

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Analytická chemie



Mgr. Timotej Strmeň

Hmotnostní spektrometrie s chemickou ionizací za atmosférického tlaku při
nízkých průtocích: konstrukční řešení a využití

Atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry at low flows:
construction and applications

Disertační práce

Vedoucí disertační práce: doc. RNDr. Josef Cvačka, Ph.D.

Konzultant: doc. RNDr. Zuzana Bosáková, Csc.

Praha 2020

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem předloženou závěrečnou práci vypracoval samostatně s využitím uvedených pramenů a literatury. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědom toho, že případné využití výsledků získaných v této práci mimo Univerzitu Karlovu je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne

.....

Předkládaná disertační práce obsahuje výsledky z mého Ph.D. studia na Katedře analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v letech 2016 – 2020. Experimentální práce byla provedena na pracovišti Skupiny hmotnostní spektrometrie v Ústavu organické chemie a biochemie Akademie věd České republiky.

Práce byla finančně podpořena Grantovou agenturou České republiky (č. 16-01639S) a projektem SVV (č. 260440).

Vedoucí práce: doc. RNDr. Josef Cvačka, Ph.D.

Skupina hmotnostní spektrometrie

Ústav organické chemie a biochemie Akademie věd České republiky

Katedra analytické chemie

Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy

Konzultant: doc. RNDr. Zuzana Bosáková, CSc.

Katedra analytické chemie

Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy

Poděkování

V prvním řadě bych chtěl poděkovat svému vedoucímu doc. Josefovi Cvačkovi za všechny cenné rady přes celou dobu studia a velmi příjemný přístup. Také bych chtěl poděkovat všem lidem na oddělení hmotnostní spektrometrie (současným i bývalým) za příjemné pracovní prostředí, které na oddělení vládlo a rovněž za jejich pomoc, zejména RNDr. Vladimírovi Vrkoslavovi. Můj vděk patří i Vývojovému centru ÚOCHB, zejména Ondřejovi Pačesovi a Jiřímu Smržovi za pomoc při technickém řešení iontových zdrojů. Na závěr bych chtěl poděkovat svým rodičům, přítelkyni a všem, kteří mě při studiu podporovali.

Klíčová slova: chemická ionizace za atmosférického tlaku, korónový výboj, virtuální tryska s koaxiálním tokem plynu, reakce v plynné fázi, kryt iontového zdroje, hmotnostní spektrometrie, mikročip, miniaturizace, zmlžovač, otevřený trubicový zmlžovač

Key words: atmospheric pressure chemical ionization, corona discharge, gas dynamic virtual nozzle, gas-phase reactions, ion source housing, mass spectrometry, microchip, miniaturization, nebulizer, open tubular nebulizer

Seznam publikací použitých v práci

- I. Strmeň T, Vrkoslav V, Bosáková Z, Cvačka J: APCI Mass Spectrometry at Low Flow Rates: Importance of Ion Source Housing. *Rapid Commun Mass Spectrom* **34**, e8722 (2020)
- II. Strmeň T, Vrkoslav V, Pačes O, Cvačka J: Evaluation of an ion source with a tubular nebulizer for microflow atmospheric pressure chemical ionization. *Monatsh Chem* **149**, 987-994 (2018)
- III. Vrkoslav V, Rumlová B, Strmeň T, Nekvasilová P, Šulc M, Cvačka J: Applicability of low-flow atmospheric pressure chemical ionization and photoionization mass spectrometry with a microfabricated nebulizer for neutral lipids. *Rapid Commun Mass Spectrom* **32**, 639-648 (2018)
- IV. Vrkoslav V, Rumlová B, Strmeň T, Cvačka J: Temperature-programmed capillary high-performance liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionization–mass spectrometry for analysis of fatty acid methyl esters. *J Sep Sci*, **43**, 2579-2588 (2020)

Prohlášení o autorství

Jako zástupce spoluautorů prohlašuji, že Mgr. Timotej Strmeň (dále jen „autor“) se podílel na publikovaných pracích následujícím způsobem:

I. Autor zkonstruoval otevřenou variantu komerčního APCI zdroje a prováděl veškerá měření v publikaci, podílel se i na psaní publikace.

(podíl 80 %)

II. Autor prováděl veškerou optimalizaci zdroje a veškerá měření v publikaci, také se podílel na psaní publikace.

(podíl 80 %)

III. Autor měřil spektra týkající se konstrukce kalibrační křivky pro komerční APCI zdroj a mikročipový APCI zdroj.

(podíl 10 %)

IV. Autor měřil spektra týkající se konstrukce kalibrační křivky pro komerční APCI zdroj a mikročipový APCI zdroj.

(podíl 10 %)

doc. RNDr. Josef Cvačka, Ph.D.

.....

Abstrakt (CZ)

V první části disertační práce se porovnávají ionizační reakce v APCI zdroji v přítomnosti, respektive nepřítomnosti krytu iontového zdroje (angl. „housing“). Pro účel studie těchto rozdílů se modifikoval komerční APCI zdroj tak, aby ho bylo možné použít jako otevřený i jako uzavřený zdroj. V pozitivním módu byla pozorovaná rozdílná ionizace u nepolárních sloučenin rozpuštěných v aprotických rozpouštědlech (toluenu, chloroformu a sírouhliku). Zatímco v otevřeném zdroji převažovaly protonované molekuly nepolárních sloučenin, v uzavřeném zdroji byly většinou přítomny jejich radikalkationty. Zvýšená protonace v otevřeném zdroji byla způsobena pronikáním molekul vody do ionizačního prostoru. Voda kromě toho reagovala v otevřeném zdroji s alkyny za vzniku iontu $[M + 19]^+$. Fragmentační studie potvrdila, že se jednalo o 2-methylketony, které vznikaly adicí vody na alkyny dle Markovnikovho pravidla. Tím se potvrdil výskyt artefaktu v otevřeném zdroji, který může představovat komplikaci při kvalitativních analýzách. Dále bylo v otevřeném zdroji pozorováno potlačení tvorby iontu $[M + 55]^{+}$ atmosférickým kyslíkem. V uzavřeném zdroji vznikal ion $[M + 55]^{+}$ reakcí nenasycených sloučenin s acetonitrilem, přičemž jeho fragmentací bylo možné zjistit polohu dvojně vazby nenasycené sloučeniny. Z toho vyplývá, že některé metody používané v uzavřeném komerčním APCI jsou v otevřených APCI zdrojích nepoužitelné. V negativním módu se v otevřeném zdroji potlačovaly reakce na bázi přenosu náboje. Na základě těchto poznatků se ukázal uzavřený zdroj jako lepší alternativa, protože na rozdíl od otevřeného zdroje lze přesně kontrolovat reakční prostředí přidávkem žádaných aditiv (jako vody nebo kyslíku) do mobilní fáze, nebo nebulizačního plynu.

V druhé části práce bylo popsáno testování třech iontových zdrojů APCI pro nízké průtoky vzorku (přibližně 0,05 až 10,0 $\mu\text{l}/\text{min}$). Jednalo se o mikročipový APCI zdroj, APCI zdroj s otevřeným trubcovým zmlžovačem a GDVN-APCI zdroj. Všechny tři zdroje se ukázaly jako lepší varianty pro analýzu přímou infuzí, než komerční APCI zdroj díky stabilnějšímu signálu a nižším limitům detekce testovaných látek. APCI zdroj s otevřeným trubcovým zmlžovačem měl oproti ostatním zdrojům výhodu v tom, že jeho konstrukce byla jednoduchá a levná. Pro spojení HPLC s MS ale není vhodný kvůli pozorovanému chvostování píků a paměťových efektů. Pro změnu mikročipový APCI zdroj (demonstrováno již v jiných pracích) a GDVN-APCI zdroj jsou použitelné pro systém LC/MS.

APCI zdroj s otevřeným trubcovým zmlžovačem i mikročipový APCI zdroj byly citlivé na velmi vysoké teploty, při kterých po zplynění přicházejícího kapalného vzorku docházelo po určité době k ucpání kapiláry přivádějící kapalnou vzorek. Naproti tomu GDVN-APCI zdroj generoval místo par rozpouštědel úzký sprej. Kapky spreje stříkající do vzdálenosti přibližně 10 cm se odpařovaly dál za místem, kde se sprej generoval, pomocí odporového topení. Díky tomu nebylo v případě GDVN-APCI zdroje pozorováno ucpání kapiláry přivádějící kapalnou vzorek. Výhody GDVN-APCI zdroje poukazují na jeho velký potenciál pro spojení HPLC a MS.

Abstract (EN)

The first part of the thesis describes the ionization reactions in the APCI source in the presence (enclosed configuration) and absence (open configuration) of the ion source housing. Commercial APCI source was modified and used in enclosed, as well as open configuration. All other parameters were kept the same (including the source geometry). In the positive mode, the biggest differences were observed for non-polar analytes dissolved in aprotic solvents like toluene, chloroform and carbon disulfide. Protonated species were dominant in the open configuration, while radical cations were mostly present in the enclosed configuration. The excessive protonation in open ion source was caused by the diffusion of water vapor molecules into the ionization region from the atmosphere. Water vapor molecules were also responsible for the formation of an ion $[M + 19]^+$ from alkynes in the open configuration. The fragmentation study confirmed that the ion $[M + 19]^+$ was a 2-methylketone formed by the addition reaction. The formation of such artifacts can pose problems in qualitative analysis. On the other hand, the ion $[M + 55]^{++}$ was observed in the enclosed ion source as a reaction product of unsaturated compounds with acetonitrile solvent molecules. Its fragmentation can be used for the double bond determination of the original unsaturated compound. However, the formation of the ion $[M + 55]^{++}$ was suppressed in the open configuration by atmospheric oxygen. Atmospheric oxygen also suppressed charge transfer reactions in the negative mode in open configuration due to its positive electron affinity. In conclusion, an enclosed configuration was demonstrated to be a better alternative, since the ionization in the enclosed APCI source can be controlled by adding additives into the mobile phase or the nebulizing gas.

The second part of the thesis describes three low-flow APCI sources (for approximately 0.05 – 10.0 $\mu\text{l}/\text{min}$ liquid flow rates), namely microchip APCI source, APCI with an open tubular nebulizer, and GDVN-APCI source. The latter two were developed in our laboratories. All three sources were producing a stable signal and were demonstrated to be suitable for direct infusion analysis. Besides, limits of detection of all tested compounds were lower in low-flow APCI sources than in commercial high-flow APCI source. APCI with open tubular nebulizer had the simplest and cheapest construction among all ion sources; however, observed peak tailing and memory effects prevent its use in LC/MS system. On the other hand, microchip APCI source (as demonstrated also in other works) and GDVN-APCI source were suitable for the hyphenation of HPLC with MS.

APCI source with the open tubular nebulizer and microchip APCI source used high temperatures for the nebulization of liquid samples. The heater had to be situated very near to the sample delivery capillary for the proper nebulization. Therefore, both ion sources were prone to clogging of the sample delivery capillary. On the other hand, GDVN-APCI source generated a narrow spray of droplets to 10 cm distance, so the heating could be placed few milliliters behind the orifice of the sample delivery capillary. As a result, no clogging of the sample delivery capillary was observed. At this moment, GDVN-APCI source has great potential to be commercialized.

Obsah

SEZNAM ZKRATEK	12
1. TEORETICKÝ ÚVOD	14
1.1. CHEMICKÁ IONIZACE ZA ATMOSFÉRICKÉHO TLAKU.....	14
1.1.1. REAKCE PROBÍHAJÍCÍ V CHEMICKÉ IONIZACI ZA ATMOSFÉRICKÉHO TLAKU	14
1.1.1.1. ZÁKLADNÍ POJMY	14
1.1.1.2. REAKCE V POZITIVNÍM MÓDU	15
1.1.1.3. REAKCE V NEGATIVNÍM MÓDU	16
1.1.1.4. VLIV FUNKČNÍCH SKUPIN NA IONIZACI V APCI	17
1.1.1.5. VLIV ROZPOUŠTĚDLA NA IONIZACI V APCI	17
1.1.1.6. VLIV NEBULIZAČNÍHO PLYNU NA IONIZACI V APCI	18
1.1.1.7. REAKCE V APCI V PROSTŘEDÍ SUPERKRITICKÉ KAPALINY U SUPERKRITICKÉ FLUIDNÍ CHROMATOGRAFIE	19
1.1.2. VYUŽITÍ CHEMICKÉ IONIZACE ZA ATMOSFÉRICKÉHO TLAKU S HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIÍ	20
1.1.2.1. APCI BEZ SEPARAČNÍ METODY	20
1.1.2.2. APCI JAKO IONTOVÝ ZDROJ PRO GC/MS	20
1.1.2.3. APCI JAKO IONTOVÝ ZDROJ PRO HPLC/MS	21
1.1.2.4. APCI JAKO IONTOVÝ ZDROJ PRO SFC/MS	22
1.2. ZAVÁDĚNÍ KAPALNÉHO VZORKU DO IONTOVÉHO ZDROJE	22
1.2.1. FYZIKÁLNÍ PRINCIPY ZMLŽOVÁNÍ (ATOMIZACE)	22
1.2.1.1. FYZIKÁLNÍ PRINCIPY ZMLŽOVÁNÍ KAPALINY	22
1.2.1.2. REŽIMY ZMLŽOVÁNÍ KAPALINY BEZ POUŽITÍ EXTERNÍCH VLIVŮ	23
1.2.1.3. REŽIMY ZMLŽOVÁNÍ KAPALINY S VNĚJŠÍMI VLIVY	25
1.2.2. ZAVÁDĚNÍ KAPALINY DO IONTOVÝCH ZDROJŮ	26
1.2.2.1. ZAVÁDĚNÍ KAPALNÉHO VZORKU DO ZDROJE S ELEKTRONOVOU A CHEMICKOU	26

IONIZACÍ	
1.2.2.2. ZMLŽOVÁNÍ V ZDROJI PRO TERMOSPŘEJOVOU IONIZACI	27
1.2.2.3. ZMLŽOVÁNÍ V ESI ZDROJI	27
1.2.2.4. ZMLŽOVÁNÍ V APCÍ/APPI ZDROJI	28
1.3. KONSTRUKCE APCÍ ZDROJŮ	29
1.3.1. KONSTRUKCE KOMERČNÍCH APCÍ ZDROJŮ PRO KONVENČNÍ PRŮTOKY	29
1.3.2. VÝVOJ KONSTRUKCÍ APCÍ PRO NÍZKÉ PRŮTOKY	31
2. MATERIÁLY A INSTRUMENTACE	34
3. CÍLE PRÁCE	37
4. SHRNUÍ VÝSLEDKŮ A DISKUZE	38
4.1. CHEMICKÉ REAKCE V APCÍ PŘI NÍZKÝCH PRŮTOCÍCH VZORKU	38
4.1.1. SESTAVENÍ OTEVŘENÉHO ZDROJE	38
4.1.2. VLIV LABORATORNÍHO PROSTŘEDÍ NA IONIZACI PŘI VYSOKÉM A NÍZKÉM PRŮTOKU VZORKU	39
4.1.3. VÝBĚR ROZPOUŠTĚDEL A ANALYTŮ PRO NÍZKÉ PRŮTOKY	40
4.1.4. ROZDÍLY V IONIZACI V POZITIVNÍM MÓDU	40
4.1.5. ROZDÍLY V IONIZACI V NEGATIVNÍM MÓDU	45
4.1.6. ROZSAH FRAGMENTACE V OTEVŘENÉ A UZAVŘENÉ KONFIGURACI	47
4.1.7. SHRNUÍ K OTEVŘENÉ A UZAVŘENÉ KONFIGURACI	48
4.2. EXPERIMENTÁLNÍ IONTOVÉ ZDROJE	49
4.2.1. APCÍ ZDROJ NA BÁZI OTEVŘENÉHO TRUBICOVÉHO ZMLŽOVAČE	49
4.2.1.1. HLEDÁNÍ OPTIMÁLNÍ KONSTRUKCE	49
4.2.1.2. CHARAKTERISTIKA SIGNÁLU	51
4.2.1.3. POROVNÁNÍ OTEVŘENÉHO TRUBICOVÉHO ZMLŽOVAČE S KOMERČNÍM APCÍ ZDROJEM	52
4.2.1.4. VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE S OTEVŘENÝM TRUBICOVÝM ZMLŽOVAČEM	55

4.2.1.5. SHRnutí – OTEVŘENÝ TRUBICOVÝ ZMLŽOVAČ	56
4.2.2. APCI NA BÁZI MIKROČIPU	56
4.2.2.1. POROVNÁNÍ DETEKCE V MIKROČIPOVÉM A KOMERČNÍM APCI ZDROJI	56
4.2.2.2. POROVNÁNÍ KONSTRUKCE MIKROČIPOVÉHO ZDROJE S OTEVŘENÝM TRUBICOVÝM ZMLŽOVAČEM	58
4.2.3. GDVN-APCI ZDROJ	59
4.2.3.1. VÝROBA GDVN ZMLŽOVAČE	59
4.2.3.2. CHARAKTERISTIKA SPREJE	61
4.2.3.3. KONSTRUKCE GDVN-APCI IONTOVÉHO ZDROJE	63
4.2.3.4. GDVN V APCI ZDROJI	64
4.2.3.5. SHRnutí KE GDVN-APCI ZDROJI	67
5. ZÁVĚR	68
SEZNAM PŘEDNÁŠEK A PLAKÁTOVÝCH SDĚLENÍ	69
SEZNAM CITACÍ	70
PŘÍLOHA: PUBLIKACE POUŽITÉ V TÉTO PRÁCI	81

Seznam zkratek

- APCI – chemická ionizace za atmosférického tlaku (atmospheric pressure chemical ionization)
- APPI – fotoionizace za atmosférického tlaku (atmospheric pressure photoionization)
- CI – chemická ionizace
- EI – elektronová ionizace
- ESI – elektrosprejová ionizace (electrospray ionization)
- FIA – průtoková injekční analýza (flow injection analysis)
- GC – plynová chromatografie
- GC/MS – plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií (gas chromatography – mass spectrometry)
- GDVN – virtuální tryska s koaxiálním tokem plynu (gas dynamic virtual nozzle)
- HePI – ionizace v heliové plazmě (helium plasma ionization)
- HILIC – chromatografie hydrofilních interakcí (hydrophilic interaction chromatography)
- HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high-performance liquid chromatography)
- HRMS – vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrie (high resolution mass spectrometry)
- ICP-MS – hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (inductively coupled plasma mass spectrometry)
- LC/MS – kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií (liquid chromatography – mass spectrometry)
- LOD – limit detekce (limit of detection)
- MS – hmotnostní spektrometrie (mass spectrometry)
- nano-HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie s průtoky v oblasti nl/min (nano-high performance liquid chromatography)
- NP – normální fáze (normal phase)
- RP – reverzní fáze (reversed phase)
- RSD – relativní směrodatná odchylka (relative standard deviation)
- SFC – superkritická fluidní chromatografie (supercritical fluid chromatography)
- TEMPO – (2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-yl)-oxyl

TSI – termosprejová ionizace (thermospray ionization)

1. Teoretický úvod

1.1. Chemická ionizace za atmosférického tlaku

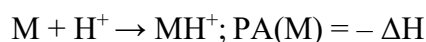
Chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI) je měkká ionizační technika, která k primární ionizaci v plynné fázi využívá elektrony o nízké energii. Tyto elektrony se mohou generovat některými radioaktivními zářiči β^- , nebo v korónovém výboji. První článek, v kterém byla popsána chemická ionizace za atmosférického tlaku ve spojení s hmotnostní spektrometrií (MS), byl publikován v roce 1973 Horningem et al, kde se jako ionizační prvek použil radioaktivní zářič β^- , isotop niklu ^{63}Ni . Kapalný vzorek se zaváděl do proudu ohřátého plynu (N_2), který jím byl následně přiváděn do 200 °C vyhřátého zdroje obsahujícího plíšek radioaktivního ^{63}Ni . Elektrony generované plíškem poté ionizovaly molekuly ohřátého plynu N_2 a sledem ion-molekulových reakcí poté docházelo k ionizaci analytů. Vzniklé ionty poté postupovaly do hmotnostního spektrometru[1]. Rok poté následovaly první experimenty zabývající se využitím APCI v kapalinové chromatografii s hmotnostní detekcí (LC/MS)[2]. K představení prvního komerčního rozhraní pro kapalinovou chromatografii s hmotnostní detekcí ale došlo až v roce 1989[3]. Elektrosprejová ionizace (ESI) později začala být mnohem rozšířenější než APCI a vystřídala ji v mnohých (ale ne všech) aplikacích[4]. Na základě dat z Web of Science byl za posledních 5 let (mezi 26.6.2015 až 26.6.2020) ve spojení LC/MS použitý ESI zdroj v 91,0 % článcích, zatímco APCI zdroj v 7,6 %. Zbylé 1,4 % připadají třetímu iontovému zdroji na bázi fotoionizaci za atmosférického tlaku (APPI). ESI zdroje dnes sice jednoznačně dominují, APCI ale zůstalo důležitou alternativou pro analýzy analytů, které pomocí ESI zdroje nelze jednoduše ionizovat.

1.1.1. Reakce probíhající v chemické ionizaci za atmosférického tlaku

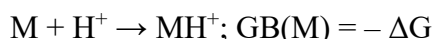
1.1.1.1. Základní pojmy

Mezi základní veličiny, které popisují chování analytů při ionizaci, patří protonová afinita, bazicita v plynné fázi, ionizační energie a elektronová afinita. První dvě veličiny popisují vlastnosti molekul, které vystupují při přenosu protonu a poslední dvě vlastnosti molekul při přenosu elektronu. Jejich definice jsou následující[5]:

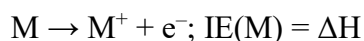
- Protonová afinita (PA) je záporná hodnota změny enthalpie u reakce v plynné fázi mezi danou molekulou a protonem. Vyjadřuje se nejčastěji v kJ/mol.



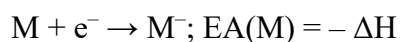
- Bazicita v plynné fázi (GB) je záporná hodnota změny Gibbsovy energie u protonační reakce. Vyjadřuje se také v kJ/mol.



- Ionizační energie (IE) molekuly je minimální energie potřebná k vypuzení elektronu z molekuly. Většinou se vyjadřuje v elektronvoltech (eV).



- Elektronová afinita (EA) je negativní hodnota změny enthalpie uvolněné při připojení elektronu na neutrální molekulu při 0 K. Většinou se vyjadřuje v elektronvoltech (eV).



Reakce v APCI jsou závislé na tom, jaké částice se v ionizační oblasti nachází. Zahrnuje to druh nebulizačního plynu[6], rozpouštědla i analytu. Dále reakce závisí na parametrech, které se použijí při analýze (teplota APCI sondy, napětí na vstupní kapiláře apod.). Díky tomu se molekuly chovají velmi individuálně a dochází k rozmanitým reakcím, z kterých bude při popisu jednotlivých reakcí vždy uvedených jen několik příkladů. Přestože se v APCI vyskytují tak rozmanité reakce, jsou výsledná spektra ve většině případů jednoduchá a přehledná.

1.1.1.2. Reakce v pozitivním módu

Mezi základní reakce, které vedou ke vzniku kladně nabitých iontů, patří zejména přenos protonu, přenos náboje a tvorba kladně nabitých aduktů protonovaných analytů s molekulou rozpouštědla (obrázek 1). Obecně uznávaná sekvence reakcí vedoucí k protonaci začíná u APCI reakcí neutrální molekuly dusíku (který se používá jako nebulizační nebo nosný plyn) s elektronem generovaném korónovým výbojem. Dojde ke vzniku radikalkationu molekuly dusíku, což má za následek sled ion-molekulových reakcí vedoucích ke vzniku protonovaného klastru (agregátu) vody, která může být přítomna v rozpouštědle přiváděném do ionizační oblasti. K přenosu protonu poté dochází v případě, když se protonovaný klaster vody $H(H_2O)_n^+$ setká s molekulou, jejíž protonová afinita je vyšší, než protonová afinita odpovídajícího neutrálního klastru vody $(H_2O)_n$. Obdobně mohou protonovat i protonované klastry jiných rozpouštědel[7]. Další hojně zastoupenou reakcí v APCI je přenos náboje. Přenos náboje nastává tehdy, když má analyt nižší ionizační energii než molekula, z které byl vytvořen radikalkation reagující s analytem. Je zejména častá při použití nepolárních aprotických rozpouštědel, jakým je třeba sirouhlík[8], methyl-terc-butylether[9] nebo toluen[10]. Třetí druh iontů, které jsou často detegovány v pozitivním módu, jsou nabitě molekulární adukty. Vznikají zejména adicí protonované molekuly rozpouštědla. Pozorované jsou například adukty protonovaného analytu s acetonitrilem[11],[12] isopropylalkoholem[13] nebo methanolem[14]. Kromě adice může rozpouštědlo ještě reagovat s analytem za vzniku kovalentní vazby, jako například nenasycené sloučeniny s molekulami acetonitrilu za vzniku iontu $[M + C_3H_5N]^{+}$ (cit. [15]). Aby se odlišily od aduktů, které jsou na analyt vázané nekovalentně, budou se v této práci označovat jako „reakční produkty“.

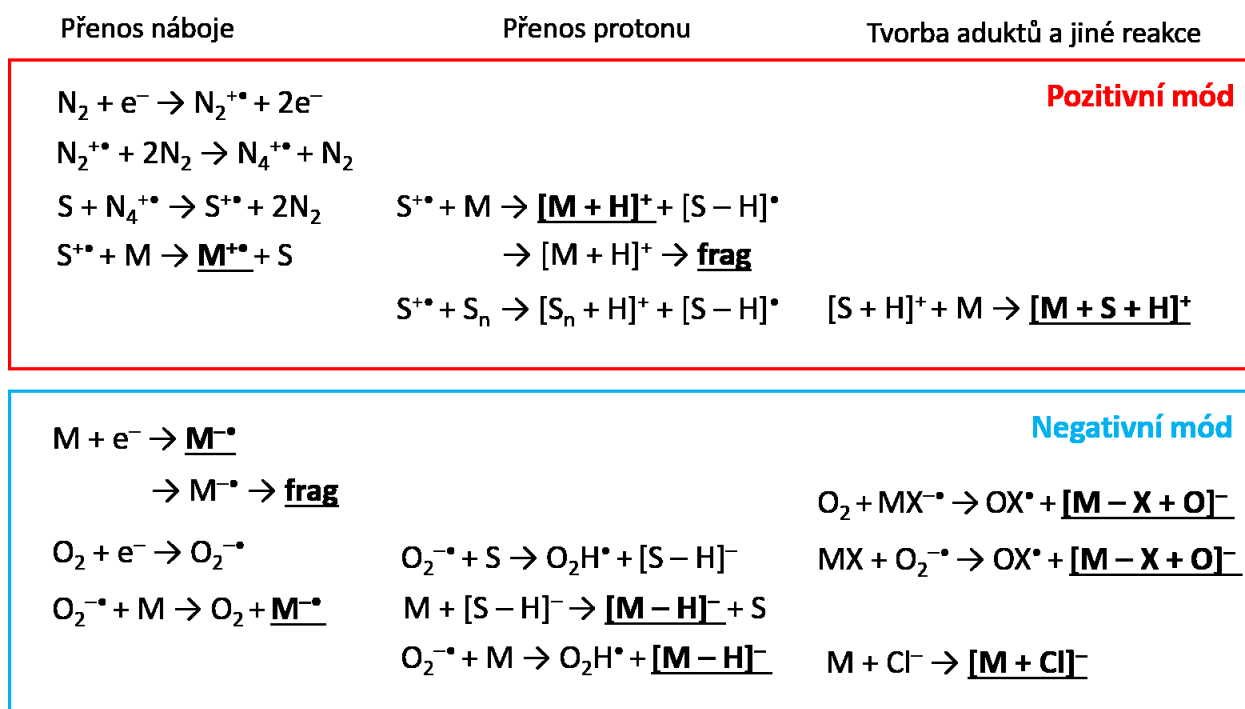
Kromě výše popsaných reakcí, které vedou k ionizaci molekul, mohou v APCI také probíhat různé eliminační reakce bez kolizní aktivace. Může se jednat o termální rozklad neutrálního analytu a následnou ionizaci fragmentů, nebo o fragmentaci již nabitých iontů s přebytkem energie. U látek s hydroxylovými skupinami dochází ke ztrátě jedné[16],[17],[18],[19] nebo vícero[20],[21] molekul vody. U některých látek (například cyklických polysiloxanů s methylovými skupinami) dochází ke ztrátě neutrální molekuly methanu[22]. Často také

dochází ke štěpení esterových vazeb a následné neutrální ztrátě mastné kyseliny u triacylglycerolů[23], cholesteryl esterů[24] a voskových esterů[25], nebo se štěpí etherové vazby glykolipidů a odštěpuje se neutrální molekula glukosy[24],[26] nebo kyselina glukoronová u glukuronátů[27]. Popsána byla i substituční reakce hydroxylové skupiny za molekulu acetonitrilu u alkoholů a diolů[28].

1.1.1.3. Reakce v negativním módu

V negativním módu převažují čtyři typy reakcí: deprotonace, elektronový záchyt (který může být disociativní nebo nedisociativní), přenos náboje a adice aniontu (obrázek 1)[29]. Deprotonace je v podstatě opakem protonace, ke které snadno dochází u sloučenin s kyselým vodíkem. K elektronovému záchytnu dochází u těch analytů, které mají pozitivní hodnotu elektronové afinity. Když molekula zůstane po záchytnu pohromadě, jde o nedisociativní záchyt, když se rozpadne, jedná se o disociativní záchyt. Důležitou molekulou, která podstupuje v APCI nedisociativní elektronový záchyt, je molekulární kyslík. Jeho elektronová afinita je pozitivní (0,45 eV[30]) a vzniká O_2^- , který pokud se setká s analytem s vyšší elektronovou afinitou, může mezi nimi dojít k přenosu náboje. Jak elektronový záchyt, tak přenos náboje vedou ke vzniku radikálaniontu, na rozdíl od deprotonace. Posledním typem reakcí je adice aniontu na neutrální molekulu. Jedná se o obdobu adice z pozitivního módu, přičemž klasickým příkladem v negativním módu je adice chloridového aniontu za vzniku $[M + Cl]^-$ ([29],[31]).

Eliminační reakce bez kolizní aktivace jsou přítomné i v negativním módu. Například z organických sloučenin obsahujících fluor se můžou odštěpovat molekuly HF za tvorby $[M - nHF]^-$ iontů[32]. Nitroaromatické sloučeniny ochotně ztrácí molekulu NO za tvorby $[M - NO]^-$ iontů[33]. V negativním módu se u halogenovaných sloučenin tvoří také fenoxidové anionty $[M - X + O]^-$, kde X je atom halogenu[34],[35] nebo například i ionty $[M - X]^-$ a $[M - HX]^-$, kde X také představuje atom halogenu[36],[37].



Obrázek 1: Nejčastější reakce v pozitivním a negativním módu APCI ionizace. Písmeno M představuje molekulu analytu a písmeno S molekulu rozpouštědla.

1.1.1.4. Vliv funkčních skupin na ionizaci v APCI

Funkční skupiny v molekulách do značné míry rozhodují, jakým procesem se bude molekula ionizovat. Jasně je to vidět při ionizaci substituovaných polyaromatických uhlovodíků (dále jen deriváty) analyzovaných v methanolu[38]. V pozitivním módu podstupují ketoderiváty, chinonové deriváty, aminoderiváty a další deriváty obsahující dusík výhradně protonaci, zatímco hydroxyderiváty podstupují protonaci i přenos náboje. V negativním módu byl pozorován pouze elektronový záchyt u nitroderivátů, ketoderivátů (s výjimkou cyklopenta[cd]pyren-3[4H]-onu a 9-fluorenonu) a chinonových derivátů (kromě 2-methylantrachinonu). Deprotonace byla pro změnu hlavním ionizačním procesem u aminoderivátů, hydroxyderivátů a některých ketoderivátů [38].

1.1.1.5. Vliv rozpouštědla na ionizaci v APCI

Rozhodující dopad na ionizaci rozpuštěných analytů má použité rozpouštědlo. V APCI-MS zdroji je možné použít jakékoliv rozpouštědlo, limitací je kompatibilita rozpouštědel s hmotnostním spektrometrem (zejména vzhledem k teplotě varu). U reverzní vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (HPLC) s reverzní fází (RP) s použitím APCI-MS se používají polární rozpouštědla a jejich kombinace, jako voda (nebo vodný roztok kyseliny mravenčí, octové, nebo octanu amonného), methanol, isopropylalkohol a acetonitril, (například v [20],[39],[40],[41],[42],[43],[44],[45],[46],[47]). Chromatografie hydrofilních interakcí (HILIC) v kombinaci s APCI-MS také využívá polární mobilní fáze (například acetonitril/voda s mravenčanem amonným[48], acetonitril s vodou okyselenou kyselinou trifluorocetovou[49], nebo směs acetonitril/voda okyselená kyselinou mravenčí[50]), toto spojení je ale mnohém méně časté. V analýze HPLC/APCI-MS s normální fází (NP) analýze

jsou u jednoduchých systémů rozpouštědel převážně používaná nepolární rozpouštědla s malou příměsí polárnějších rozpouštědel, jako například hexan s isopropylalkoholem[51], nebo acetonem[52], ethoxynonafluorobutan s isopropylalkoholem[13], cyklohexan s vodným tetrahydrofuranem[53] a isooktan s diisopropyletherem[54]. U tříložkových systémů se jako příměs k nepolárnímu rozpouštědлу použily dvě polárnější rozpouštědla, například k hexanu s ethanol a diethylamin[55], k heptanu ethanol a isopropylalkohol[56] a k chloroformu isopropylalkohol a kyselina octová[57].

U RP-HPLC a HILIC je převážně pozorovaná protonace, jelikož se často používá gradientová eluce, kde aspoň jedna složka je protické rozpouštědlo. U NP-HPLC se v uvedených příkladech [13],[51],[52],[53],[54],[55],[56],[57] díky přidavku polární složky rovněž tvoří protonované molekuly nebo molekuly od nich odvozené (například $[M + H - H_2O]^+$) a v téměř všech případech byly použity k jejich detekci nebo kvantifikaci. Výjimkou byly například tokoferoly, které se v mobilní fázi složené z isooktanu a diisopropyletheru (93:7) ionizovaly jako radikalkationty[54].

I v negativním módu závisí ionizace některých analytů na složení mobilní fáze. Například v rámci RP chromatografie se ionizace fluorotelomerových alkoholů liší ve směsi methanol/voda a acetonitril/voda. V soustavě methanol/voda probíhala převážně deprotonace, zatímco v soustavě acetonitril/voda převažoval disociativní elektronový záchyt. Autoři to připisují odlišné protonové afinitě methanol-vodných a acetonitril-vodných klastrů[58]. Dalším příkladem je ionizace alifatických isokyanátových derivátů 4-nitro-7-piperazinobenzoxadiazolu, kde v methanolu převažují radikál anionty a v acetonitrilu deprotonované molekuly[59]. Je to obrácený trend než v případě zmíněných fluorotelomerových alkoholů. Je proto nezbytně důležité přistupovat ke každému analytu individuálně, protože chování v různých rozpouštědlech se nedá vždy předvídat a hodně také závisí i na struktuře analytů. V normální chromatografii s detekcí v negativním módu se především využívá větší účinnosti ionizace elektronovým záchytem v nepolárních rozpouštědlech v porovnání s rozpouštědly používanými v RP chromatografii. Například gradientová eluce o složení hexan/ethanol (fáze A čistý hexan. Fáze B hexan:ethanol 7:3) byla použita k analýze pentafluorobenzylových derivátů prostaglandinů, které podstupovaly disociativní elektronový záchyt[60].

1.1.1.6. Vliv nebulizačního plynu na ionizaci v APCI

Značný vliv na ionizaci v APCI má nebulizační plyn, který slouží k rozprašování a sušení přiváděného kapalného vzorku z HPLC systému. V systému plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (GC/MS) závisí na složení jak nebulizačního plynu z APCI sondy, tak nosného plynu přicházejícího z kolony plynové chromatografie (GC).

Jako nebulizační plyn se většinou v HPLC/APCI-MS systémech používá dusík, protože je levný a je ho snadné vyrobit ve velkém množství. Studie porovnávající různé nebulizační plyny (kromě dusíku ještě například syntetický vzduch, oxid uhličitý nebo helium) poukazují na změny ve spektrech podle použitého plynu[6],[61],[62],[63]. Například u ionizace acetonitrilu byly ve vzduchu pozorovány ionty $(CH_3CN)_2^{2+}$ a $[(CH_3CN)_3H]^+$, které byly za

použití dusíku zastoupeny méně a v oxidu uhličitém nebyly pozorovány vůbec. Autoři to připisují schopnosti oxidu uhličitého efektivněji rozbít acetonitrilové oligomery[6]. Polyaromatické uhlovodíky se při použití oxidu uhličitého protonovaly víc než v dusíku a při použití syntetického vzduchu probíhal přenos náboje ve větší míře než u dusíku[63]. Platilo to pro případy, když se jako rozpouštědlo použil acetonitril nebo dichlormethan[61]. Při použití helia byla pro změnu pozorována větší fragmentace nasycených uhlovodíků než při použití oxidu uhličitého. Autoři to připisují větší ionizační energii helia, což vede ke vzniku energetičtějších He^+ částic, než jsou radikalkationy jiných plynů. Srážka He^+ s analytem následně vede k přenosu větší energie než v případě CO_2^+ a analyt má větší tendenci se rozpadnout. V další studii byla pozorována rozdílná ionizace v pozitivním módu například u 5- α -cholestanu, který se v heliu a dusíku ionizoval převážně jako M^+ a v syntetickém vzduchu jako $[\text{M} - \text{H}]^+$. Obecně se v této práci u syntetického vzduchu a helia pozorovala lepší ionizační účinnost než u dusíku[62]. V syntetickém vzduchu se také pozorují adukty s oxidem dusnatým[64]. Dopad nebulizačního plynu na ionizaci v negativním módu u HPLC/APCI-MS zatím nebyl studován, lze ale předpokládat podobný vliv jako při detekci v negativním módu u GC/APCI-MS systémů popsaných níže.

V GC/APCI-MS systémech je také nejčastěji používán dusík jako nebulizační plyn, který se ve zdroji míchá s nosným plynem přicházejícím z GC, nejčastěji heliem (například v [65],[66],[67],[68],[69],[70]), nebo dusíkem[71]. Ionizace ve směsi helia s dusíkem bez rozpouštědla je v pozitivním módu podobná jako ionizace v HPLC/APCI-MS. Byly pozorovány produkty reakcí přenosu náboje, protonace, eliminačních reakcí a substitučních reakcí[65]. Původ protonovaných molekul byl připisován stopovým množstvím vody v použitých plynech. V negativním módu má dopad na ionizaci přítomnost molekulárního kyslíku v nebulizačním plynu. Například v nepřítomnosti kyslíku byly pozorovány radikalanionty

2,3,7,8-tetrachlordibenzodioxinu, zatímco v přítomnosti kyslíku s ním dioxin reagoval za vzniku neutrálního 4,5-dichlor-1,2-bezochinonu a distonický radikalaniontu té samé sloučeniny[72].

1.1.1.7. Reakce v APCI v prostředí superkritické kapaliny u superkritické fluidní chromatografie

Superkritická fluidní chromatografie (SFC) používá superkritický oxid uhličitý jako mobilní fázi, často s modifikátory jako methanol nebo isopropylamin[73]. Jako nebulizační plyn se používá dusík, takže v konečném důsledku se ve zdroji vytváří směs plynného CO_2 , N_2 a par modifikátoru. V pozitivním módu v přítomnosti methanolu dominuje protonace[74],[75],[76],[77] v negativním módu u některých látek soupeří deprotonace s elektronovým záchytem[74], u jiných převládá nebo probíhá pouze jeden, a to záhyt/přenos elektronu[76], nebo deprotonace[74],[77],[78], což závisí na strukturách analytů.

1.1.2. Využití chemické ionizace za atmosférického tlaku s hmotnostní spektrometrií

APCI zdroj se může použít jak k analýzám bez použití separační techniky, jako jsou analýza přímou infuzí a průtokovou injekční analýzou (FIA, flow injection analysis), tak k propojení GC, HPLC a SFC s MS. APCI zdroj je určen zejména pro neutrální, málo až středně polární látky s nízkou až střední molekulovou hmotností[79],[80]. Uplatnění proto dnes nachází při analýze látek, které jsou v ESI těžko ionizovány, jako například lipofilní vitamíny[81]. Důležitost APCI zdroje shrnují práce o jeho využití v lipidomice[82],[83] farmaceutickém průmyslu[84], klinické a forenzní toxikologii[85], nebo analýzách životního prostředí[86]. S APCI lze také analyzovat organokovové sloučeniny[87],[88]. Jak organokovové sloučeniny, tak mnoho dalších látek lze ionizovat pomocí ESI i APCI, proto množství prací porovnává zdroje ESI a APCI při jejich analýze[89],[90],[91],[92],[93],[94]. V APCI zdroji se doporučují měřit zejména organokovové sloučeniny rozpustné v nepolárních rozpouštědlech, pro které není ESI účinná[88]. V některých případech se zjistilo, že APCI sice má větší toleranci k matričním efektům[91],[94], v ESI se však dosahuje větší citlivosti a nižšího limitu detekce (LOD)[91],[92],[93],[94].

1.1.2.1. APCI bez separační metody

K některým studiím, například u vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrie (HRMS), studiu procesů ionizace nebo fragmentačních mechanismů, není nutná separace, a tudíž ani samotné použití separačních metod. Pokud se kapalný vzorek zavádí do MS bez ředění, jedná se o metodu přímé infuze. Druhou metodou je FIA, při které se nastříkuje vzorek pomocí ventilu do proudu mobilní fáze. Těmito metodami lze studovat třídy látek, nebo komplexní směsi. Například u karotenoidů byla oběma metodami sledovaná fragmentace, která je charakteristická pro každý isomer karotenoidů a může se použít k jejich odlišení[95]. Metoda přímé infuze byla použita k analýze těžkých uhlovodíků ve frakci lehkého drceného odpadu z automobilů, bílé elektroniky a dalších domácích spotřebičů, při které bylo identifikováno přes 4000 signálů z MS[96]. Při studiu procesů ionizace se metoda přímé infuze použila například při sledování tvorby komplexů halogenových aniontů a NO_3^- se sulfonamidovými receptory v negativním módu[97]. Přímá infuze se také použila ke studiu ionizace látek obsažených v ropě, přičemž se zjistilo, že v čistém toluenu je podpořena tvorba radikálkationtů uhlovodíků a také byla pozorována zvýšená citlivost, než ve směsi toluen:methanol[10]. APCI s průtokovou injekční analýzou byla například použita ke kvantifikaci analytů (například polyethylenglykolů)[98], nebo pro kvantitativní sledování průběhu chemických reakcí[99].

1.1.2.2. APCI jako iontový zdroj pro GC/MS

První konstrukce GC/APCI-MS se objevily v sedmdesátých letech, avšak mnohem větší komerční úspěch měly vakuové zdroje pro elektronovou ionizaci (EI) a chemickou ionizaci (CI). Po několik desetiletí bylo pak spojení GC/APCI považováno za exotické[66]. Až v 90-tých letech se začaly objevovat práce, které využívají spojení GC/APCI-MS, přičemž v patentech z roku 1992[100] a 1993[101] se uvádí nedocnění tohoto spojení. Dnes je

GC/APCI iontový zdroj nabízen komerčně[102] a jeho aplikacemi se zabývá nemálo prací[65],[67],[68],[69],[71],[103],[104],[105],[106].

Spojení GC/APCI-MS je přirozeně využíváno u látek, které mají nízký bod varu a lze je bez problémů zplynit a separovat na GC. Jedná se tedy zejména o nízkomolekulární lipidy (například mastné kyseliny, které se kvůli jejich vysoké polaritě derivatizují na methylestery[103] nebo TMS deriváty[67]), dále látky s nízkou až střední molekulovou hmotností, jako fenolické látky [71], TMS deriváty malých karboxylových kyselin a sacharidů[67], a také polutanty životního prostředí jako chlorované pesticidy[104] a další pesticidy rozmanité struktury[68], dioxiny[105], polychlorované bifenyly, polybromované difenylethery[106] a bromované zpomalovače hoření[65]. Vyvinuta byla také metoda pro sledování psychoaktivních látek (opiátů, derivátů methamfetaminu, antidepresiv a dalších), přičemž autoři demonstrovali využití této metody ve forenzní analýze[69].

1.1.2.3. APCI jako iontový zdroj pro HPLC/MS

APCI se bezpochyby nejčastěji používá právě v HPLC/MS systémech. Na rozdíl od ESI je APCI kompatibilní se širokou škálou rozpouštědel a je schopna ionizovat i nepolární látky, proto se může použít jak v reverzním, tak normálním HPLC a v HILIC módu. Na reverzní fázi lze s APCI-MS analyzovat nepolární sloučeniny jako jsou lipidy, v pozitivním módu jsou to například nasycené a nenasycené uhlovodíky[61], polyaromatické uhlovodíky[107], substituované aromatické uhlovodíky[108], methylestery mastných kyselin[109], voskové estery[25],[110] diacylglyceroly[111], triacylglyceroly[112],[113],[114],[115], ceramidy[116], karotenoidy a lipofilní vitaminy[117],[118],[119],[120],[121],[122],[123], steroly[124],[125] a z polyketidů například aflatoxiny[126]. V negativním módu byla demonstrována separace velmi dlouhých mastných kyselin z krve[127] a pentafluorbenzylových derivátů mastných kyselin[60]. V klinické analýze lze APCI využít například pro analýzu steroidů[128],[129].

Polární látky lze také separovat a detegovat v HPLC/APCI-MS systému. Příkladem je analýza biogenních aminů, kde byla jejich molekulová hmotnost zvýšená dansylací[44]. V pozitivním módu byla také demonstrována separace metabolitů (například kumarinů[130],[131] psoralenů a flavonů[131]). Pesticidy lze separovat a analyzovat jak v pozitivním[39],[132] tak v negativním módu[37],[39], což závisí na jejich struktuře. V negativním módu je možné separovat a detegovat nitrolátky[133], mezi které patří i výbušniny[134],[135], pigmenty hub převážně s karboxylovou skupinou[40], nebo sloučeniny s perfluorovanými řetězci[58].

HPLC s normální fází se u lipidů používá k dělení skupin lipidů na základě jejich polární části, takže se rozdělí na třídy lipidů. Například v normálním módu lze oddělit od sebe alkylalkenoaty, ethylalkenony a methylalkenony[51], nebo mono- di- a triacylglyceroly[52] a také různé ceramidy[56]. Demonstrováno bylo dělení několika lipidových tříd od sebe v jedné analýze, konkrétně triacylglycerolů, cholesteryl esterů, voskových esterů, ceramidů, amidů a samotného cholesterolu v lidském meibu[136].

1.1.2.4. APCI jako iontový zdroj pro SFC/MS

Jak již bylo zmíněno, nejčastější mobilní fáze u SFC je oxid uhličitý kvůli nízkému kritickému tlaku a teplotě[73]. Jeho nepolární povaha dovoluje analyzovat především nepolární sloučeniny, např. androstany[137], ale více se doporučuje přidavek polárního modifikátoru pro zlepšení ionizace[138]. S použitím oxidu uhličitého jako mobilní fáze a methanolu jako modifikátoru byla demonstrována separace a analýza makrolidů a steroidních hormonů[75], apokarotenoidů[76], aflatoxinů[139], ale i polárnějších látek jako beta blokátorů[140], aminokyselin[77] a cytarabinu[141]. Separace a detekce fenolformaldehydových kopolymerů je rovněž možná[78].

1.2. Zavádění kapalného vzorku do iontového zdroje

Iontové zdroje, mezi které APCI patří, jsou důležité nejen jako ionizační prvky, ale jejich důležitou součástí jsou i zmlžovače pro kapalinu přicházející z HPLC, nebo FIA analýz. Vyvinuto bylo několik způsobů provedení proudu kapaliny na kapky nebo plyn v závislosti na druhu ionizace v iontovém zdroji. Následující kapitola shrnuje tyto způsoby u EI a CI zdrojů (kde probíhá ionizace ve vakuu, respektive za sníženého tlaku) a zdrojů s ionizací probíhající za atmosférického tlaku (zdrojů API, atmospheric pressure ionization). Nejdříve však budou popsány fyzikální principy zmlžování, poté bude popsáno zmlžování v konkrétních iontových zdrojích.

1.2.1. Fyzikální principy zmlžování (atomizace)

1.2.1.1. Fyzikální principy zmlžování kapaliny

K zmlžení kapaliny obecně dochází, když se proud kapaliny rozpadne na kapky vlivem její kinetické energie, vystavením proudu plynu o vysoké rychlosti anebo dodáním mechanické energie vibrujícím nebo otáčejícím se zařízením. Na vlastnosti produkovaného spreje (jako míra atomizace, velikost kapek, délka spreje atd.) má vliv několik veličin, které lze rozdělit do tří hlavních skupin podle jejich původu. Patří mezi ně vlastnosti kapaliny (zejména povrchové napětí a viskozita), dále vlastnosti zmlžovače (velikost otvoru, princip atomizace) a vlastnosti okolního prostředí (například v případě vystavení kapaliny rychle proudícímu plynu je to průtoková rychlost plynu)[142].

Uvažujme rozprašování, kdy proud kapaliny směřuje kolmo dolů. Tekoucí kapalina procházející skrz trysku vytváří při dostatečné rychlosti za tryskou sloupec kapaliny (angl. liquid jet, obrázek 2), který se poté rozpadá na kapky. Povrchové napětí kapaliny působí proti vytvoření nového povrchu kapaliny. Čím větší bude mít kapalina povrchové napětí, tím delší sloupec kapaliny se bude tvořit. Viskozita má rovněž dopad na rozprašování. Kapalina s vyšší viskozitou má vyšší stabilitu sloupce kapaliny, což znamená, že k rozpadu sloupce kapaliny dojde ve větší vzdálenosti než u kapaliny s nižší viskozitou. Vyplývá z toho i tvorba větších kapek u viskóznější kapaliny. Naopak, zmlžení lze podpořit přidáním deformační síly působící na kapalinu. K rozprašování pak dochází ve chvíli, když tyto deformační síly převládnu nad silou povrchového napětí kapaliny. Rozpad sloupce kapaliny se nazývá

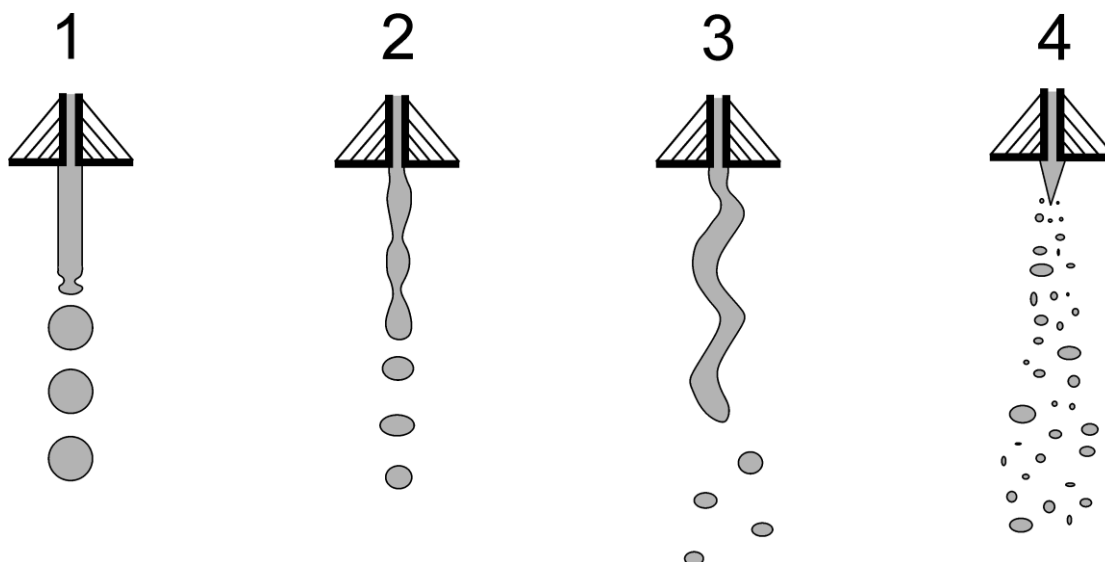
primární atomizace, zatímco případný rozpad velkých kapek na menší se nazývá sekundární atomizace [142].

1.2.1.2. Režimy zmlžování kapaliny bez použití externích vlivů

V následujícím textu se bude uvažovat zavádění kapaliny do stagnantního plynu, například vzduchu. Ohnesorge popsal tři základní režimy rozpadu sloupce kapaliny[143] podle Reynoldsovo čísla Re , definovaného jako

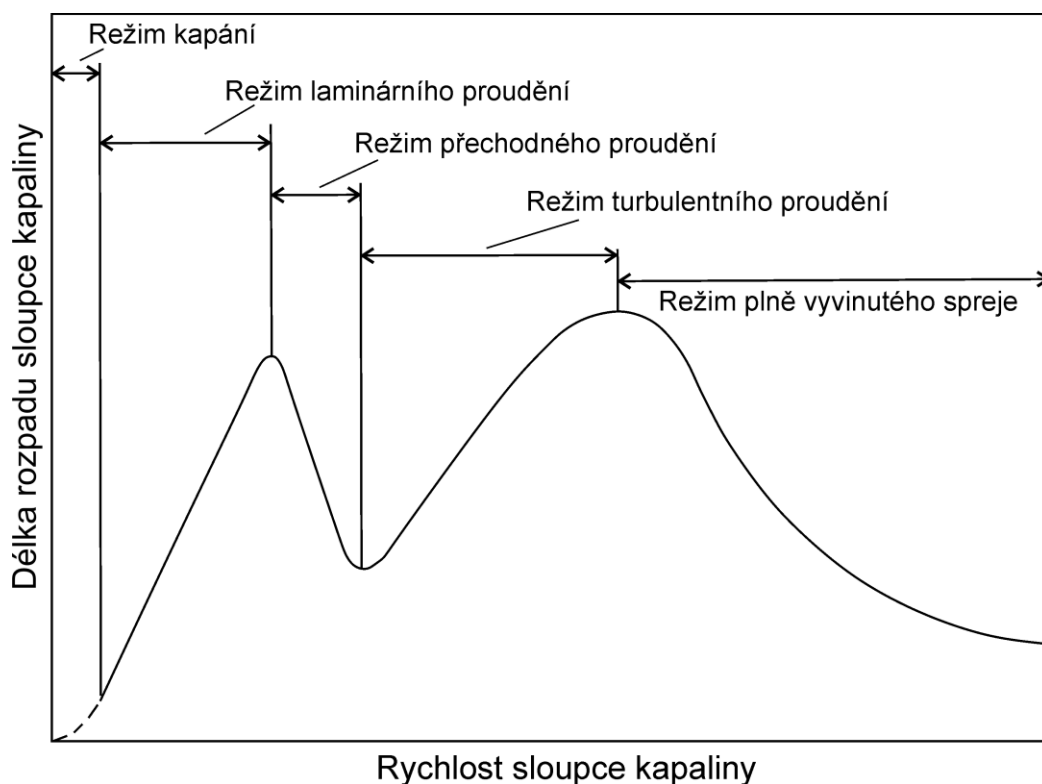
$$Re = \frac{\rho U D}{\mu}$$

kde ρ je hustota kapaliny, U je průměrná rychlost kapaliny, D je průměr otvoru, kterého kapalina vychází a μ je viskozita kapaliny[144]. V prvním režimu, kde je Re nízké se sloupec kapaliny rozpadne na přibližně stejně velké kapky. Kapky mají přibližně dvojnásobný průměr, jako měl původní sloupec kapaliny. Při vyšších hodnotách Re u druhého režimu dochází k oscilacím sloupce kapaliny podél osy sloupce. Okraje sloupců mají tvar vln v důsledku projevů aerodynamických sil (tření kapaliny o vzduch). Při vysokých hodnotách Re v třetím režimu se sloupec kapaliny rozpadne na kapky již u otvoru trysky. Stanovená hranice Re mezi druhým a třetím režimem ale nekorespondovala s některými experimentálními výsledky, proto se nakonec zavedly čtyři režimy rozpadu sloupce kapaliny[145] znázorněny na obrázku 2, z kterých se vychází i dnes[146]. První (ve směru růstu Re) se nazývá Rayleightův režim a odpovídá prvnímu režimu popsaného Ohnesorgem. Kapalina se tedy vyznačuje malými hodnotami Re a rozpadá se na kapky s větším průměrem, než má sloupec kapaliny, z kterého vznikají. Rozpad je způsoben oscilacemi symetrických s osou sloupce kapaliny způsobených povrchovým napětím kapaliny. Další režim se nazývá první režim indukovaný prouděním plynu (angl. First wind-induced regime), a při něm se začíná při povrchovém napětí kapaliny projevovat již nezanedbatelný efekt vzduchu na sloupec kapaliny díky větší rychlosti kapaliny. Okolní vzduch vytváří statickou tlakovou distribuci skrze sloupec kapaliny a tím urychluje jeho rozpad na kapky. Dalším režimem je druhý režim indukovaný prouděním plynu (angl. Second wind-induced regime) a projevuje se zvlněním sloupce kapaliny, který je způsoben vzájemným pohybem sloupce a okolního vzduchu. Vznikají kapky, které jsou menšího průměru, jaký má sloupec kapaliny. Poslední režim charakterizovaný největší hodnotou Re se nazývá atomizační režim a sloupec kapaliny se při něm rozpadá na malé kapičky hned za otvorem, odkud kapalina vychází[142],[146].



Obrázek 2: Čtyři režimy sprejování: Rayleighův režim (1), první režim indukovaný prouděním plynu (2), druhý režim indukovaný prouděním plynu (3) a atomizační režim (4). Viditelné jsou změny na tvaru sloupce kapaliny v důsledku tření kapaliny se vzduchem. Adaptované z [142].

Proudění částic v sloupci kapaliny může být laminární, přechodné, nebo turbulentní. Závislost délky sloupce kapaliny na těchto typech rozložení rychlostí je vyjádřena tzv. křivkou stability sloupce kapaliny (jet stability curve, obrázek 3). Při zvyšování rychlosti sloupce kapaliny dochází v rámci laminárního proudění ke zvětšování jeho délky, až kým se nedosáhne rychlosti, při které se laminární proudění změní na přechodné proudění. Přechodné proudění má částečně vlastnosti laminárního a částečně turbulentního proudění. Při zvětšování rychlosti sloupce kapaliny v tomto regionu délka sloupce kapaliny klesá. Po překonání další hraniční rychlosti sloupce kapaliny se proudění mění v turbulentní a délka sloupce kapaliny se opět začíná zvětšovat, až dosáhne další maximum. V tomto maximumu se mění turbulentní proudění na plně vyvinutý sprej, sloupec kapaliny se tím pádem zkracuje a rychle zaniká[142].

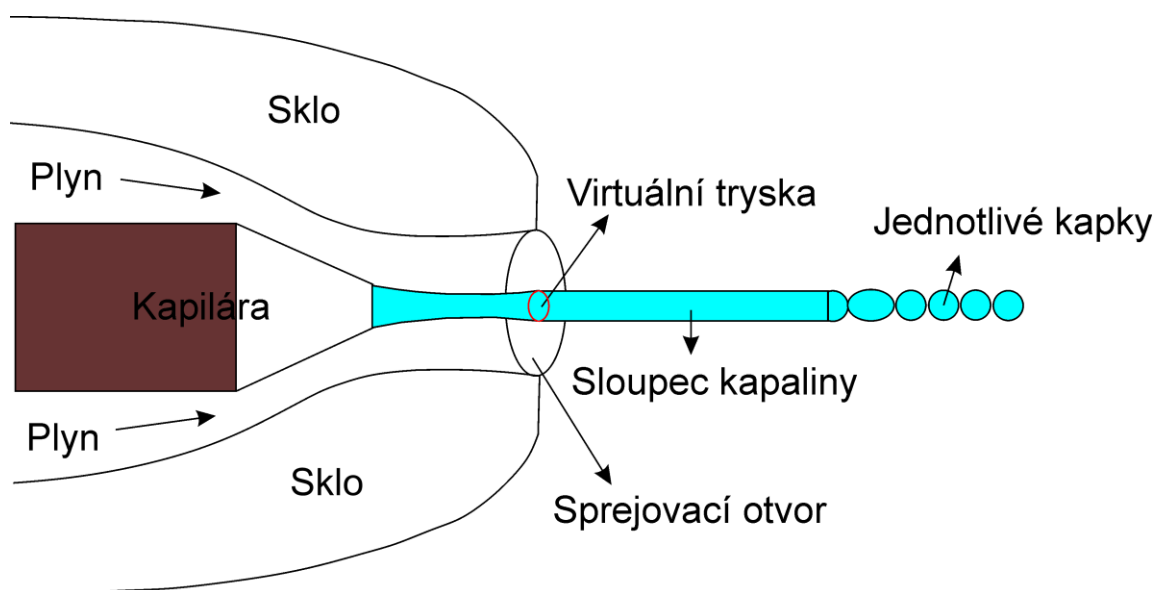


Obrázek 3: Křivka stability sloupce kapaliny při různém typu proudění kapaliny. Adaptované z [142].

1.2.1.3. Režimy zmlžování kapaliny s vnějšími vlivy

V komerčních zdrojích pro hmotnostní spektrometrii pracujících za atmosférického tlaku se ke zmlžení nepoužívá pouze rozpad kapaliny v statickém vzduchu, protože je v nich důležité, aby se kapalina zmlžila v co nejkratší dobu na co nejmenší kapičky. Proto se v nich používají externí vlivy, které výrazně zkrátí sloupec kapaliny i při systémech s nižší hodnotou Re a umožní co nejefektivnější rozprášení. Nejjednodušším typem zmlžovače je pneumatický zmlžovač, který jako externí vliv používá plyn proudící kolem proudu kapaliny, nejčastěji koaxiálně. Pneumatické zmlžovače se samy o sobě používají například v hmotnostní spektrometrii s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS) [147], v zdroji pro termosprejovou ionizaci (TSI) a APCI/APPI zdrojích jsou kapky po pneumatickém zmlžení navíc odpařovány pomocí topení. Fyzikální chování pneumatického zmlžování bude popsáno na virtuální trysce s koaxiálním tokem plynu (GDVN zmlžovačem, z angl. gas dynamic virtual nozzle).

Základy GDVN zmlžovače položil v roce 1998 Gañán-Calvo a původně sloužil pro generaci izolovaných monodisperzních kapiček letících přesně za sebou [148]. Využití našel například jako zdroj kapalinového sloupce (obrázek 4) pro analýzu biomolekul pomocí sledování rozptylu světla za použití laseru na volných elektronech (známý pod zkratkou XFEL)[149],[150]. Zmlžovač byl v roce 2008 adaptován na zdroj monodisperzního spreje využívajícího dynamické síly plynu (angl. gas dynamic forces) na zmenšení produkovaných kapek, který se neucpával. Ucpávání totiž představuje problém u mikrotrysky se sbíhajícími se stěnami[151]. Náčrt takto upraveného GDVN zdroje je na obrázku 4.



Obrázek 4: Nákres GDVN zmlžovače v tryskovém módu. Virtuální tryska (červený kroužek) je pouze hypotetická a není fyzicky ohraničena.

GDVN zmlžovač může produkovat kapky v několika režimech v závislosti na tlaku kapaliny a nebulizačního plynu v místě otvoru. Pokud jsou oba tlaky nízké, jedná se o tzv. kapání (angl. dripping), při kterém z něj vyletují velké, samostatné kapky. Při zvýšení tlaku plynu nastane nestabilní kapání (angl. unsteady dripping, nebo také spurting), při kterém se přerušovaně periodicky emituje ze sprejovacího otvoru dlouhý sloupec kapaliny, který se následně rozpadá na kapky letící za sebou. Třetí mód se nazývá tryskový (angl. jetting), který nastává při vysokém tlaku kapaliny a plynu u sprejovacího otvoru a má za následek vytvoření mikroskopického sloupce kapaliny za sprejovacím otvorem (obrázek 4), který se poté rozpadá na kapky letící za sebou. Posledním módem je vlnový (angl. whipping) při kterém má nestabilní proud kapaliny tvar vln s určitou amplitudou (což připomíná pohyb bičem)[151],[152],[153]. Preferovaným módem operace je tryskový mód [151], protože poskytuje stabilní, pravidelnou a nepřetržitou tvorbu kapek. Charakterizace sloupce kapaliny vycházejícího z GDVN je důležitá pro odhad vlastností generovaných kapek.

1.2.2. Zavádění kapaliny do iontových zdrojů

1.2.2.1. Zavádění kapalného vzorku do zdroje s elektronovou a chemickou ionizací

V začátcích spojení LC a MS prostřednictvím EI a CI se hojně používalo přímé zavádění kapalného vzorku z LC do MS prostřednictvím děliče toku (časté zejména v CI[154],[155],[156]). Bylo nutné rozdělit tok z LC tak, aby se do MS dostalo pouze takové množství kapalné fáze, při kterém bylo možné po její fázové přeměně na plyn udržet dostatečně nízký tlak v iontovém zdroji (v případě EI se jedná o tlak 0,1 Pa[157] a v případě CI o stovky Pa v důsledku přítomnosti reakčního plynu). Tímto způsobem se pouze 1 – 5 % objemu kapaliny dostalo do MS, zbytek se odvedl do odpadu. Zřejmou nevýhodou byla nízká citlivost detekce. Jednou z výhod tohoto zavádění byla stabilita termolabilních látek, které se

v zahříváných rozhraních rozkládaly[156], pokud se použila nevyhříváná varianta. Výhodou elektronové ionizace je možnost využití knihovny spekter.

Dnes myšlenka přímého zavádění kapaliny do zdroje ožívá v souvislosti s rozvojem nano- a kapilární HPLC. Vzorek se vede přes vyhříváný kanál, v kterém se mobilní fáze odpaří a až poté je nosným plynem vedena do vysokého vakua[158]. Jako výhody tohoto zdroje se uvádí možnost vytvoření knihoven spekter, minimalizace vlivů matrice a možnost analyzovat i vysoce nepolární vzorky[159]. Průtoky používané v těchto zdrojích jsou kvůli zachování vakua malé, pohybují se v rozmezí 100 až 1000, maximálně 1500 nl/min[158],[159].

1.2.2.2. Zmlžování v zdroji pro termosprejovou ionizaci

TSI byl jedním z prvních rozhraní pro LC/MS pracujícím za atmosférického tlaku. Skládá se ze dvou základních částí, TSI sondy a z ionizačního prostoru termospreje. Mobilní fáze z LC/MS vstupuje do sondy, kde se ohřívá topením a částečně odpařuje, čímž se *in situ* vytváří nebulizační plyn z odpařené mobilní fáze[160]. Jakým způsobem se přicházející kapalina odpaří, závisí na vzájemné kombinaci teploty odpařování, velikosti otvoru, přes který kapalina vystupuje z kapiláry, průtoku kapaliny, vlastnostech kapaliny a dalších[161]. Pro správné fungování termospreje je důležité, aby došlo pouze k částečnému odpaření analytu a jeho rozprašování na viditelný proud mlhy[160]. Při vyšší teplotě mlha zmizí a místo ní se tvoří horký, suchý proud par. Absolutní signál v termospreji poté klesá[161]. Vzniklá mlha poté putuje do vyhříváného ionizačního prostoru, kde jsou kapky úplně odpařeny. V ionizační oblasti dochází k termosprejové ionizaci, která je založena na přivádění těkavého pufru v rozpouštědle spolu s analytem, kde si pufr a analyt předávají náboj. Jedná se například o vodné roztoky amonných solí karboxylových kyselin s rozpuštěnými analyty. Do termospreje ještě může být zabudovaný i zdroj energetických elektronů (například filament), které ionizují vzorek[160],[162]. Část plynné fáze s ionty poté vstupuje do MS, zbytek je odsáván vakuovým systémem, aby nedošlo k zahlcení vakuového systému MS[160]. TSI zdroj byl v minulosti velmi často používaný, postupně ho ale vytlačily účinnější iontové zdroje[162].

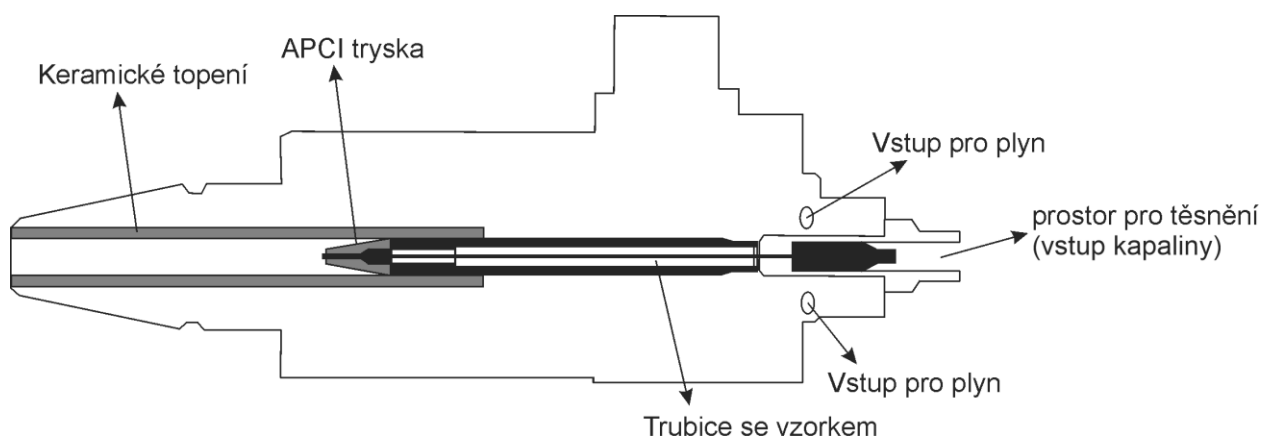
1.2.2.3. Zmlžování v ESI zdroji

Nejpoužívanější zdroj, který se používá jako rozhraní pro HPLC/MS je elektrosprej. Obecně je určen pro průtoky v rozmezí 0,001 až 1 ml/min[163]. Jeho miniaturizovaná forma, nano-elektrosprej, je určena pro nižší průtoky pohybující se pod 1 μ l/min, běžně v jednotkách až stovkách nl/min[164],[165]. Principem ionizace je aplikace vysokého napětí na přiváděný vzorek. Podle velikosti dodaného napětí na kapalinu vycházející z kapiláry, se kapalina bude chovat podle jednoho z elektrohydrodynamických režimů. Pro ESI ionizaci je klíčový režim kónické trysky, při které se po vložení napětí vytvoří tzv. Taylorův kužel[166]. Průměry generovaných kapiček jsou v tomto režimu pro průtoky kapaliny 50 až 1000 μ l/min řádově v jednotkách, respektive desítkách μ m[167],[168]. U nano-elektrospreje, kde se používají ještě menší průtoky než v elektrospreji, se průměr generovaných částic pohybuje řádově v stovkách nanometrů, při průtoku 25 nl/min se předpokládá průměr 180 nm[169]. Obecně tedy velikost kapky závisí na průtoku kapaliny, dále velikosti otvoru výstupní sprejovací

kapiláry, velikosti aplikovaného napětí a vodivosti rozprašované kapaliny[164]. Nabitě kapky se poté postupně zmenšují odpařováním. Kapka se odpařuje do objemu, při kterém nastane taková koncentrace náboje, že se kapka rozpadne v důsledku odpudivých coulombických sil. Hodnota náboje v kapce o daném průměru, při které dochází k rozpadu kapky, se nazývá Rayleighova mez[170]. Pro vznik iontů v plynné fázi existují dva modely: prvním je „odpaření“ iontu z kapky a druhým tzv. proces zbytkového náboje. První model uvažuje, že při zmenšování kapky obsahující množství nabitých iontů dochází na jejím povrchu k postupnému zvýšení síly elektrického pole do té míry, že se musí snížit repulzí jediného solvatovaného iontu. Druhý model je založen na coulombickém rozpadu mateřské kapky na menší kapky až do té doby, než kapka obsahuje pouze jedinou nabitou částici. Tato částice je následně uvolněna z kapky dalším odpařováním a deklasterizací[171]. Oba modely jsou předmětem probíhající diskuze. Po uvolnění iontů z kapek pak nabitě částice putují do hmotnostního spektrometru.

1.2.2.4. Zmlžování v APCI/APPI zdroji

APCI a APPI mají stejnou sondu pro zmlžování, liší se pouze ionizačním prvkem. Tryska se nachází uvnitř sondy (na obrázku 5 znázorněna sonda od firmy Thermo, na stejném principu ale pracuje i sonda od firmy SCIEX[172] a Shimadzu[173]) a využívá principu pneumatického zmlžování[174], které je založené na rychlém proudění plynu kolem kapaliny tekoucí z trysky. Vzniklý aerosol je poté rychle odpařen topením s teplotou několik stovek °C. Vzniká tedy horký proud plynu složený z odpařených rozpouštědel a vzorku ve směsi s plyny sloužící k zmlžování, který dál proudí do ionizační oblasti[175]. V případě APCI zdroje je ionizace zprostředkována korónovým výbojem nebo proudem β^- záření a v případě APPI zdroje ultrafialovým zářením generovaným ultrafialovou lampou. Bližší popis konstrukce celého APCI zdroje je uveden v kapitole 1.3.1.



Obrázek 5: APCI/APPI sonda se zvýrazněným systémem zmlžování. Adaptované z Ion Max and Ion Max-S API Source Hardware Manual version D[163].

V APCI/APPI sondě se používá takových teplot, aby místo bublinkového varu kapek (nucleate boiling) docházelo k účinnějšímu blánovému varu (vapor film boiling). Při blánovém varu dochází k Leidenfrostovu efektu, který se projeví na povrchu vyhřátém na vysokou teplotu tak, že se mezi kapkou a povrchem topení vytvoří plynná fáze bránící přímému kontaktu kapalné fáze s topením. Při interakci s povrchem topení kapka od něj hned

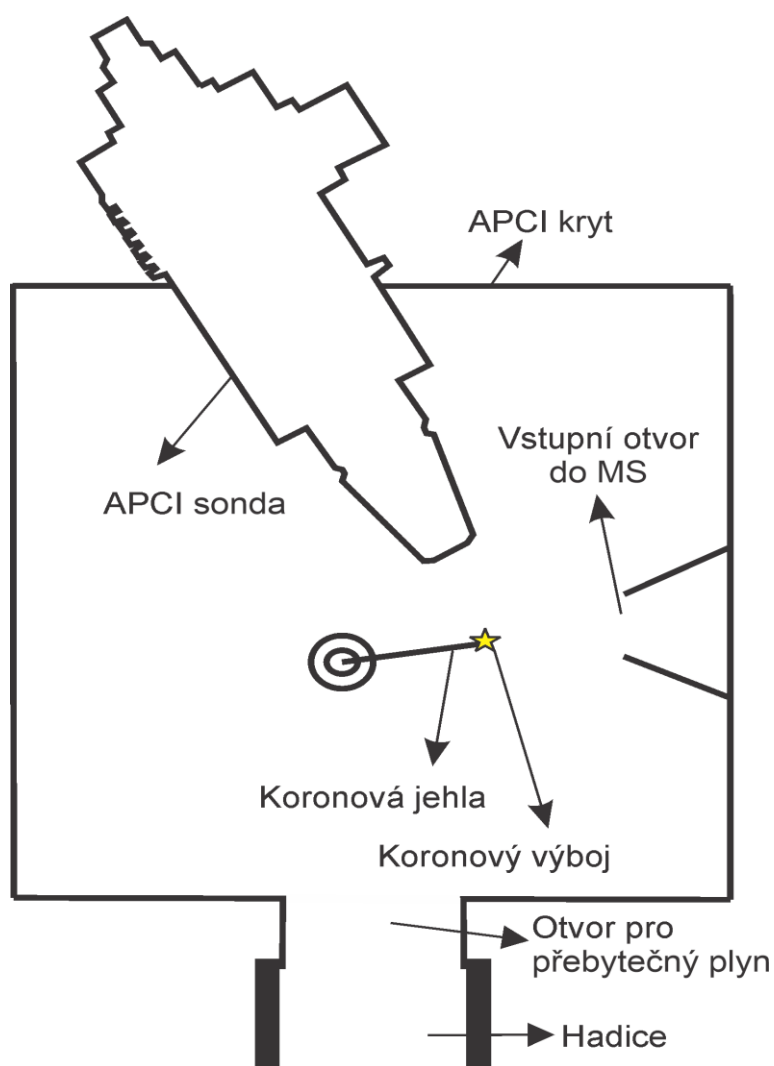
odskočí. Takto má kapka víc času k odpaření, ke kterému tím pádem nedochází výlučně na povrchu topení[176]. Do ionizačního prostoru poté vstupuje pouze plyn a APCI a APPI ionizace tedy probíhají v plynné fázi. V LC/MS jsou u APCI/APPI zdroje od firmy Thermo doporučované průtoky kapaliny mezi 0,1 až 2 ml/min[163], u firmy SCIEX 0,05 až 3 ml/min[172].

1.3. Konstrukce APCI zdrojů

1.3.1. Konstrukce komerčních APCI zdrojů pro konvenční průtoky

Dnešní komerční APCI zdroje (například Ion Max API source od firmy Thermo, obrázek 6 [163], nebo Turbo V ionization source od firmy SCIEX[172]) se skládají ze tří základních částí, a to APCI sondy, korónové jehly jako ionizačního prvku, a krytu, ve kterém jsou první dvě zmíněné části pevně ukotveny. APCI zdroj od firmy SCIEX má ještě aktivní odsávání přebytečných par rozpouštědel a nebulizačního plynu. Odsávání probíhá pomocí Venturiho systému do odpadní trubice. APCI zdroj od SCIEX využívá takové průtoky pomocných plynů k ionizaci, při kterých vzniká v ionizačním prostoru mírný přetlak[172]. Naproti tomu zdroj od Thermo má pouze otvor na spodku krytu do hadice, kterou odchází přebytečný plyn (obrázek 6).

Kapalný vzorek vstupuje do APCI sondy, kde je zmlžen pomocí ohřátého nebulizačního plynu a topení. Mezi sondou a vstupním otvorem do MS se nachází korónová jehla, na kterou se vkládá napětí tak, aby bylo dosaženo výboje, tj. aby proud byl v řádech jednotek μA . Aplikované napětí je kladné stejnosměrné, ionizace však funguje i pro střídavý proud[177]. Na špičce výbojové elektrody (korónové jehly) se po vložení napětí vytvoří korónový výboj, který patří mezi temné výboje[178]. V plazmě korónového výboje se generují elektrony o termální energii, které ionizují molekuly přítomných plynů a sledem ion-molekulových reakcí dochází k ionizaci analytů. V korónovém výboji vznikají kladně i záporně nabitě ionty. Jaké ionty se budou analyzovat závisí na polaritě protielektrody (vstupní kapiláry nebo kónusové elektrody). Celý ionizační prostor je izolován od okolního vzduchu krytem, jenž plní několik funkcí: chrání uživatele před škodlivými výpary rozpouštědel, umožňuje uchycení komponent zdroje (sondy a korónové jehly) a elektrických přívodů, chrání ionizační prostor před průvanem a před vniknutím nežádoucích chemických látek ze vzduchu do ionizační oblasti. Proudící nebulizační plyn má totiž tendenci s sebou strhávat molekuly z okolního prostředí a vnášet je do ionizační oblasti iontového zdroje [176],[179].



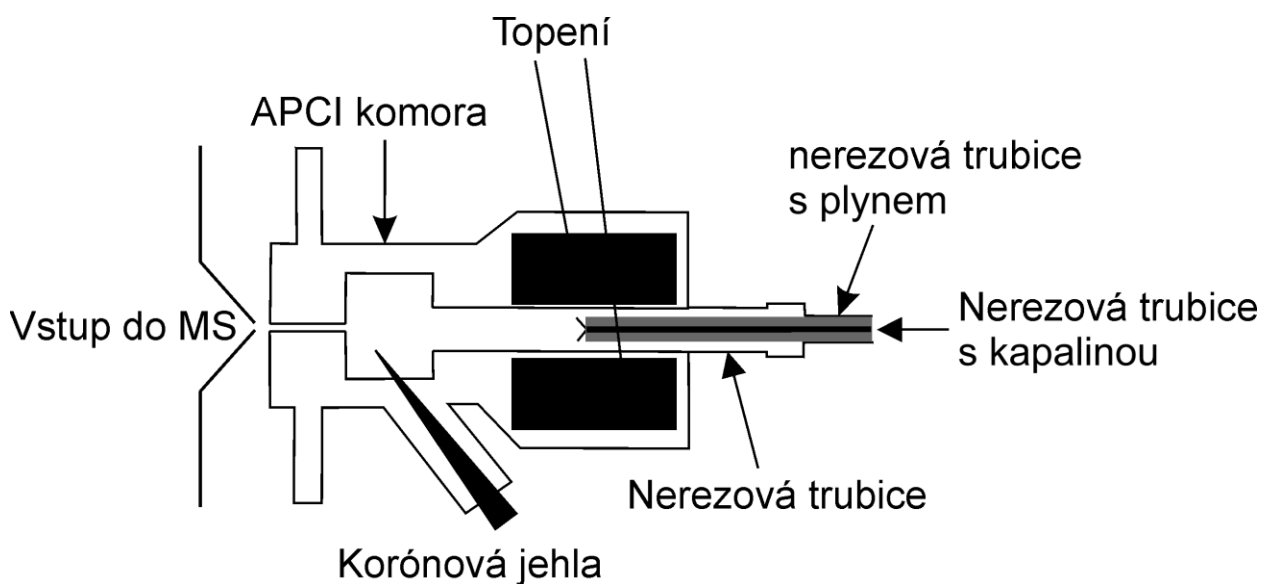
Obrázek 6: Schéma komerčního APCI zdroje (Thermo).

1.3.2. Vývoj konstrukcí APCI pro nízké průtoky

Důvodů pro miniaturizaci iontových zdrojů je několik, například malé spotřeby vzorku a rozpouštědel, z kterých plynou finanční i ekologické výhody. Vhodným konstrukčním řešením je možné zlepšit citlivost, obdobně jako v případě zdroje pro ESI. NanoESI dosahuje vyšších citlivostí[180] a větší toleranci k solím[181] než „klasický“ ESI. Zdroj pro ESI je koncentrační, což znamená, že signál analytu závisí na jeho koncentraci v analyzovaném roztoku. V malých průtocích se ale z ESI stává hmotnostně-citlivý detektor[182], což znamená, že signál analytu je závislý na hmotnostním toku analytu (množství analytu za jednotku času). Znamená to, že intenzita signálu se úměrně zvyšuje se zvyšujícím se průtokem kapalného vzorku, a ne s jeho koncentrací. APCI zdroj je na rozdíl od ESI hmotnostně-citlivý při nízkých[183] i vysokých průtocích[182]. Nízkoprůtoková varianta APCI není komerčně dostupná.

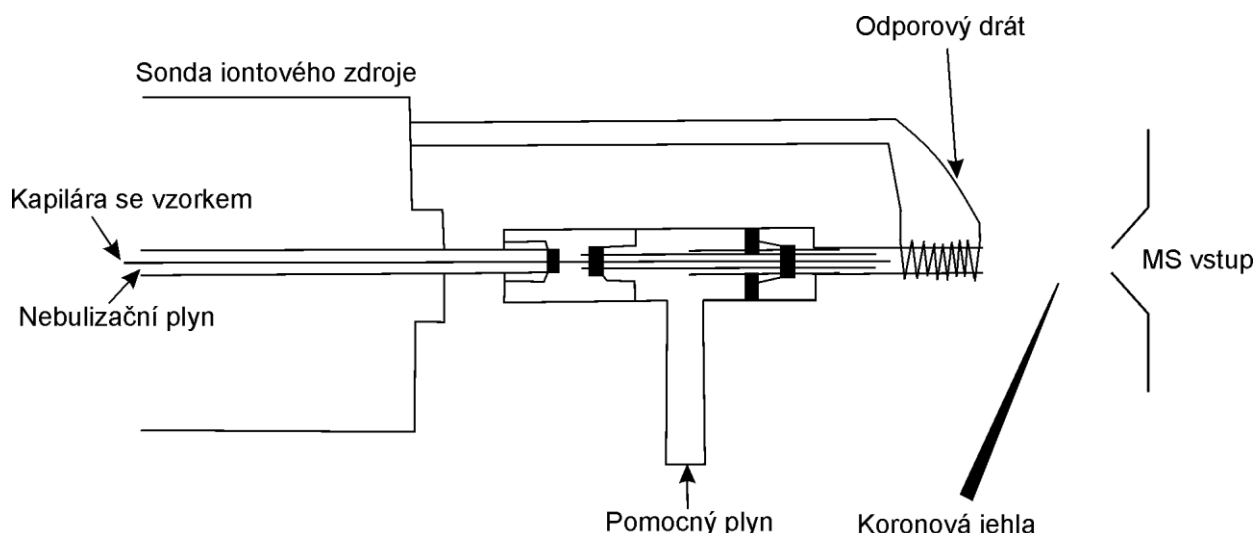
První prototypy APCI zdrojů určeny pro nízké průtoky byly převážně modifikovanou formou komerčního APCI pro vysoké průtoky[184],[185] (obrázek 7). Jednalo se o uzavřené iontové

zdroje, které měly primárně sloužit ke spojení kapilární elektroforézy s MS. Nejnižší průtok, při kterém zdroj fungoval bez jakýchkoliv komplikací, byl 10 $\mu\text{l}/\text{min}$. Při nižším průtoku (5 $\mu\text{l}/\text{min}$) docházelo k výpadkům signálu, které autoři připisovali přerušování elektrického kontaktu v rámci přídavné (pomocné) kapaliny[185].



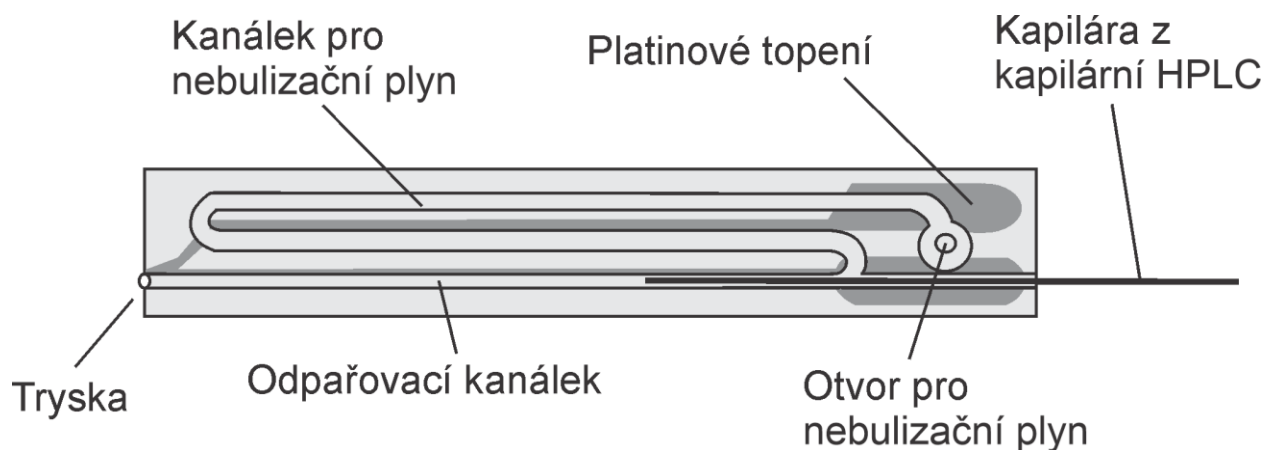
Obrázek 7: prototyp APCI pro nízké průtoky. Adaptované z[184].

Dalším typem byl zdroj na bázi otevřeného trubicového zmlžovače [186] (obrázek 8). Původně byl zkonstruován pro spojení SFC/MS [187] a později byl modifikován pro spojení LC/MS. Mobilní fáze z LC nejdříve vstupovala přes spojku do převodního potrubí (angl. transfer line), kde se dále vedla kapilárou do aparatury přibližného tvaru T. Kapilára byla umístěna k trubici, kterou proudil nebulizační plyn a rovněž ústila do zmíněné aparatury tvaru T. Do aparatury byl kolmo k směru proudění mobilní fáze zaváděn pomocný plyn. Kapilára s mobilní fází spolu s plynem pokračovala z aparatury do společné trubice, kde vyústila těsně před vyhřívanou částí trubice. K topení byl použit odporový drát, který byl ovinutý na koncové části trubice. Z konce trubice pak proudila odpařená mobilní fáze kolem korónové jehly do hmotnostního spektrometru. Tento zdroj byl určen pro velmi nízké průtoky (testován při 0,15 – 1,6 $\mu\text{l}/\text{min}$). Byla pro něj demonstrována dobrá linearita a nízký limit detekce, a také možnost analýzy termolabilních látek, které se ve vysokoprůtokovém APCI rozpadaly. Při chromatografii ale docházelo k chvostování[186].



Obrázek 8: Otevřený trubicový zmlžovač. Adaptované z [186].

Dalším typem zmlžovače pro APCI při nízkých průtocích byl mikročipový zmlžovač (obrázek 9), který je vyrobený z tenkých skleněných plátek ve tvaru obdélníků, v kterých se nachází vstup pro křemennou kapiláru (vnitřní průměr 50 μm , vnější průměr 220 μm) z kapilární HPLC. Kapilára vede do odpařovacího kanálku uvnitř mikročipu. Kanálek má tvar poloviční elipsy zřezané podél hlavní osy s délkou hlavní osy přibližně 900 μm a vedlejší osy 460 μm . Blízko vstupu kapalného vzorku se nachází druhý otvor, kterým se do mikročipu přivádí nebulizační plyn. Navazuje na něj kanálek, kterým se vede nebulizační plyn podél platinového topení, které nebulizační plyn ohřívá. Tento kanálek poté ústí do odpařovacího kanálku před ústím kapiláry přivádějící vzorek. Odpařovací kanálek je rovněž obklopen platinovým topením, aby se kapalný vzorek odpařil. Odpařovací kanálek pak ústí do trysky, která koncentruje proud nebulizačního plynu a plynného vzorku do úzkého kužele. Proud plynu následně prochází korónovým výbojem, kde dochází k ionizaci a dále postupuje do hmotnostního spektrometru, kde jsou ionty analyzovány [188]. Mikročipové zdroje lze použít pro rozsah průtoků 0,05 – 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ a vykazují vysokou citlivost, a proto jsou ideální pro spojení nano-HPLC s hmotnostním spektrometrem. Lze je využít i ke spojení GC a MS [189]. Výroba mikročipů ale vyžaduje specializované mikrofabrikační vybavení.



Obrázek 9: Schéma mikročipu z vrchu. Rozměry čipu: 33 × 5 × 1 mm.

Později po vyvinutí ohřívaného mikročipu byl testován plastový mikročipový zmlžovač pro APCI bez vyhřívání. Konstrukce byla upravena tak, aby se dva kanálky pro nebulizační plyn zbíhaly v místě výstupního otvoru pro kapalný vzorek. To zajistilo tvorbu jemného spreje, který nebylo nutné zahřívát. Za průtoku vzorku 500 nl/min při tlaku 0,5 bar byl přímou infuzí úspěšně detegován reserpin. Hlavní výhodou nevyhřívání APCI by mělo být zamezení termického rozkladu termolabilních látek[190].

2. Materiály a instrumentace

Chemikálie

Tabulka 1: Seznam chemikálií.

Chemikálie	Výrobce/dodavatel	Poznámka
(2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-1-yl)oxyl (TEMPO)	Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA)	standard
4-Amino-N-(1,3-thiazol-2-yl)benzenesulfonamid (sulfathiazol)	Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA)	standard
4-Hydroxyanilin	Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA)	standard
Acetonitril (V)	VWR Chemicals (Radnor, PA, USA)	rozpouštědlo
	Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA)	rozpouštědlo
Akridin	Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA)	standard
Ethylacetát	Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA)	rozpouštědlo
Chloroform	Penta (Česká republika)	rozpouštědlo
	Honeywell/Riedel-de Haën (Seelze, Německo)	rozpouštědlo
Chloroform-d	Euriso-top (Saint-Aubin, Francie)	rozpouštědlo
Cholesterol	Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA)	standard
Dusík (N ₂) ≥99,999%	Messer (Bad Soden, Německo)	nebulizační plyn
Kyselina 2-hydroxy-5-nitrobenzoová	Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA)	standard
Kyselina citronová	Lachema (Brno, Česká republika)	standard
Kyselina mravenčí	Lachema (Brno, Česká republika)	rozpouštědlo
Kyselina pikrová	Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA)	standard
Methanol	Honeywell/Riedel-de Haën (Seelze, Německo)	rozpouštědlo
	Merck (Darmstadt, Německo)	rozpouštědlo
	VWR Chemicals (Radnor, PA, USA)	rozpouštědlo
Methylaurát		standard
Methylinoleát	Nu-Chek Prep (Elysian, MN, USA)	standard
Methyloleát	Nu-Chek Prep (Elysian, MN, USA)	standard
N-(4-hydroxyphenyl)acetamid (paracetamol)	Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA)	standard
n-Hexan	Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA)	rozpouštědlo
Palmityloleát	Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA)	standard
Pyren	Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA)	standard
Reserpin	Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA)	standard
Rhodamin 6G	Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA)	Barvivo pro vizualizaci spreje
Sirouhlík	Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA)	rozpouštědlo
Skvalen	Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA)	standard
Tetradec-1-yn	Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA)	standard
Tetradekan-2-on	syntetizovaný	standard
Tetradekanal	syntetizovaný	standard
Těžká voda	Euriso-top (Saint-Aubin, Francie)	příměs nebul. plynu
Toluen	Merck (Darmstadt, Německo)	rozpouštědlo
	Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA)	rozpouštědlo
Trielaidin	Nu-Chek Prep (Elysian, MN, USA)	standard

Voda, Milli-Q	Merck Millipore system, Burlington, MA, USA	rozpouštědlo/ příměs nebul. plynu
Vzduch, syntetický (5,0; hydrocarbon free; 79.5% N ₂ , 20.5% O ₂)	Messer (Bad Soden, Německo)	nebulizační plyn

Přístroje

Tabulka 2: Přístroje použité v této práci.

Přístroj/nástroj	Výrobce/dodavatel	Poznámka
Hmotnostní spektrometr LTQ Orbitrap XL	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)	Hmotnostní analýza
Hmotnostní spektrometr LCQ Fleet	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)	Hmotnostní analýza
Teploměr Voltcraft IR 1200-50D	Conrad Electronic SE (Hirschau, Německo)	Měření teploty
Kapalinový chromatograf ExionLC AD System	Sciex, Framingham (MA, USA)	Kapalinová chromatografie
Kvarternární gradientové čerpadlo Rheos 2200	Flux Instruments (Reinach, Švýcarsko)	Pumpa pro kapalinovou chromatografii
Autosampler accelera	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)	Dávkovač vzorků pro kapalinovou chromatografii
Regulátor průtoku GFCS-011771	Aalborg (Orangeburg, NY, USA)	Regulátor průtoku plynu
Napěťový zdroj Manson HCS-3202-000G	Manson Engineering Industrial Ltd (Hong Kong)	Externí zdroj napětí
Stříkačková pumpa 65D	Teledyne ISCO (Lincoln, NE, USA)	Pumpa pro kapalinovou chromatografii
Dávkovač VICI CI4W.06	VICI AG International (Schenkou, Švýcarsko)	Dávkovač vzorků pro kapalinovou chromatografii
Topení pro kolony (součást autosampleru Accela)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)	Topení
Akuvrtačka ASE 18-2G	Alpha Tools (Oakland, NJ, USA)	Akumulátorová vrtačka
Vysokorychlostní kamera (VEO 401)	Dantec Dynamics (Skovlunde, Dánsko)	Kamera s osvětlením

Iontové zdroje

Iontové zdroje použité v této práci jsou stručně shrnuty v tabulce 3. V každé kapitole ve výsledkové části je podrobný popis konstrukce každého zdroje s fotografií.

Tabulka 3: Iontové zdroje použité v této práci

Iontový zdroj	Výrobce/dodavatel	Poznámka
APCI zdroj Ion Max-S	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)	Uzavřený zdroj
Modifikovaný APCI zdroj Ion Max-S	Sestrojen v laboratoři z komponent komerčního zdroje Ion Max-S	Otevřená konstrukce
APCI zdroj s otevřeným trubicovým zmlžovačem	Sestrojen v laboratoři	
APCI zdroj s mikročipovým zmlžovačem	Sestrojen v laboratoři	Mikročip dodán Markusem Haapalou z Helsinské univerzity
GDVN-APCI zdroj	Sestrojen v laboratoři	

3. Cíle práce

Cílem práce bylo prostudovat vlastnosti hmotnostně spektrometrické detekce založené na chemické ionizaci za atmosférického tlaku v kapilární HPLC a navrhnout iontový zdroj pro praktické využití

Konkrétně bylo cílem:

- Prostudovat vliv konstrukčního řešení zdroje na ionizaci vybraných analytů při nízkých průtocích vzorků (mikrolitry za minutu), a to zejména vliv vnějšího krytu zdroje
- Navrhnout zmlžovač pro nízké průtoky vzorků a porovnat ho s existujícím řešením založeném na mikročipu
- Otestovat virtuální trysku, jakožto generátor neutrálních kapiček pro zavádění vzorku do APCI zdroje

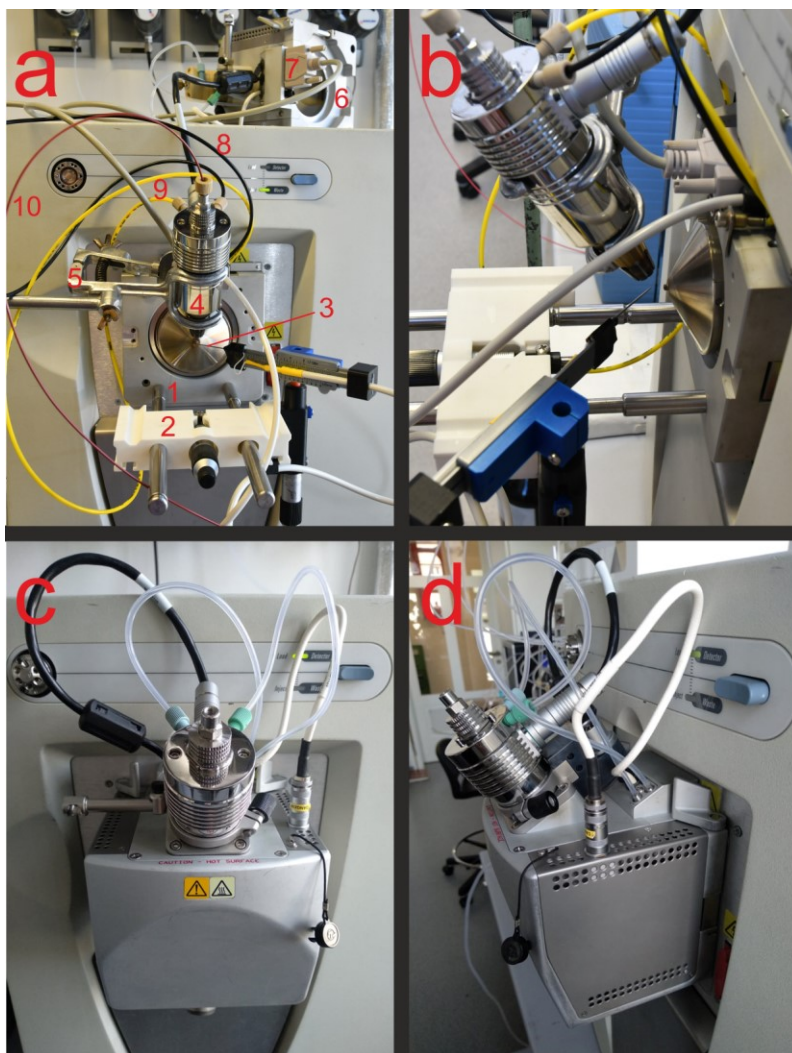
4. Shrnutí výsledků a diskuze

4.1. Chemické reakce v APCI při nízkých průtocích vzorku

Jak vyplývá z předchozího výzkumu shrnutého v teoretické části, procesy v iontovém zdroji při chemické ionizaci mohou být ovlivněny konstrukcí iontového zdroje i jeho parametry. Zabývali jsme se proto chemickými reakcemi, které se uplatňují při APCI za nízkých průtoků, a to konkrétně při průtokové rychlosti vzorku 10 $\mu\text{l}/\text{min}$. Protože jsou ionizace při MS detekci v nízkoprůtokové LC většinou prováděny v otevřené atmosféře (např. nanoESI, většina experimentálních mikro-APCI zdrojů), zajímal nás zejména vliv izolace ionizačního prostoru od okolní atmosféry pomocí krytu zdroje (ang. „housing“). Pro studium byl použitý komerční APCI zdroj standardně dodávaný s krytem a otevřený zdroj sestavený v laboratoři, který využíval sondu i elektrodu pro korónový výboj z komerčního zdroje. Uspořádání těchto prvků vůči vstupnímu otvoru do hmotnostního spektrometru bylo identické jako v případě komerčního uzavřeného zdroje.

4.1.1. Sestavení otevřeného zdroje

Fotografie otevřeného komerčního APCI zdroje je na obrázku 10. Na dvou tyčích příruby byl připevněn držák na korónovou jehlu. Vedle příruby byl umístěn stojan, na kterém byla pomocí držáku na chladič připevněna APCI sonda. Sonda byla připojena kabelem ke krytu položenému na hmotnostním spektrometru, a kryt byl zapojen k hmotnostnímu spektrometru (LCQ Fleetu) pomocí kabelu s 15 pin D-SUB male/female konektorem. Jelikož nebyla APCI sonda zasunuta v krytu, systém hlásil chybu. Proto bylo nutné do krytu zasunout jinou sondou (například ESI). Vzdálenosti a úhly mezi sondou, jehlou a vstupem do hmotnostního spektrometru byly nastaveny tak, aby byly stejné jako v případě uzavřeného komerčního APCI zdroje.



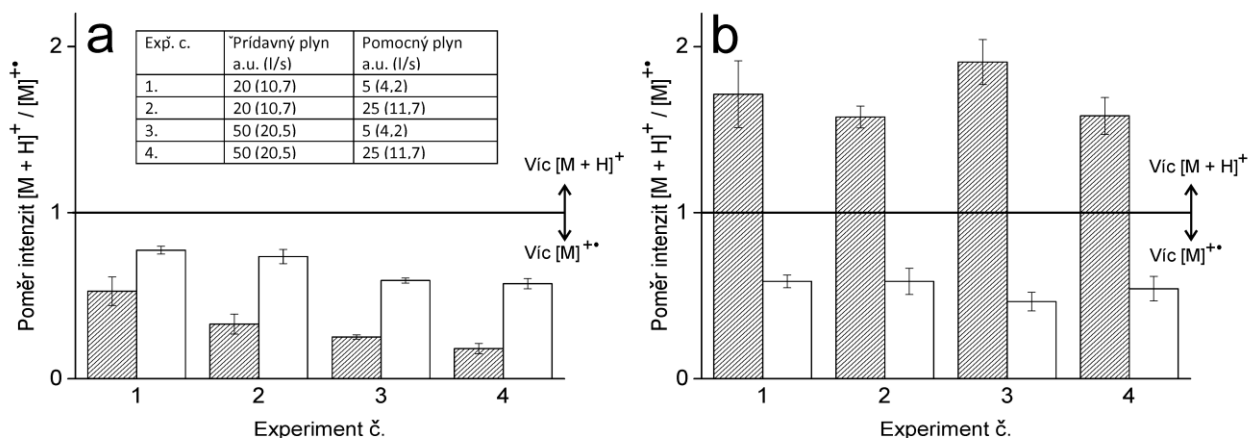
Obrázek 10: Komerční APCI zdroj s otevřenou konfigurací, pohled zepředu (a) a z boku (b), komerční APCI zdroj s uzavřenou konfigurací, pohled zepředu (c) a z boku (d).

4.1.2. Vliv laboratorního prostředí na ionizaci při vysokém a nízkém průtoku vzorku

Vliv krytu zdroje byl nejdříve testován při nízkém a vysokém průtoku (10 a 1000 $\mu\text{l}/\text{min}$) roztoku pyrenu v toluenu. Při nízkém průtoku byl kontinuálně zaváděn roztok pyrenu v toluenu (o koncentraci 25 $\mu\text{mol}/\text{l}$) přímo do hmotnostního spektrometru. Při vysokém průtoku byl ten samý roztok přiváděn do T-spojky, kde se k němu přidal toluen o průtoku 990 $\mu\text{l}/\text{min}$ a společně postupovaly do APCI zdroje. Tím se dosáhlo stejného hmotnostního toku pyrenu v obou průtocích. Jelikož APCI zdroj je hmotnostně-citlivý detektor, intenzity signálu pyrenu byly při obou průtocích podobné.

Při průtoku 1000 $\mu\text{l}/\text{min}$ nebyl mezi spektry pyrenu získaných v otevřené a uzavřené konfiguraci zdroje zásadní rozdíl, v obou případech se převážně tvořil radikalkation pyrenu $[\text{M}]^+$. Při průtoku vzorku 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ se v uzavřeném zdroji rovněž tvořily převážně radikalkationty pyrenu. V otevřené konfiguraci ale převládla protonace (obrázek 11). Protonace neprobíhala v otevřeném zdroji za průtoku vzorku 1000 $\mu\text{l}/\text{min}$ zřejmě proto, že

toluen přítomný ve velkém množství zabránil výraznému pronikání složek vzduchu do ionizační oblasti. Při nízkých průtocích byla ale koncentrace plynného toluenu v ionizačním prostoru nižší, a proto se projevil vliv okolní atmosféry, s největší pravděpodobností vliv vody ve formě vodní páry. Různé kombinace rychlosti přídavného a pomocného plynu neměly na poměr intenzit zásadní vliv. Jejich hodnoty jsou v tabulce vyjádřeny v a.u. (hodnota nastavena v přístroji) a v závorce jsou uvedeny odpovídající rychlosti plynů v l/s zjištěné experimentálně.



Obrázek 11: Sloupcové grafy znázorňující poměry intenzit protonovaného pyrenu (m/z 203) k radikálkationtu pyrenu (m/z 202) o průtoku 1000 $\mu\text{l}/\text{min}$ (a) a 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ (b). Intenzita signálu protonovaného pyrenu byla korigovaná odečtením intenzity signálu isotopického radikálkationtu obsahujícího jeden ^{13}C . Výsledky z otevřené konfigurace reprezentují šrafované sloupce a výsledky z uzavřené konfigurace reprezentují prázdné sloupce. Tabulka na obrázku 11a shrnuje čtyři použité kombinace průtoku přídavného a pomocného plynu.

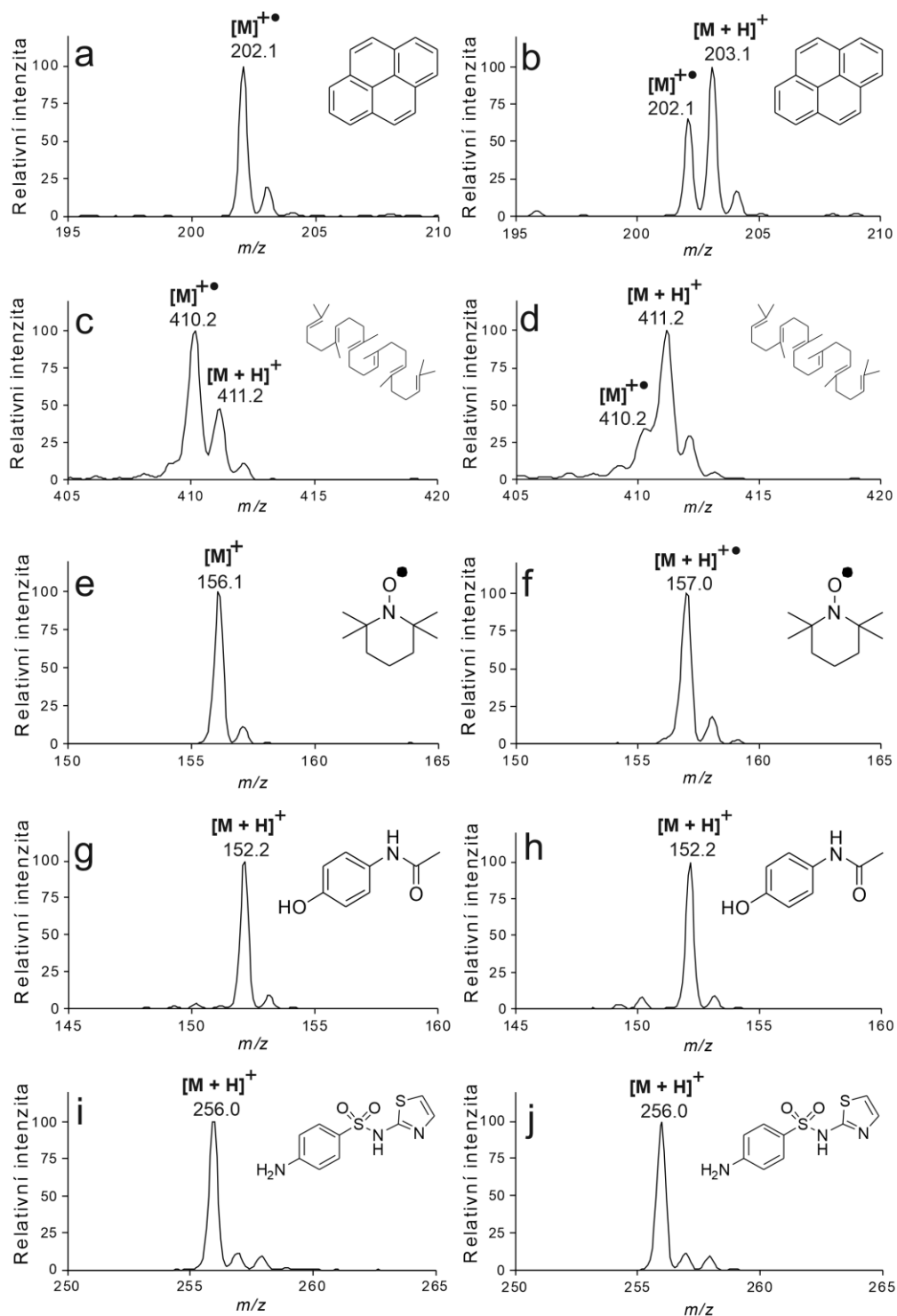
4.1.3. Výběr rozpouštědel a analytů pro nízké průtoky

Jelikož APCI zdroj je tolerantní k široké škále rozpouštědel a lze s ním analyzovat polární i nepolární analyty s malou až střední molekulovou hmotností, byla v pozitivním módu vybraná co nejrozmanitější rozpouštědla se širokým rozsahem polarit a protonových afinit (od hexanu až po methanol), což platilo i pro vybrané analyty (od pyrenu přes trielaidin po paracetamol). V negativním módu byly studovány nitroaromatické sloučeniny. Sledovány byly rozdíly mezi ionizací analytů v uzavřené a otevřené konfiguraci. Pro pozorování rozdílů mezi dvěma konfiguracemi byly provedeny experimenty, které vysvětlily příčinu rozdílů pozorovaných v otevřené a uzavřené konfiguraci.

4.1.4. Rozdíly v ionizaci v pozitivním módu

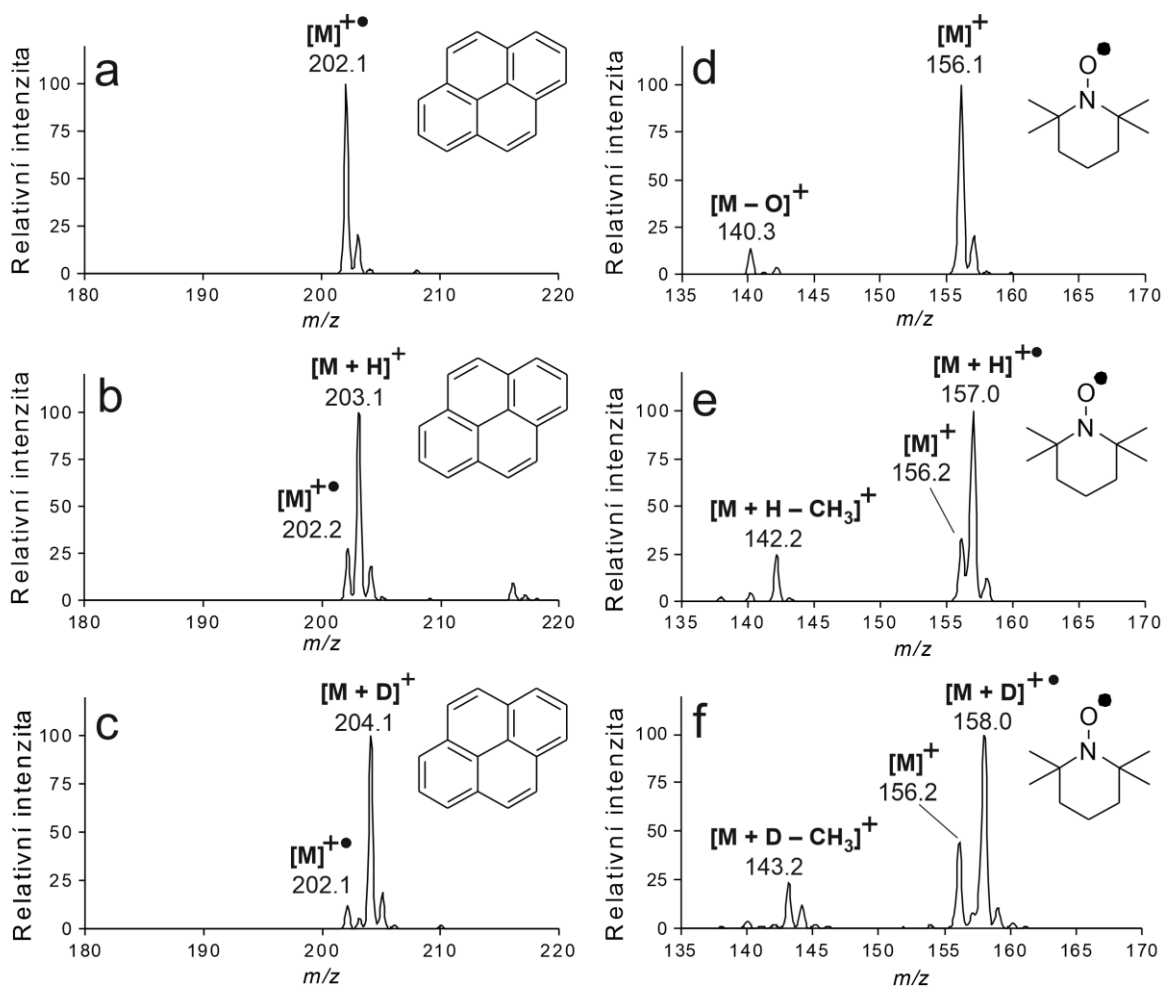
V pozitivním módu byly nejzásadnější rozdíly ionizace v případě nepolárních analytů rozpuštěných v nepolárních aprotických rozpouštědlech. U rozpouštědel sulfidu uhličitého, toluenu a chloroformu byla jasná převaha přenosu náboje v uzavřeném zdroji, zatímco

v otevřeném zdroji probíhal, jak přenos náboje, tak protonace. V případě methanolu jako rozpouštědla a polárních analytů v acetonitrilu nebyly pozorovány žádné rozdíly ve spektrech ani u jednoho testovaného analytu. V otevřeném i uzavřeném zdroji byla pozorována výhradně protonace (obrázek 12).



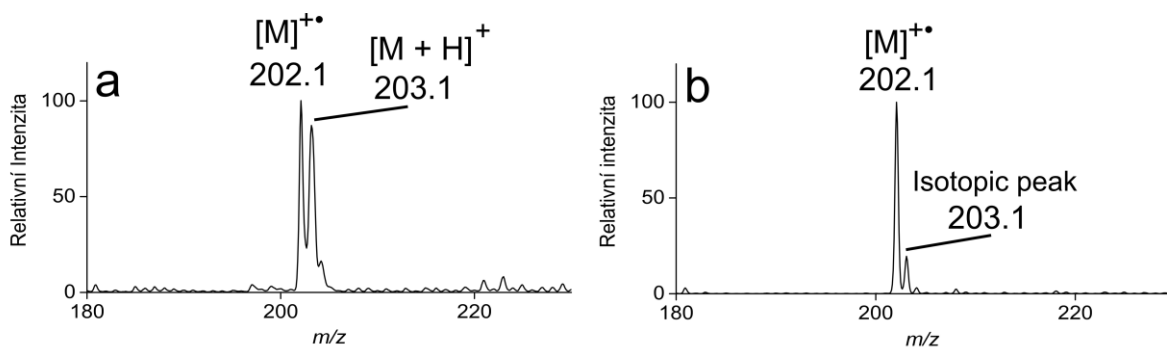
Obrázek 12: APCI+ hmotnostní spektrum pyrenu v sírouhlíku (a,b), skvalenu v chloroformu (c,d), TEMPO v toluenu (e,f), paracetamolu v acetonitrilu (g,h) a sulfathiazolu v methanolu (i,j) měřené v uzavřené konfiguraci (a,c,e,g,i) a v otevřené konfiguraci (b,d,f,h,j).

Logickým vysvětlením zvýšené protonace v otevřeném zdroji byla přítomnost molekul schopných protonovat, zejména vody ve formě vodní páry v laboratorním ovzduší. V hmotnostním spektru pozadí otevřeného zdroje byl pozorován klastér vody $\text{H}(\text{H}_2\text{O})_2^+$. Schopnost vody protonovat analyty byla prokázána experimentem, kdy byly do zdroje přiváděny spolu s nebulizačním plynem také páry lehké a těžké vody k pyrenu a k TEMPO rozpuštěnému v chloroformu, respektive v CS_2 . V případě vody se vedle radikalkationtů tvořily také protonované molekuly, v případě těžké vody to byly deuterované molekuly $[\text{M} + \text{D}]^+$ (obrázek 13).



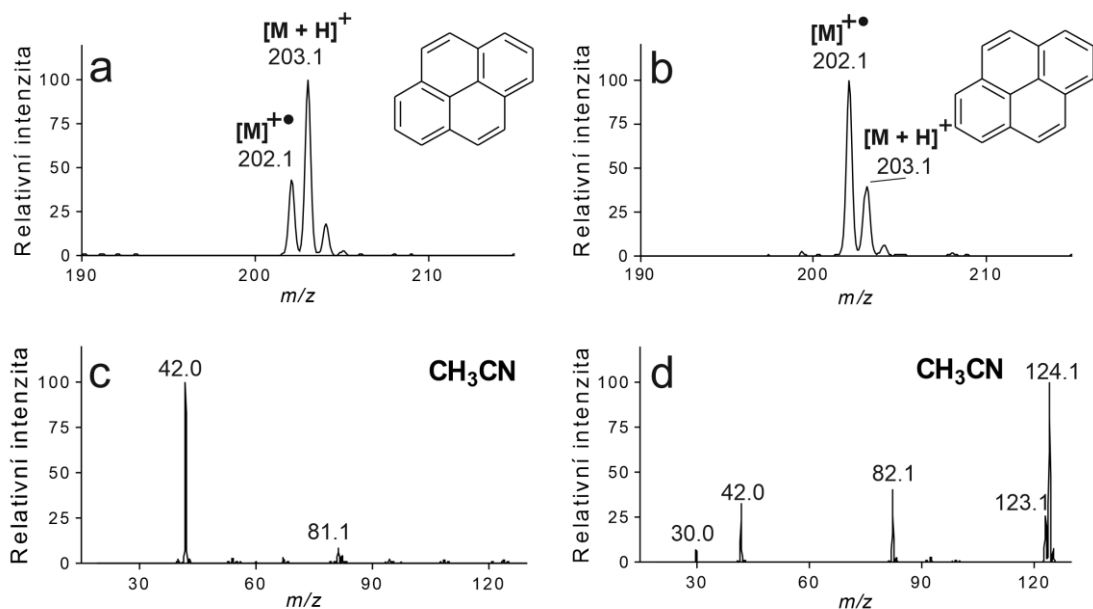
Obrázek 13: APCI+ hmotnostní spektrum pyrenu v chloroformu s dusíkem jako nebulizačním plynem (a), s dusíkem obohaceným o vodní páru (b) a s dusíkem obohaceným o páru těžké vody (c) a hmotnostní spektrum TEMPO v sírouhlíku s dusíkem jako nebulizačním plynem (d), s dusíkem obohaceným o vodní páru (e) a s dusíkem obohaceným o páru těžké vody (f). Všechna měření jsou z uzavřené konfigurace.

Je důležité zmínit, že chloroform se nejprve musel zbavit svého stabilizátoru (ethanolu). Zatímco ve stabilizovaném chloroformu docházelo k protonaci analytů, po odstranění stabilizátoru byl v uzavřeném zdroji pozorován výlučně přenos náboje (obrázek 14).



Obrázek 14: APCI+ hmotnostní spektrum pyrenu rozpuštěného v chloroformu s 1 % ethanolem jako stabilizátorem (a) a bez stabilizátoru (b).

Uhlovodíky v acetonitrilu vykazovaly větší tvorbu radikálkationtů, a to překvapivě v otevřeném zdroji. Efekt se mnohem víc zvýraznil, když byl v uzavřeném zdroji jako nebulizační plyn použitý syntetický vzduch (obrázek 15 a,b). Bylo jasné, že zvýšenou tvorbu radikálkationtů mají na svědomí acetonitril a některá složka vzduchu. Proto se pyren v acetonitrilu změnil v uzavřeném zdroji za použití syntetického vzduchu jako nebulizačního plynu. Efekt tvorby radikálakationtů se ještě víc zvýraznil. Podobný efekt vzduchu na tvorbu radikálkationtů byl již u polyaromatických uhlovodících popsán, ale nebyl vysvětlen[63]. Po přeměření čistého acetonitrilu bez analytu se vzduchem jako nebulizačním plynem se ukázalo, že acetonitril v přítomnosti kyslíku tvoří radikálkationty typu $(\text{CH}_3\text{CN})_n^+$ (obrázek 15 c,d), které se v čistě dusíkové atmosféře netvoří a mají na svědomí přenos náboje na analyt.

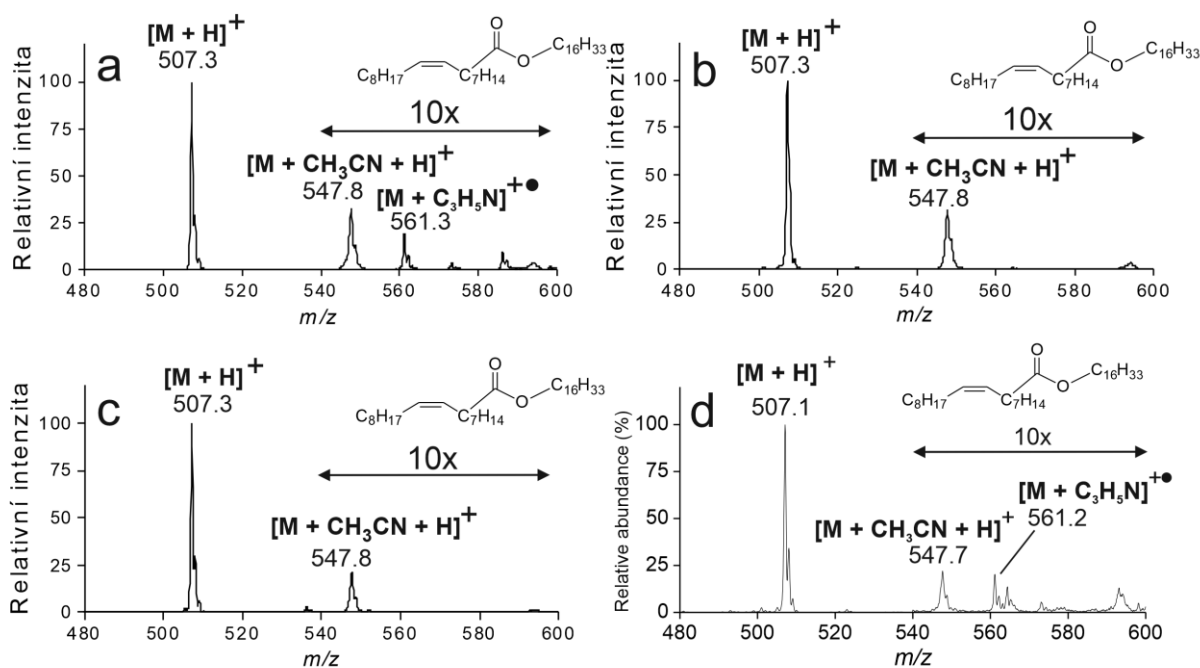


Obrázek 15: APCI+ hmotnostní spektrum acetonitrilu v uzavřeném APCI zdroji s dusíkem jako nebulizačním plynem (c) a syntetickým vzduchem jako nebulizačním plynem (d).

V uzavřeném zdroji dochází k adici iontů $\text{C}_3\text{H}_5\text{N}^+$ na dvojnou vazbu, přičemž následná fragmentace reakčního produktu $[\text{M} + \text{C}_3\text{H}_5\text{N}]^+$ odhalí polohu dvojně vazby. Ukázalo se však, že v otevřeném zdroji se tento typ reakčních produktů netvoří, zatímco byla za stejných

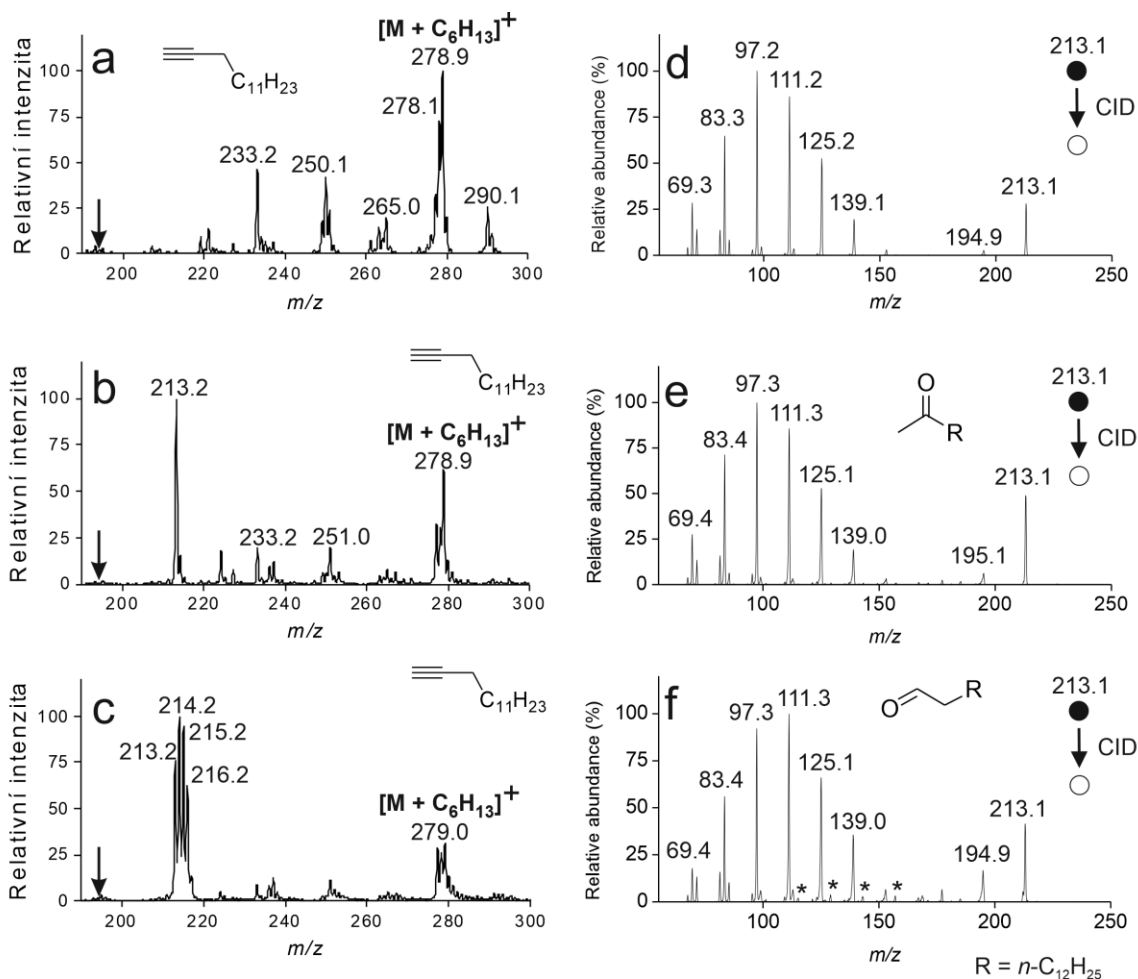
podmínek demonstrována jeho tvorba v uzavřeném zdroji na palmityleátu (obrázek 16 a-c). Příčinou byl opět kyslík; ke vzniku reakčních produktů $[M + C_3H_6N]^+$ nedocházelo ani v uzavřeném zdroji když se jako nebulizační plyn použil syntetický vzduch. Voda ale jejich vznik nepotlačovala, ani když tvořila 20 % (v/v) rozpouštědla (obrázek 16d). Pravděpodobně se v přítomnosti kyslíku přednostně tvořily ionty typu $(CH_3CN)_n^+$ a reakce vedoucí ke vzniku

$[M + C_3H_6N]^+$ byly potlačeny. Z těchto zjištění vyplývá, že metody používané v uzavřeném APCI zdroji mohou být neproveditelné v otevřeném zdroji kvůli některé složce vzduchu.



Obrázek 16: APCI+ hmotnostní spektrum palmityleátu v acetonitrilu v uzavřeném zdroji s dusíkem jako nebulizačním plynem (a), v uzavřeném zdroji se syntetickým vzduchem jako nebulizačním plynem (b), v otevřeném zdroji (c) a v uzavřeném zdroji s 20% podílem vody v rozpouštědle (d).

Dalším rozdílem mezi otevřeným a uzavřeným zdrojem byla tvorba artefaktů u některých analytů v otevřeném zdroji. 1-Tetradecyn v otevřeném APCI tvořil reakční produkt $[M + 19]^+$, který v uzavřeném APCI nebyl pozorován (obrázek 17 a-b) a pomocí HRMS se identifikoval jako $C_{14}H_{29}O^+$ (m/z 213,2210; $-0,3$ ppm), což odpovídá $[M + H_3O]^+$. V přítomnosti par deuterované vody v ionizační oblasti se tvořily ionty $[M + H_3O]^+$; $[M + H_2DO]^+$ $[M + HD_2O]^+$ a $[M + D_3O]^+$ což dále potvrdilo vznik reakčního produktu alkynu a vody (obrázek 17 c). Porovnáním fragmentačního spektra reakčního produktu 1-tetradecynu se standardy 2-tetradekanonu a tetradekalanu se ukázalo, že se jedná o adici vody na alkyne dle Markovnikova a ve zdroji vzniká odpovídající 2-methylketon (obrázek 17 d-f). U otevřeného zdroje je tedy nebezpečí vzniku nečekaných produktů reakce ve zdroji, které mohou vést k falešně pozitivním výsledkům a je potřebné si dávat pozor při interpretaci spekter z otevřeného zdroje.

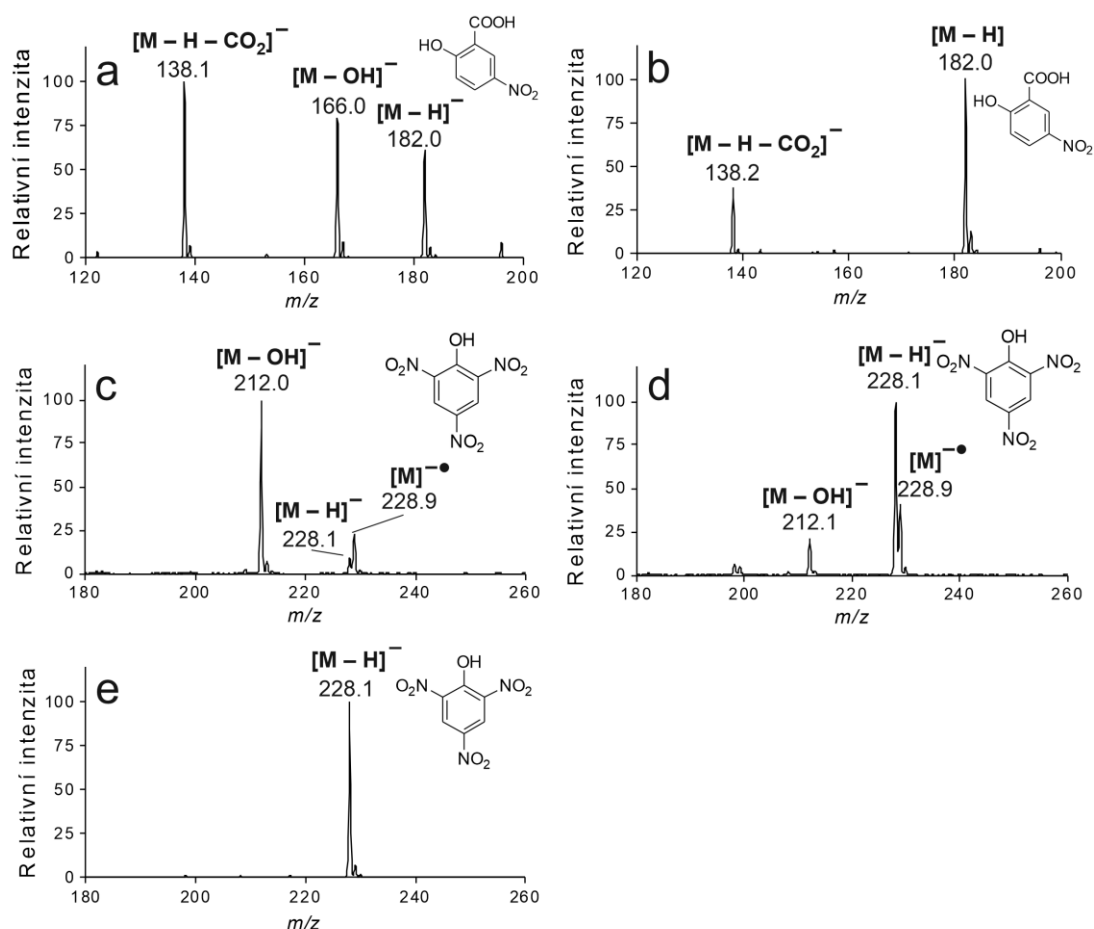


Obrázek 17: APCI+ hmotnostní spektrum tetradec-1-ynu v hexanu v uzavřeném zdroji (a) v otevřeném zdroji (b) a v otevřeném zdroji s přívodem páry těžké vody do ionizační oblasti (c). CID MS/MS fragmentační spektrum iontu 213 z obrázku 17b (d), tetradekan-2-onu (e) a tetradekanal (f). Hvězdičky ve spektru 24f odpovídají sérii fragmentů $C_nH_{(2n+1)}O^+$, která nebyla pozorována ani u ketonu, ani u reakčního produktu vody a alkyne.

4.1.5. Rozdíly v ionizaci v negativním módu

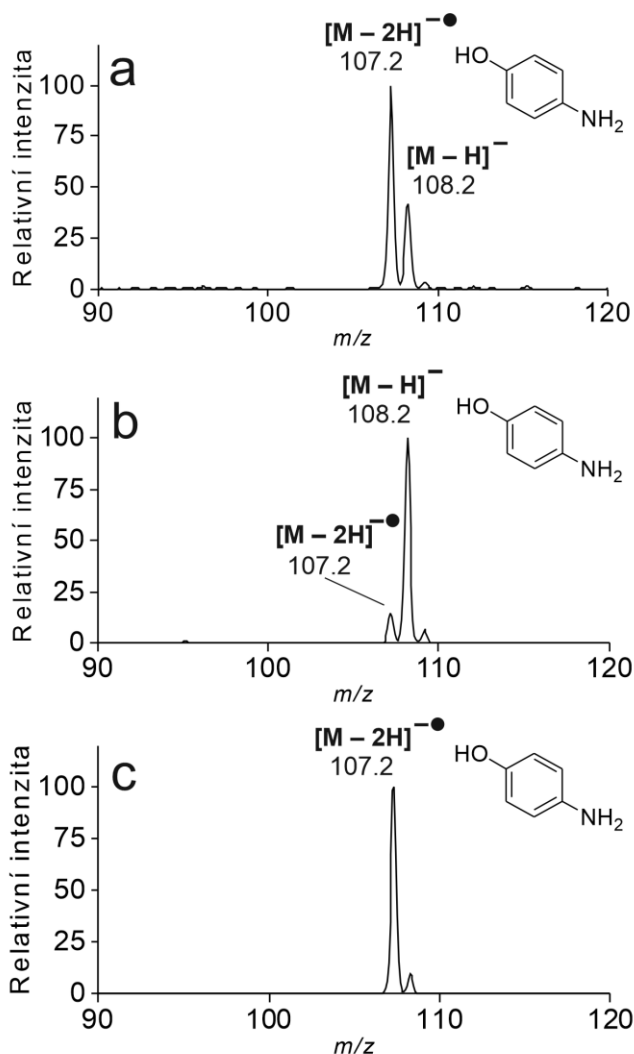
V negativním módu byly testovány nitrolátky, které mohou podstupovat jak elektronový záchyt, tak deprotonaci. Kyseliny pikrová a 5-nitro-2-hydroxysalicylová obsahují nitroskupiny jež ochotně zachycují elektrony a zároveň mají kyselý vodík, který se snadno odštěpí. Hlavním rozdílem ve spektrech obou kyselin byla výrazná přítomnost iontu $[M - 17]^-$ v uzavřeném zdroji, který vznikl disociativním elektronovým záchytem. V otevřeném zdroji byla jeho tvorba potlačena, takže ve spektru kyseliny 5-nitro-2-hydroxysalicylové nebyl ion $[M - 17]^-$ ani pozorován (obrázek 18 a-d). Potlačení elektronového záchyty lze vysvětlit přítomností molekul s pozitivní elektronovou afinitou, které zachytávají elektrony generované v APCI a elektrony se proto nedostanou k molekulám analytu. Nejpravděpodobněji se jedná o kyslík, který má pozitivní elektronovou afinitu[30] a je hojně zastoupen v atmosféře. Stejný efekt byl pozorován, když byla kyselina pikrová analyzována

v chloroformu v uzavřeném zdroji (obrázek 18 e). Chloroform s pozitivní elektronovou afinitou vychytal většinu elektronů v APCI zdroji a ve spektru byly pozorovány výhradně produkty deprotonace. Chloroform měl tedy obdobný efekt, jako molekulární kyslík.



Obrázek 18: APCI– hmotnostní spektrum kyseliny 5-nitro-2-hydroxybenzoové v methanolu (a,b), a kyseliny pikrové v methanolu (c,d) v uzavřeném zdroji (a,c) a otevřeném zdroji (b,d). APCI– hmotnostní spektrum kyseliny pikrové v chloroformu v uzavřeném zdroji (e).

Kyslík v ionizační oblasti otevřeného zdroje měl za následek i další pozorované jevy. Hassan et al pozoroval v zdroji HePI (helium plasma ionization) zvýšenou tvorbu iontů $[M - 2H]^-$ u fenolických látek a připisoval je přítomnosti kyslíku[191]. Testovali jsme tedy vliv přítomnosti krytu na ionizaci p-nitrofenolu. K jeho ionizaci byla použita vysoká koncentrace (1 mg/ml) a přesto v uzavřeném zdroji vykazoval slabý signál, převážně iontu $[M - H]^-$ (obrázek 19a) V otevřeném zdroji byl jeho signál mnohem větší a převažovaly ionty $[M - 2H]^-$ (obrázek 19b), jak bylo pozorováno v HePI. Abychom potvrdili kyslík jako molekulu odpovědnou za pozorovaný jev, použil se jako nebulizační plyn stlačený vzduch v uzavřeném zdroji (obrázek 19c). Hmotnostní spektrum vypadalo velmi podobně jako to z otevřeného zdroje, čímž se potvrdila role kyslíku při mechanismu tvorby iontů $[M - 2H]^-$.

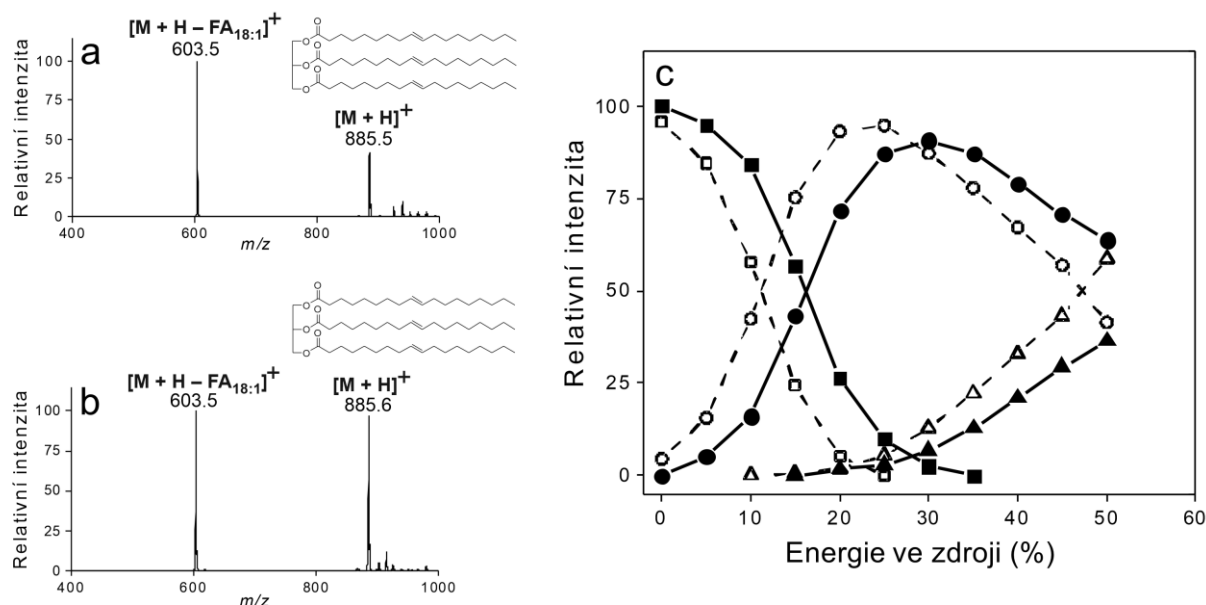


Obrázek 19: APCI– hmotnostní spektrum p-nitroanilinu v otevřeném zdroji (a), v uzavřeném zdroji s dusíkem jako nebulizačním plynem (b) a v uzavřeném zdroji se syntetickým vzduchem jako nebulizačním plynem (c).

4.1.6. Rozsah fragmentace v otevřené a uzavřené konfiguraci

Při porovnání spekter trielaidinu byla pozorována menší fragmentace v otevřeném zdroji než v uzavřeném (obrázek 20 a,b). Jedním z možných vysvětlení byl rozdíl teplot proudu plynu vycházejícího z APCI sondy, přičemž v případě otevřeného zdroje docházelo k většímu zchlazení plynu a následně snížení energie zplyněných molekul trielaidinu. Nižší energie pak vyústila v menší fragmentaci trielaidinu v otevřeném zdroji. Naopak, u uzavřeného zdroje mohlo docházet ke zvyšování teploty vnitřku v důsledku zahřívání kovového krytu APCI sondou. Pro studium rozsahu fragmentace v obou konfiguracích se použila fragmentace indukovaná ve zdroji a jako modelová molekula byl vybrán TEMPO, protože tvoří zanedbatelné množství fragmentů na rozdíl od trielaidinu. Fragmentace byla větší u uzavřeného zdroje při použití všech fragmentačních energií (obrázek 20c). Také byly proměřeny teploty proudu plynu v uzavřeném a otevřeném zdroji a byl zjištěn rozdíl asi 40 °C (130 °C pro otevřený a 170 °C pro uzavřený). Snížená fragmentace je důležitá u

kvantitativních analýz, protože při rozsáhlé fragmentaci se snižuje citlivost detekce molekulového aduktu. Z tohoto pohledu je výhodnější otevřený zdroj.



Obrázek 20: APCI+ hmotnostní spektrum trielaidinu v uzavřeném (a) a otevřeném zdroji (b). Diagram znázorňující relativní zastoupení mateřského a fragmentačních iontů v závislosti na in-source fragmentační energii (c). Prázdné symboly představují data z uzavřeného zdroje, plné symboly z otevřeného zdroje. Čtverec představuje relativní intenzity iontu m/z 157 $[M+H]^+$, kroužek představuje relativní intenzity iontu m/z 142 $[M+H-CH_3]^+$, a trojúhelník představuje relativní intenzity iontu m/z 109 $[M+H-CH_3-NH_2OH]^+$.

4.1.7. Shrnutí k otevřené a uzavřené konfiguraci

Rozdíly v otevřené a uzavřené konstrukci se ukázaly být značné v pozitivním i negativním módu. Obecně se u otevřené konstrukce jednalo o potlačení radikálových reakcí. Zároveň v pozitivním módu došlo ke zvýšení protonace v otevřeném zdroji díky vodní páře ze vzduchu, která byla v uzavřeném zdroji po určitém čase (asi 30 minut) z velké části vyfoukána pryč a prakticky nepřítomna. V případě alkyňů byl dokonce v otevřeném zdroji pozorován reakční produkt $[M+H_3O]^+$ který tím dával falešně pozitivní výsledek pro sloučeninu, která se v analyzovaném roztoku nevyskytovala a vznikala reakcemi v zdroji. Z těchto důvodů je velice důležité posoudit, jakou konfiguraci má zdroj mít. Uzavřená konfigurace se jeví být lepší alternativou, protože je u ní možné mnohem líp kontrolovat podmínky ionizace přidáním žádaných aditiv do mobilní fáze nebo nebulizačního plynu. Otevřená konfigurace tuto možnost nemá a ionizace je ponechána napospas aktuálnímu složení vzduchu, které se může měnit s časem, nebo může být v každé laboratoři jiné (například vlhkost vzduchu, kontaminanty ve formě molekul rozpouštědel atd.). Na druhé straně se v otevřeném zdroji vyskytovala mnohem nižší fragmentace, což by mohlo představovat výhodu při analýze termolabilních látek. Obě konfigurace tedy mají výhody a nevýhody. U obou konstrukcí (z velké části u uzavřeného) ale byly při vyšších teplotách a při použití rozpouštědel s nižším bodem varu (např. chloroformu a sirouhlíku) pozorovány velké

nepravidelné změny intenzity signálu. Způsobovalo to nepravidelné odpařování rozpouštědla v kapiláře uvnitř komerční APCI sondy v důsledku relativně vysoké teploty vzhledem na malý průtok kapaliny. Komerční zdroj má tedy omezené použití v APCI při nízkých průtocích.

4.2. Experimentální iontové zdroje

Komerční zdroj pro APCI použitý pro testování chemických procesů při ionizaci nefungoval při nízkých průtokových rychlostech vzorku optimálně. Tento zdroj byl navržen a je výrobcem specifikován pro výrazně vyšší průtoky (100 – 2000 $\mu\text{l}/\text{min}$). Protože neexistuje komerčně dostupná verze nízkoprůtokového APCI, pokusili jsme se navrhnout a otestovat několik variant takového zdroje. Ve všech případech byl iontový zdroj řešen jako otevřený (bez ochranného krytu). Zdroje se od sebe lišily zejména způsobem rozprašování vzorku, tj. konstrukcí zmlžovače (jinak též sprejeru). Postupně byly testovány 3 konstrukčně různé zmlžovače, které budou popsány v následujících kapitolách.

4.2.1. APCI zdroj na bázi otevřeného trubicového zmlžovače

Navržený trubicový zmlžovač byl jednoduchou miniaturizovanou verzí komerčních zmlžovačů používaných v APCI. Sestával z odporově vyhřívané křemenné nebo korundové trubice, do které byl zaváděn nebulizační plyn a v jejímž středu byla koncentricky umístěná křemenná kapilára pro přívod kapalného vzorku. Zdroj byl do jisté míry konstrukčně podobný APCI zdroji pro submikrolitrové průtoky, který byl vytvořený Nyholmem et al.[186]. Nově navržený zmlžovač byl určen pro průtokové rychlosti vzorku 1 - 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ a jeho konstrukce byla vedena snahou o co nejjednodušší řešení, snadno realizovatelné v běžné laboratoři z běžně dostupných šroubení a dalších komponent. Motivací byla rovněž možnost ovlivňování vlastností topené zóny, čímž by se vyřešilo přehřívání kapaliny známé z komerčních APCI zdrojů při používání nízkých průtoků kapaliny, jak bylo zmíněno výše. Nejdřív se optimalizovaly parametry geometrie zmlžovače a poté další parametry (jako například průtok plynu, průtok vzorku, stabilita signálu atd.). Nakonec byl zdroj s trubicovým zmlžovačem otestován za podmínek HPLC/MS.

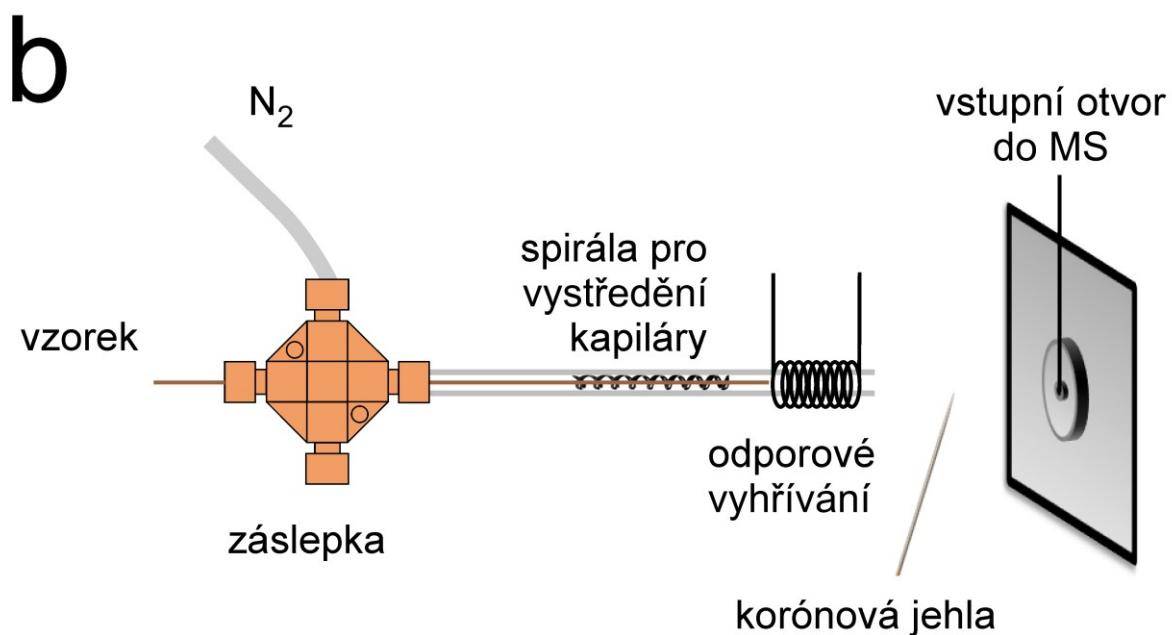
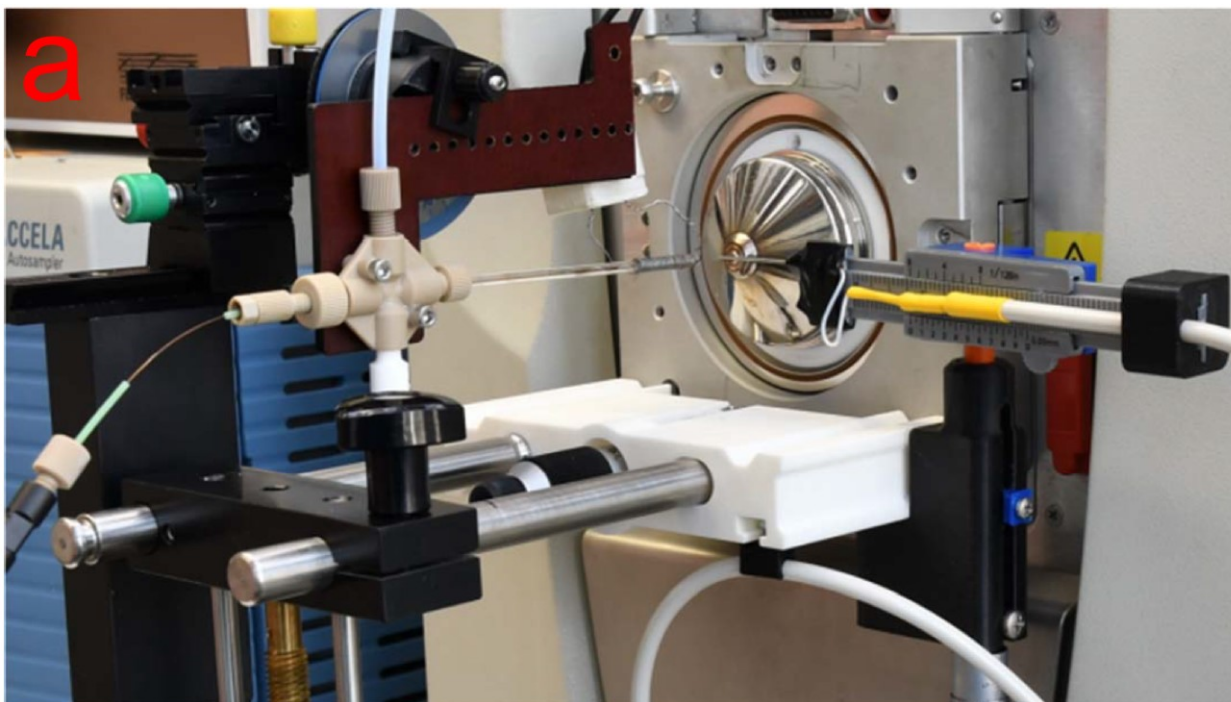
4.2.1.1. Hledání optimální konstrukce

Obecná konstrukce (obrázek 21) byla založena na trubici (křemenné nebo korundové) s odporovým vyhříváním na konci a koncentricky umístěnou křemennou kapilárou uvnitř. Z konce trubice (asi posledních 3 cm) byla odstraněna polyamidová vrstva, protože při zahřívání by se z ní mohly uvolňovat nežádoucí látky. Koncentrická poloha křemenné kapiláry byla zabezpečena pomocí spirály z tenkého kovového drátu (o průměru 0,4 mm) vložené uvnitř trubice. Křemenná kapilára (vnější průměr 375 μm , vnitřní průměr 25 μm) centrovaná kovovou spirálou procházela skrz nízkotlaký polyether ether ketonový (PEEK-

ový) kříž, ke kterému byla také připevněna křemenná nebo korundová trubice pomocí 1/8 palcového šroubení. Další otvor kříže sloužil k přívodu nebulizačního plynu (dusíku). Průtok dusíku byl regulován pomocí regulátoru průtoku plynu (GFCS mass-flow controller, Aalborg, Orangeburg, NY, USA). Čtvrtý otvor kříže byl zaslepený a připravený k případnému zavádění dopantu.

První testování bylo zaměřeno na výběr trubice. Intenzita signálu byla porovnána u dvou trubic, křemenné o vnějším průměru 3,0 mm a vnitřním průměru 1,5 mm; a korundové o vnějším průměru 2,2 mm a vnitřním průměru 1,3 mm. U korundové trubice se zaznamenal vyšší signál, pravděpodobně díky menší tloušťce pláště trubice a díky lepším tepelně-vodivostním vlastnostem korundu. Tepelná vodivost použitého křemenného skla při 20 °C je 1,4 W m⁻¹ K⁻¹ (cit. [192]) a korundu 41,9 W m⁻¹ K⁻¹ (cit. [193]). Proto se v dalších experimentech používala korundová trubice.

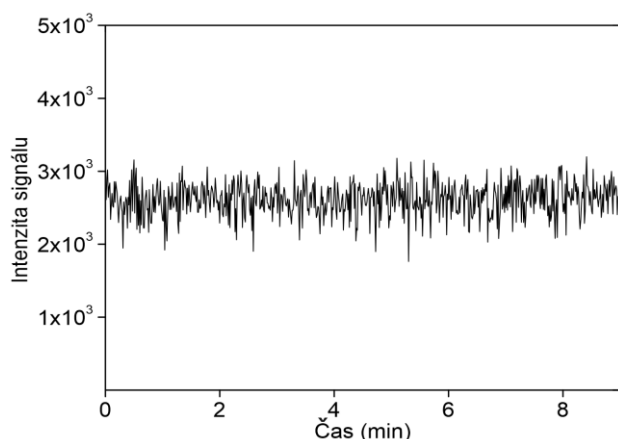
Dalším studovaným parametrem byla délka křemenné kapiláry uvnitř vnější korundové trubice. Porovnali jsme dvě uspořádání – v prvním případě byla vnitřní křemenná trubice stejně dlouhá jako vnější korundový plášť, ve druhém případě byla kratší, přičemž její ústí končilo před částí vnějšího pláště vyhřívaného odporovým topením (viz obr. 20b). V prvním případě, tj. když přecházela skrz topení, se často ucpávala tepelně degradovanými analyty a byl pozorován nestabilní signál, zřejmě v důsledku vznikajících bublin plynu uvnitř kapiláry. Ve druhém případě, tj. při umístění konce kapiláry v dostatečné vzdálenosti od topení tyto problémy nebyly pozorovány. Nemohla se ale umístit příliš daleko od topení, protože pak se na konci kapiláry tvořila kapka a nedocházelo k dostatečnému odpařování. Nové umístění kapiláry tedy řešilo problém, který byl pozorován i v komerčním APCI při použití nízkých průtoků kapaliny. U něj nedocházelo k ucpávání kapiláry, ale byl pozorován nestabilní signál analytů v důsledku přehřívání přiváděné kapaliny. V komerčním APCI není možné tento problém odstranit snížením teploty, protože by došlo k nedostatečnému odpařování analytů s vysokým bodem varu. Pro přímé přivádění vzorku je proto otevřený trubicový zmlžovač lepší alternativou než komerční APCI zdroj.



Obrázek 21: Fotografie otevřeného trubicového zmlžovače (a), a jeho schematické znázornění s popisem (b).

4.2.1.2. Charakteristika signálu

Při testování APCI s trubicovým zmlžovačem bylo zjištěno, že stabilita signálu závisí na proudění vzduchu v laboratoři, které je ovlivněno klimatizací nebo prudkým otevřením dveří. To byla zřejmá nevýhoda otevřené konstrukce zdroje (absence krytu). Po vypnutí klimatizace byl u akridinu (50 $\mu\text{mol/l}$ v acetonitrilu) dosažen stabilní signál, který měl za podmínek výkonu topení 10,5 W, průtoku nebulizačního plynu 220 ml/min a průtoku vzorku 1,0 $\mu\text{l/min}$ hodnotu relativní směrodatné odchylky (RSD) 7,5 % (obrázek 22).

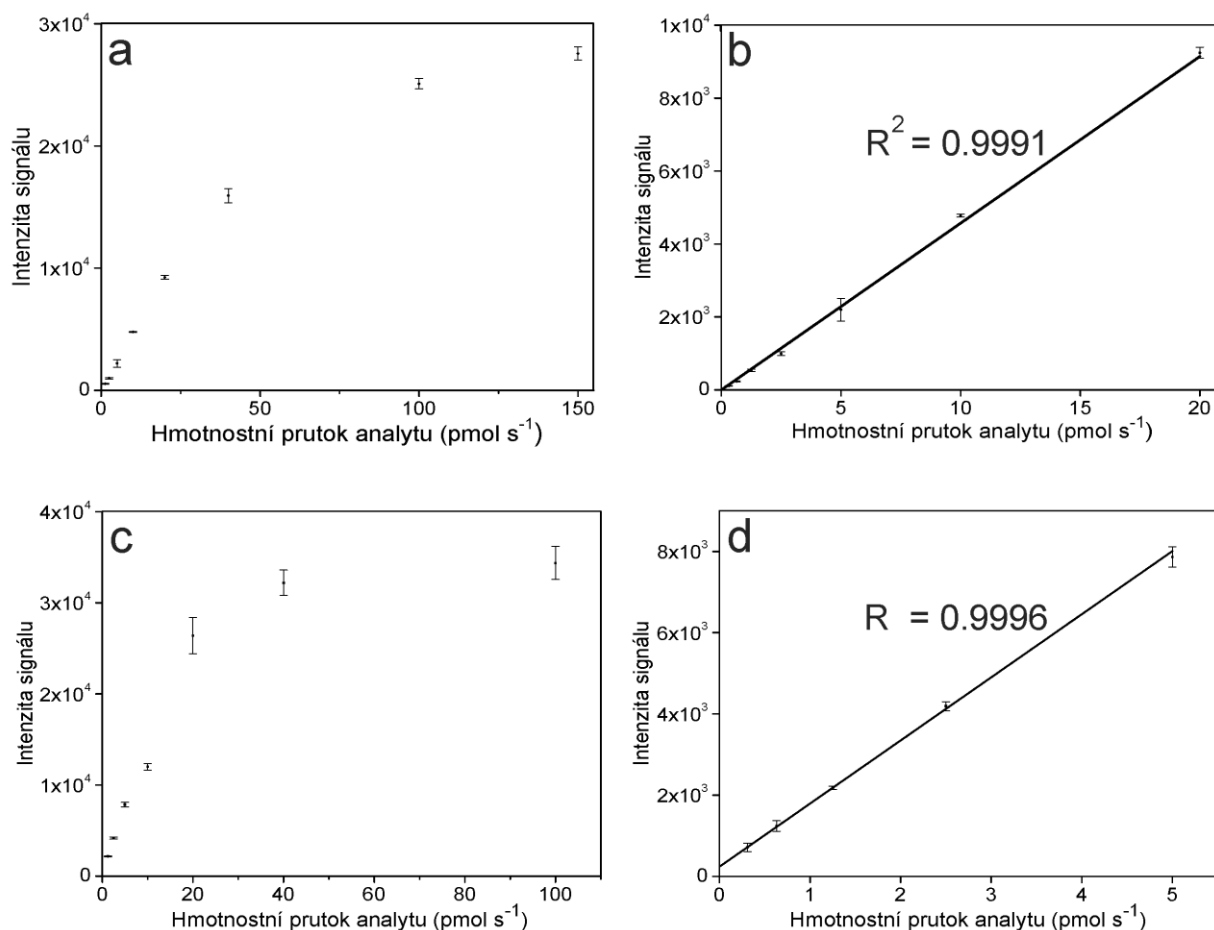


Obrázek 22: Signál akridinu v acetonitrilu (50 $\mu\text{mol/l}$) o průtoku vzorku 1,0 $\mu\text{l/min}$. Průtok nebulizačního plynu byl 220 ml/min a výkon topení byl 10,5 W.

4.2.1.3. *Porovnání otevřeného trubicového zmlžovače s komerčním APCI zdrojem*

Intenzita signálu akridinu se měnila s průtokovou rychlostí vzorku. To znamená, že stejně jako APCI o vysokých průtocích a nano-ESI[182] je i APCI zdroj s trubicovým zmlžovačem hmotnostně-citlivým detektorem. Takové detektory reagují na změnu hmotnostního toku, na rozdíl od koncentračně-citlivých detektorů, které reagují na změny koncentrace analytu v roztoku. Pro porovnání citlivostí konvenčního vysokoprůtokového APCI s nízkoprůtokovým APCI s trubicovým zmlžovačem byly proměřeny kalibrační závislosti, které byly vyjádřeny závislostí intenzity signálu na hmotnostním toku analytu. K měření byly použity roztoky akridinu 6,2 $\mu\text{mol/l}$ – 3,0 mmol/l při průtoku 3 $\mu\text{l/min}$ pro zdroj s trubicovým zmlžovačem a 0,04 – 12,0 $\mu\text{mol/l}$ při průtoku 500 $\mu\text{l/min}$ pro konvenční zdroj, přičemž hmotnostní tok byl v obou zdrojích v daných rozsazích přibližně stejný.

Z obrázku 23 je vidět, že komerční APCI poskytuje větší signál. U otevřeného trubicového zmlžovače byl však mnohem menší šum než v případě komerčního APCI, proto se mez detekce snížila 17-krát (tabulka 4). Komerční zdroj má menší dynamický rozsah i lineární dynamický rozsah oproti otevřenému trubicovému zmlžovači.



Obrázek 23: Kalibrační křivka akridinu v otevřeném trubicovém zmlžovači (a) a její lineární část (b), kalibrační křivka akridinu v komerčním APCI zdroji (c) a její lineární část (d). U trubicového zmlžovače byl průtok nebulizačního plynu 180 ml/min a výkon topení $9,3 \text{ W}$.

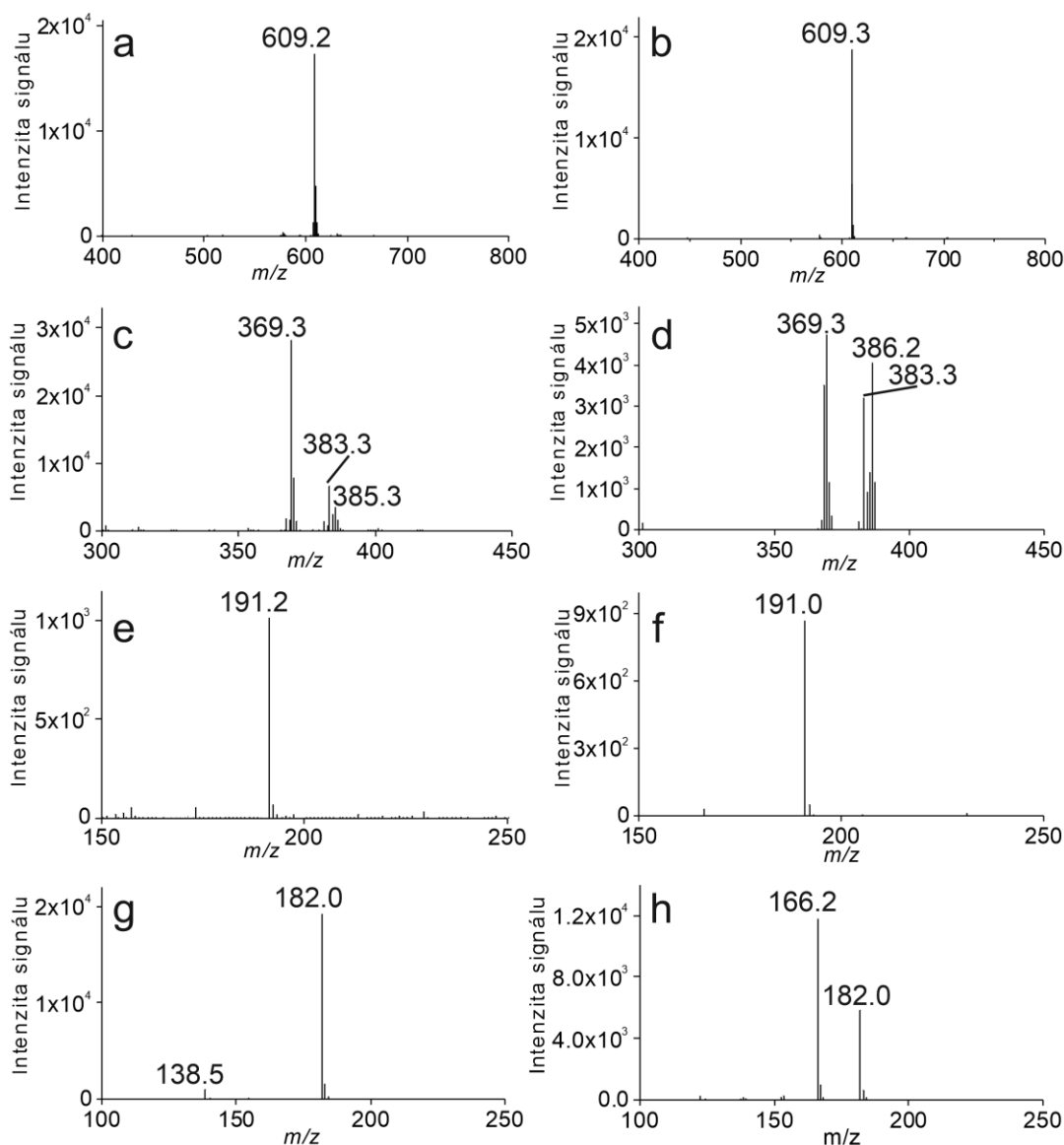
Tabulka 4: Parametry kalibrační závislosti pro akridin v komerčním APCI zdroji a v trubicovém zmlžovači. LOD se vypočetlo jako trojnásobná hodnota signálu šumu $s/m/z$ nejbližší k m/z 180.1 (protonovaný akridin) vydělena směrnici lineární části kalibrační přímky.

Iontový zdroj	LOD (fmol/s)	Dynamický rozsah (pmol/s)	Lineární dynamický rozsah (pmol/s)
Komerční APCI	170	0,17 až > 40	0,17–5
Otevřený trubicový zmlžovač	10	0,01 až > 150	0,01–20

Po měření vzorků byl však často pozorován paměťový efekt a při použití vysokých koncentrací nebo dlouhého měření bylo nutné zmlžovač rozebrat a vnější korundovou trubicí umýt v rozpouštědle. Teplota generovaná odporovým drátem při výkonu do $10,5 \text{ W}$ a při průtoku nebulizačního plynu do 220 ml/min zřejmě nepostačovala k dostatečné desorpci málo těkavých analytů z konce trubice, případně přenos tepla přes trubicí nebyl dostatečně efektivní. Použití vyšší teploty při stejném průtoku nebulizačního plynu nebylo možné, protože by mohlo dojít k přepálení odporového drátu topení.

Aby se porovnala ionizace ve zdroji s otevřeným trubicovým zmlžovačem s ionizací v komerčním APCI zdroji, byly v nich proměřeny čtyři analyty: v pozitivním módu reserpin

v acetonitrilu (50 $\mu\text{mol/l}$, obrázek 24a,b) a cholesterol v toluenu (260 $\mu\text{mol/l}$, obrázek 24c,d) a v negativním módu kyselina citronová v methanolu (500 $\mu\text{mol/l}$, obrázek 24e,f) a kyselina 5-nitro-2-hydroxybenzoová v methanolu (500 $\mu\text{mol/l}$, obrázek 24g,h). Průtok mobilní fáze byl u otevřeného trubicového zmlžovače 3 $\mu\text{l/min}$ (pozitivní mód) a 5 $\mu\text{l/min}$ (negativní mód), zatímco u komerčního APCI zdroje byl vždy 500 $\mu\text{l/min}$. Jak je vidět na obrázku 24, u reserpinu a kyseliny citronové nebyl pozorován žádný rozdíl v ionizaci. U reserpinu docházelo v obou zdrojích k protonaci, zatímco u kyseliny citronové docházelo v obou zdrojích k deprotonaci. Cholesterol v toluenu se také v obou zdrojích protonoval, nejčastěji s následnou neutrální ztrátou vody za vzniku iontu $[\text{M} + \text{H} - \text{H}_2\text{O}]^+$ (m/z 369,3), V komerčním APCI zdroji se kromě toho tvořil radikalkation cholesterolu, $[\text{M}]^{+\bullet}$ (m/z 386,2), který v otevřeném trubicovém zmlžovači nebyl pozorován. Vyplývá to z otevřené konfigurace otevřeného trubicového zmlžovače, v kterém převážila protonace díky difundování molekul vody z atmosféry. Toto pozorování koreluje s výsledky z kapitoly 4.1.4. U kyseliny 5-nitro-2-hydroxybenzoové byl v komerčním APCI kromě deprotonace pozorován ion $[\text{M} - \text{OH}]^-$, který se ve spektru z otevřeného trubicového zmlžovače nevyskytoval. Příčina tohoto jevu je vysvětlena v kapitole 4.1.5.

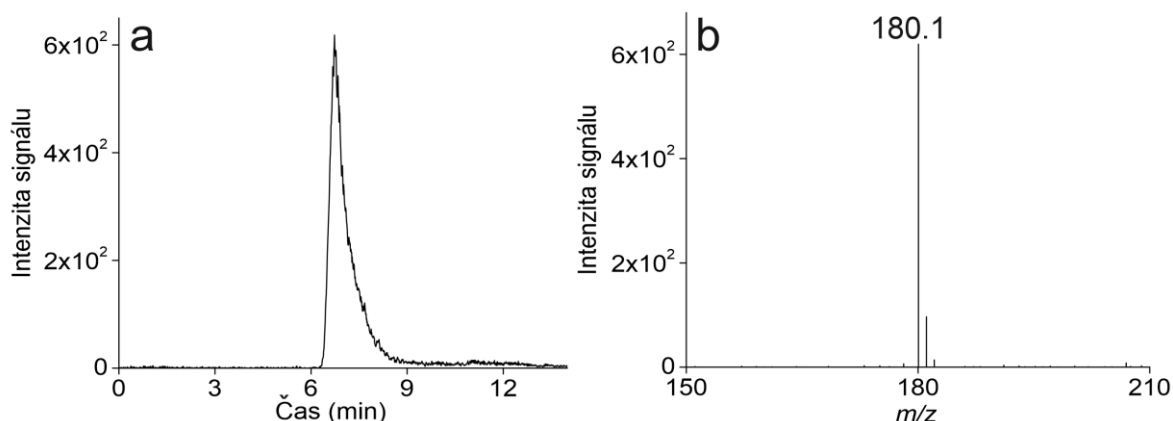


Obrázek 24: APCI+ hmotnostní spektrum reserpinu v acetonitrilu (a,b), cholesterolu v toluenu (c,d), APCI– kyseliny citronové v methanolu (e,f) a kyseliny 5-nitro-2-hydroxybenzoové v methanolu (g,h) měřené v otevřeném trubicovém zmlžovači (a,c,e,g) a v komerčním APCI zdroji (b,d,f,h).

4.2.1.4. Vysokoučinná kapalinová chromatografie s otevřeným trubicovým zmlžovačem

Možnost spojení HPLC s MS prostřednictvím trubicového zmlžovače byla otestována pro kolonu Zorbax XDB-C18 (0,5 mm vnitřní průměr x 150 mm délka, velikost částic 3,5 μm) od firmy Agilent. Jako analyt se použil akridin. Průtok mobilní fáze byl 10 $\mu\text{l}/\text{min}$, Pík akridinu byl široký a chvostoval (obrázek 25), což bylo vysvětleno paměťovým efektem. Jak je popsáno výše, paměťový efekt souvisel se zachytáváním analytu na vnitřních stěnách té části trubice, kolem které bylo omotané topení. Analyty se poté ze stěn postupně uvolňovaly a trvalo několik minut, než se analyt zcela vypláchnul. Při projevech paměťového efektu (pozorování signálu akridinu po dobu několik minut při přivádění čistého rozpouštědla) byla trubice přeláchnuta acetonitrilem a výsledný roztok byl analyzován v komerčním APCI

zdroji. Signál akridinu byl pozorován ve spektru, což dokazuje správnost hypotézy původu paměťového efektu.



Obrázek 25: Chromatogram akridinu v otevřeném trubicovém zmlžovači (a), a odpovídající hmotnostní spektrum (b).

4.2.1.5. Shrnutí – otevřený trubicový zmlžovač

Otevřený trubicový zmlžovač má jednoduchou a levnou konstrukci, kterou lze rychle a jednoduše poskládat. Hodí se zejména pro kvalitativní studie vzorků s přímým nástřikem a pro studium ionizačních reakcí v APCI. Zároveň má tento zdroj výhody nízkoprůtokového zdroje – nízká spotřeba vzorku a rozpouštědel. Jeho spojení s chromatografickými metodami ale není vhodné kvůli paměťovým efektům a velkému chvostování píků, které bylo pozorováno již u Nyholm et al[186] a nepomohlo ani použití vyšších průtoků mobilní fáze. Problém by se mohl vyřešit lepším systémem vyhřívání, který by rychle odpařil zmlžený vzorek tak, aby nedošlo k depozici analytů na stěnách vnější trubice.

4.2.2. APCI na bázi mikročipu

4.2.2.1. Porovnání detekce v mikročipovém a komerčním APCI zdroji

Mikročip ve spojení s APCI byl poprvé představen v publikaci Östmanem[194] et al v roce 2004. Podobně jako u zdroje s otevřeným trubicovým zmlžovačem byly i parametry detekce zdroje s mikročipem porovnány s parametry komerčního APCI zdroje. Jako analyt byl použitý methyloleát rozpuštěný v toluenu. Do mikročipového zdroje byly přiváděny jednotlivé kalibrační roztoky o koncentracích 0,03-500 $\mu\text{g/ml}$ průtokovou rychlostí 5 $\mu\text{l/min}$. U komerčního APCI zdroje byl použitý průtok 100 $\mu\text{l/min}$ a kalibrační standardy o stejných koncentracích

(0,03-500 $\mu\text{g/ml}$) byly nastříknuty pomocí velkoobjemové (20 μl) smyčky, aby se vždy vytvořily dostatečně široké zóny signálu kalibračních roztoků. Intenzita z plató se poté použila pro sestavení kalibrační přímky. Pro konstrukci kalibračních závislostí se použil hmotnostní průtok (jelikož se jedná o hmotnostně-citlivý detektor) a také koncentrace (pro porovnání).

Mikročipový APCI zdroj se při této metodice ukázal jako mnohem citlivější zdroj s menším LOD a větším dynamickým i lineárním dynamickým rozsahem než komerční APCI zdroj (tabulka 5). Jelikož se k porovnání obou zdrojů použil jiný analyt a jiný průtok vzorku v komerčním APCI než v případě porovnání otevřeného trubicového zmlžovače, nelze výsledky z těchto zdrojů porovnat. V obou případech je však zřejmé, že při zvolených podmínkách se u analytů dosahuje menší limit detekce v miniaturizovaném zdroji než v komerčním zdroji.

Tabulka 5: Parametry kalibrační závislosti pro methyloléat v komerčním APCI zdroji a v mikročipovém APCI zdroji. Hodnota LOD se vypočetla jako trojnásobek signálu šumu z m/z 297,3 získaného v toluenu vydělený směrnici lineární části kalibrační přímky.

Iontový zdroj	LOD (fmol/s)	LOD (nmol/ml)	Dynamický rozsah (nmol/ml)	Lineární dynamický rozsah (nmol/ml)
Komerční APCI	1550	0,93	0,62–843	0,62–15
Mikročipové APCI	20	0,19	0,13–1986	0,13–116

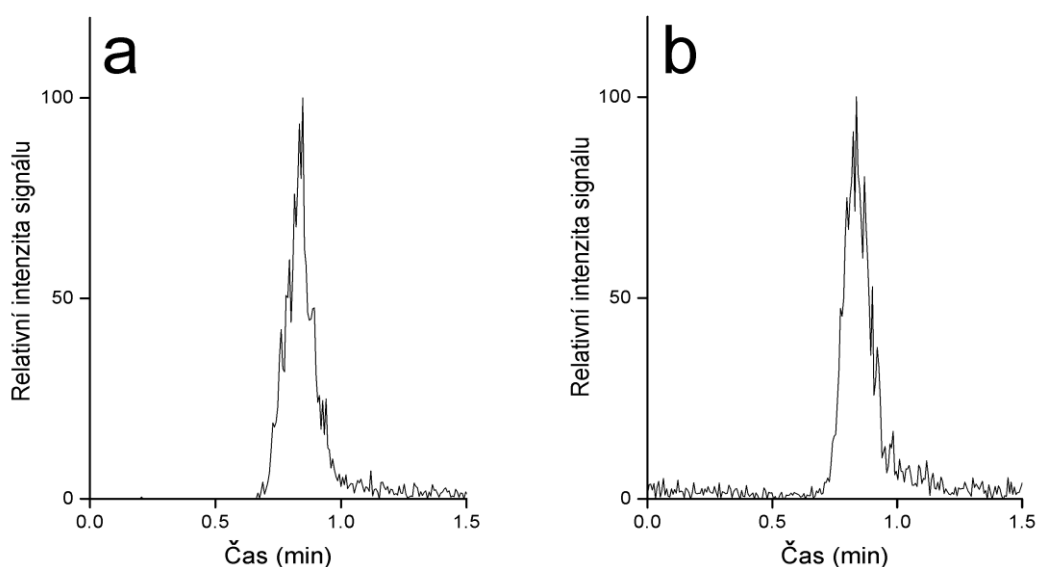
Další porovnání mikročipového APCI zdroje s komerčním APCI zdrojem se uskutečnilo pro methylinoléat rozpuštěný ve směsi methanol:chloroform v poměru 3:1. Koncentrace roztoků methylinoléatu se pohybovala v rozmezí 1-10000 $\mu\text{g/ml}$. Tentokrát se měření neprovádělo přímou infuzí, ale nástřikem analytu do smyčky a analýzou výšek a ploch píků. Signál se zaznamenával v módu monitorování jedné reakce (SRM), aby se snížil dopad signálu šumu na kalibraci. Byl použitý fragmentační přechod m/z 295,2 > 263,2 při normalizované kolizní energii 30 %. Hodnota signálu šumu a následně LOD byly určeny z parametrů píků blanku, kterým byla čistá směs rozpouštědel methanol:chloroform v poměru 3:1. Průtok v obou zdrojích byl stejný, 10,0 $\mu\text{l/min}$.

Mikročipový zdroj se i v tomto případě ukázal jako zdroj s nižší mezí detekce (tabulka 6). Lineární dynamický rozsah není ohraničen v horních hodnotách koncentrace, protože linearita platila i pro nejkonzentrovanejší použité vzorky u obou zdrojů. Z toho důvodu nelze určit, jestli má mikročip širší lineární dynamický rozsah než komerční APCI. V nízkých hodnotách koncentrací je ale lineární dynamický rozsah ohraničen hodnotou LOD, a proto má mikročip hranici lineárního dynamického rozsahu v nižších koncentracích než komerční APCI zdroj. Z tohoto důvodu se mikročipový zdroj jeví jako lepší alternativa než komerční APCI zdroj.

Tabulka 6: Parametry kalibrační závislosti pro methyllinoleát v komerčním APCI zdroji a v mikročipovém APCI zdroji.

Iontový zdroj	LOD (µg/ml)	Lineární dynamický rozsah	R ²
Komerční APCI	3,45	3,45 µg/ml až > 10 mg/ml	0,9985
Mikročipové APCI	0,42	0,42 µg/ml až > 2,5 mg/ml	0,9991

Tvary píků použitých ke kalibraci jsou téměř Gaussovské u obou zdrojů (obrázek 26). U mikročipového zdroje nebylo pozorováno chvostování v porovnání s otevřeným trubcovým zmlžovačem. Na rozdíl od otevřeného trubcového zmlžovače je tedy mikročipový APCI zdroj lépe použitelný jako rozhraní v LC/MS.



Obrázek 26: Pík methyllinoleátu v komerčním APCI zdroji (a) a v mikročipovém APCI zdroji (b) při koncentraci 31,25 µg/ml.

4.2.2.2. Porovnání konstrukce mikročipového zdroje s otevřeným trubcovým zmlžovačem

Oproti otevřenému trubcovému zmlžovači má pevně danou konstrukci, kterou nelze měnit. Výhodou toho je reprodukovatelnost měření, nevýhodou malá flexibilita konstrukce (například nelze změnit velikost vyhřívané zóny, polohu kapiláry v mikročipu, průměr kanálků v mikročipu apod.). Také z toho vyplývá, že po porušení některé části není možné mikročip opravit. Na druhé straně má mikročipový APCI zdroj potenciál být rozhraním pro spojení LC/MS, protože poskytuje úzké píky bez chvostování a nejsou pozorovány paměťové efekty[188], jako v případě otevřeného trubcového zmlžovače.

V obou zdrojích je kapalný vzorek přiváděn křemennou kapilárou. V případě mikročipu kapilára ústí do kanálku tvaru poloviční elipsy zřezané podél velké osy s délkou hlavní osy přibližně

900 µm a vedlejší osy 460 µm, který prochází skrz mikročip. Principiálním rozdílem mezi

oběma zdroji je umístění topení, které je v případě mikročipu umístěno podél kanálku určeného pro přívod kapaliny v celé jeho délce. Kromě toho topení také vede podél kanálku přivádějícího nebulizační plyn, čímž se nebulizační plyn ohřívá ještě před zmlžením vzorku. U otevřeného trubicového zmlžovače je topení umístěno těsně za ústím křemenné kapiláry přivádějící kapalný vzorek, takže se kapalný vzorek i nebulizační plyn ohřívají až při ústí křemenné kapiláry. Částečně se tím předejde ucpání křemenné kapiláry přivádějící kapalný vzorek, které bylo pozorováno u mikročipu.

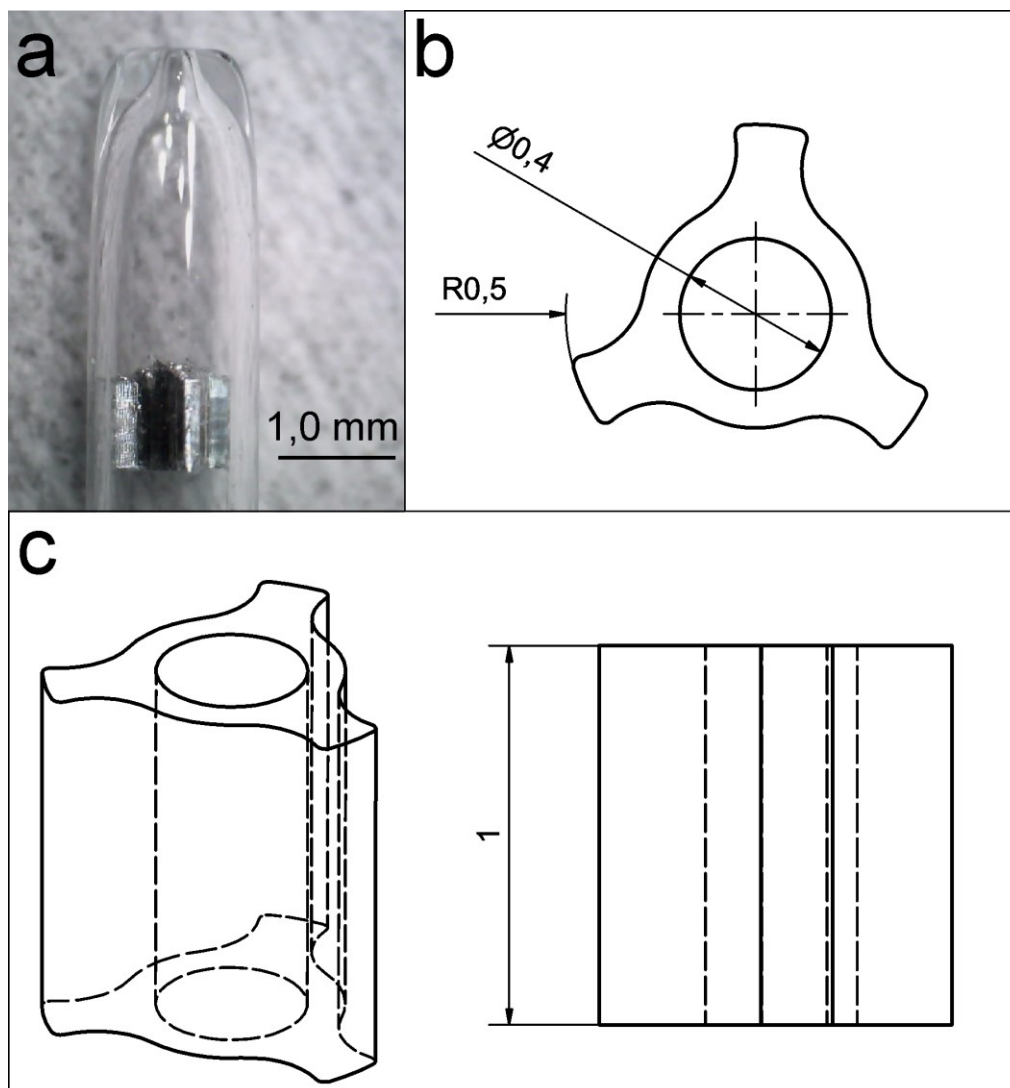
4.2.3. GDVN-APCI zdroj

GDVN zmlžovač byl původně vyvinutý jako velmi účinný generátor úzkého kapkového spreje [151],[195] určeného k využití například pro pokrývání materiálů, mikroenkapsulace, tvorbu vysoce kvalitních vláken atd. Jako zmlžovač pro hmotnostní spektrometrii byl poprvé použitý v naší laboratoři, a to v nízkoprůtokovém APCI zdroji (GDVN-APCI zdroj). Díky tomu, že kapalina v GDVN nepřichází do styku s vnitřními stěnami zmlžovače, nedocházelo u tohoto zmlžovače k ucpávání kapilár. Byl tedy vhodným kandidátem pro využití v APCI zdroji. Nový APCI zdroj na bázi GDVN byl sestaven ze tří hlavních částí: GDVN zmlžovače, topení k odpaření kapek spreje a korónové jehly. V porovnání se zdrojem s otevřeným trubicovým zmlžovačem a mikročipovým zdrojem měl GDVN-APCI zdroj výhodu v tom, že vyhřívaná zóna nebyla součástí zmlžovače. Z kapalného vzorku se v GDVN vytvořil fokusovaný proud malých kapiček. Rozpouštědlo se z kapiček odpařilo až v dalším prvku zdroje, vyhřívané křemenné trubici.

4.2.3.1. Výroba GDVN zmlžovače

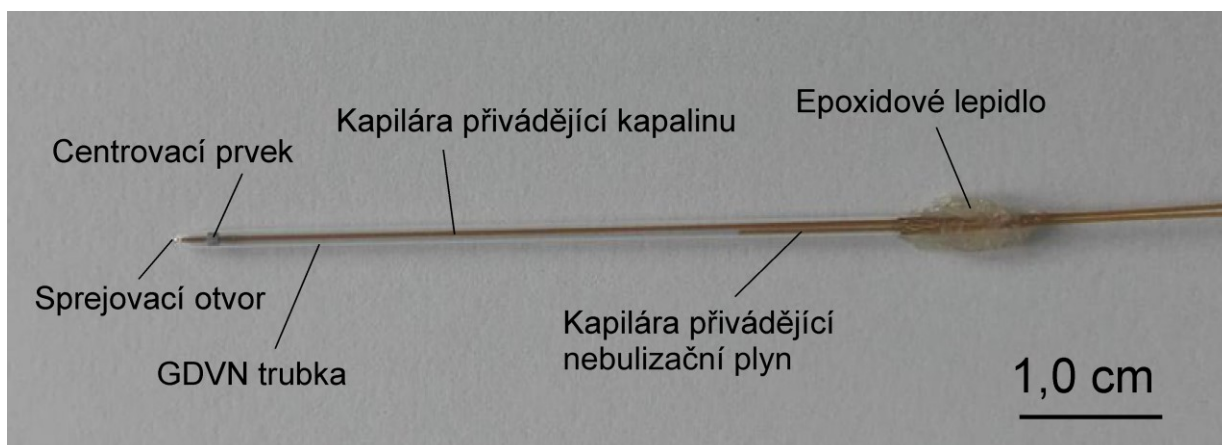
Vnější část zmlžovače GDVN (obrázek 4) byla tvořena skleněnou trubicí, jejíž jeden konec byl upraven tak, aby vznikl otvor o průměru několika desítek mikrometrů. Toho lze docílit kontrolovaným tavením konce trubice v plamenu. Muselo se zajistit, aby byl otvor kruhového tvaru a aby byl symetricky umístěn v rámci konce trubice (jinými slovy, aby sprej sprejoval rovně, a ne do strany). K jeho výrobě byly použity borosilikátové kapiláry určeny pro bodotávek (vnitřní průměr 1,15 mm, vnější průměr 1,55 mm), z kterého byla odříznutá zaslepená část. Takto upravená trubička byla upevněna do sklíčidla akumulátorové vrtačky ASE 18-2G a za otáčení přibližně 1-10 otáček za sekundu byla vložena na 2 – 4 sekundy do středu plamene lihového kahanu. Otáčení trubičky zajistilo rovnoměrnou distribuci tepla a mělo za následek lepší tvar otvorů (centrované a kruhové otvory), než když se trubice pouze staticky vložila do plamene. Plamen kahanu byl chráněn skleněnou trubicí proti průvanu, který někdy plamenem hýbal. Vytvořená skleněná trubice (dále označovaná jako „GDVN trubice“), měla tvar, který je na obrázku 27a. Vnitřní prostor GDVN trubice se sigmoidně zužoval k sprejovacímu otvoru s inflexním bodem přibližně 400 μm od sprejovacího otvoru. Sprejovací otvor měl průměr 0,1 až 0,4 mm. Pro výrobu GDVN zmlžovače byly použity GDVN trubice se sprejovacími průměry v rozsahu 0,2 až 0,3 mm. V dalším kroku výroby zmlžovače byl asi 3 mm před sprejovací otvor do GDVN trubice vložen kovový centrovací prvek (fotografie na obrázku 27a, technické nákresy na obrázku 27b-c). Centrovací prvek byl

zhotoven ve Vývojovém centru ÚOCHB a jeho otvor měl přesný rozměr, aby skrze něho prošla křemenná kapilára o vnějším průměru 360 μm .



Obrázek 27: Fotografie GDVN trubice s kovovým centrovacím prvkem (a), technický náčrt centrovacího prvku při pohledu shora (b) a z boku (c). Číselné údaje jsou vzdálenosti v mm. Autorem obrázků 23b a 23c je Ondřej Pačes.

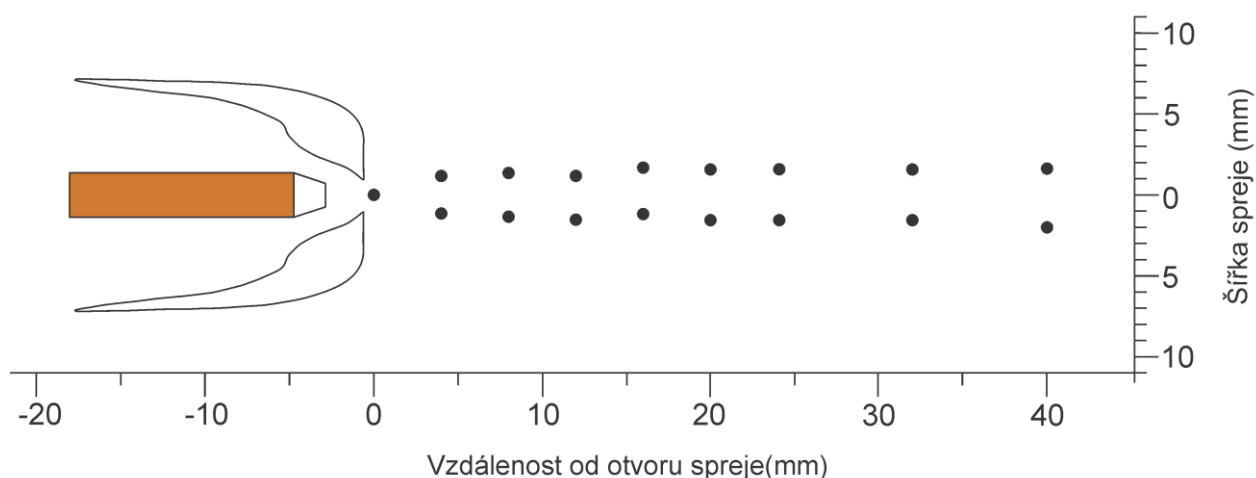
Do GDVN trubice se skrze centrovací prvek provlékla kapilára zakončená zbroušením ve tvaru kužele („tapered tip“ kapilára, vnitřní průměr 50 μm , vnější průměr 360 μm). Konec této kapiláry se umístil přibližně 150–200 μm před sprejovací otvor. Do GDVN trubice se také vložila křemenná kapilára (vnitřní průměr 250 μm , vnější průměr 355 μm) přivádějící nebulizační plyn, přibližně 4 cm od sprejovacího otvoru z celkové délky GDVN trubice 5,5 cm. Obě kapiláry se poté ke GDVN trubici přilepily epoxidovým lepidlem (Pattex Repair Epoxy, universal) tak, aby byl úplně zalitý otvor GDVN trubice, kterým obě kapiláry procházely (je na druhé straně, než je sprejovací otvor). GDVN zmlžovač byl tímto připraven k testování (obrázek 28).



Obrázek 28: Fotografie GDVN zmlžovače s popisem jednotlivých komponent.

4.2.3.2. Charakteristika spreje

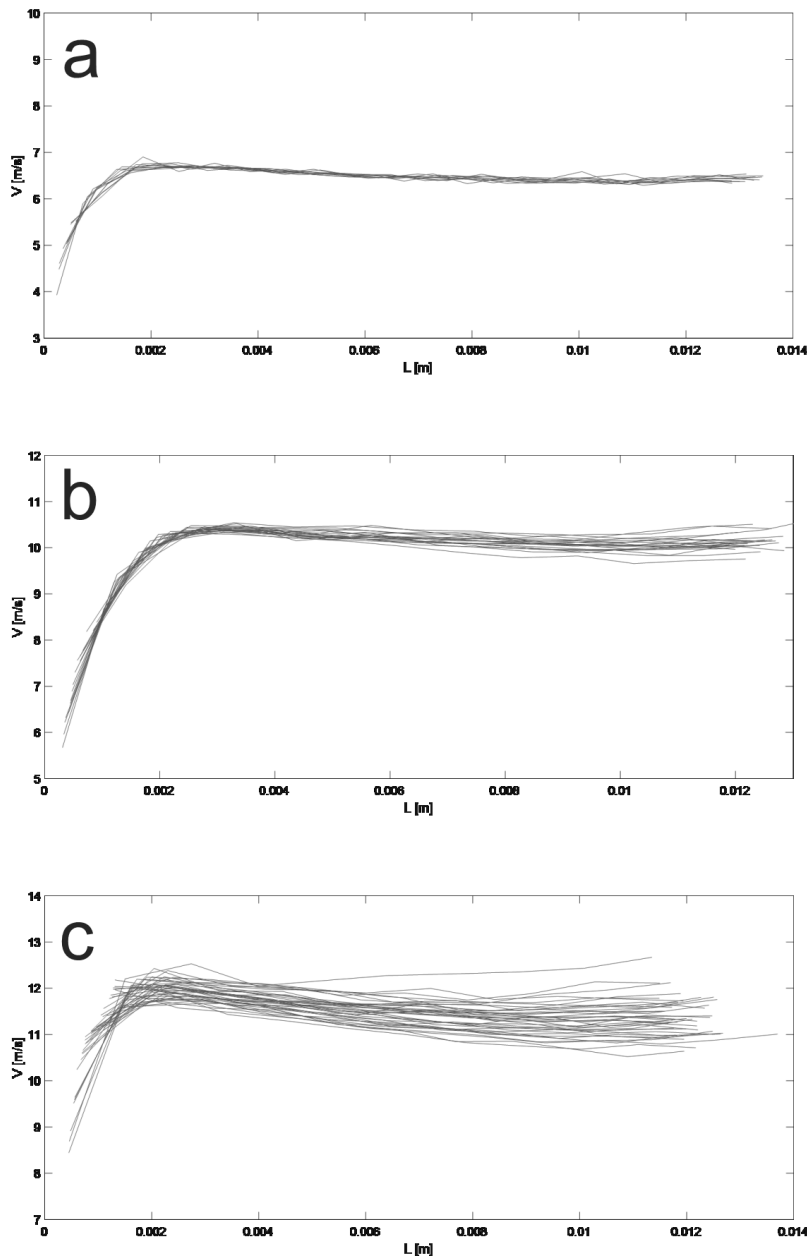
Průměr spreje byl nejdříve zjišťován experimentem, při kterém byl roztok barviva Coomassie Brilliant Blue G-250 v methanolu (0,1 mmol/l) sprejován na filtrační papír v různých vzdálenostech po dobu 30 sekund. Tvar spreje byl poté zrekonstruován z tvarů a průměrů skvrn na papíře (obrázek 29). Při sprejování byl použitý průtok vzorku 2,0 $\mu\text{l}/\text{min}$, průtok nebulizačního plynu 100 ml/min a nebylo použité žádné topení.



Obrázek 29: Tvar spreje zrekonstruován ze skvrn Coomassie Brilliant Blue G-250 (0,1 mmol/l v methanolu) na papíře. Podmínky: průtok vzorku 2,0 $\mu\text{l}/\text{min}$, průtok nebulizačního plynu 100 ml/min, doba sprejování 30 s, bez topení.

Pro studium velikosti kapek a jejich rychlosti byla použita vysokorychlostní kamera VEO 401 (Dantec Dynamics). Veškerá měření s kamerou a zpracování výsledků bylo provedeno doc. Ing. Zdeňkem Chárou CSc. Jako kapalina byla použita voda o průtoku 2,0 $\mu\text{l}/\text{min}$. Pro tato měření byl použitý GDVN zmlžovač s otvorem o průměru 232 μm a bylo testováno sprejování v třech různých průtocích nebulizačního plynu (130, 170 a 210 ml/min). Obraz byl kamerou zaznamenáván s rychlostí záznamu 10000 snímků za sekundu. Snímky byly konvertovány do barev BW (černá-bíla) a zpracovány v programu MATLAB. Podle těžišť jednotlivých fotek se poskládal obraz putování kapky v prostoru. Ze známých vzdáleností

kapky při dané rychlosti snímání (10000 fotek za sekundu) byla vypočítaná rychlost kapky. Jak je vidět na obrázku 30, kapky si zachovávaly podobnou rychlost minimálně 12 cm od otvoru spreje. Průměrná rychlost kapek se podle očekávání se zvyšujícím průtokem plynu zvětšovala a rozšiřoval se i interval rychlostí kapek. Zatímco u průtoku plynu 130 ml/min měly všechny kapky velmi podobnou rychlost (přibližně kolem 6,5 m/s), v případě průtoku plynu 210 ml/min se rychlosti kapek pohybovaly v rozmezí 10,5 až 12,0 m/s. Průběhy rychlosti i tvaru křivek byly podobné i při průtocích vody 3,0; 4,0 a 5,0 $\mu\text{l}/\text{min}$. U průtoku 1,0 $\mu\text{l}/\text{min}$ měla rychlost kapek širší distribuci i při nižších průtocích plynu.



Obrázek 30: závislost rychlosti kapek na vzdálenosti od zdroje spreje. Průtok nebulizačního plynu byl 130 ml/min (a), 170 ml/min (b) a 210 ml/min (c). Další podmínky: kapalina voda, průtok kapaliny 2 $\mu\text{l}/\text{min}$, poloměr otvoru spreje 116 μm , průměr tapered tip křemenné kapiláry 50 μm .

Z rychlosti vyletování kapek byly pak dopočítány další parametry, jako je frekvence vyletování kapek a jejich velikost. Pro výpočet průměru kapky byly použity následující vzorce:

$$V = \frac{v_p}{f}$$

kde V je objem kapky v μl , v_p je průtok kapaliny v $\mu\text{l}/\text{min}$ a f je frekvence vyletování kapek v s^{-1}

$$d = 2 \times \sqrt[3]{\frac{3V}{4\pi}}$$

kde V je objem kapky v μl a d je průměr kapky v μm . Průměrné hodnoty velikostí kapek jsou uvedeny v tabulce 7.

Tabulka 7: průměr kapek naměřených za různých průtoků kapaliny a plynů

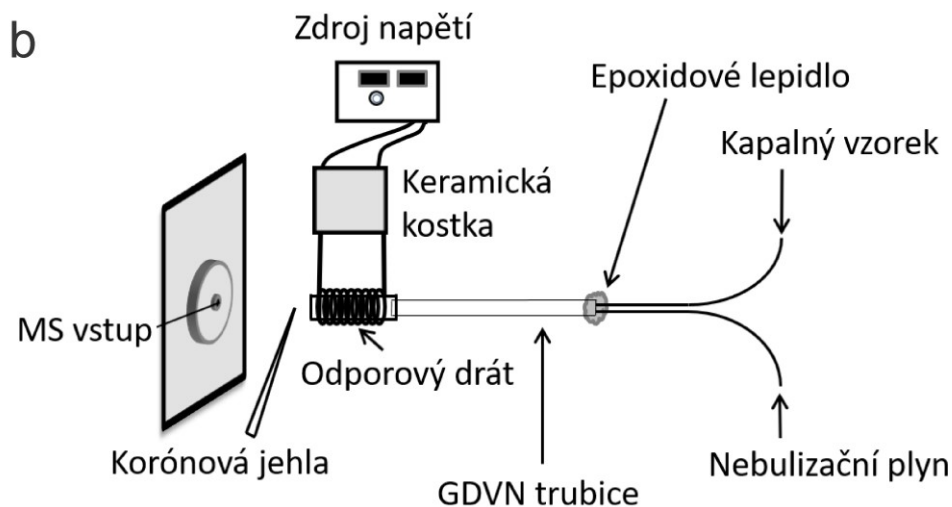
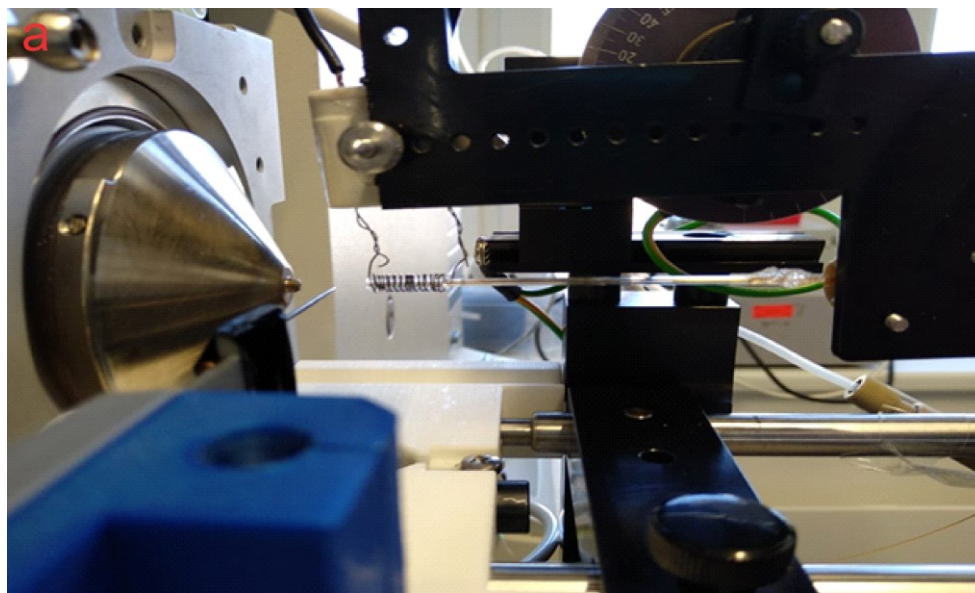
Průtok kapaliny ($\mu\text{l}/\text{min}$)	Průměrná velikost kapky (průměr v μm)		
	Průtok plynu 130 ml/min	Průtok plynu 170 ml/min	Průtok plynu 210 ml/min
1	106,2	85,3	70,4
2	106,8	81,6	69,6
3	105,4	80,5	69,0
4	108,0	81,8	68,4
5	106,7	80,9	69,3

Jak je vidět v tabulce 7, rozdílný průtok kapaliny neměl v testovaném rozsahu vliv na velikost kapek, rozdíly v průtocích plynu ale byly dostatečně velké na to, aby ovlivnili velikost kapky. I při největším průtoku plynu byly kapky vody větší než typické kapky u ESI. Při větším průtoku kapaliny (vody) se zformoval větší počet kapek, jejich průměrná velikost se však téměř nezměnila, jak je uvedeno v tabulce 7. Ukazuje se tedy, že pokud by byla jako rozpouštědlo použita voda, je potřeba upravit GDVN sprej tak, aby vznikaly menší kapky. Snížením velikosti sprejovacího otvoru GDVN trubice lze pravděpodobně dosáhnout generování menších kapek, které se budou rychleji odpařovat. Odpaření kapek je však nutné podpořit pomocí vyhřívaného prvku umístěného za zmlžovačem.

4.2.3.3. Konstrukce GDVN-APCI iontového zdroje

GDVN zmlžovač byl přichycen k plastovému držáku, který byl dále přichycen k přírubě s dvěma tyčemi orientovanými kolmo na vstup do hmotnostního spektrometru (stejně jako v případě otevřeného trubicového zmlžovače). Průtok dusíku byl regulován stejně jako v případě otevřeného trubicového zmlžovače regulátorem průtoku plynu (Aalborg, Orangeburg, NY, USA). Skleněná GDVN trubice zmlžovače se poté vsunula přibližně 2 mm hluboko do křemenné trubice (3,0 mm OD; 1,5 mm ID; 1,7 cm dlouhá) s namotaným odporovým topením (Kanthal™, 14 závitů omotaných v délce 1,3 cm až po výstupní

otvorkřemenné trubice) tak, aby konec vnitřní kapiláry nezasahoval do vyhřívané zóny. Za křemennou trubicí s topením byla umístěna korónová jehla ve vzdálenosti 0,5 cm od konce křemenné trubice i od vstupu do MS. Korónová jehla byla přichycena ke stolku fixovanému na kovové tyči na přírubě. Vzájemná poloha jehly, křemenné trubice a vstupnímu otvoru do hmotnostního spektrometru je znázorněna na obrázku 31.

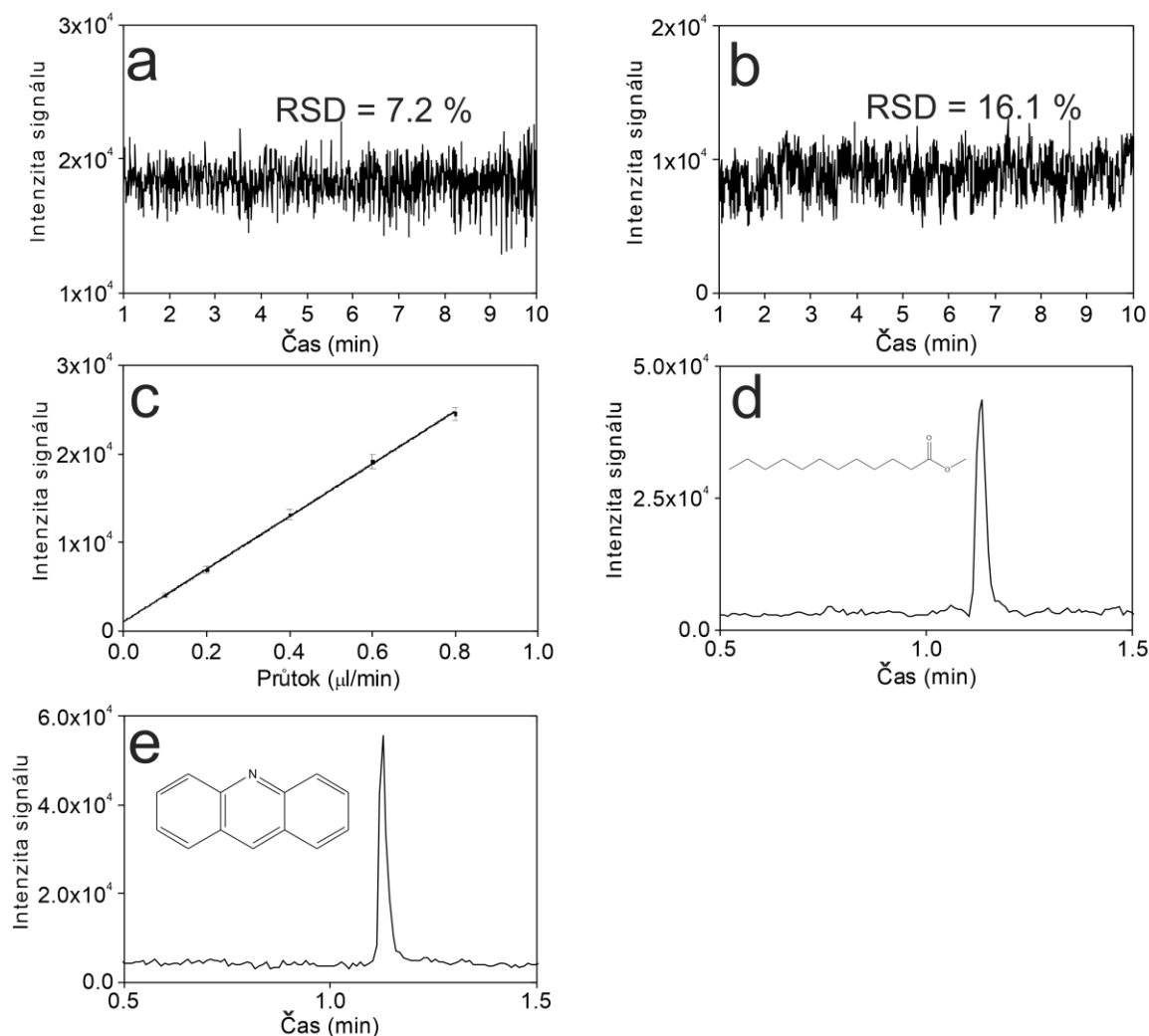


Obrázek 31: fotografie GDVN-APCI zdroje (a) schéma GDVN-APCI uspořádání (b).

4.2.3.4. GDVN v APCI zdroji

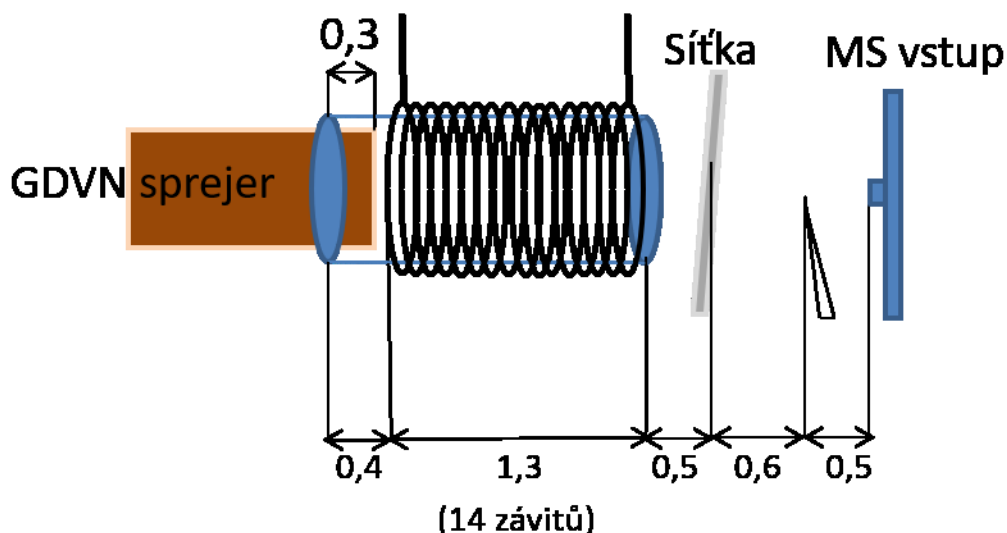
GDVN-APCI zdroj se při měření analytů ukázal jako mnohem lepší varianta než otevřený trubicový zmlžovač a účinností byl porovnatelný s mikročipem. Poskytoval stabilní signál, ucpání křemenné kapiláry nebylo pozorováno ani jednou a nebyly pozorovány ani paměťové efekty. Bylo to v důsledku generování úzkého spreje, který se nezachytával po stěnách trubice, na rozdíl od otevřeného trubicového zmlžovače. Stabilita signálu vyjádřena relativní směrodatnou odchylkou byla u akridinu při průtoku vzorku 1,0 $\mu\text{l}/\text{min}$ 16,1 % a při průtoku 4,0 $\mu\text{l}/\text{min}$ byla přibližně poloviční, 7,2 % (obrázek 32a,b). Intenzita signálu lineálně stoupala

se zvyšujícím se průtokem (od 0,1 do 0,8 $\mu\text{l}/\text{min}$; obrázek 32c), přičemž nejnižší průtok použitý k detekci se blížil k nejnižšímu průtoku, jaký byl použitý pro mikročip v jiných pracích[188],[183] (0,05 $\mu\text{l}/\text{min}$). Možnost spojení HPLC s MS pomocí GDVN-APCI zdroje byla dále testována v režimu průtokové injekční analýzy při nástřiku 60 nl roztoků methylauratu (2,9 mmol/l) a akridinu (1,0 mmol/l) rozpuštěných v acetonitrilu s použitím 65D stříkačkové pumpy (Teledyne ISCO, Lincoln, NE, USA). Jako mobilní fáze se použil acetonitril s 0,1 % kyselinou mravenčí. Při průtoku 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ bylo dosaženo úzkých, téměř symetrických píků (obrázek 32d,e), což prokazuje vhodnost použití GDVN-APCI zdroje pro spojení HPLC a MS o nízkých průtocích.



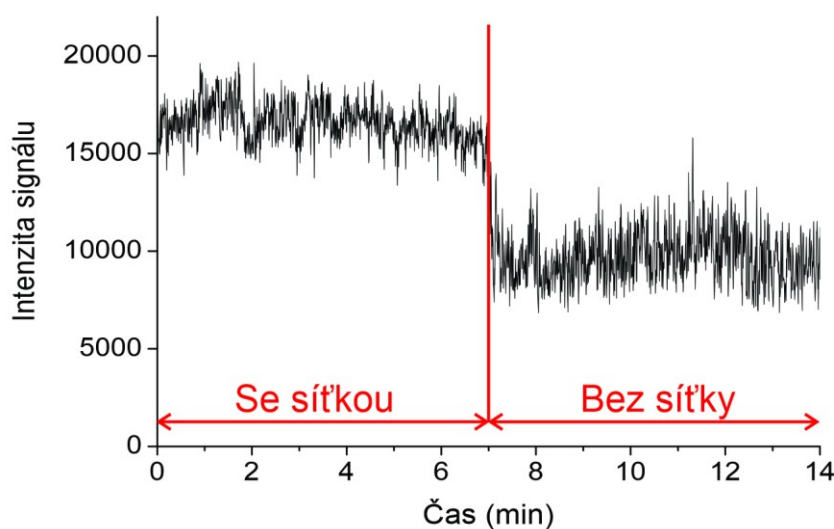
Obrázek 32: signál akridinu v acetonitrilu měřen při průtoku 4,0 $\mu\text{l}/\text{min}$ (a) a 1,0 $\mu\text{l}/\text{min}$ (b), odezva akridinu při různých průtocích u přímého nástřiku (c), 2,9 mmol/l roztok methylauratu v acetonitrilu s 0,1 % kyselinou mravenčí jako mobilní fází (d), 1,0 mmol/l roztok akridinu v té samé mobilní fází (e).

Stabilita a také intenzita signálu byla ještě zvýšena, když se těsně za zmlžovač umístila nerezová síťka s velikostí ok 0,1 mm. Cílem tohoto uspořádání inspirovaného pneumatickým zmlžovačem pro ICP obsahujícího impaktivou kuličku[147] bylo rozbít kapky na menší, a tím zvýšit účinnost desolvatace. Nejdřív bylo potřebné zbavit vlákna síťky povrchového filmu jeho vypálením nad plamenem. Poté byla síťka umístěna 0,5 mm od GDVN zmlžovače a 0,6 mm od korónové jehly (obrázek 33).



Obrázek 33: Schéma zapojení síťky do GDVN zmlžovače. Vzdálenosti jsou v centimetrech.

Jak je vidět na obrázku 34, signál klesl v okamžiku, když se síťka z cesty spreje odstranila. RSD signálu bylo bez síťky 13,1 %, zatímco se sítkou kleslo na 6,1 %. Byla tedy dosáhnuta lepší stabilita signálu i při nižších průtocích (v tomto případě 1,0 $\mu\text{l}/\text{min}$). Bylo to nejspíš způsobeno tím, že velké kapky se na síťce rozpadly na menší a malé kapky se poté snadněji vypařovaly, podobně jak se to uvádí v [147]. Paměťový efekt nebyl pozorován ani po 30-minutovém sprejování přes stejné místo síťky.



Obrázek 34: Záznam signálu akridinu v acetonitrilu se sítkou a bez ní. Průtok kapalného vzorku 1 $\mu\text{l}/\text{min}$, průtok nebulizačního plynu 130 ml/min , výkon topení 12,6 W, koncentrace roztoku akridinu v acetonitrilu 100 $\mu\text{mol}/\text{l}$.

Zmlžovač GDVN lze snadno opravit, pokud se například utrhne kapilára přivádějící nebulizační plyn. Drahý, nepoškozený tapered tip se dá uvolnit od epoxidového lepidla pinzetou při zahřívání horkovzdušnou pistolí nastavenou na optimální teplotu (při moc

vysoké teplotě zčerná polyimidový povlak tapered tipu). Opravitelnost představuje výhodu oproti mikročipu.

4.2.3.5. *Shrnutí ke GDVN-APCI zdroji*

GDVN-APCI zdroj se ukázal jako iontový zdroj vhodný pro spojení HPLC/MS. Kromě toho měl výhodu, že se samotný sprej generoval bez zahřívání, proto nedocházelo k ucpávání tapered tipu. Vlastnosti GDVN záležely na velikost sprejovacího otvoru zmlžovače a na umístění tapered tipu uvnitř zmlžovače. Výroba GDVN trubice v plamenu však zatím není dostatečně reprodukováná. Testovaný GDVN-APCI zdroj dokázal detegovat analyty v rozsahu 0,1 – 10,0 $\mu\text{l}/\text{min}$ a ukázal se jako vhodná volba pro spojení HPLC s MS, při které navíc nedocházelo k ucpávání křemenné kapiláry jako v případě mikročipového zdroje. Další výhodou GDVN zmlžovače oproti mikročipu bylo, že při porušení některé části bylo možné sprej rozebrat a nepoškozené součásti použít znovu, zatímco u mikročipu to nebylo možné.

5. Závěr

Důležitým parametrem v APCI se ukázala být přítomnost krytu izolujícího ionizační prostor od laboratorní atmosféry, zejména u nízkoprůtokových zdrojů. V zdroji uzavřeném krytem se vytvořila dusíková atmosféra, v které probíhaly všechny reakce (přenos náboje i protonace) a ionizace byla pouze závislá na analytech a použitých rozpouštědlech. V otevřené konfiguraci ale ionizační prostor nebyl chráněn před složkami vzduchu, například kyslíkem a vodní párou. Vodní pára způsobovala v pozitivním módu nadměrnou protonaci a kyslík díky své pozitivní elektronové afinitě zachytával elektrony a zhasel reakce zahrnující přenos náboje (elektronový záchyt) v negativním módu. Otevřením zdroje se tedy znemožnily analýzy, které vyžadovaly přenos náboje. Kromě toho se ztratila jakákoliv kontrola nad reprodukovatelností analýz (například kvůli kolísání vlhkosti v laboratoři). Na druhé straně byla v otevřeném zdroji pozorována menší míra fragmentace, což by mohlo být výhodné při analýze termolabilních látek. U obou konfigurací (hlavně uzavřené) byl problém udržet stabilní signál při použití teploty typické pro vysoké průtoky vzorku u rozpouštědel s nízkou teplotou varu (například chloroformu nebo sirouhlíku). Eliminace tohoto fenoménu byla klíčová při konstrukci nízkoprůtokových APCI zdrojů.

V disertační práci byly prostudovány tři typy zmlžovačů pro nízkoprůtokové APCI zdroje: otevřený trubicový, GDVN a mikročipový zmlžovač, z toho první dva byly zkonstruovány v naší laboratoři. Všechny tři zmlžovače fungovaly jako součást iontového zdroje APCI spolehlivě (docházelo k dostatečnému zmlžování, ionizaci v korónovém výboji a detekci iontů). Ani u jednoho zdroje se nepozoroval nestabilní signál, jako v případě komerčního zdroje. APCI na bázi otevřeného trubicového zmlžovače se ale ukázal jako nevhodný zdroj pro spojení HPLC/MS kvůli výraznému chvostování píků. Jeho levná a jednoduchá konstrukce byla ale vhodná pro analýzy přímým nástřikem, nebo studium ionizačních procesů. GDVN-APCI a mikročip byly křehčí a jejich výroba byla náročnější než v případě otevřeného trubicového zmlžovače, na druhé straně byly využitelné ve spojení HPLC/MS. Při poškození některé části GDVN-APCI zdroje se navíc jeho nepoškozené části, na rozdíl od mikročipu, daly opravit. Kromě toho GDVN-APCI sprejoval „za studena“ a vzniklé kapky se odpařovaly až za zmlžovačem, což zajistilo jeho odolnost vůči ucpávání. Jeho výroba ale zatím není reprodukovatelná.

Seznam přednášek a plakátových sdělení

Přednášky s konferenčními články

- Strmeň T, Vrkoslav V, Pačes O, Cvačka J: Development of a Tube Nebulizer for Microflow Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry, 13th Modern analytical chemistry (2017), Praha, Česká republika, ústní prezentování
- Strmeň T, Cvačka J: Aldrithiol-2 as a new derivatization agent for double bond localization in unsaturated compounds by mass spektrometry. 15th Modern analytical chemistry (2019) Praha, Česká republika, ústní prezentování

Plakátová sdělení

- Strmeň T, Vrkoslav V, Pačes O, Cvačka J: ČSHS - Gas dynamic virtual nozzle as a sprayer for miniaturized atmospheric pressure chemical ionization source. 7. konference České společnosti pro hmotnostní spektrometrii (2018) Praha, Česká republika, forma „poster talk“
- Strmeň T, Cvačka J: A new method for the identification of double bond positions using aldrithiol-2 and electrospray mass spectrometry. 6. Česká lipidomická konference (2018), Praha, Česká republika, plakátové sdělení
- Strmeň T, Vrkoslav V, Pačes O Cvačka J: Low-flow atmospheric pressure chemical ionization based on a gas dynamic virtual nozzle nebulizer. 22nd International Mass Spectrometry Conference (2018) Florencie, Itálie, plakátové sdělení
- Strmeň T, Vrkoslav V, Cvačka J: ČSHS - Reduction of nitro compounds in atmospheric pressure chemical ionization. 8. konference České společnosti pro hmotnostní spektrometrii (2019) Olomouc, Česká republika, plakátové sdělení
- Strmeň T, Cvačka J: Localization of double and triple bonds in lipids using aldrithiol-2 derivatization and electrospray ionization mass spektrometry. 19th Interdisciplinary Meeting of Young Researchers and Students in the Field of Chemistry, Biochemistry, Molecular Biology, and Biomaterials (2019), Milovy, Česká republika, plakátové sdělení

Seznam citací

1. Horning, E.C., M.G. Horning, D.I. Carroll, I. Dzidic, et al., *New picogram detection system based on a mass spectrometer with an external ionization source at atmospheric pressure*. Analytical Chemistry, 1973. **45**(6): p. 936-943.
2. Carroll, D.I., I. Dzidic, R.N. Stillwell, M.G. Horning, et al., *Subpicogram detection system for gas phase analysis based upon atmospheric pressure ionization (API) mass spectrometry*. Analytical Chemistry, 1974. **46**(6): p. 706-710.
3. Our History (SCIEX), dostupné z URL: <<https://sciex.com/about-us/our-history>> [cit. 7.7.2020]
4. Schmitz, O., *State of the Art in the LC/MS*, in *The HPLC-MS Handbook for Practitioners*. 2017. p. 1-17.
5. Lias S. G., Bartmess J. E.: Gas-phase ion thermochemistry. Dostupné z URL: <<https://webbook.nist.gov/chemistry/ion/>> [cit. 7.7.2020]
6. Kolakowski, B.M., J.S. Grossert, and L. Ramaley, *Studies on the positive-ion mass spectra from atmospheric pressure chemical ionization of gases and solvents used in liquid chromatography and direct liquid injection*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2004. **15**(3): p. 311-324.
7. Terrier, P., B. Desmazières, J. Tortajada, and W. Buchmann, *APCI/APPI for synthetic polymer analysis*. 2011. **30**(5): p. 854-874.
8. Owen, B.C., J. Gao, D.J. Borton II, L.M. Amundson, et al., *Carbon disulfide reagent allows the characterization of nonpolar analytes by atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry*. 2011. **25**(14): p. 1924-1928.
9. van Breemen, R.B., *Mass Spectrometry of Carotenoids*. 2001. **00**(1): p. F2.4.1-F2.4.13.
10. Kim, Y.H. and S. Kim, *Improved Abundance Sensitivity of Molecular Ions in Positive-Ion APCI MS Analysis of Petroleum in Toluene*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2010. **21**(3): p. 386-392.
11. Bogusz, M.J., R.-D. Maier, M. Erkens, and S. Driessen, *Determination of morphine and its 3- and 6-glucuronides, codeine, codeine-glucuronide and 6-monoacetylmorphine in body fluids by liquid chromatography atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry*. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 1997. **703**(1): p. 115-127.
12. Konstantinova OV, A.A., Oldham NJ, Zhabinskii VN, Khripach VA, Schneider B., *Analysis of Underivatized Brassinosteroids by HPLC/APCI-MS. Occurrence of 3-Epibrassinolide in Arabidopsis thaliana*. Collection of Czechoslovak Chemical Communications, 2001. **66**: p. 1729-1734.
13. Kagan, M., M. Chlenov, A. Greenfield, and D.M. Ho, *Normal-phase chiral liquid chromatography–mass spectrometry of non-UV-active compounds: Applications for pharmaceutically relevant racemates*. Journal of Chromatography A, 2006. **1120**(1): p. 82-88.
14. Glasius, M., M. Duane, and B.R. Larsen, *Determination of polar terpene oxidation products in aerosols by liquid chromatography–ion trap mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 1999. **833**(2): p. 121-135.
15. Vrkoslav, V., M. Háková, K. Pecková, K. Urbanová, et al., *Localization of Double Bonds in Wax Esters by High-Performance Liquid Chromatography/Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry Utilizing the Fragmentation of Acetonitrile-Related Adducts*. Analytical Chemistry, 2011. **83**(8): p. 2978-2986.
16. Cañabate-Díaz, B., A. Segura Carretero, A. Fernández-Gutiérrez, A. Belmonte Vega, et al., *Separation and determination of sterols in olive oil by HPLC-MS*. Food Chemistry, 2007. **102**(3): p. 593-598.
17. van Breemen, R.B., C.-R. Huang, Y. Tan, L.C. Sander, et al., *Liquid Chromatography/Mass Spectrometry of Carotenoids Using Atmospheric Pressure Chemical Ionization*. 1996. **31**(9): p. 975-981.
18. Pott, I., D.E. Breithaupt, and R. Carle, *Detection of unusual carotenoid esters in fresh mango (Mangifera indica L. cv. 'Kent')*. Phytochemistry, 2003. **64**(4): p. 825-829.

19. Jin, Z., S. Daiya, and H.I. Kenttämä, *Characterization of nonpolar lipids and selected steroids by using laser-induced acoustic desorption/chemical ionization, atmospheric pressure chemical ionization, and electrospray ionization mass spectrometry*. International Journal of Mass Spectrometry, 2011. **301**(1): p. 234-239.
20. Gorassini, A., G. Verardo, S.-C. Fregolent, and R. Bortolomeazzi, *Rapid determination of cholesterol oxidation products in milk powder based products by reversed phase SPE and HPLC-APCI-MS/MS*. Food Chemistry, 2017. **230**: p. 604-610.
21. You, J., Y. Shi, Y. Ming, Z. Yu, et al., *Development of a Sensitive Reagent, 1,2-Benzo-3,4-dihydrocarbazole-9-ethyl-p-toluenesulfonate, for Determination of Bile Acids in Serum by HPLC with Fluorescence Detection, and Identification by Mass Spectrometry with an APCI Source*. Chromatographia, 2004. **60**(9): p. 527-535.
22. Badjagbo, K., A. Furtos, M. Alaei, S. Moore, et al., *Direct Analysis of Volatile Methylsiloxanes in Gaseous Matrixes Using Atmospheric Pressure Chemical Ionization-Tandem Mass Spectrometry*. Analytical Chemistry, 2009. **81**(17): p. 7288-7293.
23. Háková, E., V. Vrkoslav, R. Míková, K. Schwarzová-Pecková, et al., *Localization of double bonds in triacylglycerols using high-performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization ion-trap mass spectrometry*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2015. **407**(17): p. 5175-5188.
24. Rozenberg, R., N.L. Ruibal-Mendieta, G. Petitjean, P. Cani, et al., *Phytosterol analysis and characterization in spelt (*Triticum aestivum* ssp. *spelta* L.) and wheat (*T. aestivum* L.) lipids by LC/APCI-MS*. Journal of Cereal Science, 2003. **38**(2): p. 189-197.
25. Vrkoslav, V., K. Urbanová, and J. Cvačka, *Analysis of wax ester molecular species by high performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 2010. **1217**(25): p. 4184-4194.
26. Ma, X.-Q., X.-M. Liang, Q. Xu, X.-Z. Zhang, et al., *Identification of ginsenosides in roots of *Panax ginseng* by HPLC-APCI/MS*. 2005. **16**(3): p. 181-187.
27. Keski-Hynnälä, H., L. Luukkanen, J. Taskinen, and R. Kostianen, *Mass spectrometric and tandem mass spectrometric behavior of nitrocatechol glucuronides: a comparison of atmospheric pressure chemical ionization and electrospray ionization*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 1999. **10**(6): p. 537-545.
28. Bogseth R, E.E., Jones CM, Chess EK, Hu P, *Acetonitrile adduct formation as a sensitive means for simple alcohol detection by LC-MS*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2014. **25**(11): p. 1987-1990.
29. McEwen, C.N. and B.S. Larsen, *Ionization Mechanisms Related to Negative Ion APPI, APCI, and DART*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2009. **20**(8): p. 1518-1521.
30. Ervin, K.M., I. Anusiewicz, P. Skurski, J. Simons, et al., *The Only Stable State of O₂⁻ Is the X ²Π_g Ground State and It (Still!) Has an Adiabatic Electron Detachment Energy of 0.45 eV*. The Journal of Physical Chemistry A, 2003. **107**(41): p. 8521-8529.
31. Zencak, Z. and M. Oehme, *Chloride-enhanced atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry of polychlorinated n-alkanes*. 2004. **18**(19): p. 2235-2240.
32. Burinsky, D.J., J.D. Williams, A.D. Thornquest, and S.L. Sides, *Mass spectral fragmentation reactions of a therapeutic 4-azasteroid and related compounds*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2001. **12**(4): p. 385-398.
33. Campbell, S., R. Ogoshi, G. Uehara, and Q.X. Li, *Trace Analysis of Explosives in Soil: Pressurized Fluid Extraction and Gas and Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*. Journal of Chromatographic Science, 2003. **41**(6): p. 284-288.
34. Haraguchi, K., Y. Kato, K. Atobe, S. Okada, et al., *Negative APCI-LC/MS/MS Method for Determination of Natural Persistent Halogenated Products in Marine Biota*. Analytical Chemistry, 2008. **80**(24): p. 9748-9755.
35. Luosujärvi, L., M.-M. Karikko, M. Haapala, V. Saarela, et al., *Gas chromatography/mass spectrometry of polychlorinated biphenyls using atmospheric pressure chemical ionization and atmospheric pressure photoionization microchips*. 2008. **22**(4): p. 425-431.

36. Mesmer, M.Z. and R.A. Flurer, *Determination of Bromethalin in Commercial Rodenticides Found in Consumer Product Samples by HPLC-UV-vis Spectrophotometry and HPLC-Negative-Ion APCI-MS*. Journal of Chromatographic Science, 2001. **39**(2): p. 49-53.
37. Chusaksri, S., S. Sutthivaiyakit, and P. Sutthivaiyakit, *Confirmatory determination of organochlorine pesticides in surface waters using LC/APCI/tandem mass spectrometry*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2006. **384**(5): p. 1236-1245.
38. Bataineh, M., U. Lübcke-von Varel, H. Hayen, and W. Brack, *HPLC/APCI-FTICR-MS as a Tool for Identification of Partial Polar Mutagenic Compounds in Effect-Directed Analysis*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2010. **21**(6): p. 1016-1027.
39. Martínez, K. and D. Barceló, *Determination of antifouling pesticides and their degradation products in marine sediments by means of ultrasonic extraction and HPLC-APCI-MS*. Fresenius' Journal of Analytical Chemistry, 2001. **370**(7): p. 940-945.
40. Davoli, P. and R.W.S. Weber, *Simple method for reversed-phase high-performance liquid chromatographic analysis of fungal pigments in fruit-bodies of Boletales (Fungi)*. Journal of Chromatography A, 2002. **964**(1): p. 129-135.
41. Blount, B.C., K.E. Milgram, M.J. Silva, N.A. Malek, et al., *Quantitative Detection of Eight Phthalate Metabolites in Human Urine Using HPLC-APCI-MS/MS*. Analytical Chemistry, 2000. **72**(17): p. 4127-4134.
42. Baila-Rueda, L., A. Cenarro, M. Cofán, I. Orera, et al., *Simultaneous determination of oxysterols, phytosterols and cholesterol precursors by high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry in human serum*. Analytical Methods, 2013. **5**(9): p. 2249-2257.
43. Saliu, F., F. Modugno, M. Orlandi, and M.P. Colombini, *HPLC-APCI-MS analysis of triacylglycerols (TAGs) in historical pharmaceutical ointments from the eighteenth century*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2011. **401**(6): p. 1785-1800.
44. La Torre, G.L., M. Saitta, A. Giorgia Potorti, G. Di Bella, et al., *High performance liquid chromatography coupled with atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry for sensitive determination of bioactive amines in donkey milk*. Journal of Chromatography A, 2010. **1217**(32): p. 5215-5224.
45. Jerkovic, V., M. Bröhan, E. Monnart, F. Nguyen, et al., *Stilbenic Profile of Cocoa Liquors from Different Origins Determined by RP-HPLC-APCI(+)-MS/MS. Detection of a New Resveratrol Hexoside*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010. **58**(11): p. 7067-7074.
46. Ding, L., T. Zhu, Q. Song, Y. Zhang, et al., *HPLC-APCI-MS for the determination of teprenone in human plasma: Method and clinical application*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2007. **44**(3): p. 779-785.
47. Zarrouk, W., A. Carrasco-Pancorbo, A. Segura-Carretero, A. Fernández-Gutiérrez, et al., *Exploratory Characterization of the Unsaponifiable Fraction of Tunisian Virgin Olive Oils by a Global Approach with HPLC-APCI-IT MS/MS Analysis*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010. **58**(10): p. 6418-6426.
48. Gomez, F.J.V., I.G. Hernández, L.D. Martinez, M.F. Silva, et al., *Analytical tools for elucidating the biological role of melatonin in plants by LC-MS/MS*. 2013. **34**(12): p. 1749-1756.
49. Martens-Lobenhoffer, J., S. Postel, U. Tröger, and S.M. Bode-Böger, *Determination of ornithine in human plasma by hydrophilic interaction chromatography-tandem mass spectrometry*. Journal of Chromatography B, 2007. **855**(2): p. 271-275.
50. Peru, K.M., S.L. Kuchta, J.V. Headley, and A.J. Cessna, *Development of a hydrophilic interaction chromatography-mass spectrometry assay for spectinomycin and lincomycin in liquid hog manure supernatant and run-off from cropland*. Journal of Chromatography A, 2006. **1107**(1): p. 152-158.
51. Becker, K.W., J.S. Lipp, G.J.M. Versteegh, L. Wörmer, et al., *Rapid and simultaneous analysis of three molecular sea surface temperature proxies and application to sediments from the Sea of Marmara*. Organic Geochemistry, 2015. **85**: p. 42-53.
52. Donot, F., G. Cazals, Z. Gunata, D. Egron, et al., *Analysis of neutral lipids from microalgae by HPLC-ELSD and APCI-MS/MS*. Journal of Chromatography B, 2013. **942-943**: p. 98-106.

53. Manners, G.D. and A.P. Breksa III, *Identifying citrus limonoid aglycones by HPLC-EI/MS and HPLC-APCI/MS techniques*. 2004. **15**(6): p. 372-381.
54. Stöggli, W.M., C.W. Huck, H. Scherz, M. Popp, et al., *Analysis of vitamin E in food and phytopharmaceutical preparations by HPLC and HPLC-APCI-MS-MS*. *Chromatographia*, 2001. **54**(3): p. 179-185.
55. Nicolas, G., C.K. Jankowski, C. Lucas-Lamouroux, and C. Bresson, *Development of normal phase-high performance liquid chromatography-atmospherical pressure chemical ionization-mass spectrometry method for the study of 6,6'-bis-(5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydrobenzo[1,2,4]-triazin-3-yl)-[2,2']-bipyridine hydrolytic degradation*. *Journal of Chromatography A*, 2011. **1218**(37): p. 6369-6378.
56. Jeroen van Smeden, L.H., Rob van der Heijden, Thomas Hankemeier, Rob J. Vreeken, and Joke A. Bouwstra, *LC/MS analysis of stratum corneum lipids: ceramide profiling and discovery*. *Journal of Lipid Research*, 2011. **52**(6): p. 1211-1221.
57. Farwanah, H., J. Wohlrab, R.H.H. Neubert, and K. Raith, *Profiling of human stratum corneum ceramides by means of normal phase LC/APCI-MS*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2005. **383**(4): p. 632-637.
58. Ayala-Cabrera, J.F., F. Javier Santos, and E. Moyano, *Negative-ion atmospheric pressure ionisation of semi-volatile fluorinated compounds for ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry analysis*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2018. **410**(20): p. 4913-4924.
59. Heiko Hayen, N.J., Martin Vogel, Uwe Karst, *LC-electron capture-APCI(-)-MS determination of nitrobenzoxadiazole derivatives*. *Analyst*, 2003. **128**: p. 1365-1372.
60. Lee, S.H., M.V. Williams, R.N. DuBois, and I.A. Blair, *Targeted lipidomics using electron capture atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry*. 2003. **17**(19): p. 2168-2176.
61. Gao, J., B.C. Owen, D.J. Borton, Z. Jin, et al., *HPLC/APCI Mass Spectrometry of Saturated and Unsaturated Hydrocarbons by Using Hydrocarbon Solvents as the APCI Reagent and HPLC Mobile Phase*. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*, 2012. **23**(5): p. 816-822.
62. Souza, L.M., L.V. Tose, F.M.R. Cardoso, F.P. Fleming, et al., *Evaluating the effect of ion source gas (N₂, He, and synthetic air) on the ionization of hydrocarbon, condensed aromatic standards, and paraffin fractions by APCI(+)-FT-ICR MS*. *Fuel*, 2018. **225**: p. 632-645.
63. Kolakowski, B.M., J.S. Grossert, and L. Ramaley, *The importance of both charge exchange and proton transfer in the analysis of polycyclic aromatic compounds using atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry*. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2004. **15**(3): p. 301-310.
64. Marotta, E. and C. Paradisi, *Positive ion chemistry of esters of carboxylic acids in air plasma at atmospheric pressure*. *Journal of Mass Spectrometry*, 2005. **40**(12): p. 1583-1589.
65. Zacs, D., I. Perkons, and V. Bartkevics, *Evaluation of analytical performance of gas chromatography coupled with atmospheric pressure chemical ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry (GC-APCI-FT-ICR-MS) in the target and non-targeted analysis of brominated and chlorinated flame retardants in food*. *Chemosphere*, 2019. **225**: p. 368-377.
66. Tiziana Pacchiarotta, E.N., Alegria Carrasco-Pancorbo, André M. Deelder, and Oleg A. Mayboroda, *Evaluation of GC-APCI/MS and GC-FID As a Complementary Platform*. *Journal of Biomolecular Techniques*, 2010. **21**(4): p. 205-213.
67. Hurtado-Fernández, E., T. Pacchiarotta, O.A. Mayboroda, A. Fernández-Gutiérrez, et al., *Metabolomic analysis of avocado fruits by GC-APCI-TOF MS: effects of ripening degrees and fruit varieties*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2015. **407**(2): p. 547-555.
68. Gómez-Pérez, M.L., P. Plaza-Bolaños, R. Romero-González, J.L. Martínez Vidal, et al., *Evaluation of the Potential of GC-APCI-MS for the Analysis of Pesticide Residues in Fatty Matrices*. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*, 2014. **25**(5): p. 899-902.
69. Mesihää, S., R.A. Ketola, A. Pelander, I. Rasanen, et al., *Development of a GC-APCI-QTOFMS library for new psychoactive substances and comparison to a commercial ESI library*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2017. **409**(8): p. 2007-2013.

70. Pacchiarotta, T., R.J. Derks, E. Nevedomskaya, W. van der Starre, et al., *Exploratory analysis of urinary tract infection using a GC-APCI-MS platform*. *Analyst*, 2015. **140**(8): p. 2834-2841.
71. Ma, S., C. Ma, K. Qian, Y. Zhou, et al., *Characterization of phenolic compounds in coal tar by gas chromatography/negative-ion atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry*. 2016. **30**(15): p. 1806-1810.
72. Mitchum, R.K., G.F. Moler, and W.A. Korfmacher, *Combined capillary gas chromatography/atmospheric pressure negative chemical ionization/mass spectrometry for the determination of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in tissue*. *Analytical Chemistry*, 1980. **52**(14): p. 2278-2282.
73. Li, F. and Y. Hsieh, *Supercritical fluid chromatography-mass spectrometry for chemical analysis*. *Journal of Separation Science*, 2008. **31**(8): p. 1231-1237.
74. J. Carrott, M. and G. Davidson, *Identification and analysis of polymer additives using packed-column supercritical fluid chromatography with APCI mass spectrometric detection*. *Analyst*, 1998. **123**(9): p. 1827-1833.
75. Garzotti M, R.L., Hamdan M, *Coupling of a supercritical fluid chromatography system to a hybrid (Q-TOF 2) mass spectrometer: on-line accurate mass measurements*. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2001. **15**(14): p. 1187-1190.
76. Giuffrida, D., M. Zoccali, S.V. Giofrè, P. Dugo, et al., *Apocarotenoids determination in Capsicum chinense Jacq. cv. Habanero, by supercritical fluid chromatography-triple-quadrupole/mass spectrometry*. *Food Chemistry*, 2017. **231**: p. 316-323.
77. Wolrab, D., P. Frühauf, and C. Gerner, *Direct coupling of supercritical fluid chromatography with tandem mass spectrometry for the analysis of amino acids and related compounds: Comparing electrospray ionization and atmospheric pressure chemical ionization*. *Analytica Chimica Acta*, 2017. **981**: p. 106-115.
78. Michael J. Carrott, G.D., *Separation and characterisation of phenol-formaldehyde (resol) prepolymers using packed-column supercritical fluid chromatography with APCI mass spectrometric detection*. *Analyst*, 1999. **124**: p. 993-997.
79. Zhou, B., J.F. Xiao, L. Tuli, and H.W. Ransom, *LC-MS-based metabolomics*. *Molecular BioSystems*, 2012. **8**(2): p. 470-481.
80. Ionization Options (APPI, APCI) (SHIMADZU) dostupné z URL: <https://www.shimadzu.eu.com/ionization-options-appi-apci> [cit. 7.7.2020]
81. Heudi, O., M.-J. Trisconi, and C.-J. Blake, *Simultaneous quantification of Vitamins A, D3 and E in fortified infant formulae by liquid chromatography-mass spectrometry*. *Journal of Chromatography A*, 2004. **1022**(1): p. 115-123.
82. Zehethofer, N. and D.M. Pinto, *Recent developments in tandem mass spectrometry for lipidomic analysis*. *Analytica Chimica Acta*, 2008. **627**(1): p. 62-70.
83. Byrdwell, W.C., *Atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry for analysis of lipids*. 2001. **36**(4): p. 327-346.
84. Chen, J., W.A. Korfmacher, and Y. Hsieh, *Chiral liquid chromatography-tandem mass spectrometric methods for stereoisomeric pharmaceutical determinations*. *Journal of Chromatography B*, 2005. **820**(1): p. 1-8.
85. Maurer, H.H., *Liquid chromatography-mass spectrometry in forensic and clinical toxicology* | Dedicated to Prof. Dr. Gottfried Blaschke, Münster, Germany, on the occasion of his 60th birthday. I. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 1998. **713**(1): p. 3-25.
86. Fang, J., H. Zhao, Y. Zhang, M. Lu, et al., *Atmospheric pressure chemical ionization in gas chromatography-mass spectrometry for the analysis of persistent organic pollutants*. *Trends in Environmental Analytical Chemistry*, 2020. **25**: p. e00076.
87. Jirásko, R. and M. Holčapek, *Structural analysis of organometallic compounds with soft ionization mass spectrometry*. 2011. **30**(6): p. 1013-1036.
88. Vikse, K.L. and S. McIndoe, *Ionization methods for the mass spectrometry of organometallic compounds*. 2018. **53**(10): p. 1026-1034.

89. De O. Silva, R., M.G.G. De Menezes, R.C. De Castro, C. De A. Nobre, et al., *Efficiency of ESI and APCI ionization sources in LC-MS/MS systems for analysis of 22 pesticide residues in food matrix*. Food Chemistry, 2019. **297**: p. 124934.
90. Kuuranne, T., M. Vahermo, A. Leinonen, and R. Kostianen, *Electrospray and atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometric behavior of eight anabolic steroid glucuronides*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2000. **11**(8): p. 722-730.
91. Wang, R., L. Zhang, Z. Zhang, and Y. Tian, *Comparison of ESI- and APCI-LC-MS/MS methods: A case study of levonorgestrel in human plasma*. Journal of Pharmaceutical Analysis, 2016. **6**(6): p. 356-362.
92. Trawiński, J., R. Skibiński, and K. Ł., *Comparison of ESI and APCI sources in Q-TOF mass spectrometer in photodegradation study of selected psychotropic drugs*. Acta Chromatographica Acta Chromatographica, 2017. **29**(2): p. 161-172.
93. Commisso, M., A. Anesi, S. Dal Santo, and F. Guzzo, *Performance comparison of electrospray ionization and atmospheric pressure chemical ionization in untargeted and targeted liquid chromatography/mass spectrometry based metabolomics analysis of grapeberry metabolites*. 2017. **31**(3): p. 292-300.
94. Chen, L., F. Song, Z. Liu, Z. Zheng, et al., *Study of the ESI and APCI interfaces for the UPLC-MS/MS analysis of pesticides in traditional Chinese herbal medicine*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2014. **406**(5): p. 1481-1491.
95. van Breemen, R.B., L. Dong, and N.D. Pajkovic, *Atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry of carotenoids*. International Journal of Mass Spectrometry, 2012. **312**: p. 163-172.
96. Hourani, N. and N. Kuhnert, *Development of a novel direct-infusion atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry method for the analysis of heavy hydrocarbons in light shredder waste*. Analytical Methods, 2012. **4**(3): p. 730-735.
97. Kavallieratos K, S.A., Pau AT, Rodriguez JM, *Identification of Anionic Supramolecular Complexes of Sulfonamide Receptors with Cl, NO₃, Br, and I by APCI-MS*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2005. **16**(8): p. 1377-1383.
98. Zhang, J., J. Lin, and T.A. Anderson, *A flow injection analysis/mass spectrometry method for the quantification of polyethylene glycol 300 in drug formulations*. International Journal of Pharmaceutics, 2004. **282**(1): p. 183-187.
99. Zhu, Z., J.E. Bartmess, M.E. McNally, R.M. Hoffman, et al., *Quantitative Real-Time Monitoring of Chemical Reactions by Autosampling Flow Injection Analysis Coupled with Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry*. Analytical Chemistry, 2012. **84**(17): p. 7547-7554.
100. Eisele FL, B.H., *High pressure selected ion chemical ionization interface for connecting a sample source to an analysis device*. 1992, Georgia Tech Research Corp: USA.
101. Eisele FL, B.H., *Ion source and sample introduction method and apparatus using two stage ionization for producing sample gas ions*. 1993, Georgia Tech Research Corporation: USA.
102. Agilent Technologies G3212-65100 GC-APCI Source. Dostupné z URL: https://americanlaboratorytrading.com/lab-equipment-products/agilent-technologies-g3212-65100-gc-apci-source_13391 [cit. 7.7.2020]
103. Strashnov, I., J.D. Gilmour, A. Cannavan, G. Chen, et al., *Atmospheric pressure chemical ionisation (APCI) and photoionisation (APPI) mass spectrometry for detection of unsaturated fatty acids: potential for rapid detection of adulteration of vegetable oils*. Analytical Methods, 2019. **11**(30): p. 3819-3828.
104. Geng, D., I.E. Jogsten, J. Dunstan, J. Hagberg, et al., *Gas chromatography/atmospheric pressure chemical ionization/mass spectrometry for the analysis of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in human serum*. Journal of Chromatography A, 2016. **1453**: p. 88-98.
105. Fernando, S., M.K. Green, K. Organtini, F. Dorman, et al., *Differentiation of (Mixed) Halogenated Dibenzo-p-Dioxins by Negative Ion Atmospheric Pressure Chemical Ionization*. Analytical Chemistry, 2016. **88**(10): p. 5205-5211.

106. Fang, J., H. Zhao, Y. Zhang, M. Wong, et al., *Evaluation of gas chromatography-atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry as an alternative to gas chromatography tandem mass spectrometry for the determination of polychlorinated biphenyls and polybrominated diphenyl ethers*. *Chemosphere*, 2019. **225**: p. 288-294.
107. Jjunju, F.P.M., S. Maher, A. Li, A.K. Badu-Tawiah, et al., *Analysis of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Using Desorption Atmospheric Pressure Chemical Ionization Coupled to a Portable Mass Spectrometer*. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*, 2015. **26**(2): p. 271-280.
108. Fujiwara, F., M. Guíñez, S. Cerutti, and P. Smichowski, *UHPLC-(+)APCI-MS/MS determination of oxygenated and nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons in airborne particulate matter and tree barks collected in Buenos Aires city*. *Microchemical Journal*, 2014. **116**: p. 118-124.
109. Vrkoslav, V. and J. Cvačka, *Identification of the double-bond position in fatty acid methyl esters by liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry*. *Journal of Chromatography A*, 2012. **1259**: p. 244-250.
110. Vrkoslav, V., K. Urbanová, M. Háková, and J. Cvačka, *Analysis of wax esters by silver-ion high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry*. *Journal of Chromatography A*, 2013. **1302**: p. 105-110.
111. Lee, S.-Y., J.R. Kim, M.-Y. Ha, S.-M. Shim, et al., *Measurements of Diacylglycerols in Skeletal Muscle by Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry*. *Lipids*, 2013. **48**(3): p. 287-296.
112. Holčapek, M., P. Jandera, P. Zderadička, and L. Hrubá, *Characterization of triacylglycerol and diacylglycerol composition of plant oils using high-performance liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry*. *Journal of Chromatography A*, 2003. **1010**(2): p. 195-215.
113. Mottram, H.R., Z.M. Crossman, and R.P. Evershed, *Regiospecific characterisation of the triacylglycerols in animal fats using high performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry*. *Analyst*, 2001. **126**(7): p. 1018-1024.
114. Řezanka, T., L. Nedbalová, and K. Sigler, *Comparative analysis of triacylglycerols from different *Stichococcus* strains by RP-HPLC/APCI-MS and chiral HPLC*. *Journal of Applied Phycology*, 2015. **27**(2): p. 685-696.
115. Gastaldi, D., C. Medana, V. Giancotti, R. Aigotti, et al., *HPLC-APCI analysis of triacylglycerols in milk fat from different sources*. 2011. **113**(2): p. 197-207.
116. Masukawa Y, T.H., Narita H, *Liquid chromatography-mass spectrometry for comprehensive profiling of ceramide molecules in human hair*. *Journal of Lipid Research*, 2006. **47**(7): p. 1559-1571.
117. Schex, R., V.M. Lieb, V.M. Jiménez, P. Esquivel, et al., *HPLC-DAD-APCI/ESI-MS_n analysis of carotenoids and α -tocopherol in Costa Rican *Acrocomia aculeata* fruits of varying maturity stages*. *Food Research International*, 2018. **105**: p. 645-653.
118. A Gentili, F.C., *Trace Analysis of Carotenoids and Fat-Soluble Vitamins in Some Food Matrices by LC–APCI-MS/MS*, in *Fortified Foods with Vitamins*, M. Rychlik, Editor. 2011, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Strauss GmbH, Mörlenbach. p. 257-279.
119. Hu, K., Y. Li, R. Ding, Y. Zhai, et al., *A simple, sensitive, and high-throughput LC-APCI-MS/MS method for simultaneous determination of vitamin K1, vitamin K1 2,3-epoxide in human plasma and its application to a clinical pharmacodynamic study of warfarin*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2018. **159**: p. 82-91.
120. Bartosińska, E., J. Jacyna, A. Borsuk-De Moor, M. Kaliszan, et al., *HPLC-APCI-MS/MS method development and validation for determination of tocotrienols in human breast adipose tissue*. *Talanta*, 2018. **176**: p. 108-115.
121. Goetz, H.J., R.E. Kopeck, K.M. Riedl, J.L. Cooperstone, et al., *An HPLC–MS/MS method for the separation of α -retinyl esters from retinyl esters*. *Journal of Chromatography B*, 2016. **1029-1030**: p. 68-71.
122. Nimalaratne, C., C. Sun, J. Wu, J.M. Curtis, et al., *Quantification of selected fat soluble vitamins and carotenoids in infant formula and dietary supplements using fast liquid*

- chromatography coupled with tandem mass spectrometry*. Food Research International, 2014. **66**: p. 69-77.
123. Abro, K., N. Memon, M.I. Bhangar, S. Abro, et al., *Determination of Vitamins E, D3, and K1 in Plasma by Liquid Chromatography-Atmospheric Pressure Chemical Ionization-Mass Spectrometry Utilizing a Monolithic Column*. Analytical Letters, 2014. **47**(1): p. 14-24.
 124. Mo, S., L. Dong, W.J. Hurst, and R.B. van Breemen, *Quantitative Analysis of Phytosterols in Edible Oils Using APCI Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry*. Lipids, 2013. **48**(9): p. 949-956.
 125. Millán, L., M.C. Sampedro, A. Sanchez, M.A. Goicolea, et al., *Determination of phytosterols in oenological matrices by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization and ion-trap mass spectrometry*. Journal of Food Composition and Analysis, 2015. **42**: p. 171-178.
 126. Tóth, K., L. Nagy, A. Mándi, Á. Kuki, et al., *Collision-induced dissociation of aflatoxins*. 2013. **27**(4): p. 553-559.
 127. Nagy, K., A. Jakab, J. Fekete, and K. Vékey, *An HPLC–MS Approach for Analysis of Very Long Chain Fatty Acids and Other Apolar Compounds on Octadecyl-Silica Phase Using Partly Miscible Solvents*. Analytical Chemistry, 2004. **76**(7): p. 1935-1941.
 128. Ma, Y.-C. and H.-Y. Kim, *Determination of steroids by liquid chromatography/mass spectrometry*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 1997. **8**(9): p. 1010-1020.
 129. Taylor, D.R., L. Ghataore, L. Couchman, R.P. Vincent, et al., *A 13-Steroid Serum Panel Based on LC-MS/MS: Use in Detection of Adrenocortical Carcinoma*. Clinical Chemistry, 2017. **63**(12): p. 1836-1846.
 130. Tine Y, R.F., Costa J, Wélé A, Paolini J, *A Method for LC-MS/MS Profiling of Coumarins in Zanthoxylum zanthoxyloides (Lam.) B. Zepernich and Timler Extracts and Essential Oils*. Molecules, 2017. **22**(1): p. E174.
 131. Dugo, P., L. Mondello, L. Dugo, R. Stancanelli, et al., *LC-MS for the identification of oxygen heterocyclic compounds in citrus essential oils*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2000. **24**(1): p. 147-154.
 132. Hu, J.-Y., T. Aizawa, and Y. Magara, *Analysis of pesticides in water with liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry*. Water Research, 1999. **33**(2): p. 417-425.
 133. Hayen, H., N. Jachmann, M. Vogel, and U. Karst, *LC-Electron capture APCI-MS for the determination of nitroaromatic compounds*. Analyst, 2002. **127**(8): p. 1027-1030.
 134. Zhao, X. and J. Yinon, *Identification of nitrate ester explosives by liquid chromatography–electrospray ionization and atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 2002. **977**(1): p. 59-68.
 135. Jiang G: Simultaneous UHPLC/MS Analyses of Explosive Compounds (Thermo Fisher Scientific datasheet), <<http://apps.thermoscientific.com/media/SID/LSMS/PDF/4Explos-Perflour-toc.pdf>> [cit. 7.7.2020]
 136. Butovich IA, U.E., McCulley JP, *Lipids of human meibum: mass-spectrometric analysis and structural elucidation*. Journal of Lipid Research, 2007. **48**(10): p. 2220-2235.
 137. Mgrd, M., H.E.B. Berg, V. Tagesson, M.L.G. Jaeremo, et al., *Determination of Androstenone in Pig Fat Using Supercritical Fluid Extraction and Gas Chromatography-Mass Spectrometry*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1995. **43**(1): p. 114-120.
 138. Sandra, P., A. Medvedovici, Y. Zhao, and F. David, *Characterization of triglycerides in vegetable oils by silver-ion packed-column supercritical fluid chromatography coupled to mass spectroscopy with atmospheric pressure chemical ionization and coordination ion spray*. Journal of Chromatography A, 2002. **974**(1): p. 231-241.
 139. Liau, B.-C., T.-T. Jong, M.-R. Lee, and C.-M.J. Chang, *Supercritical fluid extraction and quantification of aflatoxins in Zizyphi Fructus by liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry*. 2007. **21**(5): p. 667-673.
 140. Yunsheng Hsieh, L.F., K.-C. Cheng, Jiwen Chen, *Chiral supercritical fluid chromatography/tandem mass spectrometry for the simultaneous determination of pindolol*

- and propranolol in metabolic stability samples*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2005. **19**(21): p. 3037-3041.
141. Hsieh, Y., F. Li, and C.J.G. Duncan, *Supercritical Fluid Chromatography and High-Performance Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometric Methods for the Determination of Cytarabine in Mouse Plasma*. Analytical Chemistry, 2007. **79**(10): p. 3856-3861.
 142. Lefebvre A. H., M.V.G., *Atomization and sprays*. 2017, Boca Raton: CRC Press.
 143. Ohnesorge, W., Die bildung von Tropfen an Düsen und die Auflösung flüssiger Strahlen. Zeitschrift für Angewandte Mathematik und Mechanik, 1936. **16**(6), p. 355–358
 144. Müller, T., A. Sängler, P. Habisreuther, T. Jakobs, et al., *Simulation of the primary breakup of a high-viscosity liquid jet by a coaxial annular gas flow*. International Journal of Multiphase Flow, 2016. **87**: p. 212-228.
 145. Reitz, R.D. and F.V. Bracco, *Mechanism of atomization of a liquid jet*. 1982. **25**(10): p. 1730-1742.
 146. Dumouchel, C., *On the experimental investigation on primary atomization of liquid streams*. Experiments in Fluids, 2008. **45**(3): p. 371-422.
 147. Herbert C. G., J.R.A.W., *Nebulizers*, in *Mass Spectrometry Basics*. 2003, CRC Press: Boca Raton. p. 137-152.
 148. Gañán-Calvo, A.M., *Generation of Steady Liquid Microthreads and Micron-Sized Monodisperse Sprays in Gas Streams*. Physical Review Letters, 1998. **80**(2): p. 285-288.
 149. Weierstall, U., J.C.H. Spence, and R.B. Doak, *Injector for scattering measurements on fully solvated biospecies*. Review of Scientific Instruments, 2012. **83**(3): p. 035108.
 150. Calvey, G.D., A.M. Katz, C.B. Schaffer, and L. Pollack, *Mixing injector enables time-resolved crystallography with high hit rate at X-ray free electron lasers*. Structural dynamics (Melville, N.Y.), 2016. **3**(5): p. 054301-054301.
 151. DePonte, D.P., U. Weierstall, K. Schmidt, J. Warner, et al., *Gas dynamic virtual nozzle for generation of microscopic droplet streams*. Journal of Physics D: Applied Physics, 2008. **41**(19): p. 195505.
 152. Zahoor, R., S. Bajt, and B. Šarler, *Influence of Gas Dynamic Virtual Nozzle Geometry on Micro-Jet Characteristics*. International Journal of Multiphase Flow, 2018. **104**: p. 152-165.
 153. Zahoor, R., G. Belšak, S. Bajt, and B. Šarler, *Simulation of liquid micro-jet in free expanding high-speed co-flowing gas streams*. Microfluidics and Nanofluidics, 2018. **22**(8): p. 87.
 154. Eckers C., S.D.S., Henion J., *On-line Direct Liquid Introduction Interface for Micro-Liquid Chromatography/Mass Spectrometry: Application to Drug Analysis*. Clinical Chemistry, 1982. **28**: p. 1882-1886.
 155. Baldwin NA, M.F., *Liquid chromatography-mass spectrometry interface-I: The direct introduction of liquid solutions into a chemical ionization mass spectrometer*. Journal of Mass Spectrometry, 1973. **7**: p. 1111-1112.
 156. Covey T. R., L.E.D., Bruins A. P., Henlon J. D., *Liquid Chromatography/Mass Spectrometry*. Analytical Chemistry, 1986. **58**(14): p. 1451-1461.
 157. Sparkman, O.D., Z.E. Penton, and F.G. Kitson, *Chapter 4 - Mass Spectrometry Instrumentation*, in *Gas Chromatography and Mass Spectrometry (Second Edition)*, O.D. Sparkman, Z.E. Penton, and F.G. Kitson, Editors. 2011, Academic Press: Amsterdam. p. 89-148.
 158. Termopoli, V., G. Famiglioni, P. Palma, M. Piergiovanni, et al., *Atmospheric Pressure Vaporization Mechanism for Coupling a Liquid Phase with Electron Ionization Mass Spectrometry*. Analytical Chemistry, 2017. **89**(3): p. 2049-2056.
 159. Termopoli, V., G. Famiglioni, P. Palma, M. Piergiovanni, et al., *Evaluation of a liquid electron ionization liquid chromatography–mass spectrometry interface*. Journal of Chromatography A, 2019. **1591**: p. 120-130.
 160. Yergey AL, E.C., Lewis I, Vestal ML, *Liquid Chromatography/Mass spectrometry Techniques and Applications*. II ed, ed. D. Hercules. 1990, New York, USA: Springer Science+Business Media.
 161. Blakley, C.R. and M.L. Vestal, *Thermospray interface for liquid chromatography/mass spectrometry*. Analytical Chemistry, 1983. **55**(4): p. 750-754.

162. Niessen, W.M.A. and A.P. Tinke, *Liquid chromatography-mass spectrometry General principles and instrumentation*. Journal of Chromatography A, 1995. **703**(1): p. 37-57.
163. *Ion Max and Ion Max-S API Source Hardware Manual version D*. 2008. Dostupné z URL: <<https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/manuals/Man-97055-97044-Ion-MAX-S-API-Source-Hardware-Man9705597044-D-EN.pdf>> [cit. 19.7.2020]
164. El-Faramawy, A., K.W.M. Siu, and B.A. Thomson, *Efficiency of Nano-Electrospray Ionization*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2005. **16**(10): p. 1702-1707.
165. Schmidt, A., M. Karas, and T. Dülcks, *Effect of different solution flow rates on analyte ion signals in nano-ESI MS, or: when does ESI turn into nano-ESI?* Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2003. **14**(5): p. 492-500.
166. Rosell-Llompарт, J., J. Grifoll, and I.G. Loscertales, *Electrosprays in the cone-jet mode: From Taylor cone formation to spray development*. Journal of Aerosol Science, 2018. **125**: p. 2-31.
167. Gan, Y., Z. Jiang, H. Li, Y. Luo, et al., *A comparative study on droplet characteristics and specific charge of ethanol in two small-scale electrospray systems*. Scientific Reports, 2019. **9**(1): p. 18791.
168. Liigand, P., A. Heering, K. Kaupmees, I. Leito, et al., *The Evolution of Electrospray Generated Droplets is Not Affected by Ionization Mode*. Journal of The American Society for Mass Spectrometry, 2017. **28**(10): p. 2124-2131.
169. Wilm, M.S. and M. Mann, *Electrospray and Taylor-Cone theory, Dole's beam of macromolecules at last?* International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes, 1994. **136**(2): p. 167-180.
170. Rayleigh, L., *On the equilibrium of liquid conducting masses charged with electricity*. Philosophical Magazine, 1882. **14**: p. 184-186.
171. Wilm, M., *Principles of Electrospray Ionization*. Molecular & Cellular Proteomics, 2011. **10**(7): p. M111.009407.
172. *API 4000™ LC/MS/MS System Hardware Manual*. 2010. Dostupné z URL: <<https://sciex.com/documents/downloads/literature/4000-api-hardware-guide.pdf>> [cit. 19.7.2020]
173. Manual, S., *Fundamental Guide to Liquid Chromatography Mass Spectrometry*. 2018.
174. H., G.J., *Mass Spectrometry A Textbook*. 2001: Springer International Publishing. 968.
175. James A. Apffel, J., Mark H. Werlich, James L. Bertsch, Paul C. Goodley, Kent D. Henry, *ORTHOGONAL ON SAMPLING FOR APCI*
- MASS SPECTROMETRY. 2003, Agilent Technologies Inc.
176. Covey, T.R., B.A. Thomson, and B.B. Schneider, *Atmospheric pressure ion sources*. Mass Spectrometry Reviews, 2009. **28**(6): p. 870-897.
177. Habib, A., D. Usmanov, S. Ninomiya, L.C. Chen, et al., *Alternating current corona discharge/atmospheric pressure chemical ionization for mass spectrometry*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2013. **27**(24): p. 2760-2766.
178. Electric glow discharge, dostupné z URL <<https://www.plasma-universe.com/electric-glow-discharge/>> [cit. 7.7.2020]
179. Franco Medrano, F., Y. Fukumoto, C.M. Velte, and A. Hodžić, *Mass Entrainment Rate of an Ideal Momentum Turbulent Round Jet*. Journal of the Physical Society of Japan, 2017. **86**(3): p. 034401.
180. Bahr, U., A. Pfenninger, M. Karas, and B. Stahl, *High-Sensitivity Analysis of Neutral Underivatized Oligosaccharides by Nanoelectrospray Mass Spectrometry*. Analytical Chemistry, 1997. **69**(22): p. 4530-4535.
181. Karas, M., U. Bahr, and T. Dülcks, *Nano-electrospray ionization mass spectrometry: addressing analytical problems beyond routine*. Fresenius' Journal of Analytical Chemistry, 2000. **366**(6): p. 669-676.
182. Urban, P.L., *Clarifying Misconceptions about Mass and Concentration Sensitivity*. Journal of Chemical Education, 2016. **93**(6): p. 984-987.

183. Östman, P., S.J. Marttila, T. Kotiaho, S. Franssila, et al., *Microchip Atmospheric Pressure Chemical Ionization Source for Mass Spectrometry*. *Analytical Chemistry*, 2004. **76**(22): p. 6659-6664.
184. Takeda, S., Y. Tanaka, M. Yamane, Z. Siroma, et al., *Ionization of dichlorophenols for their analysis by capillary electrophoresis–mass spectrometry*. *Journal of Chromatography A*, 2001. **924**(1): p. 415-420.
185. Tanaka, Y., K. Otsuka, and S. Terabe, *Evaluation of an atmospheric pressure chemical ionization interface for capillary electrophoresis–mass spectrometry*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2003. **30**(6): p. 1889-1895.
186. Nyholm, L.M., P.J.R. Sjöberg, and K.E. Markides, *High-temperature open tubular liquid chromatography coupled to atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry*. *Journal of Chromatography A*, 1996. **755**(2): p. 153-164.
187. Tyrefors, L.N., R.X. Moulder, and K.E. Markides, *Interface for open tubular column supercritical fluid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry*. *Analytical Chemistry*, 1993. **65**(20): p. 2835-2840.
188. Östman, P., S. Jäntti, K. Grigoras, V. Saarela, et al., *Capillary liquid chromatography–microchip atmospheric pressure chemical ionization–mass spectrometry*. *Lab on a Chip*, 2006. **6**(7): p. 948-953.
189. Östman, P., L. Luosujärvi, M. Haapala, K. Grigoras, et al., *Gas Chromatography-Microchip Atmospheric Pressure Chemical Ionization-Mass Spectrometry*. *Analytical Chemistry*, 2006. **78**(9): p. 3027-3031.
190. Raterink RJ, d.K.M., van der Linden H., Hankemeier T., *CHIP-BASED HEATERLESS NANO-APCI-MS in 14th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences*. 2010: Groningen, The Netherlands. p. 1985-1987.
191. Hassan, I., J. Pavlov, R. Errabelli, and A.B. Attygalle, *Oxidative Ionization Under Certain Negative-Ion Mass Spectrometric Conditions*. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2017. **28**(2): p. 270-277.
192. Properties of fused quartz. Dostupné z URL: https://technicalglass.com/technical_properties/ [cit. 7.7.2020]
193. Ye, N., J.Y. Wang, R.I. Boughton, and M.C. Hong, *Chapter 20 - Functional Crystals*, in *Modern Inorganic Synthetic Chemistry (Second Edition)*, R. Xu and Y. Xu, Editors. 2017, Elsevier: Amsterdam. p. 575-611.
194. Kauppila, T.J., P. Östman, S. Marttila, R.A. Ketola, et al., *Atmospheric Pressure Photoionization-Mass Spectrometry with a Microchip Heated Nebulizer*. *Analytical Chemistry*, 2004. **76**(22): p. 6797-6801.
195. Gañán-Calvo, A.M. and A. Barrero, *A novel pneumatic technique to generate steady capillary microjets*. *Journal of Aerosol Science*, 1999. **30**(1): p. 117-125.

Příloha: publikace použité v této práci