

# Obsah

PREDHOVOR .....	11
1. ÚVOD DO PROBLEMATIKY .....	13
2. SÚČASNÝ STAV PROBLEMATIKY .....	15
2.1. Kapilárna elektroforéza a jej postavenie vo farmaceutickej a biomedicínskej analýze .....	15
2.2. Hmotnostná spektrometria a jej postavenie vo farmaceutickej a biomedicínskej analýze .....	20
3. KAPILÁRNA ELEKTROFORÉZA AKO ANALYTICKÁ METÓDA A SEPARAČNÝ STUPEŇ V ON-LINE KOMBINÁCIÍ S HMOTNOSTNOU SPEKTROMETRIOU .....	26
3.1. Všeobecné aspekty kapilárnej elektroforézy .....	26
3.1.1. Základné princípy elektromigračných separačných metód .....	26
3.1.2. Špecifické spôsoby ovplyvňovania efektívnej pohyblivosti .....	28
3.1.2.1. Efektívna pohyblivosť v. acidobázické rovnováhy .....	28
3.1.2.2. Efektívna pohyblivosť v. komplexotvorné rovnováhy .....	30
3.1.3. Analytické parametre elektroforetických techník .....	33
3.1.3.1. Migračný čas .....	33
3.1.3.2. Účinnosť .....	34
3.1.3.3. Rozlíšenie .....	35
3.1.4. Procesy vplyvajúce na priebeh separácií .....	36
3.1.4.1. Difúzne procesy .....	36
3.1.4.2. Joulovo teplo .....	37
3.1.4.3. Dĺžka injektovanej zóny .....	38
3.1.4.4. Interakcia separovaných látok so stenami kapiláry .....	40
3.1.4.5. Elektroosmotický tok .....	41
3.1.5. Elektroforetické techniky .....	45
3.1.5.1. Zónová elektroforéza (ZE) .....	46
3.1.5.2. Izotachoforéza (ITP) .....	50
3.1.5.3. Izoelektrická fokusácia (IEF) .....	54
3.1.5.4. Micelárna elektrokinetická chromatografia (MEKC) .....	56
3.1.5.5. Kapilárna elektrochromatografia (CEC) .....	57
3.1.5.6. Elektroforéza v sieťovacích prostrediach (GE) .....	59
3.1.5.7. Kombinované (multidimenzionálne) elektromigračné separačné metódy .....	59
3.1.6. Prekoncentračné („stacking“) techniky v CE s využitím elektroforetických efektov .....	65

3.1.6.1.	Zakoncentrovanie vzorky zosilnením poľa (FASS) .....	66
3.1.6.2.	Zakoncentrovanie vzorky z veľkého objemu (LVSS) .....	67
3.1.6.3.	Injektovanie vzorky poľom (FESI) .....	67
3.1.6.4.	Technika prechodného pH rozhrania (DPJ) .....	68
3.1.6.5.	Technika „zametania“ (SWP) .....	69
3.1.6.6.	Technika prechodnej izotachofórey (tTTP) .....	71
3.1.7.	Miniaturizované elektroforetické systémy .....	72
3.2.	Praktické aspekty kapilárnej elektroforézy .....	74
3.2.1.	Elektrolytové systémy pre CZE experiment .....	75
3.2.2.	Elektrolytové systémy pre CITP experiment .....	79
3.2.3.	Selektory a pseudostacionárne fázy pre CE experiment .....	81
3.2.3.1.	Cyklohextríny .....	81
3.2.3.2.	Makrocyclické antibiotiká, biopolyméry .....	83
3.2.3.3.	Micely .....	84
3.2.4.	Separáčne kapiláry a hydrodynamické módy v CE a ich experimentálne možnosti .....	86
3.3.	Detekčné metódy pre kapilárnu elektroforézu .....	89
3.3.1.	Vodivostná detekcia .....	91
3.3.2.	Absorpčná detekcia UV-VIS .....	92
3.3.3.	Laserom indukovaná fluorescenčná detekcia .....	93
3.3.4.	Detekcia hmotnostnou spektrometriou .....	94
3.4.	Kapilárna elektroforéza ako separačný stupeň pre MS a špecifiká on-line spojenia CE-MS .....	95
3.4.1.	Elektrolytové systémy a aditíva pre CE a ich kompatibilita s MS .....	95
3.4.2.	Organické rozpúšťadlá pre CE v nevodnom prostredí .....	98
3.4.3.	Pomocné roztoky pre on-line spojenie CE-MS .....	99
3.4.4.	Prepojenie separačnej kapiláry s ionizáciou (Rozhranie CE-MS) .....	100
3.4.5.	Iné optimalizačné technické parametre prepojenia CE-MS .....	103
4.	HMOTNOSTNÁ SPEKTROMETRIA AKO ANALYTICKÁ METÓDA A DETEKČNÝ STUPEŇ V ON-LINE KOMBINÁCIÍ S KAPILÁRNOU ELEKTROFORÉZOU .....	107
4.1.	Úvodný pohľad na hmotnostnú spektrometriu a jej historický vývoj .....	107
4.1.1.	História .....	107
4.1.2.	Všeobecné aspekty hmotnostnej spektrometrie .....	108
4.2.	Ionizačné techniky pre MS .....	111
4.2.1.	Historické ionizačné techniky pre MS .....	112
4.2.1.1.	Ionizácia výbojom v plyne (Gas Discharge) .....	112
4.2.1.2.	Ionizácia poľom (Field Ionization – FI) a desorpcia poľom (Field Desorption – FD) .....	113
4.2.1.3.	Ionizácia termosprejom (Thermospray Ionization – TSI) .....	114
4.2.1.4.	Desorpcia plazmou (Plasma Desorption – PD) .....	114
4.2.2.	Ionizačné techniky na spojenie CE-MS .....	115
4.2.2.1.	Ionizácia indukčne viazanou plazmou (Inductively Coupled Plasma – ICP) .....	115

4.2.2.2.	Chemická ionizácia (Chemical Ionization – CI) a chemická ionizácia pri atmosférickom tlaku (Atmospheric Pressure Chemical Ionization – APCI) .....	117
4.2.2.3.	Fotoionizácia (Photoionization – PI), multifotónová ionizácia (Multiphoton Ionization – MPI), fotoionizácia pri atmosférickom tlaku (Atmospheric Pressure Photoionization – APPI) .....	120
4.2.2.4.	Ionizácia elektrosprejom (Electrospray Ionization – ESI) .....	121
4.2.2.5.	Ionizácia rýchlymi atómami (Fast Atom Bombardment – FAB) .....	125
4.2.2.6.	Ionizácia desorpciou laserom (Laser Desorption/ Ionization – LD), ionizácia/desorpcia laserom za účasti matrice (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization – MALDI), ionizácia/desorpcia laserom za účasti matrice pri atmosférickom tlaku (Atmospheric Pressure Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization – AP-MALDI) .....	127
4.2.3.	Ionizačné techniky na spojenie MS s inými separačnými technikami ...	129
4.2.3.1.	Termálna ionizácia (Thermal Ionization – TI) .....	129
4.2.3.2.	Ionizácia iskrovým výbojom (Spark Source – SS) .....	130
4.2.3.3.	Ionizácia tlejivým výbojom (Glow Discharge – GD) .....	130
4.2.3.4.	Ionizácia nárazom elektrónov – elektrónová ionizácia (Electron Impact – EI) .....	131
4.2.3.5.	Desorpčná ionizácia elektrosprejom (Desorption Electrospray Ionization – DESI) .....	132
4.2.3.6.	Priama analýza v reálnom čase (Direct analysis in real time – DART) .....	133
4.2.3.7.	Ionizácia rýchlymi iónmi (Secondary Ion Mass Spectrometry – SIMS) .....	134
4.2.3.8.	Povrchom podporená ionizácia/desorpcia laserom (Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization – SELDI) ..	135
4.2.4.	Trendy v ionizačných technikách a ich prepojenie s CE .....	136
4.3.	Hmotnostné analyzátory .....	140
4.3.1.	Úvod .....	140
4.3.1.1.	Funkcia a rozdelenie hmotnostných analyzátorov .....	140
4.3.1.2.	Základné charakteristiky hmotnostných analyzátorov .....	141
4.3.2.	Letová trubica – analyzátor času letu (Time-of-Flight – TOF) .....	142
4.3.3.	Magnetický/elektrický sektor (Magnetic/Electric Sector) .....	145
4.3.3.1.	Sektorové analyzátory s dvojitou fokusáciou .....	147
4.3.3.2.	Akceleračná hmotnostná spektrometria (Accelerator Mass Spectrometry – AMS) .....	148
4.3.4.	Kvadrupólové hmotnostné filtre (Quadrupole Mass Filter – Q filter) ..	150
4.3.5.	Kvadrupólová iónová pasca (Quadrupole Ion Trap – QIT) .....	153
4.3.6.	Orbitrap .....	158

4.3.7. Iónová cyklotrónová rezonancia s Fourierovou transformáciou (Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance – FT-ICR) .....	161
4.3.8. Analyzátor iónovej pohyblivosti (spektrometria iónovej pohyblivosti – Ion Mobility Spectrometry – IMS) .....	164
4.4. Detektory pre MS .....	166
4.4.1. Úvod .....	166
4.4.2. Detekcia fotografickou platňou .....	166
4.4.3. Faradayova klietka .....	167
4.4.4. Násobičové detektory .....	168
4.4.5. Mikrokanálová doštička (Microchannel plate – MCP) .....	169
4.4.6. Daly detektor .....	170
4.4.7. Kryogénny detektor .....	170
4.5. Tandemová (multidimenzionálna) hmotnostná spektrometria .....	171
4.5.1. Úvod a rozdelenie MS/MS techník a režimov .....	171
4.5.2. Spôsoby fragmentácie iónov v MS/MS .....	174
4.5.3. Tandemová hmotnostná spektrometria sektorových analyzátorov s dvojitou fokusáciou .....	176
4.5.4. Trojitý kvadrupól (QqQ) .....	177
4.5.5. Letová trubica-letová trubica (TOF-TOF) .....	178
4.5.6. Kvadrupól-letová trubica (Q-TOF) .....	179
4.5.7. Tandemová hmotnostná spektrometria v iónovej pasci a FT-ICR .....	180
5. APLIKAČNÝ POTENCIÁL SPOJENIA CE-MS .....	182
5.1. Oblasť farmaceutického a biomedicínskeho výskumu .....	190
5.1.1. Hodnotenie kvality liečiv a liekov .....	193
5.1.2. Hodnotenie liečiv v telových tekutinách a tuhých biologických matriciach .....	203
5.1.3. Chirálné separácie z pohľadu farmácie .....	213
5.2. Metóda CE-MS ako významný nástroj systémovej biológie .....	221
5.2.1. Genomika a transkriptomika .....	225
5.2.2. Metabolomika .....	228
5.2.3. Proteomika .....	234
5.2.4. Biofarmaceutiká .....	246
5.3. Oblasť výskumu životného prostredia a potravinárstva so vzťahom k zdraviu človeka .....	252
6. POĎAKOVANIE .....	257
7. SLOVNÍK ZÁKLADNÝCH POJMOV .....	258
8. VÝZNAMNÉ OSOBNOSTI ELEKTROFORÉZY A MS .....	262
9. SKRATKY .....	267
10. LITERATÚRA .....	273
11. INDEX .....	305