converted to the relative concentration of the molecule in the gas sample, p_M/p_0 , from the direct consideration of continuous flow dilution of the sampled air (flow rate, Φ_a) in to the carrier gas (flow rate, Φ_c):

$$\frac{p_M}{p_0} = \frac{[M]p_0}{n_0 p_g} \frac{T_g}{T_0} \frac{\Phi_c + \Phi_a}{\Phi_a} \quad (6)$$

Here, $n_0 = 2.687 \times 10^{19} \text{ cm}^{-3}$ is physical constant: Loschmidt's number, which is a reference value of concentration at standard atmospheric pressure, $p_0 = 760 \text{ Torr}$ and temperature $T_0 = 273.15 \text{ K}$ [10]. The ratio of the partial pressures p_M/p_0 is then expressed in the units of ppbv by multiplying by 10^9 .

4. Results and discussion

4.1 Determination of rate constants and product ion branching ratios. In this section, the details of studies carried out during the PhD project concerning the **ion chemistry** of a group of **esters** and a group of **hexanol isomers** is discussed. The ion chemistry of these compounds and a provide step by step overview of the whole experimental process starting from observed mass spectra and leading to determination of the rate constants is described. Predominantly, the material that was not discussed in the research articles published in impacted peer reviewed journals, as included in the Appendices A[11] and B[12], is discussed in thesis. This chapter complements and extends the published work rather than just summarising it.

Here I give one example of the reaction of hexyl acetate with H_3O^+ . The reaction proceeds via the formation of a protonated molecule, MH^+ . Partial fragmentation of the nascent MH^+ leads to the formation of $\text{C}_2\text{H}_5\text{O}_2^+$ (m/z 61) and $\text{C}_6\text{H}_{13}^+$ (m/z 85):

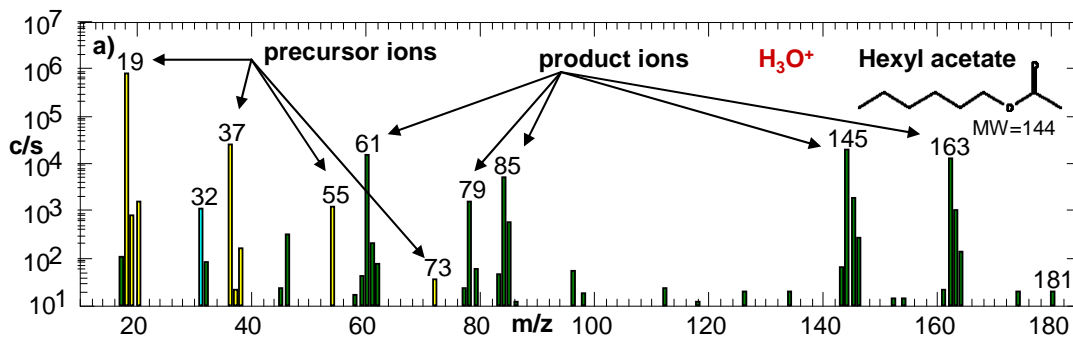
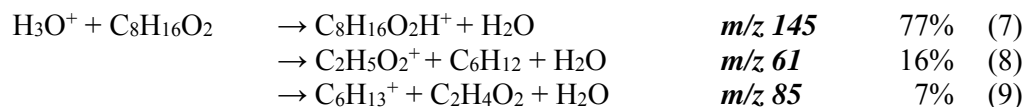


Figure 2 SIFT-MS spectra obtained as the headspace above hexyl acetate was sampled. The arrows indicate the ions resulting from the reactions of the H_3O^+ .

The format of each kinetics library entry is as follows (Table 1): After the name of the compound and the symbol of the injected ion, the number of precursor ions is given. Then, on separate lines, their m/z values are given followed by the rate constants, in units of cm^3s^{-1} , for their reactions with the indicated trace gas (in this example, hexyl acetate) and the factors, f_i , as indicated in equation (4). The f_i are simply used to multiply the acquired raw count rate of the ion with its m/z given at the beginning of the row. Normally, f_i values of 1.0 are used. However, such a simple calculation would not provide valid results in the cases when additional ion chemistry occurs (e.g. the removal of the product ions by reactions with H_2O molecules in reverse proton transfer or switching reactions) or when product ions overlap with other ions present. Values other than 1.0 can thus be used to account for the influence of humidity or for optimized calculations that do not sum all product ions (see Appendix A).

Table 1 SIFT-MS kinetics library in the format required by the SIFT-MS software for on-line calculations of the concentrations of the three selected esters, optimised for minimum cross sensitivity.

compound(ion)	Hexylacetate (H_3O^+)	Benzylacetate (H_3O^+)	Methylbenzoate (H_3O^+)
number of precursors	4 precursors	4 precursors	4 precursors
m/z k f_i	19 3.2e-9 1.0	19 3.4e-9 1.0	19 3.3e-9 1.0
	37 2.4e-9 1.0	37 2.5e-9 1.0	37 2.5e-9 1.0
	55 2.1e-9 1.0	55 2.2e-9 1.0	55 2.2e-9 1.0
	73 1.9e-9 1.0	73 2.0e-9 1.0	73 2.0e-9 1.0
number of products	5 products	3 products	3 products
m/z k f_p	61 1.0	91 1.38	137 1.236
	79 1.0	151 -0.86	155 1.088
	85 1.066	169 -0.86	153 -0.16
	145 1.088		
	163 1.088		

4.2 Inflammatory bowel disease. Inflammatory bowel disease (IBD) is a term covering a group of chronic disorders of the gastrointestinal tract that cause extensive damage and inflammation of the intestines and rectum. The primary forms of IBD are **ulcerative colitis**

(UC) and **Crohn's disease** (CD). The actual cause of IBD has not yet been elucidated, but everything indicates that it is an autoimmune disease. IBD primarily affect the age group 15 - 30. The estimated prevalence in Czech population is about 0.3 %, but accurate epidemiological data are not available. Current treatment of IBD (pharmacological or surgical) can only ameliorate the symptoms such as abdominal pain, weight loss and bloody diarrhoea, but there is no curative therapy available to date. Diagnosis of IBD is based on the presence of architectural distortion by endoscopy and CT and MRI.

Breath analysis carried out by SIFT-MS has the potential to noninvasively diagnose or even monitor the therapy of these diseases. One of the factors that cause the inflammation is free radicals (reactive oxygen species). These molecules react with the polyunsaturated fatty acids in phospholipids, the main components of cell membranes, which leads to the lipid peroxidation. In this process, **pentane** and other alkanes [13, 14] are formed as by-products [15]. The scheme of the radical chemistry is presented in the manuscript given as Appendix C, which was adopted from Spitteler *et al.* [16].

The aim of the study carried out in Prague and reported here was to develop a method for real-time quantification of **pentane** in human breath by SIFT-MS as a potential **biomarker of IBD**. Having achieved this, the method was tested by a pilot study of the analysis of the exhaled breath of a cohort of patients suffering from both CD and UC. **My specific contribution** to this collaborative study was to study **ion chemistry of pentane** in support of SIFT-MS analyses and I have also participated in **the clinical study** carried out in the hospital.

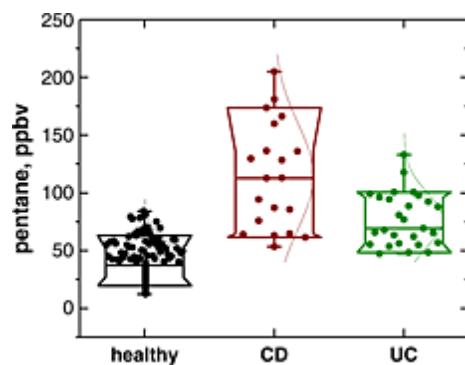


Figure 3 Box-and-whisker plots for the breath pentane concentrations in parts-per-billion by volume, ppbv, for the three cohorts – healthy, patients with CD and patients with UC.

4.3 Cystic fibrosis. Cystic fibrosis, CF, is an inherited genetic disease that is incurable despite the advances of medicine. CF affect most severely the respiratory and digestive system. The lungs of healthy individuals are covered with a thin layer of mucus, which facilitates airways stretching and allows expectoration. In patients suffering from cystic fibrosis, excessive production of mucus occurs and breathing becomes increasingly harder. The second consequence of abnormal mucus production is a risk of **bacterial infection**, because the lungs become a rich nutrient medium for bacteria [17, 18]. These bacteria, normally harmless for healthy people, cannot be removed fast enough and cause chronic respiratory infections. Repeated infections cause lung damage, which then fail. The lungs of CF patients are often colonized by by *Pseudomonas aeruginosa* (PA) [19], which is the major cause of morbidity and mortality together with *Burkholderia cepacia*.

Breath analysis could potentially be a useful non-invasive diagnostics tool of PA infection and analyses of VOCs emitted from PA cultures are becoming an important part of the search for volatile breath markers of PA lung infection [20]. This approach offers a way since the detection by SIFT-MS of HCN emission from cultures of PA *in vitro* [21, 22]. The pilot

experiment carried out in Španěl's research group in collaboration with the microbiologists from the National Institute of Public Health using SPME-GC/MS has clearly indicated a presence of **methyl thiocyanate** in PA cultures (Appendix D). Thus, my specific contribution to this collaborative study were the experimental determinations of kinetics of reactions of H_3O^+ , NO^+ and O_2^{++} with methyl thiocyanate (MW73) and formulation of a method which allows its real time quantification using SIFT-MS.

The primary ion chemistry of methyl thiocyanate is relatively simple (see Figure 4): H_3O^+ reacts with this compound only by proton transfer reaction resulting in a primary product ion at m/z 74 CH_3SCNH^+ . This protonated molecule associates and forms hydrates at m/z 92, 110, 128.

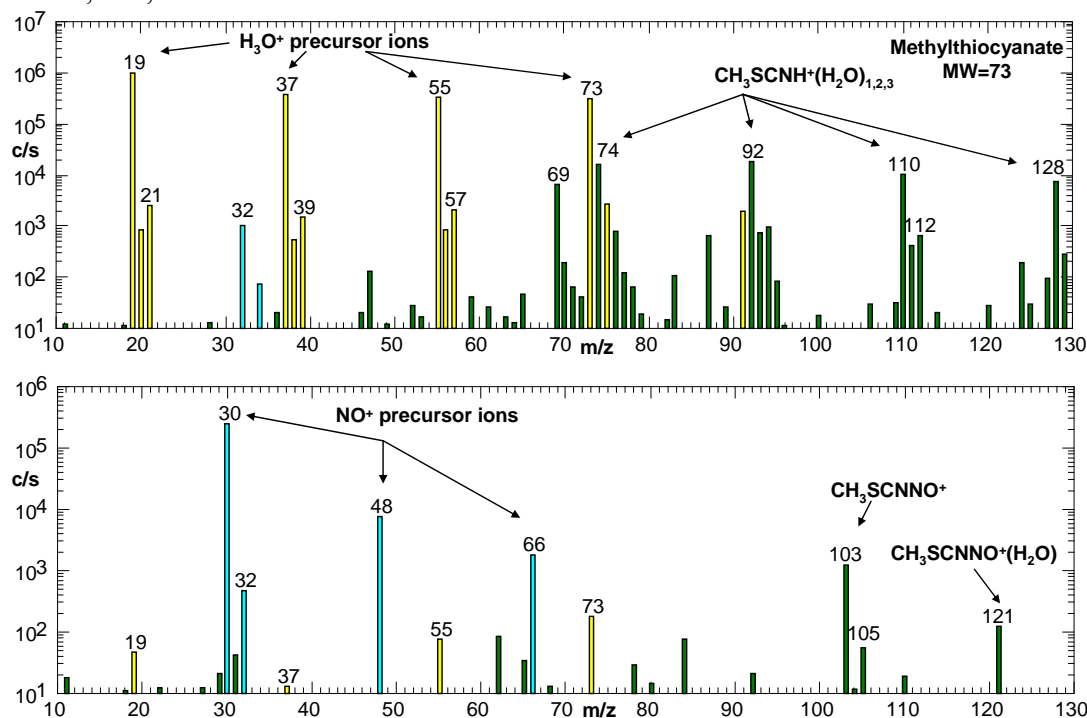
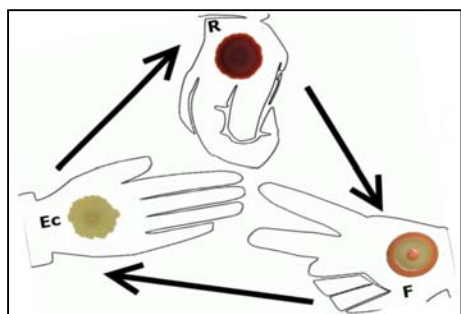


Figure 4 SIFT-MS spectra obtained while the headspace weak aqua solution of methyl thiocyanate was introduced into the flow tube. Ion signal intensities are given in counts per second, c/s, plotted against the mass-to-charge ratio, m/z . In these two spectra are shown the major product ions of CH_3SCN with H_3O^+ and NO^+ . Protonated molecule and its hydrates at H_3O^+ spectrum and an adduct at NO^+ spectrum.

The collisional rate constant for the formation of the protonated product CH_3SCNH^+ is $4.6 \times 10^{-9} \text{cm}^3 \text{s}^{-1}$ according to the calculation using the parameterized trajectory theory [23] and the known polarisability and dipole moment of CH_3SCN ($a=7.62 \times 10^{-24} \text{cm}^3$ and $m=3.56 \text{D}$, respectively).

4.4 Population dynamics. Although bacteria do not have any sensory organs, they somehow can perceive what is happening around them and it is possible that they are able to



communicate using chemical signals. As a model system to investigate such communication I have studied VOCs released by bacterial colonies in selected clones of *Serratia rubidaea* (R, red and smooth), *Serratia marcescens* (F, fountain shape colonies) and *Escherichia coli* (Ec) grown on nutrient rich media. These three organisms form an interesting ecosystem of competing species and their concurrent growth may result in the “survival of the fittest” scenario. In a ternary system like this the interaction

can be seen as an analogue of the well known game “rock-paper-scissor. Whilst the ultimate result of the population dynamics can be observed by counting of surviving colony forming units, it would be much more instructive to follow them in the real time using volatile signatures of the individual clones. It was the objective of this study to identify such chemical. Six different cultures were prepared: monocultures of R, Ec, F, and binary systems of REc, FEc, RF. The SIFT-MS instrument was set in the full scan mode with the scan duration of 120 s in the mass spectral range 10 – 100 m/z and all three precursor ions were cycled. Using this experimental protocol the time evolution of the headspace composition above each sample was monitored and analysed. One experiment took **24 hours** and typically 273 mass spectra were obtained for each precursor ion in each case (for more detail see the published paper in Appendix E). The data were evaluated using the statistical method of principal component analysis (PCA). Several compounds (ammonia, acetone, acetoin, acetaldehyde, acetic acid, ethanol and propanol) were identified and quantified in the bacterial headspace.

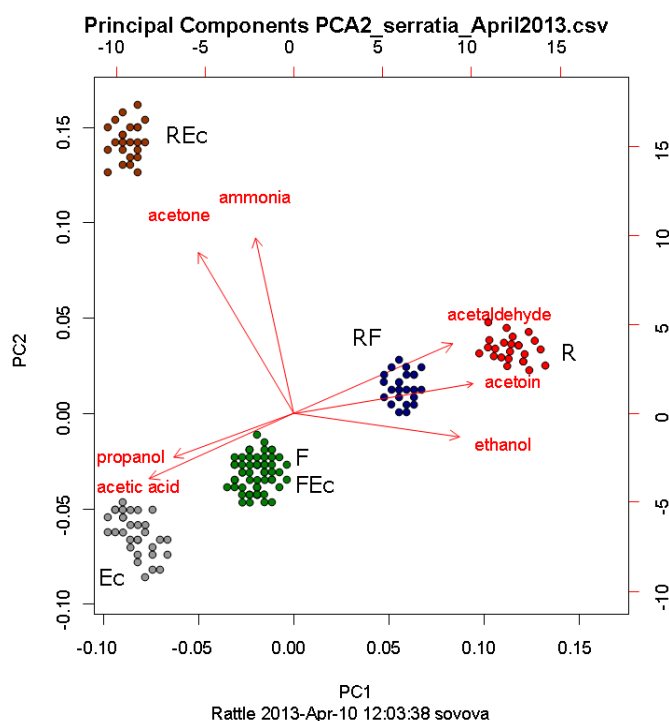


Figure 5 PCA analysis of 3 different bacterial species and their binary mixtures. The red arrows indicate the directions of increasing concentrations of variables: acetone, ammonia, acetoin, acetaldehyde, ethanol, propanol and acetic acids. The F colony and FEc binary mixture are located near the middle of the arrows. This means that these two colonies have rather average values of variables concentration in contrast to the other samples. The population of Ec is characterized by a higher concentration of acetic acid and propanol, R colony is dominated

by acetoin, acetaldehyde and ethanol. RF goes in the direction which is close to the R colony. The binary system of REc (with the significant reduction of propanol level) is then characterized by acetone and ammonia.

SIFT-MS analyses have been successfully used for non-destructive and quantitative monitoring of the population dynamics of bacterial cultures in real time. Another motivation for this research was that the identification of bacteria based on the composition of VOCs released by their metabolism can be used also to diagnose and monitor the occurrence and progression of bacterial infections. The theme of bacterial fingerprinting is currently at the forefront of research interest in mass spectrometry; however, most of the approaches require isolation and cultivation of bacteria before the ionisation, which is usually destructive. SIFT-MS can potentially be used to screen groups of patients at risk for early signs of infection and to choose optimal therapy for its eradication. Thus, such methodology would be not only applied to the research in the field of population dynamics in fundamental ecology and biodiversity, but also in medicine.

4.5 Phytovolatilization of selenium. The aim of this study was to develop a method for the real time quantification of volatile forms of selenium (Se) which are formed during the process of phytovolatilization (Figure 6). Some plant species are known to be Se accumulators; they are growing on seleniferous soils and are thus tolerant to high concentrations of Se; on the other hand most plants are Se non-accumulators [24]. The main forms of Se in soils or water are inorganic water soluble selenate (SeO_4^{2-}) or selenite (SeO_3^{2-}) ions. The ions are assimilated using sulphur transporters and enzymes and transformed into volatile forms, including dimethylselenide, $(\text{CH}_3)_2\text{Se}$, and dimethyldiselenide, $(\text{CH}_3)_2\text{Se}_2$ [25].

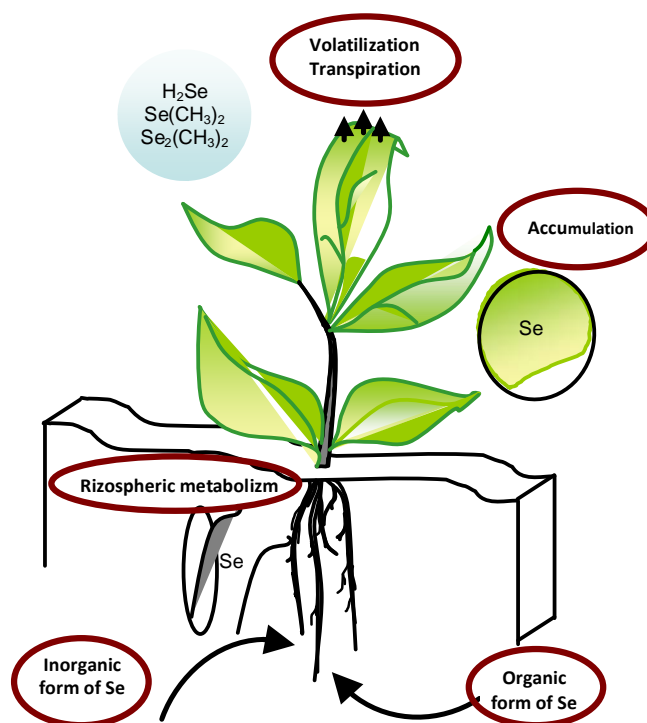


Figure 6 The scheme of selenium (Se) uptake, transport, accumulation in the root and to the shoots and transpiration of volatile forms.

The ion-molecule reaction of $(\text{CH}_3)_2\text{Se}$ with H_3O^+ produced protonated product ions at m/z 107-109-111-113, these several observed masses being due to the isotopic composition of Se: ^{76}Se (9.02 %), ^{78}Se (23.52 %), ^{80}Se (49.82 %) and ^{82}Se (9.19 %). Note that the isotopic composition is very useful when a complex mixture is analysed, it helps to distinguish overlaps in the spectra.

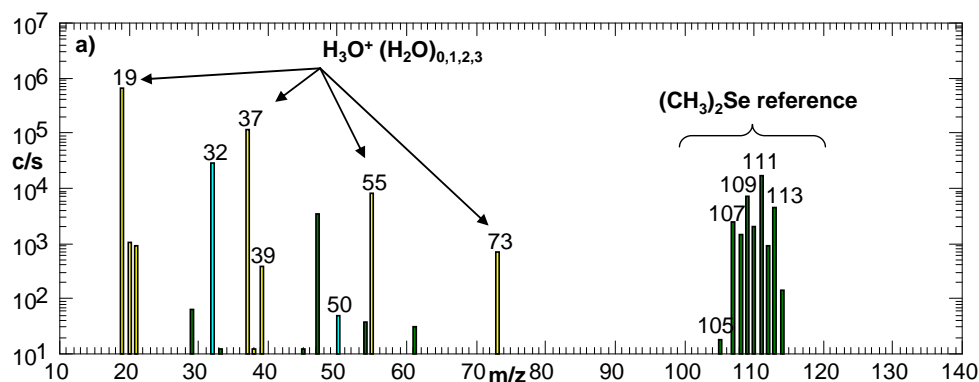


Figure 7 The SIFT-MS spectrum obtained as the headspace above dimethyl selenide solution is sampled. The arrows indicate the ions resulting from the reactions of the H_3O^+ precursor ions.

In the present study, the maize plant (*Zea mays*) cultivated with an enhanced supply of Se nutrients was used. $(\text{CH}_3)_2\text{Se}$ was quantified in real time using the MIM mode of SIFT-MS analysis. The kinetics library entries (Table 2) used for quantification were constructed to calculate the absolute concentration of DMSe $(\text{CH}_3)_2\text{Se}$ from the ion signals at m/z 107 and 109 multiplied by a coefficient of 3 (corresponding approximately to the contribution of isotopologues $1/(0.0902 + 0.2352)$) to avoid contribution of the overlapping signal of ethanol at m/z 83.

Table 2 Optimized kinetic library entries in the format used in SIFT-MS software

DMSe (H_3O^+)	DMSe 107,109only (H_3O^+)	DMSe (NO^+)	DMSe (O_2^+)
4 precursors	4 precursors	3 precursors	1 precursor
19 2.6e-9 1.0	19 2.6e-9 1.0	30 2.0e-9 1.0	32 2.3e-9 1.0
37 2.0e-9 1.0	37 2.0e-9 1.0	48 1.8e-9 1.0	3 products
55 1.8e-9 1.0	55 1.8e-9 1.0	66 1.7e-9 1.0	106 1.075
73 1.6e-9 1.0	73 1.6e-9 1.0	2 products	108 1.307
3 products	2 products	108 1.307	110 2.0
107 1.075	107 3.0	110 2.0	
109 1.307	109 3.0		
111 2.0			

4.6 Explosives. In cooperation between Explosia a.s in Pardubice (Czech Republic) and the Heyrovský Institute, a research project codename “TANDEM” has been carried out in this field. This project was funded by the Czech Ministry of Trade and Industry. The aim of this research project was to study highly explosives materials and their decomposition products and finally to develop a detection apparatus.

The initial research combined two powerful techniques of Laser Induced Breakdown Spectroscopy, LIBS and Selected Ion Flow tube Mass Spectrometry, SIFT-MS. The combination of these two methods allowed the study and characterization of the products of explosions using microscopic scale laboratory experiments without the need to initiate macroscopic explosions of test charges weighing several grams or more (see Figure 8).

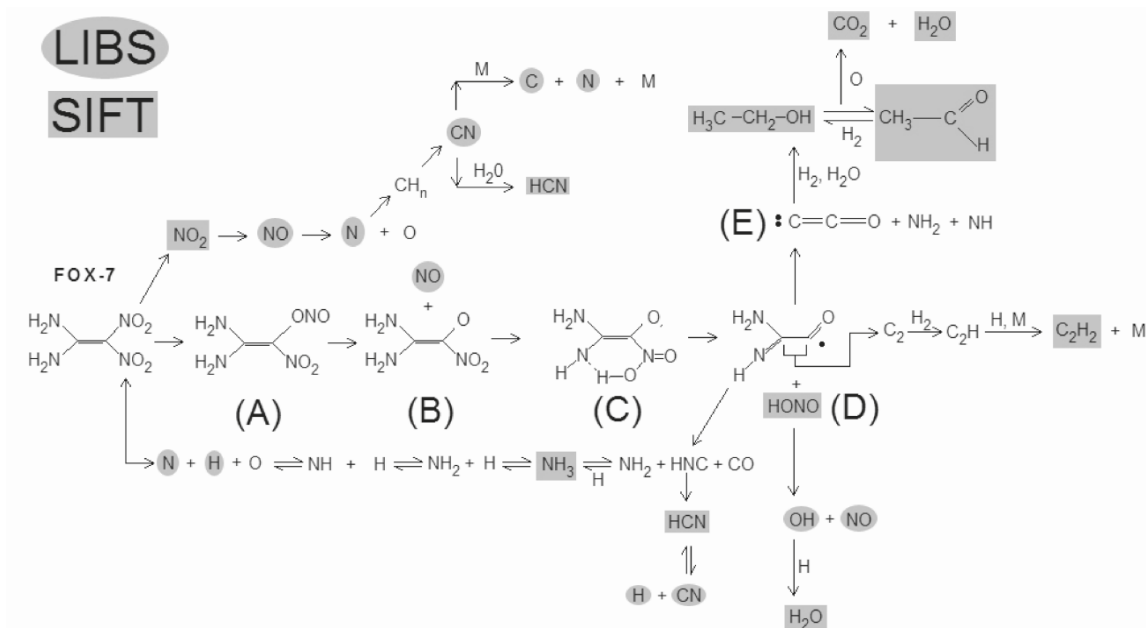


Figure 8 A reaction scheme for the decomposition of FOX-7 and the formation of the final stable products.

5. Conclusions

This thesis summarises my research in a variety of subjects related to SIFT-MS from fundamental ion chemistry, via development of analytical methods to their use in interdisciplinary areas of research including microbiology, plant physiology, explosives and medical diagnostics. In the population dynamics study I have also touched upon advanced statistical analyses of data obtained using SIFT-MS.

There are several outcomes of my work:

6. I have obtained kinetic data for ion-molecule reaction of group of esters and hexanol isomers. The rate constants and product ion branching ratio were published in peer reviewed journals for almost 40 reactions (Appendices A and B). The methodology for optimization of kinetics library entries avoiding cross sensitivity was formulated and in detail described in Appendix A.
7. A new method for selective monitoring of volatile selenium forms such as dimethylselenide, dimethyldiselenide, hydrogen selenide and methyl selenol was described (Appendix F).
8. The ion chemistry of pentane and methyl thiocyanate relevant for the real time monitoring of these two biomarkers of inflammatory bowel disease and cystic fibrosis in human breath was investigated (Appendices C and D).
9. Results of a pilot study of population dynamics of three different bacterial species that has been carried out non-destructively and quantitatively in real time (Appendix E).
10. A reaction scheme for the decomposition of FOX-7 has been proposed on the basis of SIFT-MS analyses of fumes (Appendix G).

These results will hopefully be useful for other researchers working in the individual areas of science where SIFT-MS analyses of volatile compounds help in understanding of biological or chemical processes.

6. References

- [1] K. Goodner, R. Rouseff, Practical analysis of flavor and fragrance materials, Wiley-Blackwell, 2011.
- [2] A. Herrmann, The chemistry and biology of volatiles, Wiley Online Library, 2010.
- [3] A. Amann, D. Smith, Volatile Biomarkers: Non-Invasive Diagnosis in Physiology and Medicine in, Elsevier, Oxford UK, 2013.
- [4] K. Demeestere, J. Dewulf, B. De Witte, H. Van Langenhove, Sample preparation for the analysis of volatile organic compounds in air and water matrices, *J. Chromatogr. A*, 1153 (2007) 130-144.
- [5] J. Koziel, M.Y. Jia, J. Pawliszyn, Air sampling with porous solid-phase microextraction fibers, *Anal. Chem.*, 72 (2000) 5178-5186.
- [6] D. Smith, P. Španěl, Application of ion chemistry and the SIFT technique to the quantitative analysis of trace gases in air and on breath, *International Reviews in Physical Chemistry*, 15 (1996) 231-271.
- [7] P. Španěl, K. Dryahina, D. Smith, Microwave plasma ion sources for selected ion flow tube mass spectrometry: Optimizing their performance and detection limits for trace gas analysis, *International Journal of Mass Spectrometry*, 267 (2007) 117-124.
- [8] D. Smith, A. Pysanenko, P. Španěl, Ionic diffusion and mass discrimination effects in the new generation of short flow tube SIFT-MS instruments, *International Journal of Mass Spectrometry*, 281 (2009) 15-23.
- [9] P. Španěl, D. Smith, Influence of water vapour on selected ion flow tube mass spectrometric analyses of trace gases in humid air and breath, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 14 (2000) 1898-1906.
- [10] P. Španěl, K. Dryahina, D. Smith, A general method for the calculation of absolute trace gas concentrations in air and breath from selected ion flow tube mass spectrometry data, *Int. J. Mass Spectrom.*, 249 (2006) 230-239.
- [11] K. Sovová, K. Dryahina, P. Španěl, Selected ion flow tube (SIFT) studies of the reactions of H_3O^+ , NO^+ and O_2^+ with six volatile phytogetic esters, *Int. J. Mass Spectrom.*, 300 (2011) 31-38.
- [12] D. Smith, K. Sovová, P. Španěl, A selected ion flow tube study of the reactions of H_3O^+ , NO^+ and O_2^+ with seven isomers of hexanol in support of SIFT-MS, *Int. J. Mass Spectrom.*, 319 (2012) 25-30.
- [13] J. Kokozska, R.L. Nelson, W.I. Swedler, M. John Skosey, H. Abcarian, Determination of inflammatory bowel disease activity by breath pentane analysis, *Dis. Colon Rectum*, 36 (1993) 597-601.
- [14] M.A. Pelli, G. Trovarelli, E. Capodicasa, G.E. De Medio, M. Gabrio Bassotti, Breath alkanes determination in ulcerative colitis and Crohn's disease, *Dis. Colon Rectum*, 42 (1999) 71-76.
- [15] B.E. Wendland, E. Aghdassi, C. Tam, J. Carrier, A.H. Steinhart, S.L. Wolman, D. Baron, J.P. Allard, Lipid peroxidation and plasma antioxidant micronutrients in Crohn disease, *The American journal of clinical nutrition*, 74 (2001) 259-264.
- [16] G. Spiteller, Peroxidation of linoleic acid and its relation to aging and age dependent diseases, *Mechanisms of ageing and development*, 122 (2001) 617-657.
- [17] P.K. Singh, A.L. Schaefer, M.R. Parsek, T.O. Moninger, M.J. Welsh, E. Greenberg, Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms, *Nature*, 407 (2000) 762-764.
- [18] P.O.F.P. EXACERBATIONS, Cystic fibrosis pulmonary exacerbations, *The Journal of pediatrics*, 148 (2006) 259-264.
- [19] C. Stover, X. Pham, A. Erwin, S. Mizoguchi, P. Warrenner, M. Hickey, F. Brinkman, W. Hufnagle, D. Kowalik, M. Lagrou, Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen, *Nature*, 406 (2000) 959-964.
- [20] F.J. Gilchrist, C. Razavi, A.K. Webb, A.M. Jones, P. Španěl, D. Smith, W. Lenney, An investigation of suitable bag materials for the collection and storage of breath samples containing hydrogen cyanide, *J. Breath Res.*, 6 (2012) 036004.
- [21] W. Carroll, W. Lenney, T. Wang, P. Španěl, A. Alcock, D. Smith, Detection of volatile compounds emitted by *Pseudomonas aeruginosa* using selected ion flow tube mass spectrometry, *Pediatr. Pulmonol.*, 39 (2005) 452-456.
- [22] F.J. Gilchrist, A. Alcock, J. Belcher, M. Brady, A. Jones, D. Smith, P. Španěl, K. Webb, W. Lenney, Variation in hydrogen cyanide production between different strains of *Pseudomonas aeruginosa*, *European Respiratory Journal*, 38 (2011) 409-414.
- [23] T. Su, W.J. Chesnavich, Parametization of the ion-polar molecule collision rate-constant by trajectory calculations, *Journal of Chemical Physics*, 76 (1982) 5183-5185.
- [24] N. Terry, A.M. Zayed, M.P. de Souza, A.S. Tarun, Selenium in higher plants, *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 51 (2000) 401-432.
- [25] M.P. de Souza, C.M. Lytle, M.M. Mulholland, M.L. Otte, N. Terry, Selenium assimilation and volatilization from dimethylselenoniopropionate by Indian mustard, *Plant Physiology*, 122 (2000) 1281-1288.

Curriculum vitae

Personal

Born 28 December 1984, Mladá Boleslav

Higher education

- 2009 - present: PhD study: Physical chemistry
Charles University in Prague
Faculty of Science
Passed exams including Cambridge English: Preliminary (PET),
Physical chemistry, Mass spectrometry, Phytoremediation,
Passed final PhD state examination in physical chemistry, 25
March 2013
- 2007 - 2009: MSc study: Environmental chemistry, Charles University in
Prague
Faculty of Science
MSc thesis title: Study of explosive materials using
spectroscopic methods
- 2004 - 2007: BSc study: Environmental chemistry, Charles University in
Prague
Faculty of Science
BSc thesis title: High resolution FTIR spectroscopy and gas
chromatography study of decomposition products of PET
material

Previous employment

- 2013 – present: Secretary of the board of J. Heyrovský Institute of physical
chemistry, AVCR, v. v. i.
- 2009 – present: J. Heyrovský Institute of physical chemistry, AVCR, v. v. i.
Dolejšková 3, Prague
Department of mass spectrometry
Postgraduate student
- 2008: Institute of Physics, AVCR, v. v. i.
Application of spectroscopic measurements in the plasma
research
12 month part-time contract as laboratory assistant
- 2006 - 2009: J. Heyrovský Institute of physical chemistry, AVCR, v. v. i.
Department of Fourier transform (FT) and laser spectroscopy
Undergraduate student

Membership

- Czech society for mass spectrometry
- Jan Marek Marci spectroscopic society
- Association of the Czech Chemical Societies

Publications in peer reviewed journals with impact factor

1. Dryahina K., Španěl P., Pospíšilová V., **Sovová K.**, Hrdlička L., Machková N., Lukáš M. and David Smith: Quantification of pentane in exhaled breath, a potential biomarker of bowel disease, using selected ion flow tube mass spectrometry *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **27**, 1983 (2013).
2. **Sovová K.**, Čepel J., Markoš A. and Španěl P.: Real time monitoring of population dynamics in concurrent bacterial growth using SIFT-MS quantification of volatile metabolites *Analyst* **138**, 4795 (2013).
3. Shestivska V., Španěl P., Dryahina K., **Sovová K.**, Smith D., Musílek M., Nemeč A.: Variability in the concentrations of volatile metabolites emitted by genotypically different strains of *Pseudomonas aeruginosa* *J. Appl. Microbiol.* **113**, 701 (2012).
4. **Sovová K.**, Shestivska V. and Španěl P.: Real-time quantification of traces of biogenic volatile selenium compounds in humid air by selected ion flow tube mass spectrometry *Anal. Chem.* **84**, 4979 (2012).
5. Smith D., **Sovová K.** and Španěl P.: A selected ion flow tube study of the reactions of H_3O^+ , NO^+ and O_2^{++} with seven isomers of hexanol in support of SIFT-MS *Int. J. Mass spectrom.* **319**, 25 (2012).
6. Shestivska V., Nemeč A., Dřevínek P., **Sovová K.**, Dryahina K. and Španěl P.: Quantification of methyl thiocyanate in the headspace of *Pseudomonas aeruginosa* cultures and in the breath of cystic fibrosis patients by selected ion flow tube mass spectrometry *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **25**, 2459 (2011).
7. Civiš M., Civiš S., **Sovová K.**, Dryahina K., Španěl P., Kyncl M.: Laser Ablation of FOX-7: Proposed Mechanism of Decomposition *Anal. Chem.* **83**, 1069 (2011).
8. **Sovová K.**, Dryahina K., Španěl P.: Selected ion flow tube, SIFT, studies of the reactions of H_3O^+ , NO^+ and O_2^{++} with six volatile phytogetic esters *Int. J. Mass spectrom.* **300**, 31 (2011).
9. **Sovová K.**, Dryahina K., Španěl P., Kyncl M., Civiš S.: A study of the composition of the products of laser-induced breakdown of hexogen, octogen, pentrite and trinitrotoluene using selected ion flow tube mass spectrometry and UV-Vis spectrometry *Analyst* **135**, 1106 (2010).
10. **Sovová K.**, Ferus M., Matulková I., Dryahina K., Španěl P., Dvořák O., Civiš S.: A study of thermal decomposition and combustion products of disposable polyethylene terephthalate (PET) plastic using high resolution Fourier transform infrared spectroscopy, selected ion flow tube mass spectrometry and gass chromatography mass spectrometry *Molecular Phys.* **106**, 1205 (2008).

Proceedings included in WoS

11. Cihelka J., Matulková I., **Sovová K.**, et al.: Optical Emission Spectroscopy of High-Power Laser-Induced Dielectric Breakdown in Molecular Gases and Their Mixtures: Investigating Early Stages of Plasma Chemical Action in Planetary Atmospheres *Origins of life and evolution of biospheres* **39**, 227 (2009).
12. **Sovová K.**, Matulková I., Kamas M., et al.: SIFT-MS Analysis of Molecular Gas Mixtures Exposed to High-Power Laser Plasmas: Laboratory Simulation of High-Energy-Density Events in Early Earth's Atmospheres *Origins of life and evolution of biospheres* **39**, 249 (2009).

Lectures at scientific meetings

1. Summer school of mass spectrometry, Pec pod Sněžkou 20.9.-24.9. 2010: SIFT-MS: VOCs emitted by plants.
2. "SIFT-MS; current and proposed applications" ISTM, Medical School, Keele University, Thornburrow Drive, Stoke-on-Trent. Wednesday November 3rd 2010: SIFT-MS: VOC emissions from plants.
3. Second Ion Chemistry Meeting Dolní Malá Úpa, May 27 – 29. 2011: Real-time SIFT-MS detection of volatile forms of selenium released by plants.
4. Czech conference on mass spectrometry 19.-21.10. 2011, Hradec Králové: Selected Ion Flow Tube Mass Spectrometry.
5. 64. congress of the Association of Czech and Slovak Chemical Societies 25. - 27. June 2012 Olomouc: Selected Ion Flow Tube Mass Spectrometry.

Research projects

- Co-ordinating & responsible person of " Key Activity" number 7 (KA 7) (January 2013 – May 2014) in project: BIO-OPT-XUV (BOX) Research Team Advancement at the Faculty of Biomedical Engineering, Czech Technical University in Prague. Project duration: July 1, 2011 – May 30, 2014.
- Principal investigator of GAUK (Charles University Foundation) student project: Study of volatile compounds released by plants during phytoremediation of contaminated soil using selected ion flow tube mass spectrometry, SIFT-MS (2010-2013).
- Collaborator at: Selected ion flow tube mass spectrometry studies of volatile compounds emitted by bacterial cultures (PI Patrik Španěl, 2009-2012, Czech Science Foundation).
- Collaborator at: Research of new methods of detection of explosives (PI Svatopluk Civiš, 2007-2010, Czech ministry of trade and industry).

Short scientific visits in the UK and abroad

Keele University and Imperial College London (1 week in 2010)
Open University (SIFT-MS laboratory, Dr. C. Turner) (1 week in 2010)
Faculty of Bioscience Engineering - Organic Chemistry Environmental Organic Chemistry and Technology: EnVOC, Coupure links 653, 9000 Ghent – Belgium
(1 week in 2012).