

SPOJENÍ ELEKTROCHEMICKÝCH METOD S HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIÍ – POTENCIÁL PRO ANALYTICKOU A FYZIKÁLNÍ CHEMII A BIOCHEMII

JANA JAKLOVÁ DYTRTOVÁ^{a,b} a MICHAL JAKL^c

^a Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i., Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6, ^b Katedra fyziologie a biochemie, Fakulta tělesné výchovy a sportu, Univerzita Karlova v Praze, José Martího 31, 162 52 Praha 6,

^c Katedra agroenvironmentální chemie a výživy rostlin, Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, Česká zemědělská univerzita v Praze, Kamýcká 129, 165 21 Praha - Suchbátka
jana.dytrtova@uochb.cas.cz

Došlo 15.10.15, přijato 12.11.15.

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

Klíčová slova: spojení metod, elektrochemie, hmotnostní spektrometrie, mimikování

Obsah

1. Úvod
2. Výhody a limity elektrochemických a hmotnostně spektrometrických metod
 - 2.1. Hmotnostní spektrometrie
 - 2.2. Elektrochemické metody
3. Nároky na spojení elektrochemie s hmotností spektrometrií
 - 3.1. Výhody plynoucí ze spojení elektrochemie s hmotnostní spektrometrií
 - 3.2. Elektrochemie v průtoku
 - 3.3. Elektrochemické cely
 - 3.4. Typy elektrod
4. Možnosti využití spojení elektrochemie s hmotností spektrometrií
 - 4.1. Separace analytu z matrice a elektrochemická aktivace analytu
 - 4.2. Studium mechanismu redoxních reakcí
5. Závěr

1. Úvod

Spojením dvou analytických metod odlišného fyzikálně chemického principu lze získat vícedimenzionální pohled na studovaný problém, což je hlavním důvodem, proč se pokoušet metody spojovat. Spojením dvou (případně i více) metod lze nejen získat více informací o studovaném vzorku (z pohledu analytické chemie), či obecněji studovaného problému, ale často i úsporu času, prostorových náro-

ků na přístroje v laboratoři i počet obsluhujících pracovníků, což jsou nesporně důvody, které mají odezvu i v ekonomicko-manažerské části současné vědy.

Spojení v principu různých metod s sebou však může přinášet celou řadu kompromisních řešení, nutně vedoucích ke ztrátě rozsahu spojovaných metod. Touto ztrátou rozsahu aplikovatelnosti metody se rozumí v případě spojení elektrochemických metod s hmotnostně spektrometrickými např. provádění elektrochemických reakcí v roztocích s nižší vodivostí, než je pro elektrochemii běžné (vysoké koncentrace elektrolytů jsou pro každodenní provoz hmotnostních spektrometrů nežádoucí), anebo omezení se pouze na rozpouštědla použitelná v elektrochemii. Některá omezení však nemusí být definitivní a je možné je řešit různými konstrukčními prvky. Při posouzení vhodnosti spojení metod by se mělo porovnat, zda získané výhody skutečně převáží nad zmíněnou ztrátou rozsahu aplikovatelnosti spojovaných metod.

Tento referát si klade za cíl na základě současně dostupné literatury a vlastních zkušeností autorů s vývojem kompatibilních elektrochemických cel nastínit problematiku spojení elektrochemických metod s hmotností spektrometrií. Z důvodů ucelenosti a stručnosti referátu se autoři zaměřili především na (i) problematiku konstrukce „home made“ elektrochemických cel pro on-line spojení s hmotnostním spektrometrem a (ii) možnosti využití on-line spojení elektrochemie s hmotností spektrometrií k analytickým účelům, či (iii) pro studium reakčních mechanismů redoxních reakcí využitelných např. i pro biometiku biochemických redox reakcí.

2. Výhody a limity elektrochemických a hmotnostně spektrometrických metod

2.1. Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie (MS) je v současnosti jednou z nerozšířenějších metod detekce v mnoha odvětvích analytické chemie, její využití dominuje např. v analýze potravin¹, v lékařské laboratorní diagnostice, ev. v metabolomice², monitoringu životního prostředí³ a dalších. Nespornou výhodou hmotnostní spektrometrie je zejména její vysoká citlivost a univerzálnost a zároveň vysoká specifita pro organické sloučeniny⁴. Je zároveň robustní a dostatečně rychlá i pro velké série vzorků. Běžné hmotnostní spektrometry lze rozlišit např. podle typu analyzátoru (viz tabulka I) a způsobu předřazené ionizace analytů, či převodu z kapalného, popř. pevného skupenství do plynné fáze, podrobněji viz cit.⁵.

Patrně nejrozšířenější metodou předřazené ionizace analytu⁶ je v současnosti ionizace elektrosprejem (angl. electrospray ionization; ESI). Umožňuje ionizovat širokou

Tabulka I

Přehled hlavních analyzátorů používaných v hmotnostních spektrometrech (upraveno podle cit.⁴)

Typ analyzátoru	Akronym	Princip
Time-of-flight analyzátor doby letu (průletový)	TOF	časová disperze pulzujícího iontového svazku; separace na základě různé délky letu různé těžkých částic, lehčí přiletí na detektor dříve než ty těžké
Magnetic sector magnetický sektorový analyzátor	B	výchylka kontinuálního iontového svazku; separace na základě momentů v magnetickém poli v důsledku Lorenzovy síly
Linear quadrupole lineární kvadrupólový analyzátor	Q	kontinuální iontový paprsek v lineárním poli kvadrupólu; separace na základě nestability iontových trajektorií
Linear quadrupole ion trap lineární kvadrupól – iontová past	LIT	kontinuální iontový paprsek dopraví ionty do iontové pasti; kde může dojít eventuálně k separaci podle poměru frekvence pole kvadrupólu a rezonanční excitace
quadrupole ion trap kvadrupól – iontová past	QIT	chycené ionty se separují podle 3D poměru frekvence pole kvadrupólu a rezonanční excitace
Fourier transform-ion cyclotron Iontová cyklotronová rezonance s FT	FT-ICR	chycené ionty v magnetickém poli (Lorenzova síla); separace podle frekvence cyklotronu, následná Fourierova transformace signálu
Orbitrap	Orbitrap	axiální oscilace v homogenním elektrickém poli, detekce frekvence, následná Fourierova transformace signálu

škálu látek, jako jsou např. některé pesticidy, organokovové komplexy, peptidy, proteiny apod. ESI-MS lze tedy využít pro selektivní a citlivou detekci a stanovení látek alespoň slabě polárních⁷. Bohužel i metoda s tak širokým uplatněním má své omezení, které spočívá v nemožnosti provádět přímé analýzy nepolárních látek s využitím protonizace/deprotonizace.

Další omezení ESI-MS (obecně MS) pro využití v praxi lze spatřit v potřebě určité separace analyzovaných látek, pokud je analyzován vzorek biologického či obecně přírodního původu, např. krev, moč, plasma, půdní roztok, vzorky připravené z potravin, částí zvířat, či rostlin⁸. Běžnou praxí je předřazení separace (např. kapalinovou chromatografií či jejími různými modifikacemi). V každém případě nevýhodou předřazených separačních postupů bývá jejich časová náročnost, která se podle typu látky i matrice vzorku může pohybovat v řádech minut i hodin, či potřeba různých kolon pro různé skupiny látek v kombinaci s možností sorpce analytu na tyto kolony (uplatňuje se zejména pro látky amfifilního charakteru).

2.2. Elektrochemické metody

Elektrochemické metody (EC) jsou v praxi také velice využívané metody, lze se s nimi setkat v širokém spektru aplikací. Jsou značně rozmanité i jejich podstatou, můžeme k nim řadit metody voltametrické, potenciometrické, coulometrické, amperometrické, (bezkontaktní) vodivostní metody, i např. některé separační techniky (elektromigrační metody), či impedanční spektroskopii. Spojením elektromigračních metod se podrobně zabývá přehled⁵, proto se zde zaměříme na spojení metod ponejvíce voltametrických. Jedna elektrochemická cela může

ostatně sloužit jak pro účely voltametrie, tak amperometrie, jen pouhou změnou nastavení měřicího režimu (např. cit.⁹). Voltametrické metody (podrobněji např. cit.^{10,11}) zahrnují techniky, kdy se na pracovní elektrodu vkládá potenciál a sleduje se proudová odezva. V tříelektrodovém zapojení se měří vůči nepolarizované referenční elektrodě, změny velikosti proudu protékajícího pracovní elektrodou se měří proti pomocné elektrodě¹¹. Patří sem např. voltametrie rozpouštěcí nebo diferenční pulsní (rozpouštěcí), případně lineární, square wave, cyklická, adsorpční a další¹².

Sama voltametrie zahrnuje mnoho potenciálních aplikací; jen ve stručnosti, lze ji využít např. v metabolomice¹³, při analýze nukleových kyselin¹⁴, případně v životním prostředí při speciaci kovů¹², nízkomolekulárních organických kyselin¹⁵ a dalších.

3. Nároky na spojení elektrochemie s hmotností spektrometrií

Nároky se v tomto případě myslí zavedení kompromisů v nastavení obou metod, či technická řešení kompenzující zavedené kompromisy. Vzhledem k tomu, že on-line spojení elektrochemie s hmotnostní spektrometrií zažívá v současné době renesanci (první pokusy byly prováděny již v 70. letech minulého století^{16,17}) a přední výrobci zaměřující se především na vývoj a prodej hmotnostních spektrometrů v současnosti zavádějí na trh jako horké novinky právě hmotnostní spektrometry vybavené elektrochemickou celou, rychle narůstá řada různých technických řešení vylepšujících toto spojení. Nárůst zájmu v posledních 15 letech lze přisuzovat především zavedení

výhodného způsobu ionizace vzorku (ESI, cit.¹⁸). On-line spojení EC/ESI-MS bylo testováno již ke konci 90. let minulého století, např. cit.^{19–21}.

Zde je nutné zmínit, že elektrochemie je prováděna v roztoku, přičemž v hmotnostní spektrometrii před vlastní separací podle m/z a detekcí dochází k převodu z kapalné fáze do fáze plynné. Zmíněný přechod je mimo jiné závislý na množství přiváděného vzorku²². Jedná se tedy, v případě, že nechceme konstrukčně zasahovat do sestavy hmotnostního spektrometru, o limitní a určující parametr, kterému je třeba přizpůsobit nastavení elektrochemické metody a též konstrukci cely. Dále je třeba se vypořádat s vhodným elektrolytem pro EC a přítomnými solemi tak, aby nebyla narušena funkčnost MS (suprese signálu, koroze). Nezanedbatelným faktorem je správná volba rozpouštědla, vhodného pro celý systém.

3.1. Výhody plynoucí ze spojení elektrochemie s hmotnostní spektrometrií

Navzdory velké oblíbenosti hmotnostní spektrometrie (zvláště ESI-MS) je stanovení, či studium látek již slabě polárních téměř nemožné, stejně jako studium látek přítomných v různých speciích (v biologických maticích) bez předchozí separace. Právě tato dvě analytická omezení lze řešit právě spojením EC metod s MS.

O tom, že detekce/stanovení nepolárních látek pomocí ESI-MS je stále velkým problémem, svědčí i několik publikací zabývajících se různými způsoby „navázání“ nepolárních látek na polární nosič. Např. Jin a spol.²³ pro charakterizaci lipidů a některých sterolů pomocí ESI-MS provedli jejich „polarizaci“ pomocí laserem indukované akustické desorpce (angl. laser-induced acoustic desorption) kombinované s klasterizací pomocí $\text{CIMn}(\text{H}_2\text{O})^+$ a chemickou ionizací. Další možností, jak detegovat nepolární látky pomocí MS, je např. využití kombinace s laserovou ionizací za spoluúčasti matrice (matrix assisted laser desorption/ionization; MALDI)²⁴, tento postup je však vhodný především pro polymery. Obecně je MALDI možné využít při detekci nepolárních látek, jedná se však vždy o desorpci látky z pevné fáze, či je nutné studovanou látku nanést na kovovou destičku.

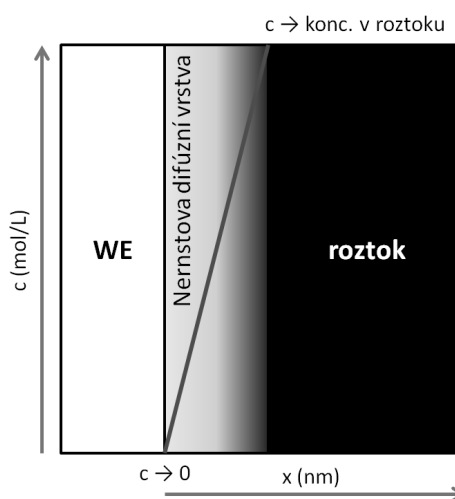
Ionizace nepolárních látek spočívá v předřazené oxidaci či redukci látky, anebo její navázání na ion generovaný na pracovní elektrodě (dále v textu jako elektrochemická aktivace). Tedy spojení EC/MS. Díky velké variabilitě elektrochemických metod¹⁰ je možné danou použitou metodu, či elektrochemickou celou přímo modifikovat tak, aby vyhovovala řešení pro daný analytický problém. Plattner a spol.²⁵ použili ke stanovení kovalentních aduktů nukleových kyselin elektrochemickou aktivací (ve smyslu reakce s nabitou částicí), která byla předřazena následně separaci kapalinovou chromatografií (LC) s MS detekcí. Elektrochemickou aktivaci studované látky ve spojení s LC-MS lze využít např. pro detekci metabolitů kůže²⁶. Zmíněné přístupy tedy zahrnují nejprve elektrochemickou aktivaci studované látky, následně separaci pomocí LC a detekci MS, tedy EC-LC-MS. Další možností je nejprve využít

separaci LC, po níž následuje elektrochemická aktivace a MS detekce/stanovení, tj. LC-EC-MS. Zmíněného přístupu bylo využito při stanovení isokyanátu a příbuzných nepolárních látek, kdy jeho elektrochemická aktivace pomocí ferrocenoyl piperazidu byla provedena až po separaci LC (cit.²⁷). Analogicky byly tímto spojením studovány polyfenolické antioxidanty²⁸.

Toto uspořádání naznačuje možnost urychlit analýzu vyloučením separačního kroku pomocí LC, neboť k tzv. vyvázání látky z komplikované matrice vzorku dochází elektrochemickou cestou. Je možné ho použít pro selektivní, citlivé a časově nenáročné stanovení pesticidů přímo v matici půdního roztoku bez jakékoli předchozí úpravy vzorku²⁹. Princip metody je založen na vysoké afinitě látky ke generovanému iontu (např. iontům Cu^+ a Cu^{2+}). Ve studii bylo využito dvouelektrodového zapojení průtokové elektrochemické cely. Toto zapojení je sice velmi jednoduché, nicméně je zatíženo nižší robustností, nižší spolehlivostí a vyšší náchylností k poskytování podhodnocených či nadhodnocených výsledků a v extrémních případech nedochází ke generaci požadovaných iontů (látek) vůbec, protože u tohoto druhu zapojení elektrod není možné zajistit přesné dosažení a dlouhodobou stálost požadovaného vkládaného potenciálu.

3.2. Elektrochemie v průtoku

Základním požadavkem pro dobrou, nejlépe úplnou konverzi analytu na pracovní elektrodě je minimalizace tzv. Nernstovy difúzní vrstvy, která se tvoří při difúzně řízeném ději (tedy závislém na koncentraci a difúzním koeficientu dané látky). Problematika vytvoření Nernstovy difúzní vrstvy spočívá ve vytvoření zpravidla několik nm silné oblasti obklopující pracovní elektrodu (WE)



Obr. 1. Schematické znázornění lineární distribuce analytu v blízkosti (nm) pracovní elektrody (WE); v těsné blízkosti WE se koncentrace analytu limitně blíží nule, na okraji Nernstovy difúzní vrstvy je koncentrace analytu stejná jako ve zbytku roztoku (bulk concentration)

v důsledku odčerpávání iontů analytu z nejbližšího okolí WE a jejich následné konverzi na WE (viz obr. 1). V oblasti Nernstovy difuzní vrstvy tedy dojde k lineární distribuci analytu (směrnici je difuzní koeficient látky), kdy u povrchu WE se koncentrace analytu limitně blíží nule a na okraji Nernstovy difuzní vrstvy dosahuje hodnot koncentrace analytu v roztoku (tzv. bulk concentration). Pokud dojde k vyčerpání analytu v těsné blízkosti WE a analyt putuje k WE pouze rychlostí danou jeho difuzním koeficientem a další procesy již rychlost přeměny analytu na WE nesnižují, hovoříme o tzv. difuzně řízeném procesu. Často lze těchto dějů využít ke studiu fyzikálně-chemických vlastností systému^{30,31}, nicméně pro úplnou konverzi analytu na WE v nějakém reálném čase se jedná o jevy nežádoucí, které se snažíme v různé míře eliminovat. Eliminování vzniku Nernstovy difuzní vrstvy lze docílit dostatečným mícháním analyzovaného roztoku. Míchání může být zajištěno buď mechanickým mícháním roztoku, nebo vznikem turbulencí překročením Reynoldsova čísla pro vyšší rychlosti průtoku. Laminární proudění neumožňuje efektivně narušit vznik Nernstovy difuzní vrstvy. V hodnocení (výpočtu) Reynoldsova čísla je třeba brát v úvahu jak rychlost proudění, tak průměr kapiláry.

Kapiláry využívané pro přívod vzorku k hmotnostnímu spektrometru mají zpravidla průměr 0,25 mm (samozřejmě jiné průměry jsou možné), přičemž průtoky vzorku v těchto kapilárách se pohybují v rozmezí 0,3 až 1 ml h⁻¹. Při takto nízkém průtoku nabývá tloušťka hydrodynamické hraniční vrstvy milimetrových rozměrů³².

Při průměru kapilár 0,25 mm dané hodnoty průtoků nestačí k vytvoření turbulentního míchání vzorku. Tento problém lze v principu řešit několika způsoby: (i) zvětšením průměru kapilár, což však povede k neúměrnému a nežádoucímu zvětšení spotřeby vzorku, (ii) zvětšením průtoku vzorku, což však povede opět k neúměrné spotřebě vzorku, navíc je obojí provázené zahlcením iontového zdroje hmotnostního spektrometru. Další možností je (iii) umístit míchací zařízení do těla voltametrické cely, případně do přívodní kapiláry. Nicméně umístění míchacího zařízení do miniaturizované cely s sebou přináší nemalé konstrukční výzvy. Poměrně elegantním a jednoduchým řešením (iv) může být vytvoření turbulentního proudění uvnitř voltametrické cely vytvořením dostatečné povrchové nerovnosti. Toto řešení bylo využito např. u dvouelektrodové cely o vnitřním objemu 0,72 µl povysunutím elektrod o 0,15 mm do proudícího roztoku²². V neposlední řadě je možné (v) vytvořit různé typy odděleného dávkování vzorku pro voltametrii i hmotnostní spektrometrii umístěním rozdělovacích ventilů³³.

3.3. Elektrochemické cely

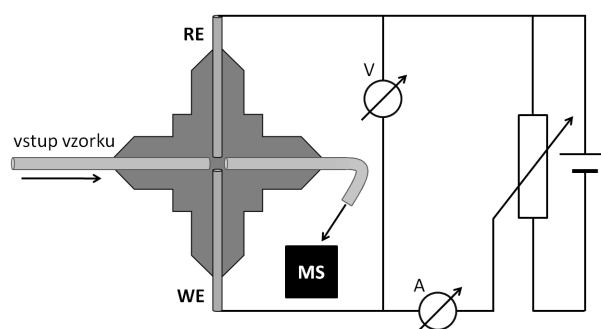
Za téměř čtyři dekády uplynulých let pokusů o spojení EC/MS bylo vyvinuto nespočet variant průtokových elektrochemických cel. Z hlediska zapojení potenciostatu lze tyto cely dělit na tříelektrodové a dvouelektrodové. Konstrukčně jsou dvouelektrodové cely jednodušší, obsahují pouze WE a elektrodu referentní (REF). V tomto

uspořádání proud protéká mezi WE a REF, proto je obtížné mezi ně vkládat fixní potenciál. Pro udržení konkrétní hodnoty potenciálu je mnohem výhodnější tříelektrodové uspořádání, kdy proud protéká mezi WE a elektrodou pomocnou (AUX), přičemž REF slouží k určení potenciálu mezi WE a REF.

Konstrukce průtokových³⁴ se často zcela liší od „klasických“ neprůtokových³⁵ cel, z hlediska velikosti a tvarové rozmanitosti cel jsou pak varianty nepřehledné. Např. Shono a spol.³⁶ zkonstruovali celu o vnitřním objemu 50 ml (!), ve které generovali *N*-dealkylované specie čtyř neurofarmak bez použití jakékoli další chemikálie, což je jeden z příkladů využití EC/MS spojení k mimikování metabolické oxidace (viz dále). Obecně však cely určené pro on-line spojení EC/MS jsou spíše miniaturizované. Elektrochemické cely s miniaturizovanými vnitřními rozměry lépe vyhovují běžně používaným průtokům v MS (~ ml h⁻¹), stejně tak splňují nároky na minimalizaci spotřeby vzorku³⁷. Vnitřní průměr cely by ideálně neměl být větší než je průměr použitých kapilár, aby se předešlo vytváření mrtvých objemů. Mrtvý objem by celou analýzu zpomaloval a zároveň by docházelo k tzv. rozmývání zón elektrochemického značení.

Požadavek minimalizace elektrochemické cely lze snáze technicky docílit pro dvouelektrodové zapojení potenciostatu. V tomto případě je možné využít např. komerčně dostupný PEEK Cross (obr. 2), který má vnitřní rozměry stejné jako běžně používané kapiláry a je s nimi plně kompatibilní.

Tohoto typu konstrukce bylo využito např. ve voltametrickém značení tebukonazolu pomocí nascentních kationtů mědi²⁹. Nevýhodou této jinak konstrukčně velmi jednoduché cely je její nižší robustnost, což je pro dvouelektrodové zapojení zřejmé. Robustnost tohoto řešení je navíc snížena nemožností použít běžné referentní elektrody druhého druhu. Sestava je v tomto případě tvořena Cu drátkem (WE) a protielektrodou Ag drátkem – elektrodou pseudoreferentní (pREF). Tento systém je schopen vložených potenciálů na WE udržet pouze omezenou dobu (řádově jednotky minut dle velikosti vloženého potenciálu), poté nutně dochází k přepólování systému, tj. WE se stává



Obr. 2. Příklad zapojení elektrochemické cely z komerčně dostupného PEEK Cross pro dvouelektrodové zapojení potenciostatu

Ag elektroda. V systému se to projeví tak, že místo generování Cu kationtů dojde ke generování Ag kationtů.

Analyticky robustnější je tříelektrodové zapojení potenciostatu, toto zapojení díky použití AUX a běžné REF již splňuje nároky na stabilní kontrolovatelné držení potenciálu. Avšak nutnost miniaturizace REF s sebou nese i nemalé konstrukční výzvy (viz typy elektrod).

3.4. Typy elektrod

Pro AUX je výběr materiálů omezen pouze na nepolarizovatelné; AUX nesmí ovlivňovat chování WE. Nejčastější AUX pro spojení EC/MS jsou z nerezové oceli, grafitem dopovaného teflonu, platiny, či palladia³⁸.

Použitelné REF jsou typově stejné jako elektrody používané při průtokových měřeních, ale musí být miniaturizované a nesmí obsahovat příliš velké mrtvé objemy. Klasická Ag/AgCl (argentchloridová) referentní elektroda může být použita jen v poměrně konstrukčně náročném uspořádání v amperometrické (coulometrické) cele, v poměrně velké vzdálenosti od pracovní elektrody³⁸. Ag/AgCl může být použita v miniaturizované podobě, přičemž běžně používaný KCl je nahrazen NH₄Cl (cit.³³), který je pro použití v EC/MS výhodnější, neboť je kompatibilní s často používaným základním elektrolytem pro spojení EC/MS, tj. CH₃COONH₄. Nevýhodou argentchloridové REF (zvláště té miniaturizované) je nutná poměrně častá údržba. Další vhodnou REF je Pd/H₂, která má tu výhodu, že je téměř bezúdržbová a je možné s ní pracovat i za zvýšeného tlaku; nevýhodou je, že její potenciál je závislý na pH (cit.³⁸). Teoreticky je možné použít i Hg/Hg₂Cl₂ (kalomelovou) REF, jejíž potenciál závisí na koncentraci protiiontu, nicméně stále menší obliba rtuti a navíc nutnost použít skutečně toxické soli rtuti činí tuto REF stále méně používanou.

Výběr REF a AUX je sice omezen, ale naopak výběr WE je pestrý; mohou přicházet v úvahu stále nové a všechny dosud známé použitelné materiály, mimo kapalnou rtuť. Ve výběru WE je důležitý účel, pro který elektrochemickou celu konstruuje. Kovy, jako je stříbro, či měď, jsou vhodné pro elektrochemickou aktivaci nepolárního analytu, či separaci analytu z matrice^{29,39}, platina ne-

bo zlato jsou vhodné pro redukci analytu v případě studia (mimikování) metabolických přeměn analytu. Pro oxidaci analytu lze použít skelný uhlík (glassy carbon), či jeho modifikace^{19,40}. Dále je v environmentální analýze možné v průtoku použít např. uhlíkovou pastu, pevný amalgam, borem dopovaný diamant, či další kompozity v různých modifikacích^{41–44}.

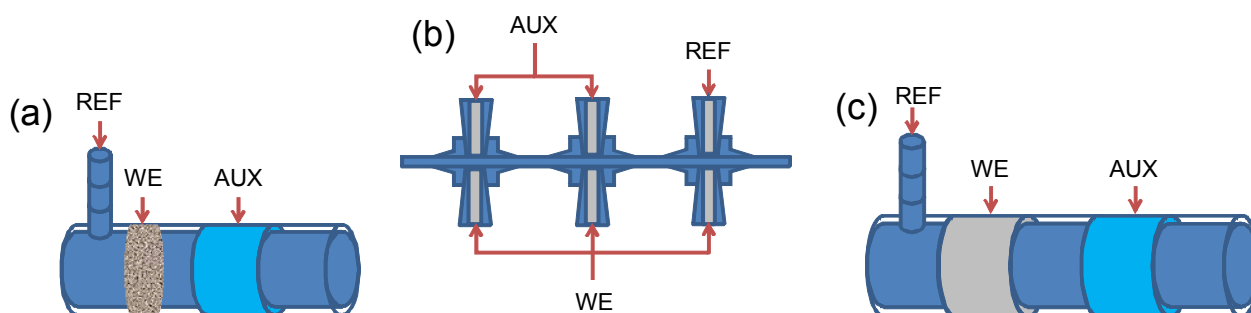
Miniaturizace elektrod pro EC je z konstrukčního hlediska poměrně nelehká pro argentchloridové REF. Miniaturizace AUX je snadná a spočívá většinou v zavedení požadované plochy AUX do průtoku vzorku. Miniaturizace WE s sebou přináší řešení přeneseného tzv. minimax problému, tj. pro úspěšnou (dostatečnou) přeměnu analytu je třeba dostatečná, relativně velká kontaktní plocha WE, ale pro miniaturizované elektrochemické cely je i velikost WE omezena. Řešením toho problému může být použití porézních WE (obr. 3a), které i přes svou malou velikost mají obrovský povrch³⁸. Dále je pro zvýšení povrchu WE možno použít sady několika drátkových elektrod, které jsou však zapojeny jako jedna WE (obr. 3b), či může jako WE sloužit závit z příslušného kovu (obr. 3c).

4. Možnosti využití spojení elektrochemie s hmotností spektrometrií

Tato část je věnována vlastním aplikacím plynoucím ze spojení voltametrie s hmotností spektrometrií. Důraz je věnován především (i) na elektrochemickou separaci analytu z biologické matrice vzorku navázáním analytu na elektrochemicky generovaný nascentní ion, (ii) na elektrochemickou aktivaci nepolárních látek, probíhajících opět navázáním analytu na elektrochemicky generovaný nascentní ion a v neposlední řadě (iii) na studium mechanismů elektrochemických reakcí včetně mimikování biochemických redox reakcí.

4.1. Separace analytu z matrice a elektrochemická aktivace analytu

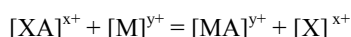
Princip separace analytu z matrice i elektrochemická aktivace nepolárního analytu jsou založeny na interakci



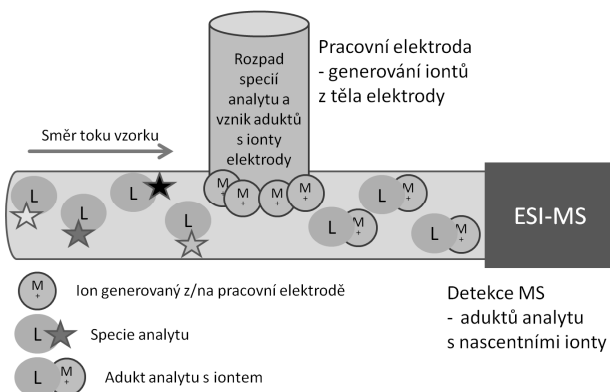
Obr. 3. Některé ukázky možností konstrukce elektrochemických průtokových cel pro tříelektrodové zapojení potenciostatu v závislosti na charakteru pracovní elektrody (WE); AUX – elektroda pomocná, REF – elektroda referentní

analytu s tělem pracovní elektrody, či na interakci analytu s ionty generovanými z těla pracovní elektrody do roztoku, proto jsou tyto dvě aplikace spojeny v jeden oddíl. Elektrochemicky generované ionty látek z materiálu elektrody vytvářejí nabitě adukty s látkami obsaženými ve vzorku, následně jsou kvantitativně či kvalitativně analyzovány hmotnostním spektrometrem (obr. 4, 6).

Základní myšlenka této separace je založena na představě, že elektrochemicky generované ionty z těla elektrody *in statu nascendi* jsou vysoce reaktivní a budou s většinou organických látek obsahujících vhodný ligand tvořit adukty, čímž způsobí rozpad původních specií analytu:



Pro materiál pracovní elektrody byly použity kovy, u kterých se předpokládá, že mají obecně vyšší afinitu k tvorbě aduktů/komplexů s organickými ligandy⁴⁵, tedy např. měď nebo stříbro. Během tohoto typu separace dochází *de facto* k vytěsnění původního iontu z původní specií analytu a jeho nahrazení iontem z těla pracovní elektrody²⁹. Nejedná se samozřejmě o separaci univerzální, nicméně její použití pro některé látky dokládá celá řada studií zaměřená na studium stability komplexů organických látek s kationty mědi^{46,47}, stříbra³⁹, zinku⁴⁵ i dalších. Například vazba s kationtem mědi může být tvořena jak přes volné elektronové páry kyslíku (např. hydroxylové či karbonylové funkční skupiny), tak pomocí π elektronu aromatického systému, či přes parciální náboj na dusíkovém atomu různých funkčních skupin, nebo přes volné elektronové páry lokalizované na atomech síry z různých funkčních skupin^{45,48,49}. Dá se očekávat, že většina organických látek obsahuje některou z výše zmíněných funkčních skupin, lze tedy očekávat, že tento typ separace by mohl být široce použitelný. Nicméně jedná se o nový přístup, který je zatím prověřen jen pro několik organických látek³³ a na své širší uplatnění teprve čeká.

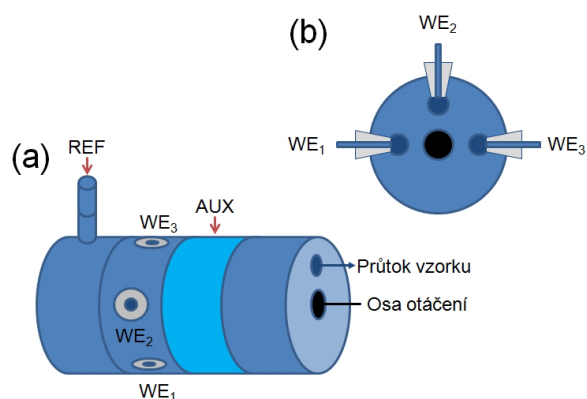


Obr. 4. Princip separace analytu z matrice vzorku pomocí elektrochemicky generovaných iontů z/na těle pracovní elektrody

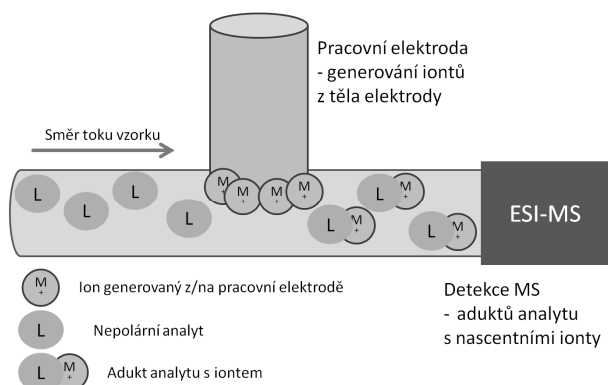
Základní otázka tkví ve volbě elektrodového materiálu pracovní elektrody. Z tohoto pohledu se jeví jako zajímavá myšlenka konstrukce elektrochemické cely obsahující více pracovních elektrod vyhotovených z různých materiálů a možnost provést separaci v sérii za sebou pomocí různých iontů³³. Pravděpodobnost nalezení optimálního iontu pro separaci tak vzrůstá s počtem sériově zapojených pracovních elektrod. Konstrukce vícekanálové cely pro různý počet WE pak může být řešena umístěním karuselu, který obsahuje požadované množství WE (např. 3WE, obr. 5), kdy změna WE je docílena prostým otočením (manuálně nebo pomocí servomotoru ovládaného softwarem) karuselu. Množství generovaných iontů lze ovlivnit jak nepřímou, rychlostí průtoku vzorku v elektrochemické cele, tak i přímo, hodnotou vkládaného napětí mezi pracovní a referenční elektrodou. Je možné generovat ionty z různých pracovních elektrod v sérii za sebou nebo jednodušeou výměnou pracovních elektrod. Tímto je možné získat data, která poskytnou více informací o analyzovaném substrátu a zajistí vyšší selektivitu. Dále je při měření na různých elektrodách v sérii za sebou možné provádět současnou regeneraci pracovních elektrod během měření na další pracovní elektrodě, čímž dojde k výraznému zkrácení analýz.

Jedná se tedy o separační metodu založenou na vysoké reaktivitě elektrochemicky generovaných iontů, čímž je umožněno vyvázání organických látek z matrice vzorku do formy stabilních aduktů a následná detekce těchto aduktů pomocí MS. Takovýto postup lze využít jako rychlou referenční metodu separace k metodám chromatografickým. Současně je možné tuto separaci použít v kombinaci s kapalinovou chromatografií (obr. 7), což umožňuje lepší separaci zaměřenou na konkrétní analyt. Kapalinovou chromatografií lze podle požadavků na stanovení analytu řadit před i za elektrochemickou separaci.

Princip elektrochemické aktivace nepolárních (obr. 6), či slabě polárních látek je podobný jako v případě separace analytu z matrice vzorku. Tento přístup je zalo-

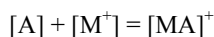


Obr. 5. Schematické znázornění elektrochemické cely obsahující 3 různé pracovní elektrody (WE) umístěné v karuselu



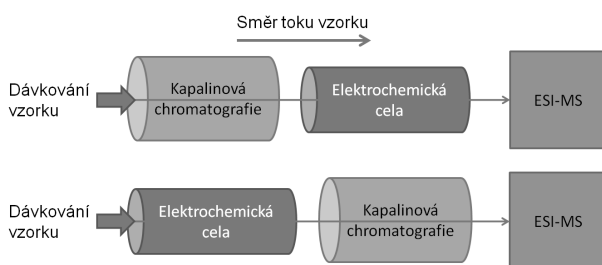
Obr. 6. Princip elektrochemické aktivace nepolárních látek pomocí elektrochemicky generovaných iontů z/na těle pracovní elektrody

žen opět na interakci analytu (tentokrát analytu nepolárního) s ionty generovanými z/na těle pracovní elektrody *in situ nascendi*. Touto interakcí vzniká z látky převážně nepolární látka nabitá:



Možnosti „zviditelnění“ nepolárního analytu pro analýzu pomocí ESI-MS spočívají v protonizaci analytu. Nespornou výhodou tohoto přístupu je zejména zvýšení citlivosti detekce, kdy komplex látky s kovem poskytuje signál o vyšší intenzitě oproti protonizované formě dané látky. Zásadní je zde možnost použití různých typů pracovních elektrod, tedy různých materiálů, z nichž je možno podle potřeby generovat vhodné ionty pro vytvoření konkrétního nabitého aduktu se sledovanými látkami.

Zapojení EC před MS umožňuje v některých případech i využití uvedeného postupu pro současnou separaci a elektrochemickou aktivaci nepolární látky z biologické matrice. Zároveň je možné v případě velmi komplexních matic zařadit kapalinovou chromatografii (LC). LC je v principu možno řadit jak před elektrochemickou celou, tak i za ní (mezi EC a MS) (obr. 7), nicméně zařazení LC před EC/MS není příliš časté, a to z jednoduchého důvodu: pokud je výrobcem dodána uzavřená sestava LC/MS, lze do ní vstupovat jen obtížně a EC je zapojována dodatečně



Obr. 7. Možnosti zapojení elektrochemické cely společně s kapalinovou chromatografií před hmotnostní spektrometr

jediným možným způsobem, tj. EC/LC/MS. Uspořádání s EC uprostřed teprve čeká na své komerční provedení.

4.2. Studium mechanismu redoxních reakcí

Poslední část tohoto příspěvku je věnována využití on-line spojení EC/MS pro studium mechanismu redoxních reakcí. Redoxní reakce jsou velmi důležité nejen pro elektrochemii jako takovou⁵⁰, ale také pro zachování samotného života, či alespoň životních funkcí. Velká část biochemických reakcí probíhající v tělech organismů jsou reakce oxidačně redukční⁵¹. Právě on-line spojení EC/MS umožňuje studovat redoxní biochemické procesy v reálném čase a *ex situ* a získat tak o produktech i často meziproduktech reakce nejen elektrochemické informace, ale též důležité (často pro pochopení a popis reakce důležitější) informace o hmotnosti a složení molekuly a změnách způsobených redoxní reakcí. Ba co víc, některé hmotnostní spektrometry jsou též vybaveny tzv. iontovou mobilitou, která umožňuje určit u molekul i tzv. reakční průměr, který přímo odkazuje k velikosti a tvaru molekuly⁵², čímž umožňuje sledovat i konformační a konstituční změny v důsledku reakčních přeměn molekul. Spojením EC/MS se tedy otevírá široká škála možností, jak studovat jednotlivé biochemické redoxní reakce metabolismu mimo organismus, a rovněž se zvyšuje množství informací, které jsme schopni z analýz spojených metod získat. Dá se očekávat, že metody založené na on-line spojení EC/MS budou velmi důležitým nástrojem pro biomimetiku redoxních reakcí.

Zejména je on-line EC/MS možné využít pro *ex situ* (i) studium jednotlivých metabolitů, což je klíčové pro pochopení základních metabolických přeměn, a (ii) sledování redoxních změn léčiv, či podobných tělu nevládních látek, což je velmi důležitý aspekt v hodnocení jejich závadnosti/nezvadnosti.

Většina tělu cizích látek (kam lze řadit jak léky, tak i např. pesticidy) putuje v lidském organismu do jater, kde dochází k jejich potenciální detoxifikaci. Játra obsahují celou řadu enzymů, které slouží k biotransformaci xenobiotik pomocí dehydrogenace, hydrolyzy, redukce, či oxidace⁵³. Jednou z nejdůležitějších a zároveň první metabolickou dráhou (fáze I), kterou prochází většina cizorodých látek, je cytochrom P450, která zahrnuje oxidační reakce vedoucí k navázání polárních funkčních skupin na xenobiotickou látku, jako jsou amino skupina, hydroxyl nebo karboxylová skupina. V další detoxikační fázi (fáze II) jsou takto upravené xenobiotické látky většinou navázány na glutathion, glukuronovou kyselinu nebo na sulfát⁵⁴. V této navázané formě se většina xenobiotik stává vysoce polárními a dochází k jejich poměrně rychlému vyloučení z organismu. Na druhé straně jsou i xenobiotika, která jsou po průchodu fází I natolik reaktivní, že se většinou reverzibilně váží na některé (membránové) proteiny nebo dokonce DNA (cit.⁵⁵). Poločas „života“ těchto reaktivních metabolitů xenobiotik je poměrně krátký (okolo jedné minuty), protože dochází k jejich navázání na matrici krve, či plasmu⁵⁶. Přímá detekce těchto látek je tedy velmi obtížná,

či nemožná. Z tohoto důvodu je pro pochopení metabolických přeměn některých xenobiotik výhodné tyto přeměny studovat *ex situ* právě pomocí on-line spojení EC/MS (cit.⁵⁷). Mezi tato reaktivní xenobiotika často patří např. chinony, u nichž dochází k nukleofilnímu ataku thiolových skupin malých molekul, jako jsou cystein, či glutathion⁵⁸. Právě reakce xenobiotik s thiolovými skupinami bílkovin vedou k narušení funkčnosti těchto bílkovin, a tím i k toxicitě těchto látek v játrech. Jako příklad vzniku reaktivního metabolitu pomocí cytochromu P450 lze uvést acetaminofen, který je přeměněn na velmi reaktivní *N*-acetyl-*p*-benzochinonimin, který je následně detoxikován interakcí s glutathionem. Potíž nastává ve chvíli, pokud je acetaminofen přítomen v takové koncentraci, že glutathion přítomný v játrech již nestačí k jeho kvantitativní detoxikaci a metabolit acetaminofenu se váže na jiné příhodné thiolové skupiny jaterních bílkovin⁵⁹.

V praxi se vznik metabolitů studuje většinou na tkáňových řezech⁶⁰, či na buněčných kulturách, což je z hlediska výtěžku reakcí způsobené sníženou enzymatickou expresí velmi problematické⁶¹. I samotné studium redoxních reakcí na substrátové úrovni je z hlediska vysokých cen komerčně dostupných enzymů drahá záležitost. Proto využití on-line zapojení EC/MS pro *ex situ* studium oxidace, či redukce xenobiotik, či mimikování metabolických drah skrývá stále značný potenciál. K těmto studiím totiž není potřeba tkáňových řezů, či buněčných kultur ani enzymatický aparát, jedná se tedy potenciálně o nízkonákladovou metodu.

5. Závěr

Spojení elektrochemických metod (EC) s hmotnostní spektrometrií (MS) je v současné době velmi slibně se vyvíjející obor analytické chemie, který nalézá své uplatnění nejen v analytické chemii samotné, ale též se objevuje potenciál využití toho spojení pro studium mechanismu elektrochemických reakcí, a to zejména redoxních biochemických reakcí.

Analytické využití spojení EC/MS zahrnuje především (i) elektrochemickou aktivaci nepolárního anebo slabě polárního analytu pro potřeby MS detekce a (ii) (elektrochemickou) separaci vyvázáním analytu přítomného ve vzorku v mnoha speciích na elektrochemicky generovaný ion a následnou detekci aduktu analytu s iontem pomocí MS.

Využití EC/MS pro studium mechanismů elektrochemických reakcí je velmi variabilní a dá se očekávat, že najde využití zejména na poli základního výzkumu v oblasti kinetiky elektrochemických reakcí. Navíc tento přístup skýtá možnost oxidovat, či redukovat nějakou lidskému organismu nevlastní látku (léčivo, pesticid apod.), čímž lze napodobit redoxní děje spojené s biochemickým odbouráváním xenobiotik. Z tohoto pohledu se otevírá široké pole potenciálních aplikací v medicíně i biochemii, jedná se o neinvazivní přístup nevyžadující experimenty, tkáňové či buněčné kultury, ba ani přítom-

nost jinak velmi drahých enzymů. K redukci či oxidaci xenobiotika dochází na pracovní elektrodě a k detekci metabolitu xenobiotika v hmotnostním spektrometru, a není třeba dalšího vybavení.

Článek je podpořen grantem GA ČR č. 13-21409P.

LITERATURA

1. Rubert J., Zachariášová M., Hajšlová J.: *Food Addit. Contam., Part A* 32, 1685 (2015).
2. Wojtowicz P., Janečková H., Friedecký D., Adam T.: *Chem. Listy* 107, 3 (2013).
3. Krska R., Becalski A., Braekevelt E., Koerner T., Cao X. L., Dabeka R., Godefroy S., Lau B., Moisey J., Rawn D. F. K., Scott P. M., Wang Z. W., Forsyth D.: *Anal. Bioanal. Chem.* 402, 139 (2012).
4. Gross J. H.: *Mass Spectrometry. A Textbook*. 2. vyd., Springer-Verlag, Berlin 2011.
5. Norková R., Jaklová Dyrtrtová J., Kašička V.: *Chem. Listy* 107, 949 (2013).
6. Klampfl C. W., Himmelsbach M.: *Anal. Chim. Acta* 890, 44 (2015).
7. Milman B. L.: *TrAC, Trends Anal. Chem.* 69, 24 (2015).
8. Hajšlová J., Zrostlíková J.: *J. Chromatogr. A* 1000, 181 (2003).
9. Diehl G., Karst U.: *Anal. Bioanal. Chem.* 373, 390 (2002).
10. Wang J.: *Analytical Electrochemistry*. 3. vyd., Wiley-VCH, New York 2006.
11. Berek J., Opekar F., Štulík K.: *Elektroanalytická chemie*. 1. vyd., Karolinum, Praha 2005.
12. Buffle J., Tercier-Waeber M. L.: *TrAC, Trends Anal. Chem.* 24, 172 (2005).
13. Navrátil T., Kohlíková E., Petr M., Heyrovský M., Pelclová D., Přistoupilová K., Přistoupil T. I., Senholodová Z.: *Food Chem.* 112, 500 (2009).
14. Fojta M., Jelen F., Havran L., Paleček E.: *Curr. Anal. Chem.* 4, 250 (2008).
15. Jaklová Dyrtrtová J., Jakl M., Schröder D., Navrátil T.: *Curr. Org. Chem.* 15, 2970 (2011).
16. Bruckenstein S., Comeau J.: *Faraday Discuss. Chem. Soc.* 56, 285 (1973).
17. Bruckenstein S., Gadde R. R.: *J. Am. Chem. Soc.* 93, 793 (1971).
18. Gun J., Bharathi S., Gutkin V., Rizkov D., Voloshenko A., Shelkov R., Sladkevich S., Kyi N., Rona M., Wolanov Y., Rizkov D., Koch M., Mizrahi S., Pridkochenko P. V., Modestov A., Lev O.: *Isr. J. Chem.* 50, 360 (2010).
19. Deng H. T., Van Berkel G. J.: *Electroanalysis* 11, 857 (1999).
20. Deng H. T., Van Berkel G. J.: *Anal. Chem.* 71, 4284 (1999).
21. Zhou F., Van Berkel G. J.: *Anal. Chem.* 67, 3643 (1995).
22. Jaklová Dyrtrtová J., Jakl M., Norková R., Navrátil T.:

- Modern Electrochemical Methods XXXII, Jetřichovice, 21.-25.5.2012*, (Navrátil T., Fojta M., ed.), Best Servis, Ústí nad Labem, str. 54, Jetřichovice 2012.
23. Jin Z., Daiya S., Kenttamaa H. I.: *Int. J. Mass Spectrom.* **301**, 234 (2011).
 24. Macha S. F., Limbach P. A., Hanton S. D., Owens K. G.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **12**, 732 (2001).
 25. Plattner S., Erb R., Pitterl F., Brouwer H. J., Oberacher H.: *J. Chromatogr. B* **883-884**, 198 (2012).
 26. Melles D., Vielhaber T., Baumann A., Zazzeroni R., Karst U.: *J. Chromatogr. B* **913-914**, 106 (2013).
 27. Seiwert B., Henneken H., Karst U.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **15**, 1727 (2004).
 28. Zettersten C., Co M., Wende S., Turner C., Nyholm L., Sjöberg P. J. R.: *Anal. Chem.* **81**, 8968 (2009).
 29. Jaklová Dyrtrtová J., Jakl M., Schröder D., Norková R.: *Int. J. Mass Spectrom.* **338**, 45 (2013).
 30. Samec Z.: *Electrochim. Acta* **84**, 21 (2012).
 31. Senda M., Kakiuchi T., Osakai T.: *Electrochim. Acta* **36**, 253 (1991).
 32. Gunasingham H., Fleet B.: *Anal. Chem.* **55**, 1409 (1983).
 33. Jaklová Dyrtrtová J., Jakl M., Navrátil T., Cvačka J.: *CZ* **305** 266 9(2015).
 34. Economou A.: *Anal. Chim. Acta* **683**, 38 (2010).
 35. Tur'yan Y. I.: *Talanta* **44**, 1 (1997).
 36. Shono T., Ohmizu Y., Toda T., Oshino N.: *Drug Metab. Dispos.* **9**, 476 (1981).
 37. van den Brink F. T. G., Olthuis W., van den Berg A., Odijk M.: *TrAC, Trends Anal. Chem.* **70**, 40 (2015).
 38. Acworth I. N., Bowers M., v knize: *Coulometric Electrode Array Detectors for HPLC*. (Acworth I. N., Naoi M., Parvez S., Parvez H., ed.), sv. 6, VSP, Utrecht 1997.
 39. Makrlík E., Jaklová Dyrtrtová J., Vaňura P., Sýkora J., Vladimír C., Storch J.: *Chem. Phys. Lett.* **633**, 105 (2015).
 40. Cox J. A., Tess M. E., Cummings T. E.: *Rev. Anal. Chem.* **15**, 173 (1996).
 41. Barek J., Fischer J., Navrátil T., Pecková K., Yosypchuk B., Zima J.: *Electroanalysis* **19**, 2003 (2007).
 42. Bruins A. P.: *TrAC, Trends Anal. Chem.* **70**, 14 (2015).
 43. McCreery R. L.: *Chem. Rev.* **108**, 2646 (2008).
 44. Navrátil T., Barek J.: *Crit. Rev. Anal. Chem.* **39**, 131 (2009).
 45. Jaklová Dyrtrtová J., Fanfrlík J., Norková R., Jakl M., Hobza P.: *Int. J. Mass Spectrom.* **359**, 38 (2014).
 46. Wang R., Chakrabarti C. L.: *Anal. Chim. Acta* **614**, 153 (2008).
 47. Achterberg E. P., van den Berg C. M. G., Boussemart M., Davison W.: *Geochim. Cosmochim. Acta* **61**, 5233 (1997).
 48. Jaklová Dyrtrtová J., Jakl M., Schröder D., Čadková E., Komárek M.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **25**, 1037 (2011).
 49. Nováková K., Navrátil T., Jaklová Dyrtrtová J., Chýlková J.: *J. Solid State Electrochem.* **17**, 1517 (2013).
 50. Jaklová Dyrtrtová J., Jakl M., Schröder D.: *Modern Electrochemical Methods XXXI, Jetřichovice, 23.-27.5.2011*, (Navrátil T., Barek J., ed.), BEST Servis, Ústí nad Labem, str. 69, Jetřichovice 2011.
 51. Faber H., Vogel M., Karst U.: *Anal. Chim. Acta* **834**, 9 (2014).
 52. Révész Á., Schröder D., Rokob T. A., Havlík M., Dolenský B.: *Phys. Chem. Chem. Phys.* **14**, 6987 (2012).
 53. Meyer U. A.: *J. Pharmacokinet. Biopharm.* **24**, 449 (1996).
 54. Parkinson A., Ogilvie B. W., Buckley D. B., Kazmi F., Czerwinski M., Parkinson O., v knize: *Casarett & Doull's Toxicology, The Basic Science of Poisons*, (Klaassen C. D., ed.). McGraw-Hill Education, New York 2013.
 55. Antoine D. J., Williams D. P., Park B. K.: *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **4**, 1415 (2008).
 56. Park B. K., Kitteringham N. R., Maggs J. L., Pirmohamed M., Williams D. P.: *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **45**, 177 (2005).
 57. Bussy U., Boisseau R., Thobie-Gautier C., Boujtita M.: *TrAC, Trends Anal. Chem.* **70**, 67 (2015).
 58. Bolton J. L., Trush M. A., Penning T. M., Dryhurst G., Monks T. J.: *Chem. Res. Toxicol.* **13**, 135 (2000).
 59. James L. P., Mayeux P. R., Hinson J. A.: *Drug Metab. Dispos.* **31**, 1499 (2003).
 60. Lake B. G., Price R. J.: *Xenobiotica* **43**, 41 (2013).
 61. Brandon E. F. A., Raap C. D., Meijerman I., Beijnen J. H., Schellens J. H. M.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **189**, 233 (2003).

J. Jaklová Dyrtrtová^{a,b} and M. Jakl^c (^a*Institute of Organic Chemistry and Biochemistry AS CR, v.v.i., Prague*, ^b*Department of Physiology and Biochemistry, Faculty of Physical Education and Sport, Charles University in Prague, Prague*, ^c*Department of Agro-Environmental Chemistry and Plant Nutrition, Faculty of Agrobiology, Food and Natural Resources, Czech University of Life Sciences Prague, Prague*): **Hyphenation of Electrochemical Methods with Mass Spectrometry – The Potential for Analytical and Physical Chemistry and Biochemistry**

The contribution provides a critical overview about hyphenation of electrochemical methods (EC) with mass spectrometry (MS). It is focused on the difficulties of the electrochemical cell construction, selection of the electrodes and electrodes arrangements. Three possible applications of on-line EC/MS are introduced and discussed: (i) electrochemical activation of nonpolar chemicals, (ii) separation of chemicals using electrochemically generated nascent ions and (iii) studies of mechanisms of electrochemical reactions including the mimicking of the detoxification process provided using cytochrome P450.