

## IONIZAČNÍ TECHNIKY A ROZHŘANÍ PRO SPOJENÍ KAPILÁRNÍCH ELEKTRO-MIGRAČNÍCH METOD S HMOTNOSTNĚ SPEKTROMETRICKOU DETEKČÍ

RENÁTA NORKOVÁ<sup>a,b</sup>, JANA JAKLOVÁ  
DYTRTOVÁ<sup>b</sup> a VÁCLAV KAŠIČKA<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze, Hlavova 8, 128 43 Praha 2,

<sup>b</sup> Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i., Flemingovo náměstí 2, 166 10 Praha 6  
norkova@uochb.cas.cz

Došlo 13.6.13, přijato 22.10.13.

Rukopis byl zařazen k tisku v rámci placené služby urychleného publikování.

Klíčová slova: kapilární elektromigrační metody, ionizační techniky, rozhraní, hmotnostní spektrometrie

### Obsah

1. Úvod
2. Ionizační techniky pro spojení CE-MS
  - 2.1. Chemická ionizace za atmosférického tlaku
  - 2.2. Fotoionizace za atmosférického tlaku
  - 2.3. Ionizace elektrosprejem
  - 2.4. Desorpční ionizace elektrosprejem
  - 2.5. Přímá analýza v reálném čase
  - 2.6. Ionizace laserem za účasti matrice
3. Rozhraní pro spojení CE-ESI-MS
  - 3.1. Rozhraní bez přídavné kapaliny
  - 3.2. Kapalinový spoj
  - 3.3. Rozhraní s přídavnou kapalinou
4. Závěr

### 1. Úvod

Zvyšující se nároky na přesnost, citlivost, rychlost a identifikační schopnost chemické analýzy vedou k potřebě neustále vyvíjet nové postupy a metody. Vedle dnes již široce používaných vysokoučinných plynových (GC) a kapalinových (LC) chromatografických separačních metod došlo v uplynulých dvou desetiletích k prudkému rozvoji metod kapilární elektroforézy (CE)<sup>1,2</sup>. Výhodami CE jsou především malá spotřeba vzorku a rozpouštědel, vysoká separační účinnost a krátká doba analýzy. Pomocí CE metod lze pro některé látky dosáhnout lepší separační účinnosti než metodami LC (cit.<sup>3,4</sup>). Je ovšem nutno zdůraznit, že účinnost separace silně závisí na charakteru separovaných látek, protože k separaci do-

chází na základě odlišných mechanismů<sup>5</sup>. CE metody jsou využívány pro analýzu vysokomolekulárních látek, jako jsou peptidy<sup>6</sup> a proteiny<sup>7</sup>, či nízkomolekulárních látek, např. ve farmaceutické analýze<sup>8</sup>. Uplatnění nacházejí i při stanovení některých fyzikálně-chemických charakteristik, např. disociačních konstant kyselin<sup>9</sup>.

Nároky na citlivost chromatografických stanovení vedly k zavedení hmotnostních spektrometrů (MS) coby univerzálních a zároveň selektivních detektorů<sup>10,11</sup>. Spojení CE-MS je v běžné praxi prozatím méně využíváno, zejména kvůli náročným požadavkům na používaná rozhraní. Pro zavedení CE-MS do běžné praxe je tedy zapotřebí mít vhodné komerčně dostupné ionizační techniky a rozhraní, které by zachovávaly separační účinnost CE a plně využily citlivosti MS (cit.<sup>12</sup>).

Výhoda on-line spojení CE s MS tkví především ve schopnosti identifikovat jednotlivé separované látky.

Cílem tohoto referátu je shrnutí výhod a nevýhod doposud vyvinutých ionizačních technik a rozhraní pro on-line spojení CE s MS. Důraz je kladen zejména na možnosti spojení CE s MS detekcí po ionizaci elektrosprejem (CE-ESI-MS).

### 2. Ionizační techniky pro spojení CE-MS

Ionizační techniky používané ve spojení CE-MS (cit.<sup>13</sup>) jsou obdobné jako pro LC-MS, neboť v obou případech dochází k ionizaci analytů z kapalně fáze. U CE ale volba ionizační techniky závisí především na konkrétní použité separační metodě, kapilární zónové elektroforéze (CZE) nebo micelární elektrokinetické chromatografii (MEKC).

#### 2.1. Chemická ionizace za atmosférického tlaku

Chemická ionizace za atmosférického tlaku (Atmospheric Pressure Chemical Ionization – APCI)<sup>14</sup> patří mezi tzv. měkké ionizační techniky. Analyty jsou převedeny do plynné fáze a následně ionizovány prostřednictvím reakčního činidla. V koronovém výboji je reakční činidlo ionizováno a při kontaktu s analytem dojde k přenosu náboje z jedné molekuly (reakčního činidla) na molekulu analytu v závislosti na elektronové afinitě molekul<sup>14</sup>. Výhodou APCI je možnost použití pufrů běžných pro CE separace<sup>15</sup> a možnost ionizace i méně polárních látek. APCI je tolerantní k přítomnosti povrchově aktivních látek, které např. v ESI snižují účinnost ionizace, a tím i citlivost metody. Proto je APCI vhodná pro spojení CZE-MS (cit.<sup>16</sup>) i MEKC-MS (cit.<sup>17</sup>).

## 2.2. Fotoionizace za atmosférického tlaku

Fotoionizace za atmosférického tlaku (Atmospheric Pressure Photo Ionization – APPI)<sup>18</sup> je dosud nejnovější měkkou ionizační technikou. Analyty ze separační kapiláry jsou převedeny do plynné fáze. Interakcí molekuly analytu s fotonem o energii vyšší než je její ionizační energie dojde k fotoexcitaci a následně ionizaci. APPI je tedy vhodná zejména pro molekuly, jejichž ionizační energie je nižší než je energie ionizujícího fotonu (což je v případě nejčastěji používaných kryptonových lamp 10 eV)<sup>18</sup>. Bylo ovšem pozorováno, že k ionizaci některých analytů dochází i nezávisle na interakci s fotonem<sup>19</sup>. V těchto případech tedy iontový zdroj funguje jako termosprej (TSI)<sup>20</sup>. Stejně jako APCI lze i APPI použít i pro spojení MEKC-MS.

## 2.3. Ionizace elektrosprejem

Ionizace elektrosprejem (ElectroSpray Ionization – ESI)<sup>21</sup> je další ionizační technika pracující za atmosférického tlaku. O vyjimečnosti této ionizační techniky svědčí i to, že v roce 2002 byla J. Fennovi za využití ESI v MS udělena Nobelova cena. Řadí se opět mezi měkké ionizační techniky a téměř při ní nedochází k fragmentaci analytů. Široké spektrum aplikací této metody je však omezeno na ionogenní a polární molekuly.

Roztok (ze separační kapiláry) vstupuje do iontového zdroje, kde dojde vlivem působení silného elektrického pole k oddělení kationtů a aniontů. V závislosti na polaritě pole dojde k vypuzení iontů z kapiláry. Po překonání povrchového napětí pak dochází ke vzniku elektrospreje. Na počátku vzniklé relativně velké kapičky jsou působením sušícího plynu zmenšovány, čímž dochází ke zvětšování povrchového náboje. Po překročení kritické hodnoty povrchového náboje (tzv. Rayleighův limit) na kapičce dochází ke Coulombickým explozím, čímž vznikají menší kapičky, ideálně až jednotlivé ionty<sup>22</sup>.

Realizace CE-MS spojení se ovšem potýká s komplikacemi jako je nekompatibilita v CE používaných roztoků základních elektrolytů (BGE) a jejich průtoků. Zatímco pro CE se používají poměrně koncentrované roztoky pufrů, v ESI mohou tyto látky potlačovat ionizaci a zanášet iontový zdroj. Pro toto spojení se jako základní elektrolyty používají roztoky těkavých kyselin (mravenčí, octové) nebo jejich amonné soli<sup>23</sup>. Nekompatibilita průtoků CE a MS je dána tím, že příliš nízké průtoky z CE nestačí k zajištění stability elektrospreje. Tento problém byl částečně vyřešen různými konstrukčními úpravami (viz dále).

I přes výše uvedené komplikace CE-ESI-MS spojení je právě toto nejčastěji využíváno<sup>12</sup>. A to zejména kvůli schopnosti ESI vytvářet vícenásobně nabitě ionty, čehož se nejčastěji využívá v proteomice<sup>24</sup>, kdy lze detegovat i vysokomolekulární polypeptidy a bílkoviny při relativně nízkých poměrech molekulové hmotnosti k náboji  $m/z$ .

## 2.4. Desorpční ionizace elektrosprejem

Desorpční ionizace elektrosprejem (Desorption

ElectroSpray Ionization – DESI)<sup>25</sup> je měkká ambientní ionizační technika. Je odvozena od ESI, ale rozdíl je v tom, že analyt je sorbován na destičce. V ESI dochází ke generování nabitých kapiček a iontů rozpouštědla, které dopadají na destičku, čímž dojde k jeho ionizaci<sup>25</sup>. Výsledná DESI hmotnostní spektra jsou velmi podobná ESI spektrům, tj. lze generovat i vícenásobně nabitě ionty. Protože je DESI oproti ESI tolerantnější vůči vyšším koncentracím solí v matrici<sup>27</sup>, jeví se tato ionizační technika pro CE-MS vhodnější než ESI.

On-line spojení CE-DESI-MS je z instrumentálního hlediska náročnější kvůli nutnosti sorpce analytu na destičku. Byla navržena off-line rozhraní pro spojení kapilárních metod s DESI-MS, kdy je eluát z kapiláry sbírán na rotující disk, ze kterého je přímo ionizován<sup>28</sup>. Miao a Chen<sup>29</sup> vynechali krok, kdy je analyt sorbován na destičku, a vytvořili rozhraní, ve kterém byl analyt ionizován ionty rozpouštědla z ESI přímo na výstup ze separační kapiláry.

## 2.5. Přímá analýza v reálném čase

Přímá analýza v reálném čase (Direct Analysis in Real Time – DART)<sup>30</sup> je další měkkou ambientní ionizační technikou. Ionizace analytu nastává po kolizi molekul s metastabilními atomy helia nebo molekulami dusíku v excitovaném stavu, což popisují tzv. Penningovy ionizace<sup>30</sup>. Jedná se o přímou analytickou metodu, tzn. vzorky není potřeba upravovat před vlastní analýzou. Běžně lze provádět analýzy kapalin i povrchů pevných látek. Použití DART pro HPLC analýzu ukázalo, že je tolerantní vůči relativně vysokým koncentracím solí (120 mmol l<sup>-1</sup> fosfátový pufr<sup>31</sup>), což z ní dělá ionizační techniku vhodnou pro spojení CE-MS. Analyty jsou ionizovány z kondenzované fáze nepřímou, proto je potřeba vyvinout vhodné rozhraní pro online spojení CE-DART-MS<sup>32</sup>. Pilotní analýzy pomocí online spojení CZE-DART-MS prokázaly srovnatelné detekční limity s CZE-ESI-MS. Byla také pozorována schopnost DART ionizovat více druhů analytů než ESI z matrice o stejném složení<sup>32</sup>.

## 2.6. Ionizace laserem za účasti matrice

Ionizace laserem v přítomnosti matrice (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – MALDI)<sup>33</sup> je rovněž měkká ionizační technika, za jejíž vývoj získal v roce 2002 K. Tanaka Nobelovu cenu. On-line spojení CE-MALDI-MS je náročnější než u DESI- či DART-MS, protože je potřeba k analytu na destičce přidat matrici. Využívá se proto off-line spojení, eluát ze separační kapiláry je „sbírán“ na vzorkovací destičku, kde je k němu přidána vhodná matrice. V ionizační komůrce je destička ozařována laserem, který způsobí desorpci matrice a její ionizaci. Tyto ionty pak (de)protonizují molekuly analytu v plynné fázi<sup>34</sup>. Tato technika může být vhodná i pro ionizaci vysokomolekulárních látek, protože dochází k tvorbě jedno- i vícenásobně nabitých iontů<sup>35</sup>.

### 3. Rozhraní pro spojení CE-ESI-MS

Při vytváření separačního okruhu v CE je nezbytné zajistit vodivé spojení obou konců kapiláry se zdrojem vysokého napětí. To je jednoduché v případě detekce na koloně (on-column), jako je spektrofotometrická detekce, kdy jsou oba konce kapiláry ponořeny v roztoku elektrolytu v elektroodových nádobkách, do kterých je přiváděno napětí pomocí platinových elektrod. MS detekce v CE je ale zařazena až za kolonou (post-column), tj. detektor je umístěn za ústím separační kapiláry. Pro spojení CE-ESI-MS je proto zapotřebí mít vhodné rozhraní, které uzavře separační okruh na konci kapiláry, dovolí aplikaci sprejovacího napětí na tomto konci a přitom zachová vysokou separační účinnost. Vhodná CE-ESI-MS spojení jsou vyvíjena od 90. let minulého století. Od té doby bylo vyvinuto několik konstrukcí rozhraní, mezi nimiž lze rozlišit tři základní druhy: (i) bez přídavné kapaliny (sheathless), (ii) kapalinový spoj (liquid-junction interface) a (iii) s přídavnou kapalinou, tzv. (sheath-flow).

#### 3.1. Rozhraní bez přídavné kapaliny

První CE-ESI-MS rozhraní publikovali v roce 1987 Olivares a spol.<sup>36</sup>. Jednalo se o rozhraní bez přídavné kapaliny (sheathless interface), ve kterém separační kapilára ústila do sprejovací kapiláry iontového zdroje. Sprejovací kapilára z nerezové oceli (ESI needle) sloužila jako katoda a zároveň jako iontový zdroj. Rozhraní bez přídavné kapaliny nevyužívají k vytvoření separačního okruhu žádné další elektrolyty, a tudíž nedochází ke zředování separovaných zón, jako je tomu u dalších dvou typů rozhraní. Sheathless CE-MS rozhraní se vyznačují zejména vysokou citlivostí a opakovatelností migračních časů jednotlivých analytů. Nevýhodou tohoto rozhraní je ovšem nízký průtok elektrolytu v CE (desítky až stovky  $\text{nl min}^{-1}$ ), a tudíž riziko nestabilního elektrospřeje<sup>37</sup>. Tento průtok je ovšem dostatečný pro mikro a nanoESI (cit.<sup>38,39</sup>), které mají také tu výhodu, že jsou tolerantnější vůči přítomnosti solí v BGE, a tudíž lze použít i netěkavé složky BGE pro separaci.

Doposud navržená rozhraní bez přídavné kapaliny jsou shrnuta v tab. I.

Nejčastěji používanými materiály pro typ rozhraní označený v tab. I jako A je zlato, méně stříbro (je nestabilní a v hmotnostním spektru se vyskytují  $\text{Ag-H}_2\text{O}$  klastry<sup>40</sup>). Vrstva kovu deponovaná na špičce emitéru je ovšem při ionizaci v pozitivním módu nestabilní a koroduje, proto se častěji používá kovový prach či grafit v polyimidu, který vykazuje stabilitu až 2000 měřicích hodin<sup>41</sup>.

Vložení elektrody do ústí separační kapiláry (tab. I, typ B) je jednoduchým řešením pro vytvoření spojení, nicméně jiskření v důsledku zkratového spojení mezi elektrodou a vstupem do MS si vynutilo menší konstrukční změnu, kdy je elektroda do kapiláry zavedena přes malý otvor v její stěně (tab. I, typ C).

Jiným řešením bylo rozdělení kapiláry na dvě části (tab. I, typ F): separační část a emitér. Napětí je přivedeno do

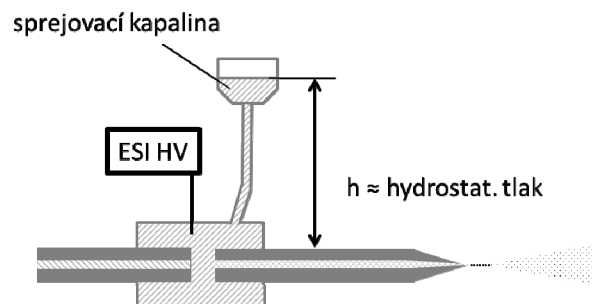
vzniklé mezery přenosem malých iontů přes Nafion<sup>42</sup> či mikrodialyzační trubičky umožňující post-separační úpravy<sup>43</sup>. Podobné je tzv. mikro-Tee<sup>44</sup> uspořádání, využívající přímé spojení kapalina-elektroda. V tomto případě je zde ovšem opět riziko elektrolyzy BGE na elektrodě.

Zatím nejnovější typ rozhraní bez přídavné kapaliny je v tab. I označeno jako typ H. Vodivé spojení je zajištěno přes porézní špičku separační kapiláry, takže nedochází k elektrolyze BGE, turbulencím ani korozi materiálu. Toto rozhraní je jako jediné „sheathless“ vyráběno komerčně, pod názvem CESI 8000 (Beckman Coulter)<sup>45</sup>.

#### 3.2. Kapalinový spoj


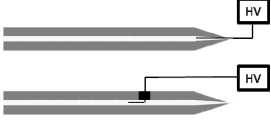
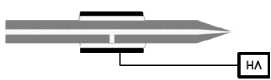
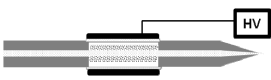
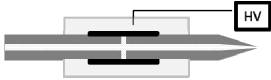
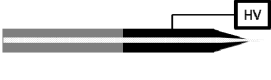
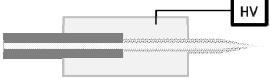
Rozhraní pomocí spojení CE s ESI-MS pomocí kapalinového spoje (liquid junction) poprvé navrhl E. D. Lee<sup>46</sup>. Princip je jednoduchý: separační kapilára je přerušena v komůrce se sprejovací kapalinou, která je pod tlakem (obr. 1). Na anodu umístěnou v grafitovém zásobníku s pufrem je vloženo vysoké napětí (30 kV). Na katodickou oblast separační kapiláry je přivedeno sprejovací napětí  $\pm 3$  kV prostřednictvím sprejovací kapaliny. V takovémto uspořádání je separační napětí +27 kV pro pozitivní ionizační mód a -33 kV pro negativní ionizační mód<sup>46</sup>. Zvýšený tlak na vstupu do separačního prostředí (vstupní tlak) zamezuje zpětnému toku kapilárou. Optimální uspořádání je takové, kdy je zajištěna stejná hodnota tlaku na vstupu i v komůrce. Vyšší vstupní tlak sice zkracuje dobu analýzy, ale snižuje separační účinnost<sup>63</sup>.

Toto rozhraní se využívá i pro mikroCE-ESI-MS (cit.<sup>64,65</sup>). Vyznačuje se robustností, jednoduchostí a relativně vysokým poměrem měřeného signálu a šumu ( $S/N$ ). Používá se pro analýzu vzorků v různých maticích, zejména pak pro klinické analýzy<sup>63,66</sup>. Při analýze směsi léčiv v moči a směsi peptidů bylo dosaženo opakovatelnosti při měření v několika dnech s  $\text{RSD} \approx 3,2\%$  pro migrační časy a cca 15 % pro plochy píků<sup>63</sup>. V porovnání s předchozím rozhraním (sheathless s porézní špičkou), toto rozhraní vykazuje nižší citlivost pro stanovení proteinů<sup>61</sup>.



Obr. 1. Schéma liquid junction CE-MS rozhraní (překresleno a upraveno podle cit.<sup>63</sup>)

Tabulka I  
Rozhraní pro CE-ESI-MS bez přídavné kapaliny

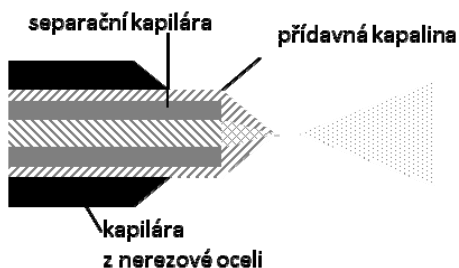
Typ	Schémata	Popis	Výhody	Nevýhody	Lit.
A		konec separační kapiláry je potažen vodivým materiálem, který je v kontaktu s BGE a je přes něj uzavřen elektrický obvod separačního napětí a přivedeno napětí elektrospreje	robustní	korodování vrstvy při ionizaci v pozitivním módu, malá stálost vrstvy, krátká životnost kovové vrstvy (1 h – 5 dní)	37, 40, 41, 47, 48
B C		elektroda (zlatý nebo platinový drát) je zavedena přímo do separační kapiláry přes její ústí nebo otvor ve stěně	konstrukčně jednoduchý, robustní	tvorba bublin elektrolyzou BGE na elektrodě, vznik turbulencí v kapiláře, možnost jiskření mezi elektrodou a vstupem do MS, použité kapiláry musí mít větší vnitřní průměr	49, 50
D		rozdělení toku, ze separační kapiláry je část toku vyvedena na vnější povrch kapiláry. Na tuto frakci je přivedeno napětí elektrospreje	jednoduchý, robustní, v separačním prostředí nedochází k tvorbě bublin elektrolyzou BGE na elektrodě	opakovatelnost vytvoření otvoru je malá (RSD ≈ 20 %); snížení průtoku do iontového zdroje	51, 52
E		stěna kapiláry je vyleptaná kyselinou fluorovodíkovou, čímž je porézní a mohou přes ní procházet malé ionty elektrolytu	v separačním prostředí nedochází k elektrolyze BGE	křehká, možnost interakcí některých látek (peptidů) se stěnou kapiláry a rozmývání zón	53–55
F		kapilára je rozdělena na separační část a emitér, separační okruh je uzavřen v místě jejich spojení	robustní, stabilní	malá reprodukovatelnost vytvoření otvoru mezi úseky, rozmývání zón	42–44, 56, 57
G		kapilára je rozdělena na separační část a emitér; emitér je tvořen kovovou kapilárou	robustní, stabilní	elektrolyza pufru na rozhraní kov-kapalina, na spoji kovové a křemenné kapiláry může docházet k rozmývání zón kvůli nemožnosti zajistit stejný průměr kapilár	58
H		kapilára je v oblasti emitéru leptaná kyselinou fluorovodíkovou, čímž se stává porézní a mohou přes její stěnu procházet malé ionty zajišťující uzavření separačního obvodu	v separačním prostředí nedochází k elektrolyze BGE, jednoduché na výrobu, reprodukovatelnost, není potřeba dalších úprav emitéru (jako např. zaostřování)	křehké v důsledku leptání	59–62

<sup>a</sup> Schémata jsou překreslena a upravena podle cit.<sup>12</sup>

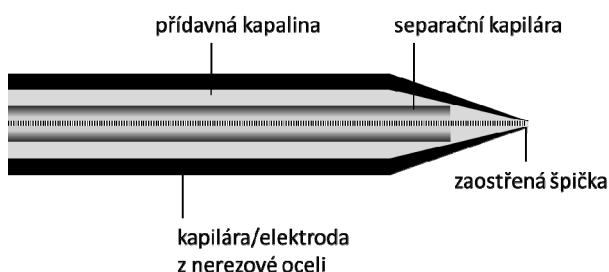
### 3.3. Rozhraní s přidavnou kapalinou

Dalším velmi často využívaným rozhraním je rozhraní s přidavnou kapalinou, tzv. sheath-flow, s nímž poprvé přišel v roce 1988 Smith a spol.<sup>67</sup>. Typické je koaxiální (sousedé) uspořádání, kdy je separační kapilára umístěna v další kapiláře, kterou proudí přidavná kapalina, prostřednictvím které je uzavřen separační okruh a na níž je vloženo sprejovací napětí. Obě tyto kapiláry ústí v iontovém zdroji, kde také dochází k mísení přidavné kapaliny a eluentu, tj. k uzavření separačního okruhu (viz obr. 2).

Přidavná kapalina má (kromě vytvoření vodivého spojení) význam pro vytvoření stabilního elektrospreje, protože nízký průtok kapaliny separační kapilárou nemusí být pro stabilní elektrosprej dostatečný; dokonce lze díky ní použít neutrální modifikátory vnitřní stěny kapiláry, které zabraňují vzniku elektroosmotického toku, a které nejsou použitelné pro ostatní (hlavně sheathless) rozhraní<sup>68</sup>. Přidavná kapalina může mít stejné složení jako BGE. Odlišné složení přidavné kapaliny a BGE je ale výhodnější, protože zvolením vhodné přidavné kapaliny lze dosáhnout zvýšení účinnosti elektrospreje<sup>69</sup>, což dále umožňuje použití vyšších koncentrací BGE pro separaci. Nevýhodou použití tohoto rozhraní může být změna profilu separované zóny vlivem sacího efektu přidavné kapaliny<sup>70</sup> a zředování zón<sup>71</sup>, což má za následek snížení citlivosti metody. V porovnání s předešlým typem rozhraní (liquid junction),



Obr. 2. Princip CE-ESI-MS sheath-flow spojení (upraveno podle cit.<sup>67</sup>)



Obr. 3. Junction-at-the-tip rozhraní (překresleno a upraveno podle cit.<sup>74</sup>)

sheath-flow poskytuje výrazně lepší opakovatelnost měření<sup>72</sup>. O výhodnosti tohoto rozhraní svědčí i fakt, že je nejčastěji využíváno pro komerčně dostupné CE-MS.

Do skupiny sheath-flow rozhraní patří i další z navržených rozhraní, tzv. spojení na špičce (junction-at-the-tip) (obr. 3)<sup>73–75</sup>.

Toto rozhraní vychází z dříve použitých návrhů<sup>76,77</sup>, u nichž separační kapilára ústí do vnější kapiláry (křemenné nebo ESI-jehly) se zaostřenou špičkou, kde se mísí pomocná kapalina s BGE a s analyty, které jsou pak dále ionizovány. Výhodou tohoto spojení je oddělení separačního prostředí od iontového zdroje, takže může být každá z těchto částí optimalizovaná samostatně. Použitím vhodných modifikátorů<sup>75</sup> lze dosáhnout menšího zředování separovaných zón, a tudíž i nižších limitů detekce<sup>73</sup> v porovnání s běžným sheath-flow rozhraním.

## 4. Závěr

On-line spojení kapilárních elektromigračních metod s hmotnostně spektrometrickou detekcí představuje mocný analytický nástroj, který umožňuje nejen vysoce citlivou a selektivní kvalitativní i kvantitativní analýzu širokého spektra látek, ale i přesné stanovení jejich relativních molekulových hmotností a určení jejich molekulární struktury. Dosud je pro spojení CE metod s MS detekcí nejčastěji využívána ionizace elektrosprejem a tři typy rozhraní: bez přidavné kapaliny, s přidavnou kapalinou a kapalinový spoj. První ze zmíněných typů rozhraní umožňuje vysoce citlivé analýzy, ale takováto rozhraní jsou někdy příliš křehká a nestabilní. Rozhraní druhého a třetího typu jsou sice robustní, ale v důsledku zředování analytů zón přidavnou kapalinou či kapalinovým spojením jsou méně citlivé. Nadějí jsou v poslední době nově vyvíjené ambientní ionizační techniky a rozhraní, které jsou tolerantní vůči solím a detergentům a umožní tak svobodnější volbu základních elektrolytů a účinnější separaci analytů CE metodami, než je tomu u ionizace elektrosprejem, která vyžaduje pouze těkavé základní elektrolyty.

*Autoři děkují za finanční podporu těchto projektů: projekt SVV na PřFUK v Praze a grantům GA ČR, granty č. 13-21409P a 13-17224S.*

### Seznam použitých zkratk

APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku
APPI	fotoionizace za atmosférického tlaku
BGE	základní elektrolyt
CE	kapilární elektroforéza
CZE	kapilární zónová elektroforéza
DART	přímá analýza v reálném čase
DESI	desorpční ionizace elektrosprejem
ESI	ionizace elektrosprejem
MALDI	ionizace laserem za účasti matrice
MEKC	micelární elektrokinetická chromatografie
TSI	ionizace termosprejem

## LITERATURA

1. Geiger M., Hogerton A. L., Bowser M. T.: *Anal. Chem.* **84**, 577 (2011).
2. Landers J. P. (ed.): *Handbook of Capillary and Microchip Electrophoresis and Associated Microtechniques*. 3. vyd.; CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton 2008.
3. Mullen W., Albalat A., Gonzalez J., Zerefos P., Siwy J., Franke J., Mischak H.: *Electrophoresis* **33**, 567 (2012).
4. Faserl K., Sarg B., Kremser L., Lindner H.: *Anal. Chem.* **83**, 7297 (2011).
5. Mikšik I., Sedláková P., Mikulíková K., Eckhardt A., Kašička V.: *Chromatographia* **67**, 89 (2008).
6. Kašička V.: *Electrophoresis* **33**, 48 (2012).
7. El Rassi Z.: *Electrophoresis* **31**, 174 (2010).
8. Suntornsuk L.: *Anal. Bioanal. Chem.* **398**, 29 (2010).
9. Šolínová V., Kašička V., Koval D., Česnek M., Holý A.: *Electrophoresis* **27**, 1006 (2006).
10. Petrovic M., Farré M., de Alda M. L., Perez S., Postigo C., Köck M., Radjenovic J., Gros M., Barcelo D.: *J. Chromatogr., A* **1217**, 4004 (2010).
11. Hernández F., Portolés T., Pitarch E., López F. J.: *TrAC* **30**, 388 (2011).
12. Maxwell E. J., Chen D. D. Y.: *Anal. Chim. Acta* **627**, 25 (2008).
13. Hommerson P., Khan A. M., de Jong G. J., Somsen G. W.: *Mass Spectrom. Rev.* **30**, 1096 (2011).
14. Horning E. C., Horning M. G., Carroll D. I., Dzidic I., Stillwell R. N.: *Anal. Chem.* **45**, 936 (1973).
15. Mol R., de Jong G. J., Somsen G. W.: *Electrophoresis* **26**, 146 (2005).
16. Takada Y., Sakairi M., Koizumi H.: *Anal. Chem.* **67**, 1474 (1995).
17. Isoo K., Otsuka K., Terabe S.: *Electrophoresis* **22**, 3426 (2001).
18. Raffaelli A., Saba A.: *Mass Spectrom. Rev.* **22**, 318 (2003).
19. Hommerson P., Khan A. M., Bristow T., Niessen W., De J. G. J., Somsen G. W.: *Anal. Chem.* **79**, 5351 (2007).
20. Blakley C. R., Carmody J. J., Vestal M. L.: *J. Am. Chem. Soc.* **102**, 5931 (1980).
21. Fenn J., Mann M., Meng C., Wong S., Whitehouse C.: *Science* **246**, 64 (1989).
22. Kebarle P., Tang L.: *Anal. Chem.* **65**, 972A (1993).
23. Pantůčková P., Gebauer P., Boček P., Křivánková L.: *Electrophoresis* **30**, 203 (2009).
24. Desiderio C., Rossetti D. V., Iavarone F., Messana I., Castagnola M.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* **53**, 1161 (2010).
25. Takáts Z., Wiseman J. M., Gologan B., Cooks R. G.: *Science* **306**, 471 (2004).
26. Weston D. J.: *Analyst* **135**, 661 (2010).
27. Jackson A. U., Talaty N., Cooks R. G., Van Berkel G. J.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **18**, 2218 (2007).
28. Barbula G. K., Safi S., Chingín K., Perry R. H., Zare R. N.: *Anal. Chem.* **83**, 1955 (2011).
29. Miao Z., Chen H.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **20**, 10 (2009).
30. Cody R. B., Laramée J. A., Durst H. D.: *Anal. Chem.* **77**, 2297 (2005).
31. Eberherr W., Buchberger W., Hertsens R., Klampfl C. W.: *Anal. Chem.* **82**, 5792 (2010).
32. Chang C., Xu G., Bai Y., Zhang C., Li X., Li M., Liu Y., Liu H.: *Anal. Chem.* **85**, 170 (2013).
33. Tanaka K., Waki H., Ido Y., Akita S., Yoshida Y., Yoshida T., Matsuo T.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2**, 151 (1988).
34. Zenobi R., Knochenmuss R.: *Mass Spectrom. Rev.* **17**, 337 (1998).
35. Karas M., Glückmann M., Schäfer J.: *J. Mass Spectrom.* **35**, 1 (2000).
36. Olivares J. A., Nguyen N. T., Yonker C. R., Smith R. D.: *Anal. Chem.* **59**, 1230 (1987).
37. Smith R. D., Olivares J. A., Nguyen N. T., Udseth H. R.: *Anal. Chem.* **60**, 436 (1988).
38. Bateman K. P.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **10**, 309 (1999).
39. Schmidt A., Karas M., Dülcks T.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **14**, 492 (2003).
40. Kelly J. F., Ramaley L., Thibault P.: *Anal. Chem.* **69**, 51 (1997).
41. Barnidge D. R., Nilsson S., Markides K. E.: *Anal. Chem.* **71**, 4115 (1999).
42. Shi L.-H., Jin Y.-X., Moon D.-C., Kim S.-K., Park S.-R.: *Electrophoresis* **30**, 1661 (2009).
43. Severs J. C., Smith R. D.: *Anal. Chem.* **69**, 2154 (1997).
44. Tong W., Link A., Eng J. K., Yates J. R.: *Anal. Chem.* **71**, 2270 (1999).
45. <https://www.beckmancoulter.com/wsrportal/wsr/research-and-discovery/products-and-services/capillary-electrophoresis/cesi-8000-high-performance-separation-esi-module/index.htm>, staženo 22.4.2013.
46. Lee E. D., Mück W., Henion J. D., Covey T. R.: *Biol. Mass Spectrom.* **18**, 844 (1989).
47. Nilsson S., Svedberg M., Pettersson J., Björefors F., Markides K., Nyholm L.: *Anal. Chem.* **73**, 4607 (2001).
48. Nilsson S., Wetterhall M., Bergquist J., Nyholm L., Markides K. E.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **15**, 1997 (2001).
49. Cao P., Moini M.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **8**, 561 (1997).
50. Fang L., Zhang R., Williams E. R., Zare R. N.: *Anal. Chem.* **66**, 3696 (1994).
51. Moini M.: *Anal. Chem.* **73**, 3497 (2001).
52. Moini M., Demars S. M., Huang H.: *Anal. Chem.* **74**, 3772 (2002).
53. Hu S., Wang Z.-L., Li P.-B., Cheng J.-K.: *Anal. Chem.* **69**, 264 (1997).
54. Janini G. M., Conrads T. P., Wilkens K. L., Issaq H. J., Veenstra T. D.: *Anal. Chem.* **75**, 1615 (2003).
55. Whitt J. T., Moini M.: *Anal. Chem.* **75**, 2188 (2003).

56. Severs J. C., Harms A. C., Smith R. D.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 10, 1175 (1996).
57. Chen Z., Boggess B., Chang H.-C.: *J. Mass Spectrom.* 42, 244 (2007).
58. Ishihama Y., Katayama H., Asakawa N., Oda Y.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 16, 913 (2002).
59. Moini M.: *Anal. Chem.* 79, 4241 (2007).
60. Tie C., Zhang D.-W., Chen H.-X., Song S.-L., Zhang X.-X.: *J. Mass Spectrom.* 47, 1429 (2012).
61. Haselberg R., Ratnayake C. K., de Jong G. J., Somsen G. W.: *J. Chromatogr., A* 1217, 7605 (2010).
62. Bonvin G., Veuthey J.-L., Rudaz S., Schappeler J.: *Electrophoresis* 33, 552 (2012).
63. Fanali S., D'Orazio G., Foret F., Kleparnik K., Aturki Z.: *Electrophoresis* 27, 4666 (2006).
64. Zhang B., Foret F., Karger B. L.: *Anal. Chem.* 72, 1015 (2000).
65. Deng Y., Henion J., Li J., Thibault P., Wang C., Harrison D. J.: *Anal. Chem.* 73, 639 (2001).
66. Sheppard R. L., Henion J.: *Electrophoresis* 18, 287 (1997).
67. Smith R. D., Barinaga C. J., Udseth H. R.: *Anal. Chem.* 60, 1948 (1988).
68. Katayama H., Ishihama Y., Asakawa N.: *Anal. Chem.* 70, 5272 (1998).
69. Vuorensola K., Kokkonen J., Sirén H., Ketola R. A.: *Electrophoresis* 22, 4347 (2001).
70. Mokaddem M., Gareil P., Belgaied J.-E., Varenne A.: *Electrophoresis* 29, 1957 (2008).
71. Mokaddem M., Gareil P., Belgaied J.-E., Varenne A.: *Electrophoresis* 30, 1692 (2009).
72. Sanz-Nebot V., Balaguer E., Benavente F., Barbosa J.: *Electrophoresis* 26, 1457 (2005).
73. Maxwell E. J., Zhong X., Zhang H., van Zeijl N., Chen D. D. Y.: *Electrophoresis* 31, 1130 (2010).
74. Liu C. C., Alary J.-F., Vollmerhaus P., Kadkhodayan M.: *Electrophoresis* 26, 1366 (2005).
75. Zhong X., Maxwell E. J., Chen D. D. Y.: *Anal. Chem.* 83, 4916 (2011).
76. Hsieh F., Baronas E., Muir C., Martin S. A.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 13, 67 (1999).
77. Lewis K. C., Opitck G. J., Jorgenson J. W., Sheeley D. M.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 8, 495 (1997).

**R. Norková<sup>a,b</sup>, J. J. Dyrťová<sup>b</sup>, and V. Kašíčka<sup>b</sup>**  
 (<sup>a</sup> *Department of Analytical Chemistry, Charles University in Prague, Prague,* <sup>b</sup> *Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i., Prague*): **Ionization Techniques and Interfaces for Coupling of Capillary Electromigration Methods with Mass Spectrometry Detection**

The article presents a review of the ionization techniques and interfaces applied for on-line or off-line coupling of capillary electromigration methods, especially capillary zone electrophoresis and micellar electrokinetic chromatography, with mass spectrometry detection. Principles of the soft ionization techniques, atmospheric pressure chemical ionization, atmospheric pressure photo ionization, electrospray ionization, desorption electrospray ionization, direct analysis in real time and matrix assisted laser desorption ionization are briefly described. Construction designs of three main types of interfaces for hyphenation of capillary electrophoresis with electrospray ionization mass spectrometry detection (sheathless, liquid junction and sheath flow) are presented.