

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Optimalizace vybraných parametrů CE-MS metody pro analýzu doplňků stravy s obsahem boswellových kyselin

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Pavel Jáč, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Dmytro Kosolapov

Hradec Králové, 2024

Filip Bařinka

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracoval samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové dne 10. září 2024

Filip Bařinka

Poděkování

Chtěl bych poděkovat PharmDr. Pavlu Jáčovi, Ph.D. za vedení této diplomové práce, za velmi cenné rady, předané zkušenosti, vstřícnost, obrovskou trpělivost a inspiraci.

Děkuji také Mgr. Dmytru Kosolapovi za velkou pomoc při práci v laboratoři a zpracovávání dat, za rady, nápady a ochotu.

Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Filip Bařinka

Školitel: PharmDr. Pavel Jáč, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Dmytro Kosolapov

Název diplomové práce: Optimalizace vybraných parametrů CE-MS metody pro analýzu doplňků stravy s obsahem boswelových kyselin

Cílem této práce bylo optimalizovat vybrané parametry existující CE-MS metody pro analýzu boswelových kyselin, hlavních biologicky aktivních obsahových látek rostlin rodu *Boswellia*. Boswelové kyseliny, resp. extrakt z *Boswellia serrata* je oblíbeným léčivem rostlinného původu s protizánětlivým a antirevmatickým účinkem, vyskytující se na českém trhu v podobě doplňků stravy, pro které je metoda vyvíjena. Metoda dále cílí na přítomnost látek ze skupiny nesteroidních antiflogistik (NSAID), jakožto potenciálních adulterantů těchto doplňků stravy, jelikož se svým terapeutickým účinkem překrývají s boswelovými kyselinami. Separace probíhala v základním elektrolytu o složení 40 mmol/L octan amonný (pH 8.5), methanol a acetonitril (5:1:4, v/v/v). Kapilární elektroforéza byla spojena s MS pomocí rozhraní s přídatnou kapalinou. Hmotnostní spektrometr byl vybaven iontovým zdrojem Agilent JetStream a trojitým kvadrupólem pro cílenou analýzu v módu „selected reaction monitoring“ (SRM).

V této diplomové práci bylo optimalizováno nastavení parametrů iontového zdroje za pomoci plánování experimentů (DoE). DoE proběhl ve dvou fázích. Screening byl proveden pomocí frakčního faktoriálního designu, během kterého byly vybrány 4 parametry (napětí na ESI kapiláře, napětí na trysce /nozzle voltage/, napětí na vysokotlaké a nízkotlaké nálevce), které měly nejsignifikantnější vliv na ionizaci analytů, jejichž nastavení bylo dále optimalizováno pomocí centrálního kompozitního designu. V dalším kroku byly porovnány dva postupy pro extrakci boswelových kyselin z doplňků stravy. Následně byly provedeny experimenty, jež měly za cíl studovat vliv dalších faktorů ovlivňujících opakovatelnost a citlivost metody s cílem dosáhnout co nejnižších hodnot RSD korigované plochy při zachování či zvýšení citlivosti. Optimalizováno bylo složení přídatné kapaliny, její průtok, nebulizační tlak, doba a způsob nástřiku vzorku. Finální metodou byly analyzovány vybrané doplňky stravy s obsahem extraktu z *Boswellia serrata*. Z výsledných SRM záznamů byl jasně patrný kvantitativní rozdíl v zastoupení jednotlivých boswelových kyselin v různých doplňcích stravy ukazující potenciál této metody pro kontrolu jakosti těchto produktů. Žádný z adulterantů ze skupiny NSAID, jejichž SRM přechody byly zahrnuty v CE-MS metodě, nebyly v analyzovaných doplňcích stravy identifikovány.

Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of analytical chemistry

Candidate: Filip Bařinka

Supervisor: PharmDr. Pavel Jáč, Ph.D.

Consultant: MSc. Dmytro Kosolapov

Diploma thesis title: Optimization of selected parameters of CE-MS method for the analysis of dietary supplements containing boswellic acids

The aim of this work was to optimize the selected parameters of the existing CE-MS method for the analysis of boswellic acids, the main biologically active substances contained in plants of the genus *Boswellia*. Boswellic acids, or *Boswellia serrata* extract, are a popular phytomedicines with anti-inflammatory and anti-rheumatic effects, available on the Czech market in the form of dietary supplements, for which the method is being developed. The method also targets the presence of substances from the group of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) as potential adulterants of these dietary supplements, as their therapeutical activity overlaps with boswellic acids. The separation took place in a background electrolyte with a composition of 40 mmol/L ammonium acetate (pH 8.5), methanol, and acetonitrile (5:1:4, v/v/v). Capillary electrophoresis was coupled with MS using a sheath-liquid interface. The mass spectrometer was equipped with an Agilent JetStream ion source and a triple quadrupole for targeted analysis in the selected reaction monitoring (SRM) mode.

In this diploma thesis, the ion source settings were optimized by means of design-of-experiments (DoE). DoE was performed in two phases. The screening was carried out using fractional factorial design, during which 4 parameters that had the most significant effect on the ionization of analytes (ESI capillary voltage, nozzle voltage, high-pressure, and low-pressure iFunnel voltage) were selected for subsequent optimization. Optimization was done using a central composite design. In the next step, two procedures for the extraction of boswellic acids from dietary supplements were compared. Subsequently, experiments were carried out to study the influence of other factors affecting the repeatability and sensitivity of the method in order to achieve the lowest possible values of RSD of the corrected area while maintaining or increasing sensitivity. The composition of the sheath-liquid, its flowrate, nebulization pressure, and time and mode of sample injection were optimized. Selected dietary supplements containing *Boswellia serrata* extract were analysed using the final method. From the resulting SRM electropherograms, a quantitative difference in the proportion of individual boswellic acids in different dietary supplements was clearly visible, showing the potential of this method for the quality control of these products. None of the adulterants from the NSAID group whose SRM transitions were included in the CE-MS method were identified in the analysed dietary supplements.

Obsah

1. Úvod	10
2. Cíl a popis zadání práce	11
3. Teoretická část	12
3.1. Boswellové kyseliny	12
3.2. Nesteroidní antiflogistika	14
3.3. Principy použitých metod	15
3.3.1. Kapilární elektromigrační metody	15
3.3.2. Instrumentace	15
3.3.3. Průběh separace v CZE	16
3.3.4. Princip ostatních kapilárních elektromigračních metod	19
3.3.5. Detektory v kapilární elektroforéze	20
3.3.6. Specifika spojení kapilární elektroforézy s hmotnostní spektrometrií	25
3.3.7. Experimentální design	28
3.3.7.1. Obecná charakteristika	28
3.3.7.2. Screeningové experimentální designy	30
3.3.7.3. Optimalizační experimentální designy	31
4. Experimentální část	33
4.1. Použité přístroje a pomůcky	33
4.2. Použité chemikálie	34
4.2.1. Standardy boswellových kyselin	34
4.2.2. Standardy nesteroidních antiflogistik	35
4.2.3. Doplnky stravy s boswellovými kyselinami	36
4.3. Příprava roztoků	36
4.3.1. Základní elektrolyt (BGE)	36
4.3.2. Zásobní roztoky NSAID standardů	36
4.3.3. Zásobní roztoky BA standardů a extraktu	37
4.3.4. Pracovní roztoky boswellových kyselin	37
4.3.5. Pracovní roztoky nesteroidních antiflogistik	37
4.3.6. Extrakce analytů z doplňků stravy	37
4.3.7. Roztok 1M amoniaku ke kondicionaci kapiláry	38
4.4. Parametry měření	38
4.5. Hodnocení metody	40
5. Výsledky a diskuse	41

5.1.	Počáteční podmínky metody	41
5.2.	Optimalizace nastavení iontového zdroje pomocí DoE.....	41
5.2.1.	Screening	42
5.2.2.	Optimalizace	47
5.3.	Výběr extrakčního postupu pro extrakci boswellových kyselin z doplňků stravy	56
5.4.	Optimalizace dalších parametrů pro zlepšení opakovatelnosti metody.....	57
5.4.1.	Optimalizace složení přídavné kapaliny.....	57
5.4.2.	Optimalizace nebulizačního tlaku	60
5.4.3.	Optimalizace doby nástřiku vzorku	61
5.4.4.	Optimalizace průtoku přídavné kapaliny při ionizaci	63
5.5.	Multisegmentová analýza.....	65
5.6.	Pilotní analýza doplňků stravy obsahující boswellové kyseliny	69
6.	Závěr	72
7.	Použitá literatura.....	74
8.	Příloha	77
8.1.	Chemické struktury nesteroidních antiflogistik monitorovaných v této práci	77
8.2.	Seznam SRM přechodů pro jednotlivé analyty	78
8.3.	Souhrny hodnot koeficientů pro odezvy S/N analytů ve screeningovém experimentu	79
8.4.	Souhrny hodnot koeficientů pro odezvy S/N analytů v optimalizačním experimentu	80
8.5.	Hodnoty Q2 a R2 u optimalizačního experimentu pomocí centrálního kompozitního designu.....	81
8.6.	Vrstevnicové grafy ukazující trendy vlivu zkoumaných faktorů na odezvu při optimalizaci.	82
8.7.	Nastavení optimalizačního nástroje softwaru MODDE	88
8.8.	Odezvy naměřené v optimalizačním experimentu.....	90

Abecední seznam zkratek

ACN – acetonitril

AJS – Agilent Jet Stream

AKBA – 3-O-Acetyl-11-keto- β -boswellová kyselina

APCI – chemická ionizace za atmosférického tlaku

APPI – fotoionizace za atmosférického tlaku

A α BA – 3-O-acetyl- α -boswellová kyselina

A β BA – 3-O-acetyl- β -boswellová kyselina

BA – boswellové kyseliny

α BA – α -boswellová kyselina

β BA – β -boswellová kyselina

BGE – základní elektrolyt

CE – kapilární elektroforéza

CEC – kapilární elektrochromatografie

CGE – kapilární gelová elektroforéza

CIEF – kapilární izoelektrická fokusace

CITP – kapilární izotachoforéza

CMC – kritická micelární koncentrace

COX – cyklooxygenáza

CZE – kapilární zónová elektroforéza

DoE – design experimentů

DS – doplňky stravy

EMV – napětí elektronového násobiče

EOF – elektroosmotický/endoosmotický tok

ESI – ionizace elektrosprejem

FASS – polem zesílené zakoncentrování vzorku

FHP – napětí na vysokotlaké iontové nálevce

FLP – napětí na nízkotlaké iontové nálevce

GC – plynová chromatografie

GF – průtok sušícího plynu

GT – teplota sušícího plynu

HRMS – hmotností spektrometrie s vysokým rozlišením

IPA – isopropylalkohol (propan-2-ol)
KBA – 11-keto- β -boswellová kyselina
HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie
MALDI – matricí asistovaná laserová desorpce/ionizace
MEKC – micelární elektrokinetická chromatografie
MeOH – methanol
MLR – vícenásobná lineární regrese
MS – hmotností spektrometrie
MSI – multisegmentový nástřik vzorku
NACE – nevodná kapilární elektroforéza
Noz – napětí na trysce
NSAID – nesteroidní antiflogistika
Ph. Eur. – Evropský lékopis
PVDF – polyvinylidenfluorid
Q-TOF – analyzátor doby letu propojený s kvadrupólovým analyzátozem
RSD – relativní směrodatná odchylka
SD – směrodatná odchylka
SFC – superkritická fluidní chromatografie
SGF – průtok přídavného plynu
SGT – teplota přídavného plynu
SL – přídavná kapalina
SRM – selektivní záznam vybrané reakce
SV – napětí na ESI kapiláře
TIC – celkový iontový proud
TLC – tenkovrstvá chromatografie
TOF – analyzátor doby letu
USP – lékopis Spojených států amerických
UV-Vis – ultrafialovo-viditelná/ý

1. Úvod

Kadidlo je surovina odpradávná používaná k náboženským a léčebným účelům. V průběhu 20. století se vědecký zájem o tuto drogu soustředil převážně na její antiflogistické a antirevmatické účinky. V dnešní době se výzkum rozšířil o testování protinádorové a antimikrobiální aktivity, terapii astmatu, autoimunních onemocnění, či testování antidiabetických, neuro- a hepatoprotektivních účinků [1] [2].

S rostoucí oblibou rostlinných doplňků stravy jakožto alternativy ke konvenčním syntetickým léčivům k samoléčbě různých onemocnění je také potřebné kontrolovat více jejich kvalitu. Zvláště když zároveň narůstá počet hlášených případů adulterací těchto přípravků. Rostlinné preparáty jsou záměrně pančovány z důvodu lepšího a okamžitého nástupu účinku sugerovaným tvrzeními výrobců [3]. K adulteracím jsou nejčastěji používána léčiva těchto skupin: inhibitory fosfodiesterázy typu 5 (používané k terapii erektilní dysfunkce), anorektika a stimulanty, hypoglykemika, antihypertenziva, a také steroidní a nesteroidní antiflogistika [3] [4]. Steroidní a nesteroidní antiflogistika jsou levná a bohužel vhodná k pančování doplňků stravy zamýšlených k léčbě chronických zánětlivých onemocnění jako revmatoidní artritida [5]. Mezi tyto rostlinné doplňky stravy patří i přípravky s obsahem extraktu z *Boswellia serrata*. Výše zmíněné adulteranty mohou mít ovšem i závažné nežádoucí účinky ohrožující zdraví konzumentů pančovaných přípravků. Je proto žádoucí, aby existovaly analytické metody schopné obsah potenciálních nedeklarovaných léčiv v těchto přípravcích monitorovat. V literatuře byly též popsány případy, kdy přípravky s obsahem extraktu z *Boswellia serrata* neobsahovaly deklarovaný obsah boswellových kyselin a panovalo podezření na pančování jinými druhy krom deklarované *Boswellia serrata* [6]. Z tohoto důvodu jsou potřebné také citlivé a spolehlivé analytické metody pro stanovení obsahu boswellových kyselin v doplňcích stravy.

2. Cíl a popis zadání práce

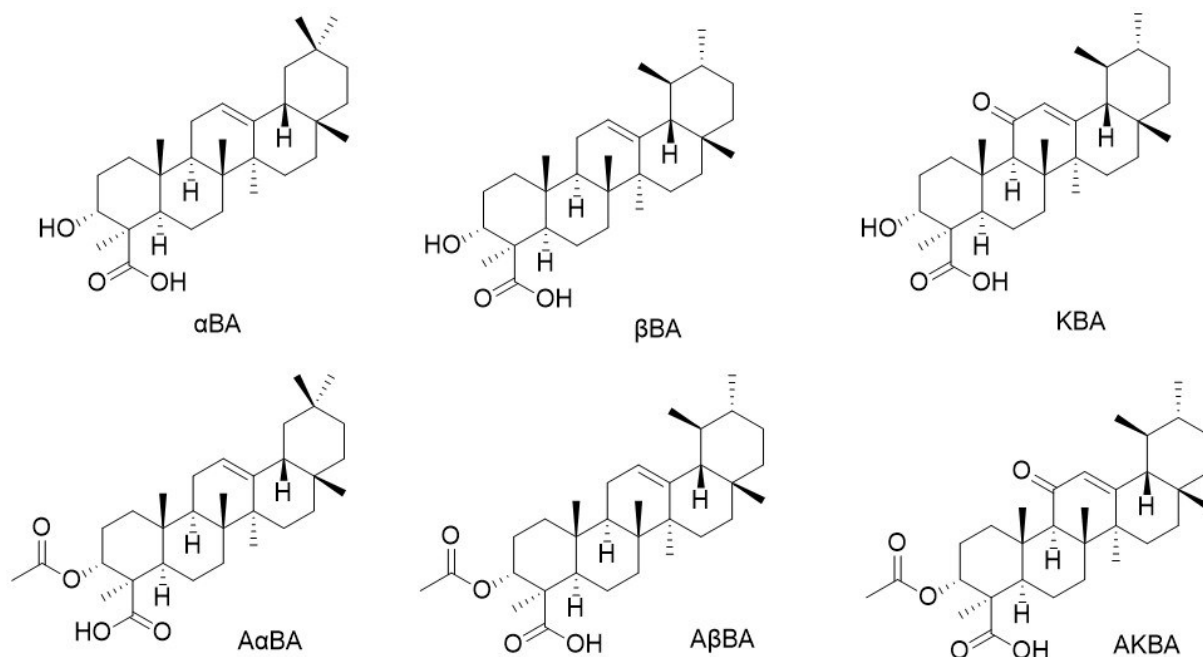
Cílem této diplomové práce byla optimalizace nové metody pro analýzu extraktů boswellových kyselin v doplňcích stravy za použití kapilární elektroforézy s hmotnostně spektrometrickou detekcí. Cílovými analyty bylo 6 boswellových kyselin a 13 léčiv ze skupiny nesteroidních antiflogistik. Tato diplomová práce se zaměřila na následující cíle:

- a) Optimalizaci parametrů iontového zdroje pro zlepšení ionizace analytů a zvýšení citlivosti metody za použití plánování experimentů (DoE).
- b) Optimalizaci složení přídavné kapaliny.
- c) Optimalizaci dávkování vzorku a případně dalších faktorů za účelem zvýšení opakovatelnosti korigovaných ploch.
- d) Předběžně analyzovat monokomponentní doplňky stravy s obsahem extraktu *Boswellia serrata*.

3. Teoretická část

3.1. Boswellové kyseliny

Boswellové kyseliny (BA) jsou po fytochemické stránce pentacyklické triterpeny oleanového a ursanového typu. Šesti hlavními kyselinami jsou: α -boswellová kyselina (α BA), β -boswellová kyselina (β BA), 3-O-acetyl- α -boswellová kyselina (A α BA), 3-O-acetyl- β -boswellová kyselina (A β BA), 11-keto- β -boswellová kyselina (KBA) a 3-O-acetyl-11-keto-boswellová kyselina (AKBA). Jsou součástí kadidla – klejoprskyřice prýstící z poraněných tkání keřů rodu *Boswellia sp* (kadidlovník, čeled' březulovité), vyskytujících se v Africe a Přední Indii. Mezi využívané druhy patří *B. serrata*, Roxb. ex Colebr., *B. sacra* Plueck (Syn. *B. carteri* Birdw.), *B. frereana* Birdw [7]. V Evropském lékopisu (Ph. Eur.) je uvedena lékopisná droga *Olibanum indicum* [8] a v Americkém lékopisu (USP) jsou v části věnované doplňkům stravy monografie *Boswellia serrata* a *Boswellia serrata extract* [9]. Klejoprskyřice se skládá cca z 3–8 % z těkavé silice, ze 60-70 % pryskyřičného základu a 27–35 % gumové (tj. polysacharidové) části, skládající se převážně z galaktózy, arabinózy a glukuronové kyseliny [2]. Konkrétní složení a poměr zastoupených složek se liší v závislosti na konkrétním druhu, místě výskytu a ročním období [1]. V kadidle se krom boswellových kyselin vyskytují další terpenoidy, např. monoterpeny, diterpeny (incensol, incensol acetát), triterpeny (α -/ β -amyrin), tetracyklické triterpeny (3-oxo-tirukalová kyselina, 3-acetoxy-tirukalová kyselina) a jiné pentacyklické triterpeny (lupeolová kyselina, acetyl-lupeolová kyselina) [10] [1].



Obrázek 1 Chemické struktury 6 hlavních boswellových kyselin. (nahore zleva) α BA – α -boswellová kyselina; β BA – β -boswellová kyselina; KBA – 11-keto- β -boswellová kyselina; A α BA – 3-O-acetyl- α -boswellová kyselina; A β BA – 3-O-acetyl- β -boswellová kyselina; AKBA – 3-O-acetyl-11-keto-boswellová kyselina.

Za protizánětlivou aktivitu boswellových kyselin zřejmě stojí více mechanismů účinku. Byl pozorován snížený vznik reaktivních forem kyslíku a dusíku a zároveň zvýšení aktivity antioxidantních enzymů jako glutathion peroxidázy, katalázy, a superoxiddismutázy. Snižují buněčnou signalizaci snížením tvorby cytokinů, migraci buněk imunitního systému a tvorbu prozánětlivých molekul jako jsou leukotrieny inhibicí enzymu 5-lipoxygenáza a prostaglandiny inhibicí enzymu mikrosomální prostaglandin E2-synthasy-1 [11]. Zároveň také tlumí aktivaci komplementu. Tyto a další mechanismy účinku se podílí na komplexní antiflogistické aktivitě boswellových kyselin [1]. Nadějná je u boswellových kyselin a klejoprskyříčných extraktů také cytotoxicita vůči nádorovým buňkám, pozorovaná nejen *in vitro*, nýbrž dokonce *in vivo*. Studovány byly např. nádory prostaty, slinivky, prsou, jater, plic či močového měchýře z nádorů solidních a leukémie a mnohočetný myelom z nádorů krevních. Molekulárních cílů je podobně jako u antiflogistické aktivity více. Krom zánětu, který hraje v kancerogenezi velkou roli, zasahují boswellové například do transdukce signálu typické pro nádorové buňky a transkripčních faktorů, buněčného cyklu, či indukce apoptózy [1]. Bylo také provedeno několik klinických studií zaměřených převážně na nádory mozku, ve kterých boswellové kyseliny výrazně zmenšily mozkový edém. Dále byly provedeny klinické studie imunologických patologií jako jsou revmatoidní artritida, osteoartróza, bronchiální astma, psoriáza, roztroušená skleróza, ulcerózní kolitida a Crohnova choroba. Studován byl také analgetický účinek [1]. Z boswellových mají dle dostupných poznatků největší biologickou aktivitu AKBA, KBA a β BA [2].

Boswellové kyseliny mají velký potenciál pro využití v medicíně založené na důkazech a je tedy žádoucí, aby existovaly přesné a citlivé analytické metody pro kontrolu kvality doplňků stravy, jež je obsahují. V tomto roce byl publikován přehledový článek, ve kterém jsou shrnuty dosavadní separační metody pro analýzu boswellových kyselin [11]. Do současné doby byly vyvinuty primárně chromatografické metody analýzy boswellových kyselin a silice kadidla [11]. Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC) je také metodou uvedenou v Ph. Eur. a USP pro stanovení obsahu KBA a AKBA [8], [9]. UV detekce je vhodná pro boswellové kyseliny s keto-skupinou, která má charakter chromoforu. Pro všechny základní boswellové kyseliny je ale vhodnější MS detekce, která je univerzálnější a také citlivější. Pro svou rychlost a dostupnost jsou využívány i metody planární chromatografie, tj. chromatografie na tenké vrstvě (TLC) a vysokoučinné tenkovrstvé chromatografie (HPTLC), jejichž nevýhodou je ovšem nižší selektivita. Popsány byly i metody plynové chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí (GC-MS), které byly použity zejména v archeologickém výzkumu. V jednom případě byla popsána superkritická fluidní chromatografie (SFC) [11]. Z elektromigračních metod byla k analýze boswellových kyselin využita pouze kapilární elektrochromatografie (CEC) [12]. Jedním z problémů analýzy pentacyklických triterpenů je podobný až stejný poměr hmoty a náboje (m/z) u těchto látek, což může činit potíže v selektivitě jak v kapilárních elektromigračních metodách, tak v hmotnostní spektrometrii [13]. Přehled základních fyzikálně-chemických vlastností BA je uveden v *tabulce 1*.

Isomerní struktury α BA/ β BA a A α BA/A β BA mají stejnou molekulovou i monoizotopickou hmotnost. Prostý MS detektor je tedy nedokáže rozlišit na základě hmoty. Při MSⁿ jsou detekovány u obou isomerů stejné produktové ionty. Tyto látky je tedy třeba nejprve rozdělit separační metodou předcházející MS detekci. Rozdílné hodnoty logP umožňují kompletní separaci v kapalinové chromatografii na reverzních fázích. Stejně hodnoty pKa a molekulové hmotnosti těchto isomerů implikuje, že v kapilárních elektromigračních metodách budou mít velmi podobnou, ne-li stejnou elektroforetickou pohyblivost.

Tabulka 1 Přehled vybraných fyzikálně-chemických vlastností boswellových kyselin

	α BA	β BA	A α BA	A β BA	KBA	AKBA
Molekulová hmotnost	456,71	456,71	498,74	498,74	470,68	512,72
Monoizotopická molekulová hmotnost	456,36	456,36	498,37	498,37	470,34	512,35
pKa	4,50 ± 0.70	4,50 ± 0.70	4,32 ± 0.70	4,32 ± 0.70	4,46 ± 0.70	4,28 ± 0.70
logP	8.9 ± 0.4	9.1 ± 0.4	9.8 ± 0.4	9.9 ± 0.4	6.6 ± 0.4	7.4 ± 0.4

3.2. Nesteroidní antiflogistika

Nesteroidní antiflogistika (NSAID) jsou široce využívaná skupina léčiv. Jejich mechanismus účinku je snížení hladin mediátorů zánětu – prostaglandinů – inhibicí enzymů COX-1 a COX-2 (cyklooxygenáza-1 a -2) zodpovědných za jejich syntézu. Krom skvělého protizánětlivého a analgetického účinku mohou mít ovšem i závažné nežádoucí účinky, jako vznik nebo zhoršení vředových onemocnění žaludku, nežádoucí kožní reakce, akutní či chronické renální insuficience, poškození jater, zvýšení rizika krvácení apod [14]. Existuje u nich také riziko lékových interakcí. Pojem NSAID zahrnuje strukturně rozmanitou skupinu látek. Tato práce je zaměřena na optimalizaci metody pro následující látky: diklofenak, indometacin, meloxicam, piroxikam, karprofen, ketoprofen, ibuprofen, kyselina tiaprofenová, flurbiprofen, kyselina niflumová, fenylbutazon, sulindak a kyselina salicylová. Struktury těchto analytů jsou zobrazeny v kapitole 8.1.

K detekci látek ze skupiny nesteroidních antiflogistik byly v minulosti použity kapilární elektromigrační metody, [15], [16] včetně kapilární elektroforézy spojenou s hmotnostní detekcí [17]. Ke kontrole adulterantů v tradičních rostlinných přípravcích byla v minulosti použita hlavně kapalinová chromatografie propojená s hmotnostní spektrometrií [3]. Kapilární elektromigrační metody propojené s hmotnostní spektrometrií byly za tímto účelem použity také, ovšem podstatně méně [3]. Adulterace nesteroidními antiflogistiky byly hlášeny v Číně, Singapuru, Pákistánu, Indii a Jižní Africe [4].

3.3. Principy použitých metod

3.3.1. Kapilární elektromigrační metody

Kapilární elektromigrační metody jsou metody schopné rozdělit analyty na základě jejich rozdílné elektroforetické pohyblivosti v elektrickém poli. Elektroforetická pohyblivost je dána především poměrem náboje, velikostí částice a charakterem prostředí. Malé, vícenásobně nabitě částice mají vyšší pohyblivost než velké částice s malým nábojem. Kromě charakteru iontů ovlivňuje pohyblivost také viskozita daného prostředí. Elektroforetickou mobilitu μ_e lze vyjádřit pomocí následující rovnice 1, kde q je celistvý náboj iontu, η je viskozita prostředí a r je poloměr iontu.

$$\mu_e = \frac{q}{6 \times \pi \times \eta \times r}$$

Rovnice 1

3.3.2. Instrumentace

Rozdílné módy kapilárních elektromigračních metod se můžou lišit svou instrumentací. Přístrojové vybavení potřebné pro kapilární zónovou elektroforézu (CZE) – standardní mód kapilárních elektromigračních metod – se skládá z následujících částí: zdroj vysokého napětí, platinové elektrody, vhodný detekční systém, termostatovaný prostor pro kazetu se separační kapilárou, autosampler, detektor a osobní počítač [18].

Pro separaci se nejčastěji využívají křemenné kapiláry potažené polyimidovým obalem s úzkým vnitřním průměrem pohybujícím se okolo 10–100 μm . Celková délka kapiláry obvykle nepřesahuje 100 cm [18]. Kapilára je ponořena na obou koncích (vstupní a výstupní) do nádobek s roztokem základního elektrolytu (BGE), který je typicky tvořen tlumivým roztokem o vhodném pH. Kromě křemenných kapilár mohou být použity také kapiláry z jiných materiálů jako je sklo či teflon [18].

Elektrické pole, které je zodpovědné za samotnou migraci iontů je generováno zdrojem stejnosměrného vysokého napětí s rozsahem do 30 kV, jehož polaritu lze přepínat. Elektrody jsou společně s koncem kapiláry ponořeny do nádobek se základním elektrolytem.

Pro vyhodnocení analýz je součástí systému detektor. Detekce může probíhat buď na konci kapiláry, či poblíž části kapiláry ponořené do výstupní nádoby – v takovém případě mluvíme o efektivní délce kapiláry, tj. délka kapiláry od místa dávkování k detektoru.

3.3.3. Průběh separace v CZE

Kapilární zónová elektroforéza (capillary zone electrophoresis – CZE) je nejjednodušší mód kapilárních elektromigračních metod. Základní princip separace v kapilární zónové elektroforéze je pohyb iontů směrem k elektrodě opačného náboje, tedy k opačným koncům kapiláry. Kladně nabitě kationty migrují směrem ke katodě, zatímco záporně nabitě anionty směrem k anodě rychlostí v dané jejich elektroforetickou pohyblivostí μ_e a intenzitou elektrického pole E (rovnice 2). Intenzita elektrického pole je podíl napětí vloženého na kapiláru U a celkové délky kapiláry L v cm dle rovnice 3.

$$v = \mu_e \times E$$

Rovnice 2

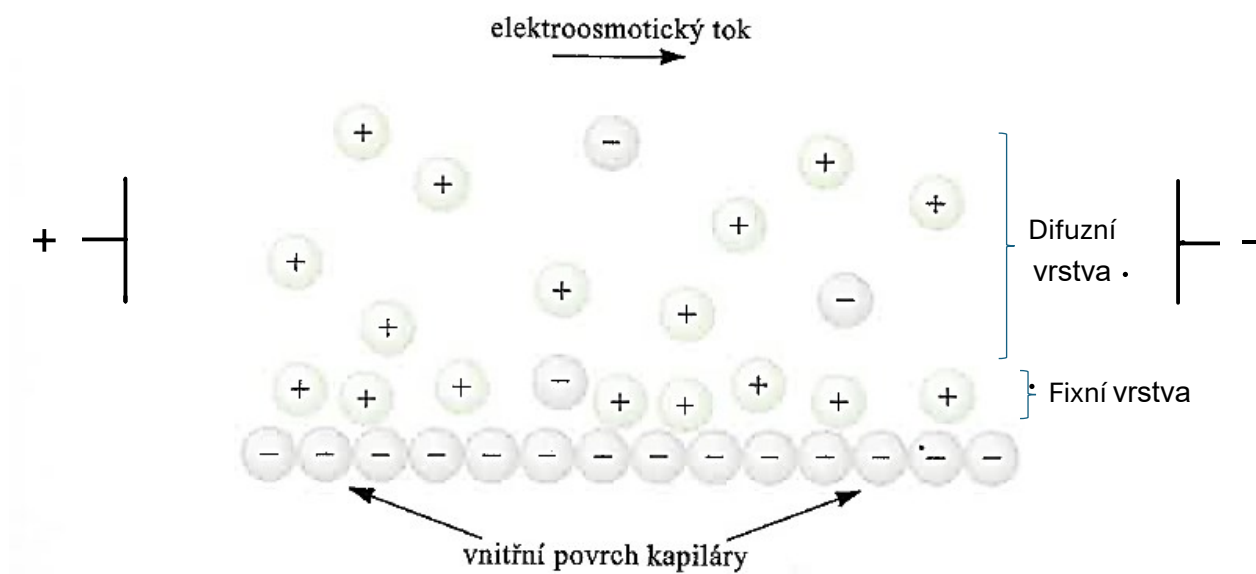
$$E = \frac{U}{L}$$

Rovnice 3

Křemenná kapilára, ve které separace probíhá, je na vnitřní stěně tvořena volnými silanolovými skupinami, které jsou za zvýšeného pH záporně nabitě. Kladně nabitě kationty elektrolytu jsou přitahovány záporně nabitými silanolovými skupinami kapiláry. Dochází k tvorbě elektrické dvojvrstvy, jež je tvořena fixní vrstvou kationtů koncentrovaných u stěny kapiláry a difuzní vrstvou vzdálenějších kationtů. Po vložení elektrického pole jsou kationty difuzní vrstvy přitahovány ke katodě a díky své solvataci s sebou táhnou ve stejném směru i celý objem kapaliny v kapiláře [19]. Tomuto jevu se říká elektroosmotický tok (EOF – electroosmotic flow, někdy také endoosmotic flow). Vznik EOF je znázorněn na obrázku 2. Díky EOF je možné najednou analyzovat anionty i kationty, neboť pohyblivost EOF může být řádově vyšší než pohyblivost aniontů migrujících v opačném směru [18]. Výsledná rychlost migrace je tedy součtem vektorů rychlostí jednotlivých analytů a EOF (viz obrázek 3). Neutrální molekuly bez náboje nejsou separovány a jsou unášeny rychlostí EOF. Rychlost EOF lze popsat rovnicí 4, kde ε je permitivita média (BGE), ξ je elektrokinetický (zeta) potenciál, E intenzita elektrického pole (viz rovnice 3) a η je viskozita BGE. Velikost a směr EOF je třeba kontrolovat. EOF je nejvíce ovlivněn pH, koncentrací elektrolytu a viskozitou separačního média. Také jej lze ovlivnit organickými aditivy či modifikací stěny kapiláry pomocí které lze obrátit i jeho směr [18]. Některé módy kapilárních elektromigračních metod naopak vyžadují minimální EOF, či jeho úplnou absenci [19].

$$v_{EOF} = \left(\frac{\varepsilon \times \xi}{\eta} \right) \times E$$

Rovnice 4

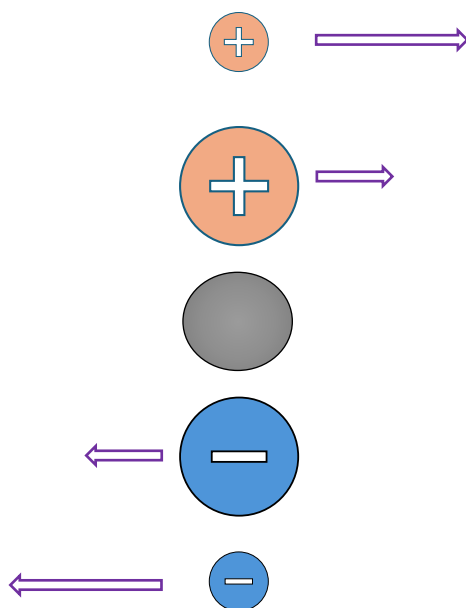


Obrázek 2 Znárodnění elektroosmotického toku v křemenné kapiláře. Na vnitřní stěně kapiláry je koncentrovaný negativní náboj volných silanolových skupin, který je částečně kompenzován fixní a difuzní vrstvou kationtů obsažených v BGE. Po vložení elektrického pole dochází k pohybu kationtů difuzní vrstvy a následně i celého objemu kapaliny v kapiláře směrem ke katodě. Převzato z [19]

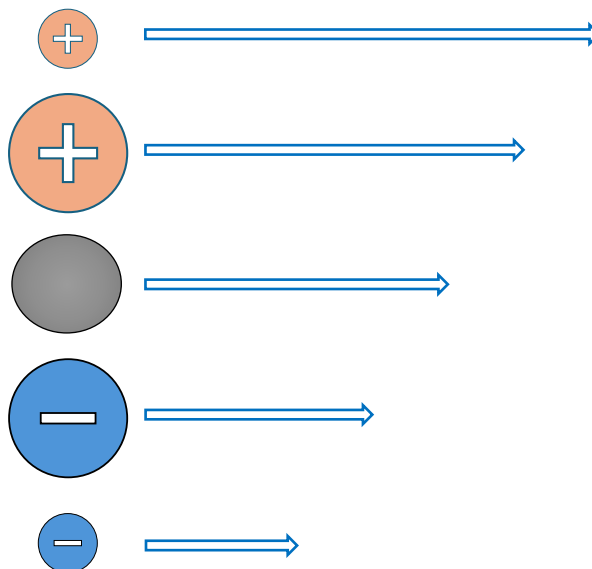
A: v (EOF):



B: v (elektroforetická):



C: v (celková) = v (elektroforetická) + v (EOF):



Obrázek 3 Pořadí migrace iontů v kapilárních elektromigračních metodách za přítomnosti EOF směřujícího ke katodě (katodický EOF). Rychlost pohybu neutrální molekuly (znázorněna šedou barvou) je shodná s rychlostí EOF. Převzato a upraveno z [19].

Další výhodou EOF je úzký rychlostní profil, daný pohybem celého objemu kapiláry, generovaného u stěny separační kapiláry na rozdíl od kapalinové chromatografie, kde laminární proudění mobilní fáze vyvolává tlakový gradient a díky třecím silám u stěny kolony má parabolický rychlostní profil. Výsledné píky v kapilárních elektromigračních metodách jsou tedy obecně užší a metody tak dosahují vysokých separačních účinností (počet teoretických pater, $N > 10^5$ - 10^6) [18].

Jednou z výhod CZE je velmi malá spotřeba vzorku, která se pohybuje řádově v nanolitrech. Vzorek může být dávkován do kapiláry několika způsoby. Prvním způsobem je metoda hydrodynamického dávkování, kdy je vzorek dávkován za pomoci rozdílu tlaku. Tento rozdíl může vzniknout buď zvýšením tlaku v nádobce se vzorkem, nebo snížením tlaku ve výstupní nádobce. Objem vzorku při jedné analýze závisí na tlakovém gradientu, vnitřním průměru kapiláry, době nástřiku, celkové délce kapiláry a viskozity BGE [18]. Zvláštní typ hydrodynamického dávkování je využití hydrostatického tlaku a kapilárních jevů – tzv. sifonového efektu – při rozdílu ve výšce hladiny vzorku v nádobce na vstupním konci kapiláry oproti hladině BGE v nádobce na druhém konci kapiláry. Druhým způsobem dávkování vzorku je elektrokinetické dávkování, kdy je na kapiláru aplikováno napětí, které je nižší než separační napětí. Princip dávkování je zde stejný jako princip migrace analytů. Díky EOF jsou nadávkovány i neutrální částice a anionty. Někdy je používána technika polem zesílené zakoncentrování (FASS, z anglického field amplified sample stacking). Tento efekt vzniká v případě, že rozpouštědlo vzorku má mnohem menší vodivost než BGE. V takovém případě je lokální intenzita elektrického pole vyšší v porovnání s okolním BGE a dle *rovnice 2* se elektroforetická rychlost analytů zvyšuje. V momentě, kdy analyty dorazí do více vodivé zóny BGE se lokální intenzita elektrického pole působící na analyty skokově sníží a analyty se zakoncentrují na rozhraní těchto dvou zón [18], [20].

Z důvodu nižší opakovatelnosti migračních časů se v kapilární elektroforéze někdy používá hodnota A/t , tedy plocha píku korigovaná migračním časem. Tímto se normalizují rozdíly v rychlosti migrace, a tedy i odezvy detektoru.

3.3.4. Princip ostatních kapilárních elektromigračních metod

Kapilární elektrochromatografie (Capillary electrochromatography – CEC) je metoda kombinující mechanismus CZE a HPLC. Separace probíhá v kapiláře (většinou o širším průměru oproti CZE) naplněné stacionární fází – sorbentem, jehož chemické složení je podobné jako u (RP-)HPLC kolony. Za průtok základního elektrolytu separačním systémem je zodpovědný EOF. Separace v CEC je zajištěna dvěma mechanismy. Prvním je rozdělování mezi mobilní fázi BGE a stacionární fází analogicky jako je tomu u RP-HPLC. Druhým může být separace na základě rozdílné elektroforetické mobility analytů. Jde tedy o hybridní metodu, kde se mechanismy separace doplňují a lze separovat i neutrální analyty; pro pohyb BGE sorbentem je využit EOF zesílený díky stacionární fázi s volnými silanolovými skupinami [18].

Micelární elektrokinetická chromatografie (micellar electrokinetic chromatography – MEKC) je elektromigrační metoda u které jsou v BGE přítomny povrchově aktivní látky, např. dodecylsírán sodný (SDS) o koncentraci, při které vznikají útvary zvané micely (tzv. kritická micelární koncentrace – CMC). Vnější povrch micely je tvořen hydrofilní nabitou částí surfaktantu (mají tak vlastní elektroforetickou pohyblivost), zatímco hydrofobní část směřuje koncentricky dovnitř micely. Micely tvoří pseudostacionární fázi a k mechanismu separace podle elektroforetické pohyblivosti se přidává i mechanismus rozdělování na základě něhož lze rozseparovat i neutrální analyty. Tato metoda tedy kombinuje elektromigraci s mechanismem separace analogickým kapalinové chromatografii s obrácenými fázemi [18].

Izotachoforéza (Capillary Isotachopheresis – CITP) je založena na dávkování vzorku mezi dva elektrolyty s různou elektroforetickou mobilitou. První elektrolyt se nazývá vedoucí elektrolyt a má vyšší elektroforetickou mobilitu než kterýkoliv z analytů, zatímco tzv. koncový elektrolyt má nejnižší elektroforetickou mobilitu. Po vložení separačního proudu dojde k rozdělení iontů dle jejich pohyblivostí. Tato metoda může rozseparovat buď jen kationty, nebo anionty; nelze separovat ionty obou znamének, jak je tomu u CZE či jiných technik. V průběhu separace dochází za vhodně zvolených podmínek k zakoncentrování vzorku [18].

Kapilární gelová elektroforéza (Capillary gel electrophoresis – CGE) je obdobou starší planární gelové elektroforézy používané k separaci biomakromolekul, jako jsou nukleové kyseliny, či proteiny. V CGE, analyty migrují skrze 3D gelovou strukturu, která se chová jako molekulové síto a analyty jsou tak rozdělovány na základě velikosti. Menší molekuly migrují skrze kapiláru naplněnou gelem rychleji než molekuly s větší velikostí [18].

Kapilární izoelektrická fokusace (Capillary Isoelectric focusing – CIEF) slouží k separaci amfoterních sloučenin, typicky proteinů a peptidů. Jedná se o sloučeniny, které mají izoelektrický bod (pI). Pokud je amfoterní molekula v prostředí, jehož pH odpovídá její pI hodnotě, tak je kladný a záporný náboj v rovnováze a daná molekula tak nemůže migrovat. Při fokusaci se tvoří uvnitř separační kapiláry pH gradient díky přítomnosti amfolytů. Amfoterní analyty migrují do zóny kapiláry, kde pH odpovídá jejich pI a dojde k zakoncentrování (fokusaci) analytu v jeho zóně. Po ukončení fokusace, která je doprovázena poklesem proudu na konstantní hodnotu je nutno rozseparované amfoterní sloučeniny mobilizovat, a to buď hydrodynamicky nebo elektrokineticky, aby byla umožněna jejich detekce [18].

3.3.5. Detektory v kapilární elektroforéze

UV-ViS spektrofotometrická detekce patří k nejoblíbenějším metodám detekce organických molekul v separačních metodách – včetně kapilární elektroforézy – díky relativně dobré citlivosti, linearitě detekce a širokému spektru organických molekul, které UV-ViS záření absorbují [18]. Při UV-ViS spektrometrii se využívá jevu absorpce

elektromagnetického vlnění v oblasti 200–800 nm za excitace valenčních elektronů molekuly na vyšší energetické hladiny. U molekul, které obsahují chromofory (skupiny atomů, které jsou charakteristické absorpcí v oblasti 200–800 nm) dochází k přechodům elektronů z π vazebných, na antivazebné π^* orbitály. Přítomnost chromoforů je typická pro aromatické a heterocyklické molekuly a sloučeniny obsahující systém konjugovaných násobných vazeb. V oblasti pod 200 nm absorbují elektromagnetické záření atomy s jednoduchou σ vazbou za přechodu elektronů ze σ vazebného orbitalu na σ^* antivazebný orbital. Elektrony atomů s volnými elektronovými páry v nevazebných orbitalech n přecházejí buďto na σ^* nebo π^* antivazebné orbitály ($n \rightarrow \pi^*$ jsou energeticky méně náročné) [21]. Při průchodu záření roztokem vzorku dojde k jeho částečné absorpci; intenzita vystupujícího záření je pak nižší než intenzita záření vstupujícího. *Rovnicí 5* lze vyjádřit transmitanci (T), neboli poměr intenzity záření po průchodu vzorkem (I) a původní intenzity (I_0) v procentech.

$$T = \frac{I}{I_0}$$

Rovnice 5

$$A = \log \frac{1}{T}$$

Rovnice 6

$$A = \varepsilon \times c \times l$$

Rovnice 7

Míra absorpce analytem se nazývá absorbance a lze ji vyjádřit jako záporný dekadický logaritmus hodnoty transmitance podle *rovnice 6*. Absorbance je v určitém rozmezí lineární funkcí koncentrace absorbujících látek dle Lambert-Beerova zákona (*rovnice 7*) kde je absorbance A závislá na molární koncentraci absorbující látky c ($\text{mol} \times \text{l}^{-1}$), jejich charakteristického molárního absorpčního koeficientu ε ($\text{l} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) a tloušťce vrstvy s absorbujícími látkami (cm). Při UV-ViS je rozsah detekovatelných vlnových délek od 200 do 800 nm, což zahrnuje oblast viditelného světla a UV oblast. Určité látky mají charakteristické absorpční spektrum a je tak možné při UV-ViS detekci získat informace jak nejen kvantitativní, ale i kvalitativní. Pro úspěšnou detekci je třeba využívat BGE, který neabsorbuje záření při stejných vlnových délkách jako analyt. Výhoda UV-ViS detekce při kapilární elektroforéze je, že k detekci dochází v samotné separační kapiláře. Detekční okno se vytvoří odstraněním polyimidového obalu. Pro analyty, které neabsorbují elektromagnetické záření v dostupných vlnových délkách je možné využít elektrolyt, který obsahuje komponenty, které záření absorbují. Jde o tzv. nepřímou UV-ViS detekci. Průchod analytu detekčním oknem se na elektroferogramu zobrazí jako pokles absorbance.

Další možnosti detekce jsou například velmi citlivé a selektivní fluorimetrické detektory využívající např. laser k excitaci molekul analytu, nebo univerzální vodivostní detektory, měřící změny vodivosti zóny látek procházejících detektorem. Spolu s UV-

ViS detekcí je lze s výhodou zapojit před jiný detektor fungující na jiném principu (např. MS).

Hmotnostní spektrometrie (MS) je technika s širokou škálou analytického využití. Samotný princip je založen na zjišťování poměru hmotnosti detekovaných částic a jejich elementárního náboje. Výstup hmotnostní spektrometrie je hmotnostní spektrum. Na ose x tohoto spektra je poměr m/z , zatímco na ose y je obvykle relativní odezva vztažená na iont s největší intenzitou signálu při detekci [19]. V analýze organických sloučenin se obvykle analyzují tzv. molekulové ionty, či jejich fragmenty (tvrdé ionizační techniky) nebo protonované/deprotonované molekuly (měkké ionizační techniky), tj. ionty, které nepodléhají při ionizaci hned fragmentaci.

Hmotnostní spektrometry mohou mít různou instrumentální konfiguraci, V principu se všechny hmotnostní spektrometry skládají z iontového zdroje zodpovědného za ionizaci částic, iontové optiky k usměrnění proudu iontů ze zdroje do analyzátoru, který rozlišuje analyzované částice na základě poměru jejich m/z a detektoru, který zaznamenává proud iontů rozdělených dle poměru m/z . Jako detektor se používají nejčastěji elektronové násobiče [19]. Součástí instrumentace je také počítač, spolu se softwarem pro ovládání MS, analýzu dat a popřípadě také jejich porovnávání s knihovny existujících hmotnostních spekter. Aby došlo k rozdělení částic na základě jejich m/z je uvnitř přístroje potřebné vakuum, kvůli vyloučení nechtěných kolizí iontů analytu se vzduchem. Proto jsou součástí vybavení k MS také zařízení schopné generovat vakuum – například turbomolekulární pumpy.

Vzorek může být dávkován několika metodami. Například přímo pomocí rezervoárového systému určeného pro těkavé, přímo plynné látky a látky s nízkým bodem varu. Pevné vzorky lze dávkovat pomocí sondy, nebo desorpce z destičky. Pro kapalné látky se využívá přímá infuze s kontrolovaným průtokem [19]. U přímého dávkování je ovšem potřebná čistota analytu ve vzorku, jinak může dojít ke zkreslení detekce. Hmotnostní spektrometrii proto dobře doplňují separační metody – např. HPLC, GC, SFC a také CZE. Příslušná separační metoda separuje jednotlivé analyty a případně i složky matrice vzorku. Díky separaci lze pomocí MS ve spojení se separačními technikami analyzovat i poměrně komplexní směsi bez výrazného vlivu na selektivitu a správnost metody v porovnání s přímým dávkováním. To je důležité hlavně v případech, kdy je poměr m/z dvou analytů stejný a nejde je tak rozlišit pomocí MS detekce, zatímco lze tyto dva analyty oddělit jinou separační metodou.

Iontové zdroje v hmotnostní spektrometrii lze klasifikovat dle toho, zdali jde o tzv. měkké, či tvrdé ionizační techniky, tj. podle toho, jak intenzivně během nich dochází k fragmentaci molekul analytů. Dle jiného dělení lze rozlišit ionizační techniky v plynném skupenství a desorpční ionizační techniky a zda pro ionizaci vyžadují vakuum, či je možné pracovat za atmosférického tlaku [19]. Pokud jsou při analýze sledovány kationty, mluvíme o pozitivním módu ionizace, zatímco u aniontů zase o negativním módu ionizace. Pro potřeby této práce budou detailněji popsány iontové zdroje používané v propojení s kapilárními elektromigračními metodami.

Ionizace elektrosprejem (ESI) umožňuje ionizaci za atmosférického tlaku bez zásadních změn ve struktuře analytů. Patří totiž mezi měkké ionizační techniky, kdy se snáze zachovává struktura molekul. Je to tedy oblíbená ionizační technika pro analýzu velkých i malých molekul v kapilární elektroforéze i v kapalinové chromatografii. Principem tvorby elektrospreje je tvorba iontů pomocí aplikovaného napětí na sprejovací kapiláru, postupné odpaření rozpouštědla a tvorba spreje, tzv. Taylorova kuželu [20]. Rozpouštědlo se dále odpařuje a povrchové náboje se ve zmenšující se kapénce koncentrují do doby, než repulzní síly těchto nábojů překonají soudržné síly kapének (tzv. *Rayleigho limit*) a dochází k tzv. „*coulombické explozi*“. Tímto mechanismem se kapénky rozpadají a zmenšují do doby, než nepřejde samotný iont do plynné fáze. Iont v plynné fázi je pak transportován transferovou kapilárou (či jejich svazkem) do analyzátoru hmotnostního spektrometru. K tzv. iontové optice může být dále připojen systém dvou iontových nálevek (technologie iFunnel společnosti Agilent). [22], [23]. Ty umožňují vysoké průtoky plynu (které mohou napomáhat ionizaci) a zároveň usměrňují proud iontů do iontové optiky, což vede ke zlepšení citlivosti detekce. Rychlost proudění kapaliny v ESI je obvykle v řádech $\mu\text{l}/\text{min}$, v praxi se ovšem používá i tzv. nanoESI s průtokem v řádu nl/min . Mezi další ionizační techniky využitelné při spojení CE-MS analýze patří chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI) a fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI). Matricí asistovaná desorpce/ionizace laserem (MALDI) je pak off-line ionizační technika, které předchází preparativní CE separace a nanášení separovaných analytů na tzv. MALDI destičky.

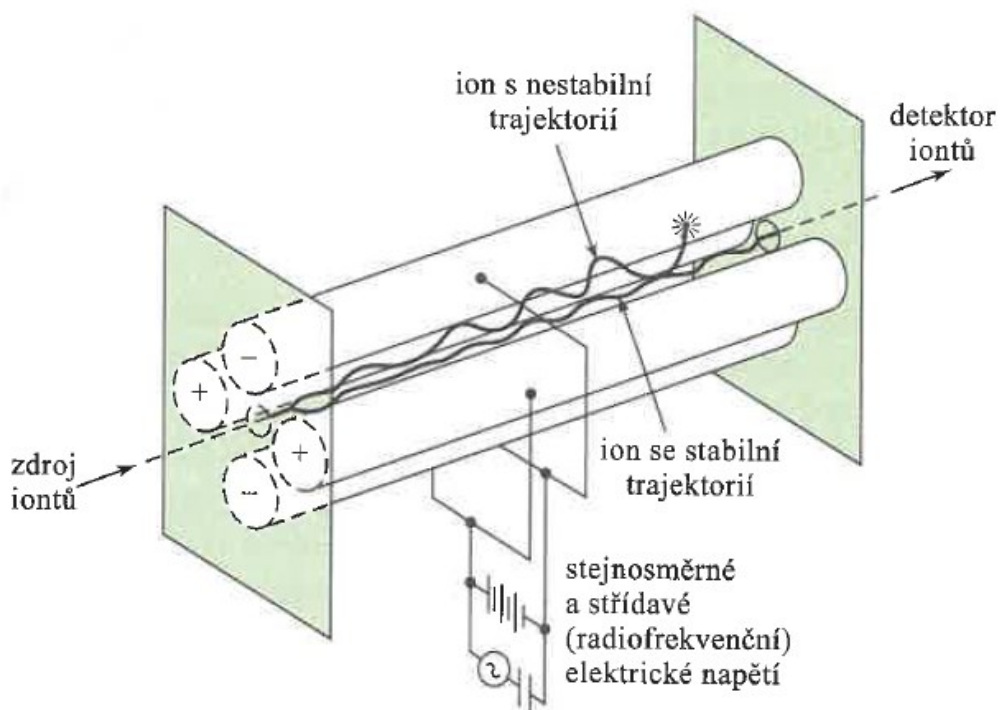
V CE-MS jsou využívány hlavně analyzátory typu kvadrupólu a analyzátory typu doby letu. Kvadrupólové analyzátory fungují na principu oscilujícího střídavého a stejnosměrného napětí mezi čtyřmi (či více) kovovými tyčemi při určitém vloženém napětí. Tento proces propustí podél celé délky kvadrupólu pouze ionty s určitým m/z . Napětí na tyčích kvadrupólu se postupně mění a tím propouští v průběhu přednastaveného časového intervalu ionty s různou m/z . Nepropuštěné ionty dopadnou na tyče kvadrupólu. Kvadrupólové analyzátory mají jednotkové rozlišení a dovedou tak rozlišit hmotu v řádu jednoho protonu. Grafické znázornění jednoduchého kvadrupólového analyzátoru je na *obrázku 4*. Kvadrupólové analyzátory je možné zapojit v sekvenci tří kvadrupólů za sebou, tzv. trojitý kvadrupól (QqQ) pro MS/MS (MS^2) mód detekce. První kvadrupól separuje prekurzorové ionty, tedy protonované nebo deprotonované molekuly dle zvolené polarizace ionizace. Ve druhém kvadrupólu (kolizní cela) dochází k fragmentaci těchto prekurzorových iontů (např. kolizí s plynem, či elektrony) a třetí kvadrupól analyzuje dceřiné neboli produktové ionty. Tento mód detekce zvaný SRM (selected reaction monitoring) se hodí pro kvantitativní analýzu a ověření identity analyzovaných látek. Schéma MS/MS je znázorněno na *obrázku 5*. Analyzátory doby letu (TOF – time-of-flight) separují ionty na základě rozdílné m/z při průletu trubicí za předpokladu, že je jim udělena stejná kinetická energie. Rychlost iontu v je dána jeho hmotností m a udělenou kinetickou energií E_k dle *rovnice 8*. Čím menší poměr m/z iont má, tím větší má rychlost a dorazí dříve k detektoru. TOF analyzátoru může být předřazen kvadrupólový analyzátor, ve kterém jsou fragmentovány prekurzorové ionty jejichž produktové ionty pokračují do navazujícího

TOF analyzátoru. Iontový zdroj v CE-MS může být buď ESI, nebo MALDI při off-line spojení.

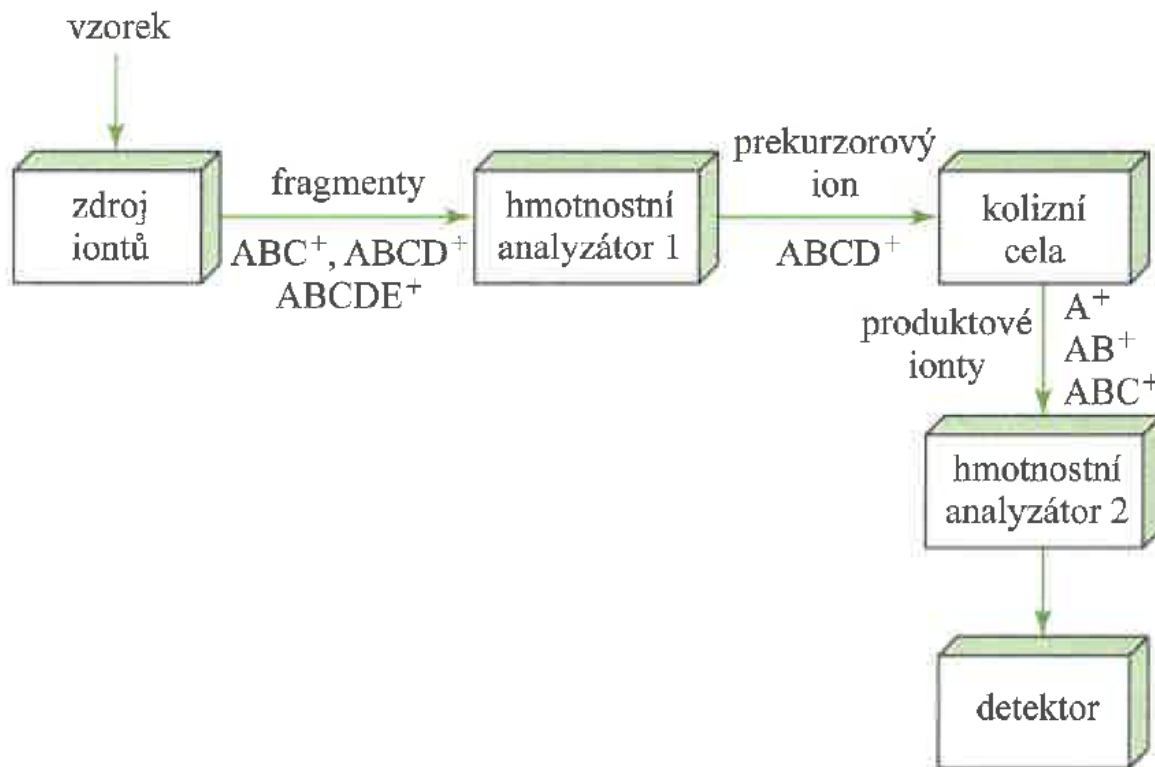
$$v = \sqrt{\frac{2 \times E_k}{m}}$$

Rovnice 8

MS je všestranný analytický nástroj charakteristický svou citlivostí a vysokou selektivitou. Jednoznačnou výhodou je možnost kvalitativní i kvantitativní analýzy. Poskytuje údaje o molekulové hmotnosti, elementárním složení analytů, a dokonce i o izotopovém zastoupení jednotlivých prvků. Je ovšem třeba zmínit i nevýhody. Využití MS může brzdit jeho cena, technická a prostorová náročnost a potřeba kvalifikovaného operátora.



Obrázek 4 Grafické znázornění kvadrupólového analyzátoru. Převzato z [19]



Obrázek 5 Schématické zobrazení MS/MS detekce. Převzato z [19]

3.3.6. Specifika spojení kapilární elektroforézy s hmotnostní spektrometrií

Jak již bylo zmíněno v předchozí kapitole, propojení MS a separační techniky jako je např. CE je velmi výhodné, protože vzájemně pokrývají své slabiny. Analyty, které není možno separovat v CE může rozlišit MS na základě jejich molekulové hmotnosti, a naopak látky se stejnou hmotností, ale rozdílnou strukturou je možné separovat pomocí CE. Výhodný je také iontový charakter analytů v CE i MS, což usnadňuje vývoj metody. Hlavní výhodou CE oproti LC je fakt, že CE vyžaduje mnohem menší objemy vzorku [24]. Propojení těchto dvou metod je ovšem technicky náročné. Mezi hlavní problémy patří fakt, že CE a iontový zdroj MS tvoří dva samostatné elektrické obvody a je tedy nutné propojit je tak, aby vznikl systém dvou elektrických článků s třemi elektrodami, z nichž jedna bude sdílená CE i MS částí [18], [20]. První elektroda v tomto systému náleží CE a je spolu se sdílenou elektrodou zodpovědná za elektroforetickou separaci a migraci iontů. Druhá elektroda je sdílená CE i MS systémem a umožňuje toto propojení a koriguje nesrovnalosti mezi systémy popsané v dalším odstavci. Třetí elektroda náleží MS a řídí vstup iontů z iontového zdroje do analyzátoru.

Další problém CE-MS propojení je řádově nižší průtok CE kapilárou. V ESI systémech spojených s LC se průtok systémem nutný k vytvoření stabilního elektrospreje pohybuje v řádech $\mu\text{l}/\text{min}$ (poté co je část průtoku oddělena do dopadu), zatímco

průtok kapilárou v CE je řádově v nl/min. Obdobná nesrovnalost je také v hodnotě elektrického proudu, který může být v CE systému až o tři rády větší (μA) než v MS (nA) [18].

Je také třeba vzít v potaz, že MS detekce omezuje kompatibilitu standardních základních elektrolytů v CE. V CE-MS je žádoucí používat těkavé pufrů organických kyselin a zásad a vyhnout se netěkavým anorganickým iontům, např. boritanům a fosforečnanům, které se ovšem s oblibou používají v tradiční CE s UV detektorem. To platí i pro jiné módy než CZE, např. pro MEKC, kde většina micelárních systémů není těkavá.

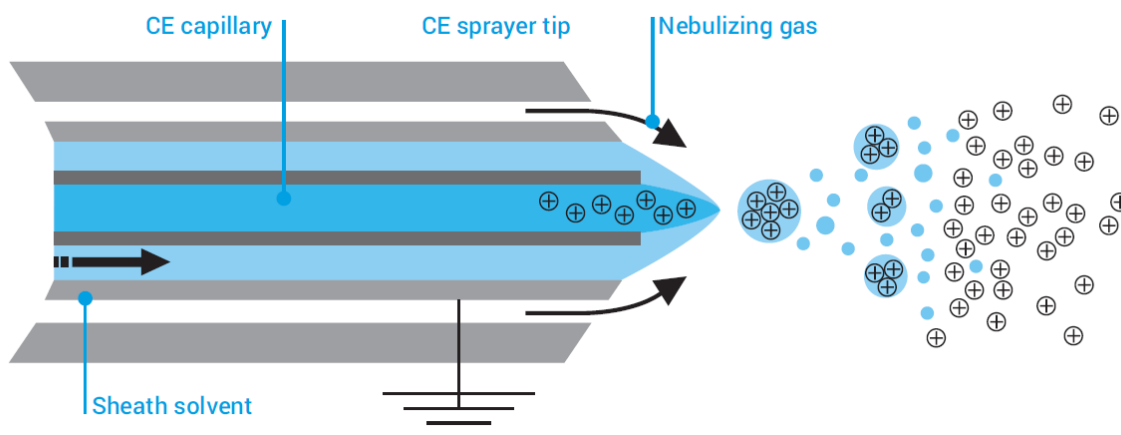
Technicky existují tři různé přístupy propojení CE-MS: (i) rozhraní s přidavnou kapalinou, (ii) rozhraní kapalně spojky a (iii) rozhraní bez přidavné kapaliny. Všechny typy rozhraní mají více variant popsaných dále.

U rozhraní s přidavnou kapalinou se proud kapaliny v kapiláře mísí s přidavnou kapalinou (tzv. sheath liquid – SL), která má dvě hlavní funkce. První funkcí SL je uzavření obvodu v CE systému, druhou funkcí je vytvoření proudu kapaliny, který bude schopný stabilně generovat elektrosprej, hlavně u komponentů konstruovaných primárně pro LC-MS. Také zlepšuje ionizaci analytů [20].

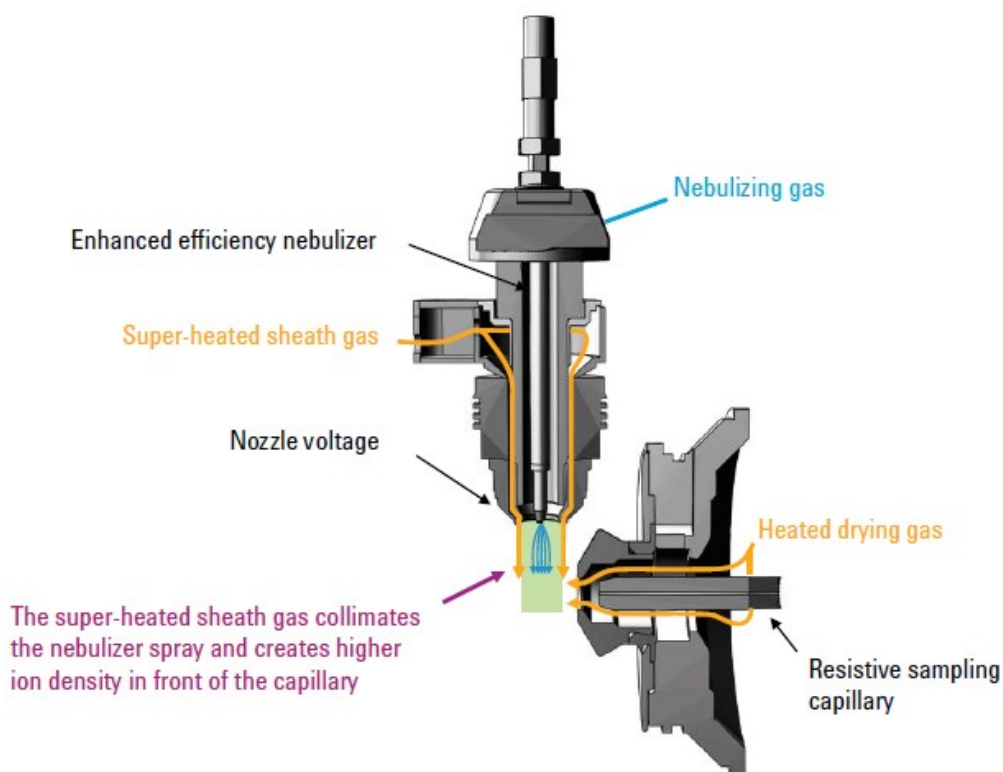
Přídavná kapalina se většinou skládá z organické a vodné složky. Vodná složka může tvořit 20-80 % SL [20]. Organická složka je tvořena s vodou mísitelnými těkavými rozpouštědly, typicky methanolem (MeOH) nebo propan-2-olem (isopropylalkoholem – IPA). Příměsí o nízké koncentraci v SL může pak být buďto kyselina, či báze. Kyselé příměsí usnadňují ionizaci analytů v pozitivním ESI⁺ módu a zásadité příměsí usnadňují ionizaci analytů v ESI⁻ módu. Další přídavné látky do SL jsou elektrolyty, které zlepšují stabilitu ESI proudu. Tyto přídavné složky by měly být především těkavé a negativně neinterferovat s ionizací a detekcí, používají se např. kyselina mravenčí, octová či amoniak a jejich soli. Nevýhodou rozhraní s přidavnou kapalinou je především fakt, že proud přidavné kapaliny z principu vzorek ředí a snižuje se tak citlivost detekce.

Nejběžnější a komerčně dostupnou konfigurací tohoto rozhraní je tzv. koaxiální typ, který se skládá ze tří koncentricky uspořádaných trubic se snižujícím průměrem (*obrázek 6*). Vnitřní trubice je samotná separační kapilára přivádějící směs elektroforeticky separovaných analytů a základního elektrolytu. Prostřední trubicí – kovovou ESI kapilárou – protéká přídavná kapalina, která je vodivá a je tedy funkčně společnou elektrodou CE-ESI-MS obvodu. Vnější trubice přivádí nebulizační plyn, který umožňuje tvorbu elektrospreje. Tyto trubice by měly pro optimální elektrosprej tvořit samy špičku kužele (jehly), v němž je separační kapilára o méně než 1 mm vysunutá z vnitřní trubice. SL je do systému přiváděna hydraulicky pomocí pumpy; její průtok se pohybuje v řádu 1-10 $\mu\text{l}/\text{min}$, tedy standardní hodnoty pro tvorbu stabilního elektrospreje. U iontového zdroje typu Agilent JetStream (technická modifikace ESI) je navíc přiváděn zahřátý přídavný plyn (sheath gas), například N_2 , který zlepšuje tvar Taylorova kuželu pomocí teplotního gradientu (*obrázek 7*) [25].

V průběhu vývoje metody se optimalizují tyto parametry: složení SL, průtok SL, ESI napětí a nastavení iontové optiky MS, teplota a tlak sušícího a přídavného plynu a nebulizační tlak.



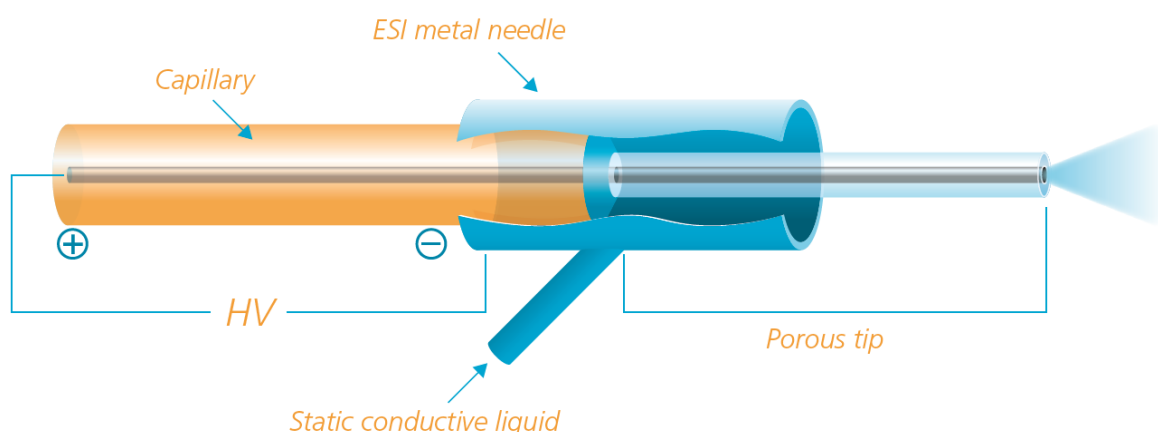
Obrázek 6 Schéma koaxiálního rozhraní s přídavnou kapalinou pro spojení CE-MS. Vnitřní – separační křemennou kapilárou (CE capillary) proudí BGE spolu s analyty. Druhá trubice – kovová ESI kapilára přivádí přídavnou kapalinu (sheath solvent), která se míší s analytem a BGE. Zároveň je vnější trubici do rozhraní přiváděn nebulizační plyn (nebulizing gas), který pomáhá generovat elektrosprej. Obrázek převzatý z [23].



Obrázek 7 Schéma iontového zdroje Agilent JetStream (AJS). Oproti běžnému ESI zdroji tato technická varianta iontového zdroje využívá horký přídavný plyn (sheath gas), aby usměrnila tvar elektrospreje pomocí teplotního gradientu pro větší hustotu iontů před hexaborální kapilárou, kterou vstupují ionty do MS (resistive sampling capillary). Převzato z [25].

Další typ rozhraní, který se vyčleňuje, ač funguje na podobném principu, je rozhraní kapalně spojky (liquid junction interface). V něm je přídavná kapalina přiváděna do cely, ve které se mísí s obsahem kapiláry. Takto smíchaná kapalina je pak přiváděna kovovou ESI jehlou do iontové zdroje, kde vzniká elektrosprej. Nevýhodou je, že dochází k většímu zředění a snížení citlivosti než u rozhraní s přídavnou kapalinou.

Historicky první rozhraní propojující kapilární elektroforézu s hmotností spektrometrií se formálně řadí mezi rozhraní bez přídavné kapaliny. Taková rozhraní jsou ovšem obvykle experimentální a mají více možných podob [20]. Jejich výhodou bývá větší citlivost, a nižší limit detekce, protože nedochází k naředění přídavnou kapalinou [24]. Všechna technická řešení tohoto typu mají však svá individuální úskalí. Rozhraní bez přídavné kapaliny zajišťují elektrický kontakt například vodivým potahem kapiláry, kovovým drátem vloženým dovnitř separační kapiláry nebo využitím kapilár s porézní stěnou a externí elektrodou [24]. V současné době je komerčně dostupné rozhraní s porézní nanosprejovou špičkou – CESI 8000 firmy AB SCIEX [26].



Obrázek 8 Rozhraní bez přídavné kapaliny CESI 8000 firmy AB SCIEX. Kovová ESI jehla (ESI metal needle) je připojena na zdroj vysokého napětí v CE systému (HV), do ní je vložena separační kapilára (capillary). Do dutiny kovové ESI jehly je přiváděna statická vodivá kapalina (static conductive liquid). Sprejovací konec separační kapiláry je porézní (porous tip; naleptáním kyselinou fluorovodíkovou), aby umožnil pohyb iontů a elektronů mezi separační kapilárou a celou se statickou vodivou kapalinou a zajistil tak elektrický kontakt bez pohybu kapaliny. [20] Obrázek je převzat z [26].

3.3.7. Experimentální design

3.3.7.1. Obecná charakteristika

Experimentální design (Design of experiments, DoE) je chemometrický přístup k získání co nejlepších dat o chemickém systému za využití co nejméně zdrojů k získání těchto dat (čas, vzorky atd.) [27]. V analytické chemii a instrumentální analýze jej lze využít pro optimalizaci metod např. pro nastavení instrumentálních parametrů analýzy, maximalizaci výtěžnosti extrakčních postupů, nebo pro nalezení vhodného složení základního elektrolytu v kapilárních elektromigračních metodách, či mobilní fáze v chromatografických systémech.

U optimalizace analytických metod se běžně používá univariantní přístup, kde se mění jedna proměnná a zkoumá se její vliv na odezvu systému, tento přístup může být ovšem zdoluhavý a nepraktický, s narůstajícím počtem zkoumaných faktorů také velmi rychle stoupá počet experimentů, a navíc nemusí být patrné vztahy mezi proměnnými, které se navzájem ovlivňují [27]. Experimentální design využívá přístup multivariantní, kde se pomocí konstrukce statistického predikčního modelu zkoumá efekt jednotlivých faktorů na odezvu systému vymezeném tzv. experimentální doménou/prostorem. Tento přístup bere ohled na vliv všech zkoumaných faktorů, ale zároveň také jejich interakcí a dovede předpovědět odezvu v bodech, které nebyly součástí experimentu [27].

Při plánování experimentálního designu je nejprve nutné určit cíle, podmínky a stanovit úroveň rizika provedení DoE. Cíle designu, tzv. kritické atributy metody jako např. rozlišení, či citlivost jsou v designu definované jako odezvy. Podmínky – kritické parametry metody jsou pak samotné faktory, které jsou v experimentálním designu proměnné [28].

Dalším krokem je výběr samotného designu. Designy se dělí na screeningové a optimalizační. Screeningové designy slouží k identifikaci faktorů, které mají zásadní vliv na odezvu systému, lze je použít k zúžení výběru faktorů k optimalizaci z kvantitativního hlediska, respektive k získání kvalitativní informace o některém z faktorů – zdali má na odezvu klíčový (signifikantní) vliv, či nikoli. Optimalizační designy pak slouží k nalezení optima, ve kterém vybraný bod poskytuje nejlepší žádanou odezvu, která má obvykle kvantitativní charakter. Několik druhů screeningových i optimalizačních designů je popsáno v dalších kapitolách. Designy většinou probíhají na několika úrovních hodnot proměnných. Tyto hodnoty jsou dle typu designu vsazeny do experimentální matice, která pak vytváří podobu jednotlivých bodů, které budou tvořit samotný experiment. Pořadí těchto experimentů je ovšem randomizováno, aby se předešlo zaměnění systematické chyby či náhodným driftům za hodnotu odezvy [27], což by mohlo negativně ovlivnit závěry vyvozené z předešlých experimentů. Je velmi výhodné zahrnout do experimentu také replikáty nejméně jednoho bodu, aby nedošlo ke špatné interpretaci odezvy jakožto vlastnosti daného bodu, i když by ve skutečnosti šlo jen o náhodnou chybu. Replikáty často bývají ve středních hodnotách zkoumaných faktorů, např. u plně faktoriálního, či centrálně kompozitního designu. Po proběhnutí samotného měření experimentu následuje statistické vyhodnocení, většinou pomocí vícenásobné lineární regrese (multiple linear regression – MLR).

Optimum je v experimentálním designu nalezeno obvykle pomocí softwaru, nebo jej lze nalézt i manuálně, nejnázne pomocí vizuálního vyhodnocování grafů odezvy – vrstevnicového grafu (tzv. contour plot), nebo pomocí prostorového zobrazení odezvy (response surface plot). Nutno poznamenat, že optimum není imperativně shodné s maximem, či optimem pro jednu odezvu, je často nutné najít kompromis pro všechny odezvy, na něž mohou mít kombinace faktorů různý vliv [27].

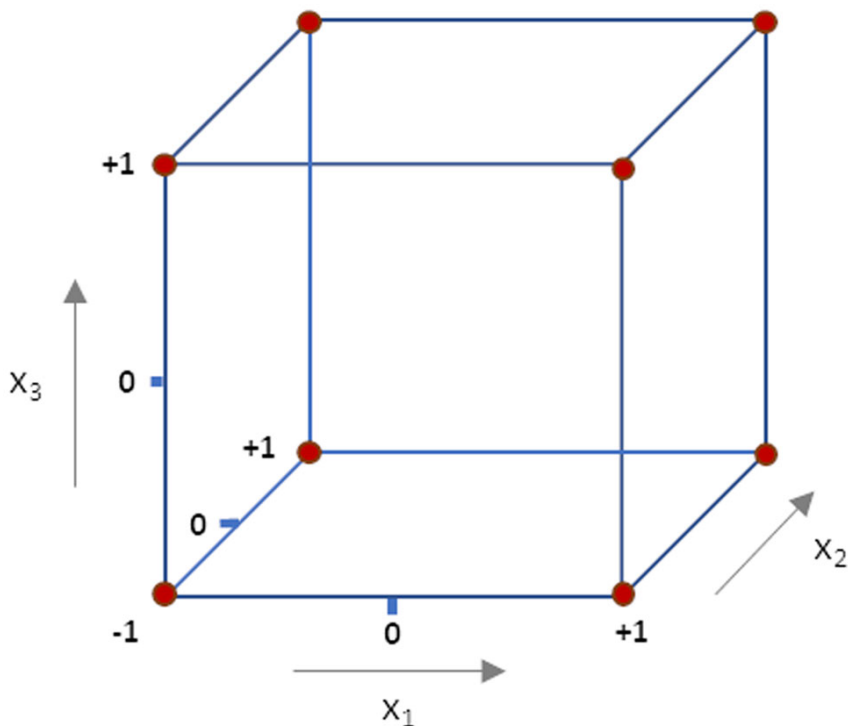
Nalezený optimální bod je nakonec nutné validovat spuštěním systému za optimalizovaných podmínek, vyhodnocením opakovatelnosti tohoto bodu a ověřením míry shody mezi predikovanými a experimentálně zjištěnými hodnotami odezev.

3.3.7.2. Screeningové experimentální designy

Screening je obvykle předkrok optimalizačního designu v případě, že je nutné omezit počet faktorů, o kterých není známo, zdali mají zásadní vliv na odezvu či ne, popřípadě je-li potřeba snížit jejich množství na ty nejvýznamnější. Screeningové modely využívají obvykle lineární model, který je jednodušší než modely nelineární (např. kvadratický) využívané u optimalizačních designů [27].

V plně faktoriálním designu se studuje vliv kombinace všech faktorů na odezvu. Odezva je v tomto typu designu lineární funkcí všech faktorů a jejich hodnot. Počet bodů v experimentu plně faktoriálního designu o dvou úrovních je roven 2^k , kde 2 je počet úrovní a k počet sledovaných faktorů. Z tohoto vztahu vyplývá, že s množstvím faktorů počet bodů v experimentu exponenciálně roste. Proto je někdy lepší uplatnit frakční faktoriální design, kde jsou kombinace některých faktorů vynechány. Plně faktoriální design může být použit i pro optimalizaci, nicméně je v něm potřeba menší počet faktorů a alespoň tři studované úrovně proměnných.

Plackett-Burmanův design je druhým typickým designem pro screeningové experimenty. Oproti plně faktoriálnímu designu je výhodný z důvodu, že lze najednou prozkoumat i větší množství faktorů relativně malým počtem experimentálních bodů. [27]. Na rozdíl od plně faktoriálního designu Plackett-Burmanův design nedovede prozkoumat vzájemné interakce faktorů, avšak to ve screeningu není vždy nutné.



Obrázek 9 Grafické znázornění plně faktoriálního designu třech faktorů X_1 - X_3 o třech úrovních; $-1, 0, 1$. Převzato z [27]

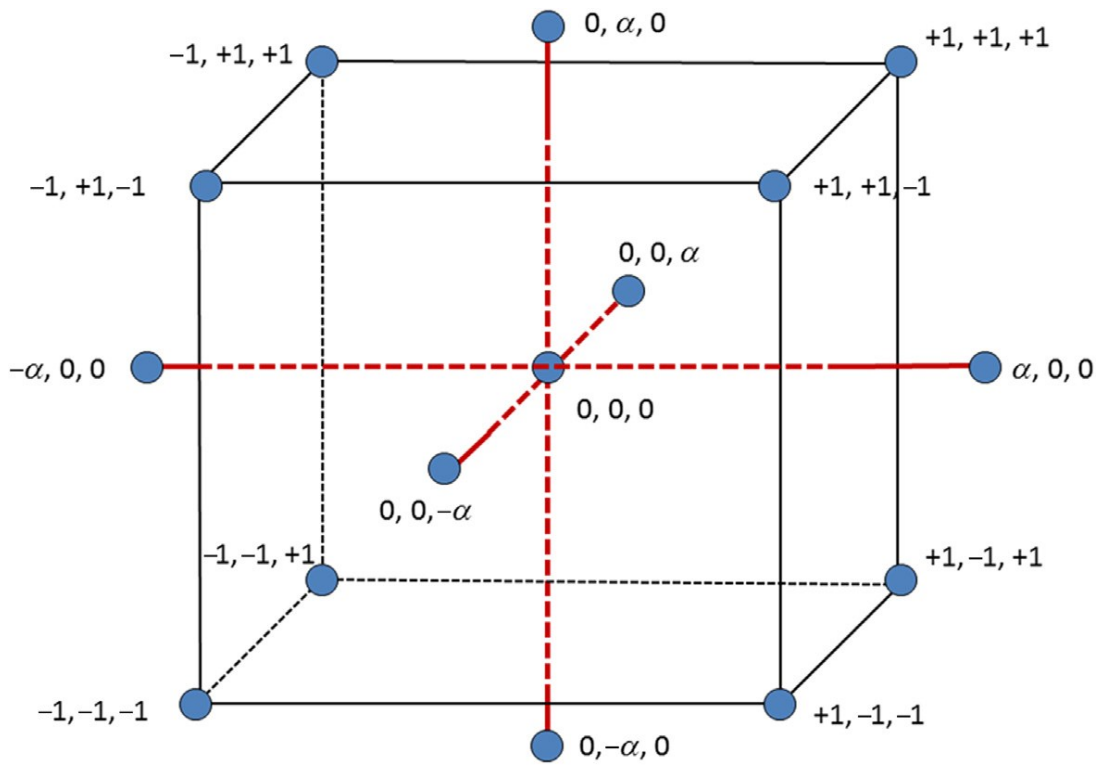
3.3.7.3. Optimalizační experimentální designy

Pro optimalizační designy je charakteristický jejich kvantitativní charakter. Častý je u nich kvadratický model, jakožto nejjednodušší polynomická funkce. Díky kvadratickému modelu je možné vliv faktorů vyjádřit prostorově (tzv. surface response design) To je někdy výhodné, protože lze zkonstruovat 3D model a nalézt v něm opticky tzv. „sweet-spot“, ve kterém jsou podmínky nejvýhodnější pro celý experiment. Optimalizační designy většinou vyžadují alespoň tři úrovně hodnot proměnných.

Centrální kompozitní design je typický optimalizační design vycházející z faktoriálního designu o dvou úrovních. Kromě typických centrálních bodů ležících v úrovni 0 může zahrnovat i tzv. „star-points“ o úrovních α a $-\alpha$ ležící v extrémních podmínkách. Tím se rozšíří rozsah experimentální matice [28]. Tento typ designu je efektivní, relativně jednoduchý a hojně využívaný způsob optimalizace chemických systémů.

U Box-Behnkenova designu je typické střídavé zafixování bodů matice na úrovni 0. Tento design tak ovšem nezkoumá extrémní podmínky, ve kterých jsou úrovně pro třífaktorový design např. $+1, +1, +1$. To je problematické v případech, kdy hypotetické optimum leží právě v těchto extrémech [27], [28]. Jeho výhodou je na druhou stranu menší počet bodů v experimentálním plánu oproti centrálně kompozitnímu designu.

Dalšími typy optimalizačních designů jsou například Doehlertův design, nebo směsný design.



Obrázek 10 Centrálně kompozitní design na třech úrovních. V tomto případě včetně „star-points“ s hodnotou $\neq 1$ či -1 tvořícími osu designu. Převzato z [29]

4. Experimentální část

4.1. Použité přístroje a pomůcky

CE-MS experimenty byly provedeny s kapilárně elektroforetickým systémem Agilent CE 7100, který byl spojen s hmotnostním spektrometrem Agilent 6495B s AJS iontovým zdrojem a trojitým kvadrupólem (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Vlastní propojení CE a MS bylo realizováno pomocí rozhraní s přídatnou kapalinou. Průtok přídatné kapaliny zajišťovala kvartérní pumpa Agilent 1260 Infinity s děličem průtoku v poměru 1:100. Celý systém byl ovládán a získaná data vyhodnocena softwarovým balíčkem MassHunter (Data acquisition verze B.09.00; Qualitative Analysis verze B.07.00).

K separaci byly použity křemenné kapiláry potažené polyimidovou vrstvou (~20 μm) s vnitřním průměrem 50 ± 3 μm a vnějším průměrem 363 ± 10 μm (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, USA). Kapiláry byly zkracovány na patřičnou délku 76 cm řezačkou s diamantovým kotoučem Shortix (Restek, Bellefonte, PA, USA, vyrobeno společností SGT-Middelburg, Middelburg, Nizozemsko). Jejich konce byly zbaveny polyimidového obalu přístrojem Window Maker (MicroSolv Technology, Leland, NC, USA).

Vzorky byly extrahovány v ultrazvukové lázni Bandelin Sonorex (BANDELIN electronic, Berlín, Německo). Hodnota pH roztoku BGE byla upravována pomocí pH metru Sentron 1400 s pH elektrodou MicroFET (Sentron, Leek, Nizozemsko). Zdrojem ultra čisté vody byl systém Mili-Q IQ 7000 (Merck Millipore, Burlington, Massachusetts, USA). K filtraci roztoků byly použity stříkačkové filtry Labstore s membránou z polyvinylidenfluoridu (PVDF) s velikostí pórů 0,22 μm . K filtraci BGE se používaly filtry s průměrem membrány 25 mm, k filtraci extraktů s průměrem 13 mm (oboje Altium International, Praha, Česká republika).

Software MODDE Pro v.13 (Sartorius Stedim Data Analytics AB, Švédsko) byl použit pro optimalizaci nastavení parametrů iontového zdroje pomocí DoE. Data z univariantní optimalizace dalších faktorů byla vyhodnocována v programu Excel 2024 balíčku Microsoft 365 pro firmy (Microsoft, Redmond, WA, USA). Program Graphpad Prism verze 10.3.0.507 byl použit k editaci elektroferogramů z původních .csv dat (GraphPad Software, Boston, MA, USA).

4.2. Použité chemikálie

K přípravě BGE byly použity tyto chemikálie:

- Octan amonný Lichropur™, Supelco: čistota: ≥99.0 %;
- Roztok amoniaku 25 % Lichropur™, Supelco;
- Methanol Optima™ LC/MS Grade, Fisher Chemical™, čistota: ≥99.0 %;
- Acetonitril Optima™ LC/MS Grade, Fisher Chemical™, čistota: ≥99.0 %

Pro přípravu SL byl použit 2-propanol LiChrosolv®, Supelco, čistota: ≥99.9 %

4.2.1. Standardy boswellových kyselin

Standardy izolovaných boswellových kyselin byly zakoupeny od společností Chemfaces (Wu-chan, Čína) a Phytolab (Vestenbergsgreuth, Německo)

α-boswellová kyselina

- Chemfaces: katalogové číslo: CFN98704, šarže: CFS202201, čistota ≥98 %,
- Phytolab: katalogové číslo: 89585, šarže: 12513, čistota: 98 %

β-boswellová kyselina

- Chemfaces: katalogové číslo: CFN90221, šarže: CFS202201, čistota: >98 %
- Phytolab: katalogové číslo: 89454, šarže: 22107, čistota: 99 %

3-O-acetyl-α-boswellová kyselina

- Chemfaces: katalogové číslo: CFN90529, šarže: CFS202201, čistota: >98 %
- Phytolab: katalogové číslo: 89555, šarže: 16395, čistota: 99 %

3-O-acetyl-β-boswellová kyselina

- Chemfaces: katalogové číslo: CFN90530, šarže: CFS202201, čistota: >98 %
- Phytolab: katalogové číslo: 89152, šarže: 24226, čistota: 97 %

11-keto-β-boswellová kyselina

- Chemfaces: katalogové číslo: CFN90152, šarže: CFS202202, čistota: >98 %
- Phytolab: katalogové číslo: 89169, šarže: 22424, čistota: 98 %

3-O-acetyl-11-keto-β-boswellová kyselina

- Chemfaces: katalogové číslo: CFN90531, šarže: CFS202201, čistota: >98 %
- Phytolab: katalogové číslo: 89153, šarže: 17229, čistota: 99 %

Boswellia serrata extrakt USP referenční standard (1 g), katalogové číslo: 1076250, šarže: F1J024, čistota: odpovídá požadavkům USP. Výrobce: USP, Rockville, MD, USA

4.2.2. Standardy nesteroidních antiflogistik

Sodná sůl diklofenaku, Supelco, katalogové číslo: PHR1144, šarže: LRAD3320, čistota: 99.7 %

Flurbiprofen, Supelco; katalogové číslo: PHR1499, šarže: LRAD1896, čistota: 99.7 %

Indometacin, Sigma-Aldrich; katalogové číslo: I8280, šarže: BCBK0293L, čistota: ≥99 % (TLC)

Ketoprofen, Sigma-Aldrich: katalogové číslo: K2012, šarže: SLBF8959V, čistota: 100.1 %

Sulindac, Sigma-Aldrich: katalogové číslo: S4429, šarže: MKCJ6559, čistota: 101.3 %

Karprofen, Supelco: katalogové číslo: PHR1452, šarže: LRAB3052, čistota: 99.7 %

Fenylbutazon, Supelco: katalogové číslo: PHR2607, šarže: LRAC6190, čistota: 99.9 %

Kyselina niflumová, Sigma-Aldrich: katalogové číslo: N0630, šarže: BCCD9366, čistota: 99.9 %

Piroxikam, Sigma-Aldrich: katalogové číslo: P0847, šarže: SLBS7980, čistota: 99,7 %

Meloxikam, Supelco: katalogové číslo: PHR1799, šarže: LRAC3164, čistota: 99.9 %

Kyselina tiaprofenová CRS, Evropský lékopisný standard: katalogové číslo: EPT1410900, šarže: 1.3 + 1.2

Kyselina salicylová, Sigma-Aldrich: katalogové číslo: 247588, šarže: 10630EA, čistota: 99,4 %

Ibuprofen, Supelco: katalogové číslo: PHR1004

4.2.3. Doplňky stravy s boswellovými kyselinami

„Arthr.Boswell“, 180 tbl., deklarovaný obsah: 450 mg 65 % standardizovaného extraktu *Boswellia serrata* v jedné tabletě (dávkování – 3×denně 1 tbl., obsah v denní dávce 1050 mg), původ: Nutricius s.r.o., Praha, Český republika, šarže: 2AB384022.

„Swanson Boswellia serrata extract“, 60 kapslí, deklarovaný obsah: 125 mg extraktu *Boswellia serrata* „5-LOXIN®“ standardizovaný na 30 % AKBA (dávka – 1 kapsle denně), původ: Swanson health products, Fargo, ND, USA, nakoupeno přes internetový obchod: Naturawit.cz, šarže: 252403

„Boswellia Extract“, 120 kapslí, deklarovaný obsah: 250 mg extraktu standardizovaného na 85 % boswellových kyselin (dávka – 1 kapsle denně), původ: HealthyHey Foods, Bombai, Indie, šarže: BEBSE2022010122

„Boswellia extrakt“, 40 tbl., deklarovaný obsah: *Boswellia serrata* extrakt 450 mg ve 3 tabletách. (150 mg v jedné tabletě, dávkování – 3×denně 1 tbl.), původ: ELIT-PHARM, Dněpropetrovk, Ukrajina, dovozce do ČR: TML, a.s., šarže: 01102022

4.3. Příprava roztoků

4.3.1. Základní elektrolyt (BGE)

Základní elektrolyt se skládá z 50% roztoku 40 mM octanu amonného (vodná složka) a 50 % předem připravené směsi methanolu a acetonitrilu v poměru MeOH: ACN 1:4 (organická složka). Při přípravě 200 ml roztoku základního elektrolytu se naváží 308 mg octanu amonného do kádinky a rozpustí se v cca 50 ml ultračisté vody. 1 ml 25% amoniaku se v malé kádince zředí na 10 ml. Za stálého míchání magnetickým míchadlem se po kapkách přidává zředěný amoniak do konečného pH 8,5. Tento roztok se kvantitativně převede do 100 ml odměrné baňky, doplní vodou po rysku a protřepe. V 250 ml uzavíratelné skleněné nádobě smísíme roztok octanového pufru a předem připravené organické složky v poměru 1:1 a promísí se. Roztok základního elektrolytu se skladuje v lednici. Před spuštěním analýzy se elektrolyt přefiltruje přes stříkačkový PVDF filtr o průměru filtrační membrány 25 mm a velikosti pórů 0,22 µm do 2 ml vialek a nechá se odplynit po dobu 5 minut v ultrazvukové lázni.

4.3.2. Zásobní roztoky NSAID standardů

Navážíme potřebné množství nesteroidních antiflogistik do 10 ml skleněné vialky a rozpustíme v potřebném množství methanolu. Koncentrace zásobních roztoků jsou: 2 mg/ml (pro ibuprofen, k. tiaprofenovou, ketoprofen a flurbiprofen), 1 mg/ml (pro sulindak, karprofen, indometacin a diklofenak) a 0,2 mg/ml (pro meloxicam, fenybutazon, k. salicylovou, piroxikam a k. niflumovou).

4.3.3. Zásobní roztoky BA standardů a extraktu

Naváží se cca 0,5 mg standardů jednotlivých boswellových kyselin do 10 ml skleněné vialky a rozpustí se v potřebném množství methanolu na koncentraci 100 µg/ml. Analogicky se postupuje při přípravě standardního USP extraktu boswellových kyselin, s tím rozdílem, že se navažuje cca 5 mg extraktu a rozpouští se na koncentraci 1 mg/ml. Po rozpuštění standardů se vialka uzavře a roztok se promíchá na vortexové míchačce.

4.3.4. Pracovní roztoky boswellových kyselin

Mikropipetou se odebere potřebné množství zásobního roztoku standardů boswellových kyselin, v 10 ml vialce se doplní methanolem na požadovanou koncentraci a promíchá se na vortexové míchačce.

4.3.5. Pracovní roztoky nesteroidních antiflogistik

Mikropipetou se odebere potřebné množství zásobního roztoku standardů nesteroidního antiflogistika, v 10 ml vialce se doplní methanolem na požadovanou koncentraci a promíchá se na vortexové míchačce.

4.3.6. Extrakce analytů z doplňků stravy

Extrakční postup A1:

Postupuje se dle formy doplňku stravy. Je-li doplněk stravy v tabletě, tableta se rozdrtí a rozetře v čisté, suché třence, v případě tobolky se tobolka otevře a její obsah vysype na hodinové sklíčko. **(I)** Takto zpracovaného prachu se naváží na analytických vahách do 10 ml uzavíratelné vialky 50 mg. Pokud je doplněk stravy ve formě jemného prachu, naváží se přímo. **(II)** K prachu se přidají 2 ml methanolu, **(III)** vialka se uzavře a obsah se extrahuje po dobu 30 minut v ultrazvukové lázni. **(IV)** Mikropipetou se obsah vialky včetně zákalu převede do předchystané injekční stříkačky s nasazeným stříkačkovým filtrem s PVDF membránou o průměru 13 mm a velikostí pórů 0,22 µm a přefiltruje se do 5 ml odměrné baňky. Skříkačka s filtrem se několikrát propláchně methanolem a tento methanol se také přefiltruje do odměrné baňky. **(V)** Odměrná baňka s extraktem se doplní po rysku methanolem a promíchá. **(VI)** Z odměrné baňky se odebere mikropipetou 1 ml extraktu a převede do čisté 5 ml odměrné baňky, která se doplní methanolem po rysku. Výsledná koncentrace roztoku extraktu je 2 mg/ml.

Extrakční postup A2:

V alternativním postupu A se naváží v kroku **(I)** 10 mg práškového doplňku stravy a v kroku **(II)** se extrahuje v 0,4 ml methanolu. Místo 5 ml odměrných baněk v kroku **(IV)** se používají 1 ml odměrné baňky. Koncentrace tohoto roztoku extraktu je 10 mg/ml. Extrakt se dále již neředí.

Extrakční postup B:

(I) Do 2 ml mikrozkušavek typu eppendorf se naváží 10 mg práškového doplňku stravy (viz **postup A**). (II) K prachu se přidá 1 ml methanolu a (III) extrahuje se v ultrazvukové lázni 10 minut. (IV) Mikrozkušavka s extraktem se poté centrifuguje po dobu 5 minut při 4300 g. (V) Supernatant se odebere mikropipetou a přefiltruje stříkačkou s nasazeným stříkačkovým filtrem do 5 ml odměrné baňky. K sedimentu na dně mikrozkušavky se přidá další 1 ml MeOH a kroky (III) až (V) se ještě dvakrát opakují. (VI) V posledním opakování se odebere spolu se supernatantem i sediment a přefiltruje se do odměrné baňky, která se posléze doplní methanolem po rysku. Výsledná koncentrace roztoku extraktu je 2 mg/ml.

4.3.7. Roztok 1M amoniaku ke kondicionaci kapiláry

Do 5 ml odměrné baňky z tmavého skla se pomocí mikropipety přidá 0,78 ml 25% vodného roztoku amoniaku. Do baňky se doplní voda po rysku a roztok se promíchá.

4.4. Parametry měření

Pro elektroforetickou separaci byla používána křemenná kapilára potažená polyimidem s vnitřním průměrem 50 μm , vnějším průměrem 375 μm a efektivní (v CE-MS efektivní=celková) délkou 76 cm.

Před prvním použitím a na začátku každého dne byla kapilára kondicionována po dobu 600 s vodným roztokem 1M amoniaku, 600 s vodou a 600 s BGE v tomto pořadí při tlaku 1000 mbar.

Před každým individuálním nástřikem vzorku byla kapilára propláchnuta BGE po dobu 240 s. Vzorek byl dávkován hydrodynamicky tlakem 50 mbar nejprve po dobu 6 s, po optimalizaci doby nástřiku 12 s. Po vzorku byl do kapiláry nadávkována předělovací zóna BGE po dobu 2 s při tlaku 50 mbar. Separace probíhala pod napětím +27 kV. Generovaný proud dosahoval v průměru hodnot kolem 11-12 μA . EOF migroval ve směru ke katodě. Kapilára byla termostatována na teplotu 25 °C.

Na konci dne byla kapilára propláchnuta po dobu 600 s BGE a posléze 600 s vodou při tlaku 1000 mbar.

Parametry AJS iontového zdroje byly pro první experimenty nastaveny na tyto hodnoty: teplota sušícího plynu 120 °C, proud sušícího plynu 11 l/min, tlak nebulizéru - 12 psi, teplota přídavného plynu 110 °C, proud přídavného plynu 4 l/min, napětí na ESI kapiláře -2000 V, napětí na trysce -1250 V. Tyto parametry byly v rámci této práce optimalizovány experimentálním designem. Po optimalizaci parametrů iontového zdroje se dále pracovalo za těchto podmínek: napětí na ESI kapiláře -3750 V, napětí na trysce -2000 V. Napětí vysokotlaké iontové nálevky hmotnostního spektrometru bylo nastaveno na -150 V a po optimalizaci na -199 V, napětí nízkotlaké iontové nálevky mělo hodnotu -60 V a po optimalizaci -112 V. Detekce probíhala v negativním módu.

Skenovací doba jednoho SRM přechodu byla 20 ms. Přidané napětí elektronového zesilovače (ΔEMV) bylo 0 V.

Dalším parametrem iontového zdroje byl tlak nebulizéru, který měl původně hodnotu 12 psi a po univariantní optimalizaci se dále pracovalo při 6 psi. Přídavnou kapalinou byl roztok isopropylalkohol: voda v poměru 75:25 (v/v), který byl posléze optimalizován na poměr 50:50 (v/v). Průtok SL byl původně nastaven na 0,4 ml/min, později byl optimalizován na průtok 0,6 ml/min. SL pumpovaná kvartérní pumpou byla rozdělena splitterem v poměru 1:100, tzn že skutečný průtok byl 4 μ l/min, resp. 6 μ l/min.

4.5. Hodnocení metody

Plocha píku korigovaná migračním časem

$$A/t = \frac{A}{t_m}$$

Rovnice 9

A – plocha píku

t_m – migrační čas [min]

Poměr signálu k šumu

$$\frac{S}{N} = 3 \times \frac{2H}{h}$$

Rovnice 10

H – výška píku

h – rozsah šumu základní linie

Směrodatná odchylka

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Rovnice 11

x_i – hodnota jednotlivého měření

\bar{x} – průměr naměřených hodnot

N – celkový počet naměřených hodnot

\bar{x}

Relativní směrodatná odchylka

$$RSD = 100 \times \frac{SD}{\bar{x}}$$

Rovnice 12

SD – směrodatná odchylka (viz rovnice 11)

\bar{x} – průměr naměřených hodnot

5. Výsledky a diskuse

5.1. Počáteční podmínky metody

Tato práce navazuje na výchozí metodu vyvíjenou a prezentovanou D. Kosolapovem na 13. Postgraduální konferenci na Farmaceutické fakultě Univerzity Karlovy [30]. Pro počáteční experimenty bylo převzato nastavení parametrů iontového zdroje (viz kapitola 4.4), složení BGE a SRM přechody, jejichž kompletní seznam je v příloze v kapitole 8.2, a složení přídavné kapaliny (isopropylalkohol: H₂O – 75:25).

Jelikož Mgr. Kosolapov pozoroval krátkou životnost separačních kapilár, bylo nutné provést experimenty mapující vliv složení přídavné kapaliny na lámavost kapilár. Polyimidový obal může v prostředí amoniaku podléhat aminolýze a při dlouhodobém používání může v prostředí organických rozpouštědel bobtnat, což může vést k ucpávání kapiláry, nebo ke zlomení křemenné kapiláry uvnitř kovové ESI kapiláry v důsledku ztráty ohebnosti a tím pádem menší pevnosti v tahu [31]. Je možné, že vysoká teplota a tlak přídavného plynu v Agilent JetStream iontovém zdroji mohou degradaci kapilár urychlovat [32]. Tyto jevy se obvykle projeví jako nestability v proudovém záznamu. Bylo připraveno 7 roztoků do nichž byly vloženy malé, cca 5 cm dlouhé kusy křemenné kapiláry. Tyto roztoky byly: čistý isopropanol; 50 % isopropylalkohol v ultračisté vodě; 50 % roztok methanolu v ultračisté vodě a jeho tři směsi s přídavkem amoniaku (1% NH₃, 0,1% NH₃ a 0,01% NH₃). Experiment byl vyhodnocen po týdnu. Ve všech roztocích s amoniakem došlo k nabobtnání obalu kapiláry, zřejmě jako důsledek aminolýzy polyimidu. Nejvíce nabobtnalý obal byl u kapiláry ponořené v 1% NH₃, což bylo jasně pozorovatelné i okem. Na základě těchto výsledků nebylo pokračováno s přídavkem NH₃ do přídavné kapaliny.

Během vývoje metody byla také testována nevodná elektroforéza (non-aqueous capillary electrophoresis – NACE), kde BGE obsahuje pouze organické složky. (např. methanol, acetonitril, octan amonný). V tomto pokusu ovšem nedošlo k separaci boswellových kyselin od EOF.

V rámci diplomové práce J. Pouškové byla testována i MEKC-MS využívající těkavé micely tvořené perfluorooktanovou kyselinou. Během těchto experimentů ovšem nedošlo k detekci α BA a β BA. Jelikož je perfluorooktanová kyselina persistující organický polutant, nebylo z environmentálních důvodů možné tímto směrem ve vývoji metody pokračovat [33].

5.2. Optimalizace nastavení iontového zdroje pomocí DoE

Nastavení jednotlivých parametrů iontového zdroje bylo optimalizováno pomocí DoE s cílem lépe porozumět vlivu těchto parametrů na ionizaci jednotlivých analytů a zároveň případně zlepšit citlivost metody pro tyto analyty. Studované faktory byly jednotlivé parametry nastavení iontového zdroje, u kterých lze předpokládat vliv na míru ionizace analytů: teplota (gas temperature – GT) a průtok sušícího plynu (gas flow – GF), teplota (sheath gas temperature – SGT) a průtok přídavného plynu (sheath

gas flow – SGF), napětí na ESI kapiláře (sprayer voltage – SV), napětí na trysce (nozzle voltage – Noz), napětí na vysokotlaké iontové nálevce (iFunnel voltage high pressure – FHP) a napětí na nízkotlaké iontové nálevce (iFunnel voltage low pressure – FLP). Rozmezí teploty a průtoku sušícího a přídavného plynu bylo potřeba vybrat tak, aby se předešlo riziku lámání separační kapiláry v CE-ESI nebulizéru [31], [32]. Screening i optimalizace byly provedeny pouze pro kvantitativní přechody boswelových kyselin a nesteroidních antiflogistik. Dohromady se tedy studovalo nastavení parametrů iontového zdroje pro 17 analytů. Jako odezvy byly vybrány intenzita signálu, tj. plocha korigovaná migračním časem a poměr signálu k šumu; celkem tedy 32 odezev. Pro screening i optimalizaci byly použity směsné roztoky standardů boswelových kyselin od společnosti Chemfaces o koncentraci 100 µg/ml a nesteroidních antiflogistik o koncentracích 10 µg/ml.

5.2.1. Screening

Pro screening byl vybrán frakční faktoriální design experimentu o dvou úrovních, model designu byl lineární. Experiment byl navrhnut pomocí softwaru MODDE Pro. Maticí experimentu tvořilo 16 různých experimentů s proměnlivými hodnotami zkoumaných faktorů, a jednoho triplikátu o stejných hodnotách uprostřed rozsahu testovaných parametrů pro ověření opakovatelnosti analýzy. Celkem bylo v průběhu screeningového designu provedeno 19 analýz. "

Zkoumanými faktory a jejich rozsah byly:

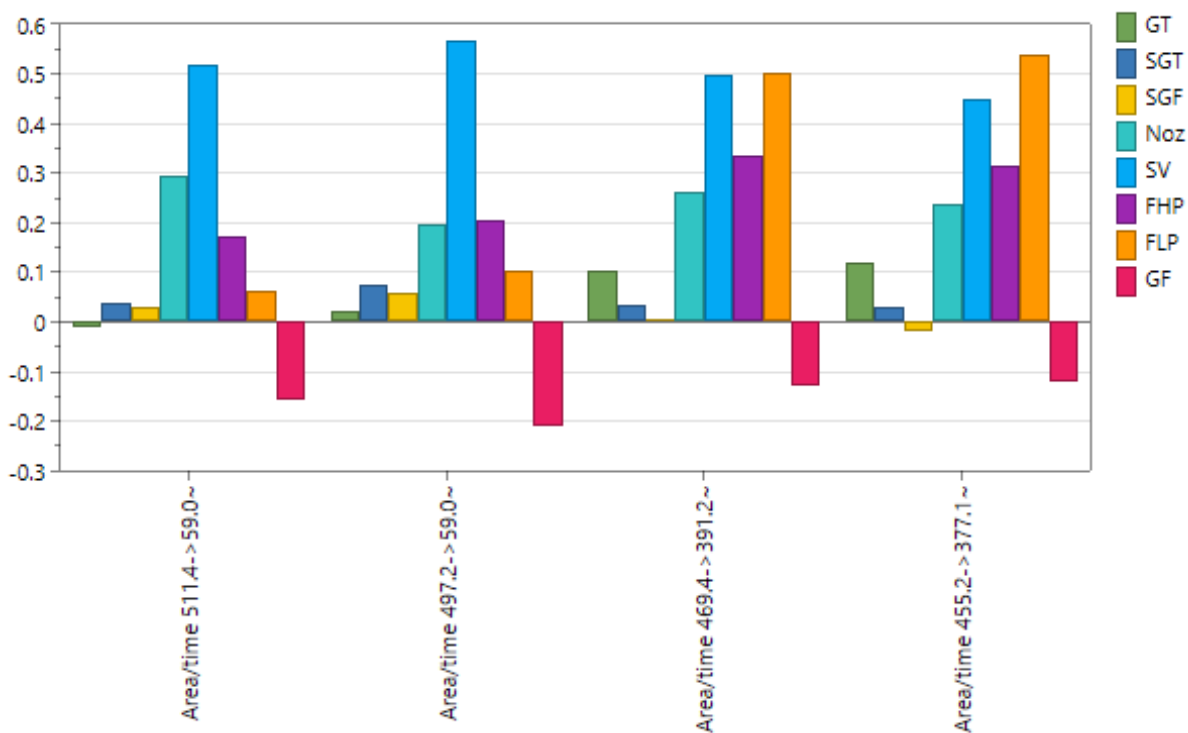
1. Teplota sušícího plynu (80-200 °C)
2. Teplota přídavného plynu (80-170 °C)
3. Průtok přídavného plynu (4-8 l/min)
4. Průtok sušícího plynu (11-20 l/min)
5. Napětí na trysce (0-2000 V)
6. Napětí na ESI kapiláře (1000-4500 V)
7. Napětí na vysokotlaké iontové nálevce (10–210 V)
8. Napětí na nízkotlaké iontové nálevce (10–210 V)

Aby byla eliminována možnost systematické chyby, pořadí experimentů bylo randomizováno. Konkrétní nastavení experimentů včetně jejich pořadí je uvedeno v *tabulce 2*.

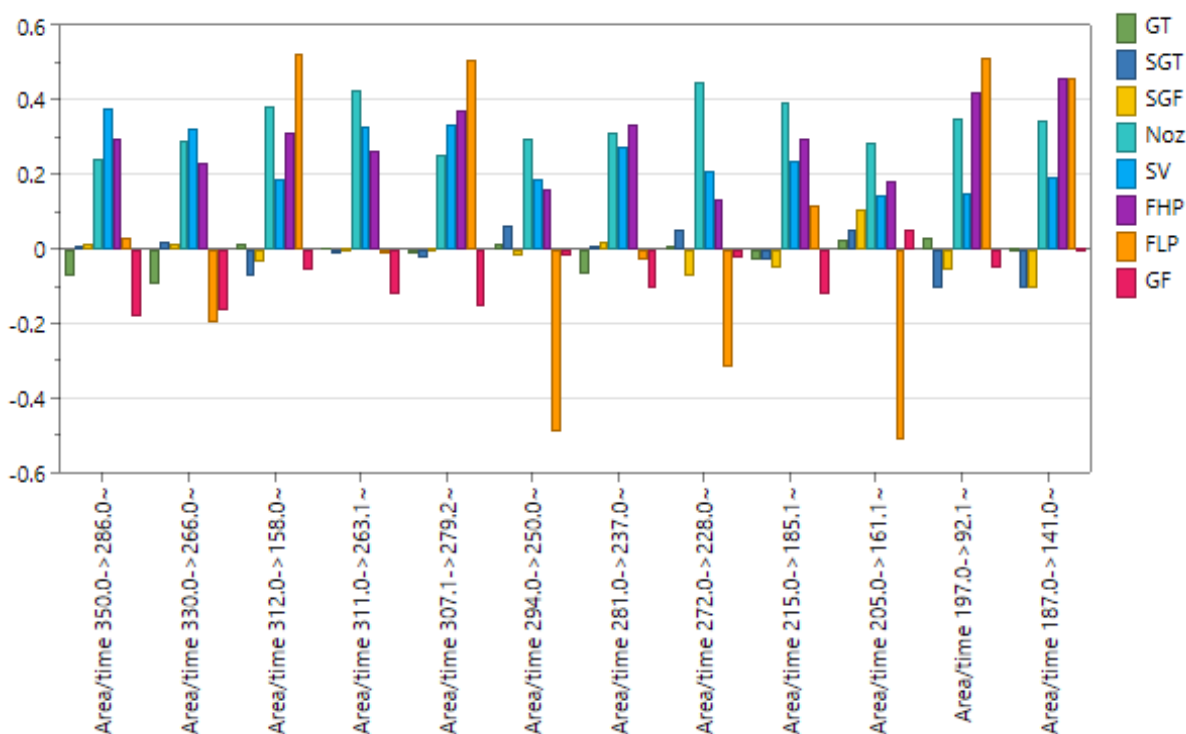
Tabulka 2 Souhrn experimentů pro screening pomocí frakčního faktoriálního designu.

Číslo experimentu	Pořadí	Teplota sušícího plynu (°C)	Teplota přidavného plynu (°C)	Průtok přidavného plynu (l/min)	Napětí na trysce (V)	Napětí na ESI kapiláře (V)	Napětí na vysokotlaké iontové nálevce (V)	Napětí na nízkotlaké iontové nálevce	Průtok sušícího plynu (l/min)
N1	6	80	80	4	0	1000	10	10	11
N2	12	200	80	4	0	1000	210	210	20
N3	2	80	170	4	0	4500	10	210	20
N4	10	200	170	4	0	4500	210	10	11
N5	13	80	80	8	0	4500	210	210	11
N6	3	200	80	8	0	4500	10	10	20
N7	5	80	170	8	0	1000	210	10	20
N8	19	200	170	8	0	1000	10	210	11
N9	9	80	80	4	2000	4500	210	10	20
N10	1	200	80	4	2000	4500	10	210	11
N11	7	80	170	4	2000	1000	210	210	11
N12	15	200	170	4	2000	1000	10	10	20
N13	18	80	80	8	2000	1000	10	210	20
N14	17	200	80	8	2000	1000	210	10	11
N15	14	80	170	8	2000	4500	10	10	11
N16	11	200	170	8	2000	4500	210	210	20
N17	16	140	125	6	1000	2750	110	110	15,5
N18	8	140	125	6	1000	2750	110	110	15,5
N19	4	140	125	6	1000	2750	110	110	15,5

Většinu odezev bylo nutno v programu MODDE Pro logaritmičsky transformovat pro zvýšení hodnot R2 (koeficient determinace) a Q2 (koeficient predikovatelnosti) s výjimkou odezev S/N pro kyselinu niflumovou a karprofen. Výsledky screeningů ukázaly, které faktory zásadně ovlivňují intenzitu signálu pro většinu analytů. Faktory s největším vlivem na model byly: napětí na trysce, napětí na ESI kapiláře, napětí na vysokotlaké iontové nálevce, napětí na nízkotlaké iontové nálevce (viz *obrázek 11* a *obrázek 12*). Faktor „průtok sušícího plynu“ měl vždy s rostoucí hodnotou negativní vliv na odezvu s výjimkou S/N flurbiprofenu a diklofenaku. a byl tak pro pozdější optimalizaci stanoven na hodnotu 11 l/min. Zbývající faktory (průtok a teplota přidavného plynu, teplota sušícího plynu) měly proměnlivý, avšak povětšinou nízký vliv na studované odezvy A/t a S/N i na kvalitu modelu. Odstraněním faktorů s malým vlivem na model docházelo ke zlepšení R2 a Q2 a tím pádem zlepšení predikčního modelu.



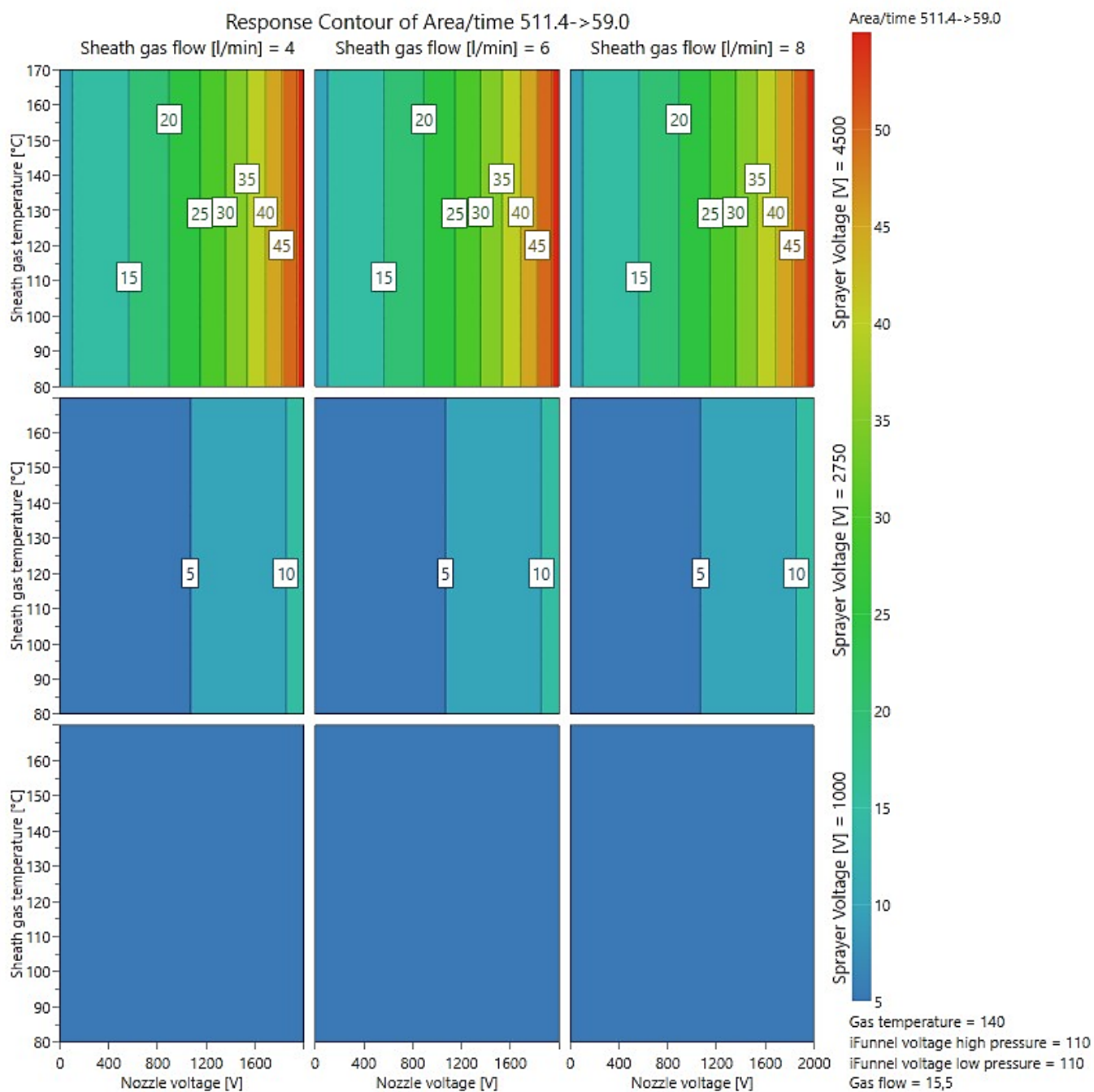
Obrázek 11 Souhrn hodnot koeficientů (95 % interval spolehlivosti) pro odezvy A/t boswellových kyselin. GT – teplota sušícího plynu, SGT – teplota přidavného plynu, SGF – průtok přidavného plynu, Noz – napětí na trysce, SV – napětí na ESI kapiláře, FHP – napětí na vysokotlaké iontové nálevce, FLP – napětí na nízkotlaké iontové nálevce, GF – průtok sušícího plynu. Hodnoty koeficientů faktorů >0 na ose y zvyšují odezvu, zatímco koeficienty faktorů <0 odezvu snižují.



Obrázek 12 Souhm hodnot koeficientů (95 % interval spolehlivosti) pro odezvy A/t NSAID. GT – teplota sušícího plynu, SGT – teplota přídavného plynu, SGF – průtok přídavného plynu, Noz – napětí na trysce, SV – napětí na ESI kapiláře, FHP – napětí na vysokotlaké iontové nálevce, FLP – napětí na nízkotlaké iontové nálevce, GF – průtok sušícího plynu. Hodnoty koeficientů faktorů >0 na ose y zvyšují odezvu, zatímco koeficienty faktorů <0 odezvu snižují.

Vliv jednotlivých faktorů na koeficienty odezvy S/N sledovaných látek je v kapitole 8.3.

Na obrázku 13 je zobrazen 4D vrstevnicový graf, ze kterého lze vyčíst, že se změnou hodnoty průtoku a teploty přídavného plynu není ovlivněna odezva A/t pro AKBA zatímco vliv napětí na ESI kapiláře a napětí na trysce mají vliv na intenzitu signálu vyjádřenou jako A/t. Jelikož lze podobné závěry vyvodit i pro další odezvy, nejsou již dále v této práci podrobněji prezentovány. Jinými slovy, tyto 4D vrstevnicové grafy ilustrují analogické trendy jako již prezentované grafy s hodnotami koeficientů (viz obrázek 11 a obrázek 12).



Obrázek 13 4D vrstevnicový graf odezvy korigované plochy pro AKBA. Zobrazenými faktory jsou průtok přidavného plynu (nahore), napětí ESI jehly (vpravo), napětí na trysce na ose X (dole), teplota průtoku přidavného plynu na ose Y (vlevo). Konstantní faktory a jejich hodnoty v tomto grafu jsou následující: teplota sušícího plynu = 140 °C; napětí nízkotlaké iontové nálevky = 110 V, napětí vysokotlaké iontové nálevky = 110 V; průtok sušícího plynu = 15,5 l/min.

5.2.2. Optimalizace

Pro optimalizaci byl použit centrálně kompozitní design o nulté a dvou dalších úrovních. Faktory, které ve screeningu nejvíce ovlivňovaly odezvy korigované plochy a poměr signálu k šumu byly Noz, SV, FLP a FHP. Rozsah úrovní těchto faktorů pro optimalizaci byl následující:

1. Napětí na trysce (500-2000 V)
2. Napětí na ESI kapiláře (1000-4500 V)
3. Napětí na vysokotlaké iontové nálevce (80–210 V)
4. Napětí na nízkotlaké iontové nálevce (10–210 V)

Faktory s malým vlivem na odezvy byly nastaveny na konstantní hodnoty: Teplota sušícího plynu – 120 °C, průtok sušícího plynu – 11 l/min, teplota přidavného plynu – 110 °C, průtok přidavného plynu – 4 l/min.

Experimentální plán pro optimalizaci zahrnoval 25 analýz, z toho 3 tvořily triplikát středních hodnot proměnných (viz *tabulka 3*). Pořadí jednotlivých experimentů bylo randomizováno jako v předchozím případě.

Tabulka 3 Souhrn experimentů pro optimalizaci pomocí centrálně kompozitního designu

Číslo experimentu	Pořadí	Napětí na trysce (V)	Napětí na ESI kapiláře (V)	Napětí na vysokotlaké iontové nálevce (V)	Napětí na nízkotlaké iontové nálevce (V)
N1	6	500	1000	80	10
N2	20	2000	1000	80	10
N3	24	500	4500	80	10
N4	22	2000	4500	80	10
N5	21	500	1000	210	10
N6	14	2000	1000	210	10
N7	3	500	4500	210	10
N8	17	2000	4500	210	10
N9	1	500	1000	80	210
N10	7	2000	1000	80	210
N11	8	500	4500	80	210
N12	27	2000	4500	80	210
N13	23	500	1000	210	210
N14	12	2000	1000	210	210
N15	25	500	4500	210	210
N16	19	2000	4500	210	210
N17	5	500	2750	145	110
N18	13	2000	2750	145	110
N19	11	1250	1000	145	110
N20	18	1250	4500	145	110
N21	15	1250	2750	80	110
N22	4	1250	2750	210	110
N23	26	1250	2750	145	10
N24	9	1250	2750	145	210
N25	16	1250	2750	145	110
N26	2	1250	2750	145	110
N27	10	1250	2750	145	110

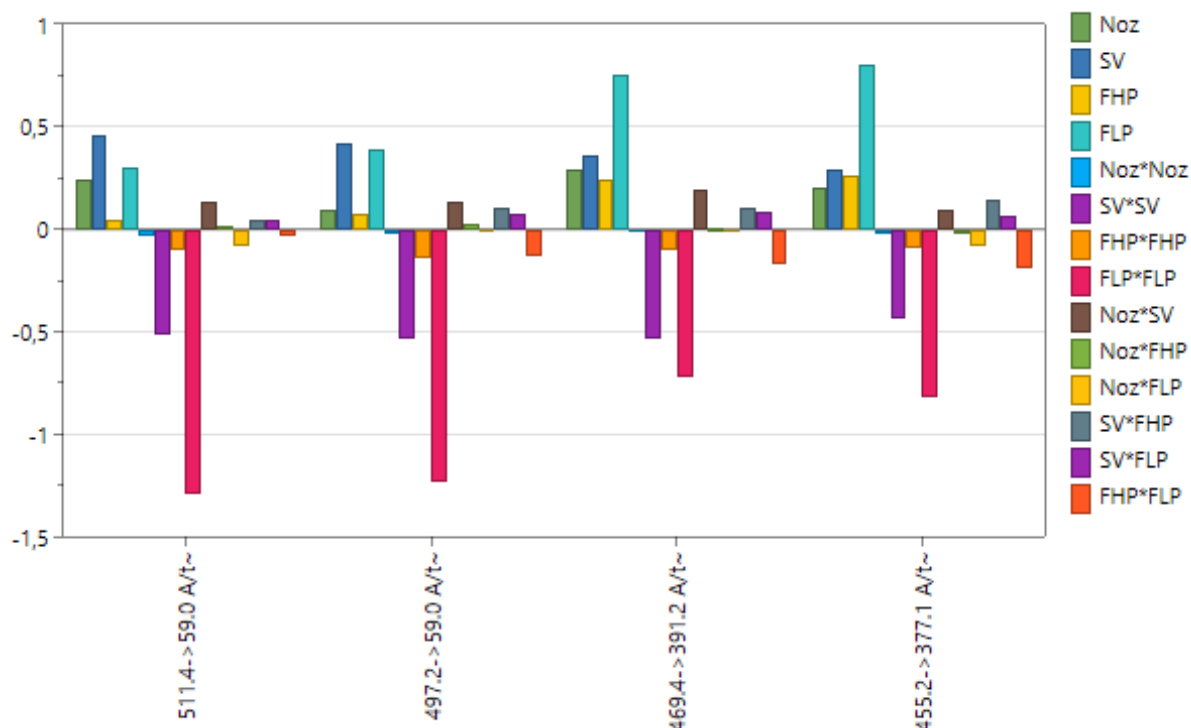
Obdobně jako při screeningu, většina odezev byla logaritmičsky transformována pro zlepšení hodnot R2 a Q2 predikčního modelu, s výjimkou diklofenaku, niflumové kyseliny a ketoprofenu, u nichž byly hodnoty R2 a Q2 uspokojivé i bez transformace. Vliv proměnných je u analyzovaných látek variabilní, obvykle je však vliv samotných faktorů na odezvu (A/t, S/N) vyšší než závislost interakce vlivu různých dvou faktorů navzájem. Vzhledem k tomu, že jde o analýzu široké skupiny látek s velmi rozdílnými chemickými strukturami, faktory jejichž změna má největší efekt na odezvu jsou pro různé látky jiné. Faktory mohou mít také rozdílný vliv na odezvu A/t a S/N u jedné látky. Pro A/t může být důležitý jeden faktor, zatímco u S/N nemá velký význam a důležitý je jiný.

Porovnání vlivu faktorů na odezvu A/t pro boswellové kyseliny a nesteroidní antiflogistika je na *obrázku 14* a *obrázku 15*. Porovnání vlivu faktorů na odezvu S/N je pak v kapitole 8.4. Obecně lze pro odezvu A/t konstatovat, že FLP má téměř vždy relativně největší vliv a to u 9 látek (KBA, α/β BA, indometacin, fenybutazon, diklofenak, ibuprofen, ketoprofen, flurbiprofen, kyselina salicylová). Rostoucí hodnota

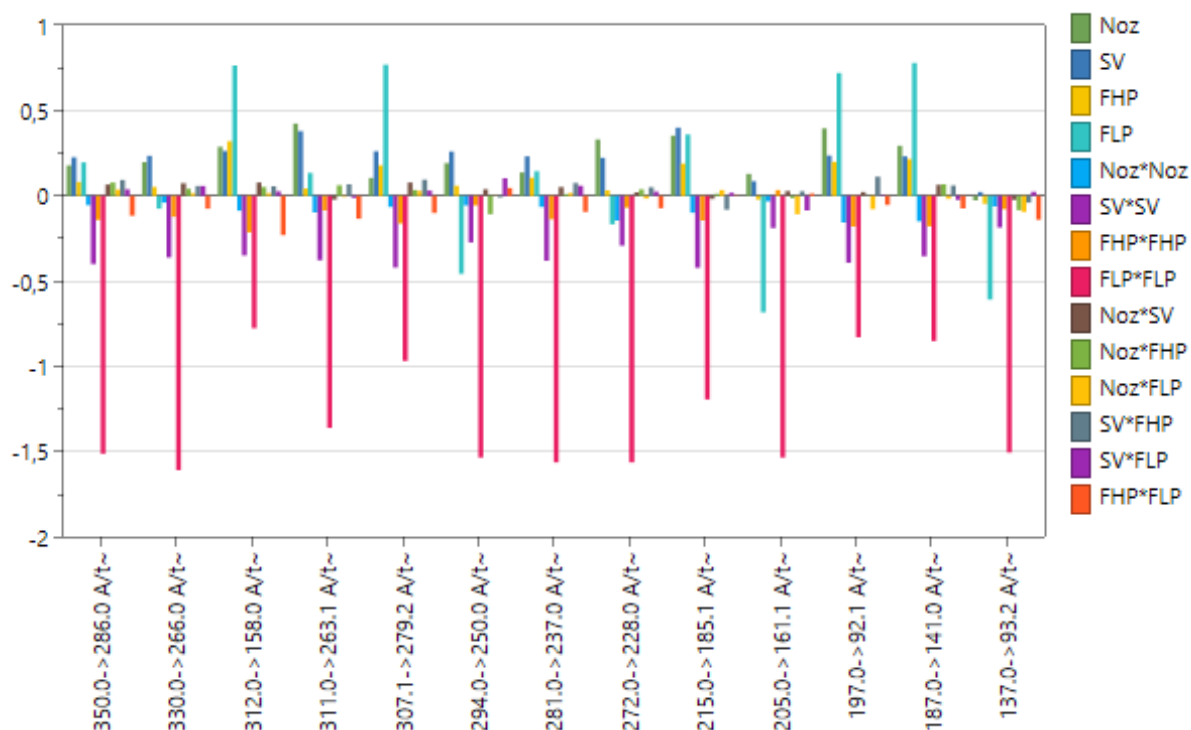
FLP má pozitivní vliv na odezvu u 12 látek, negativně ovlivňuje odezvu jen u piroxikamu, diklofenaku, karprofenu, ibuprofenu a kyseliny salicylové.

SV je nevlivnější faktor pro AKBA, A α /A β BA, meloxikam, piroxikam, kyselinu niflumovou a kys. tiaprofenovou. Se zvyšující se hodnotou Noz téměř vždy dochází ke zvýšení odezvy. Se zvyšujícím se SV a Noz se snižuje odezva pouze u kyseliny salicylové a fenybutazonu. SV a FLP ovšem obecně při stoupající hodnotě nastavení zvyšují odezvu jen v určitém intervalu, pak se opět odezva s rostoucí hodnotou snižuje (např. vrstevnicový graf na *obrázku 16*). FHP má v porovnání s ostatními faktory obvykle menší vliv na intenzitu odezvy, u většiny látek se se zvyšující se hodnotou FHP zvedá i hodnota odezvy. U tří sloučenin (A α /A β BA, piroxikam a kyselina niflumová) se odezva při zvyšování hodnoty FHP od určité hodnoty snižovala. Pro ibuprofen byla intenzita odezvy se zvyšující hodnotou FHP ve vztahu nepřímé úměry, tj. docházelo ke snížení odezvy A/t. Pro AKBA nemělo nastavení FHP téměř žádný vliv. Odezvy A/t lze obecně rozdělit do čtyř trendů, které jsou popsány ve vrstevnicových grafech v kapitole 8.6.

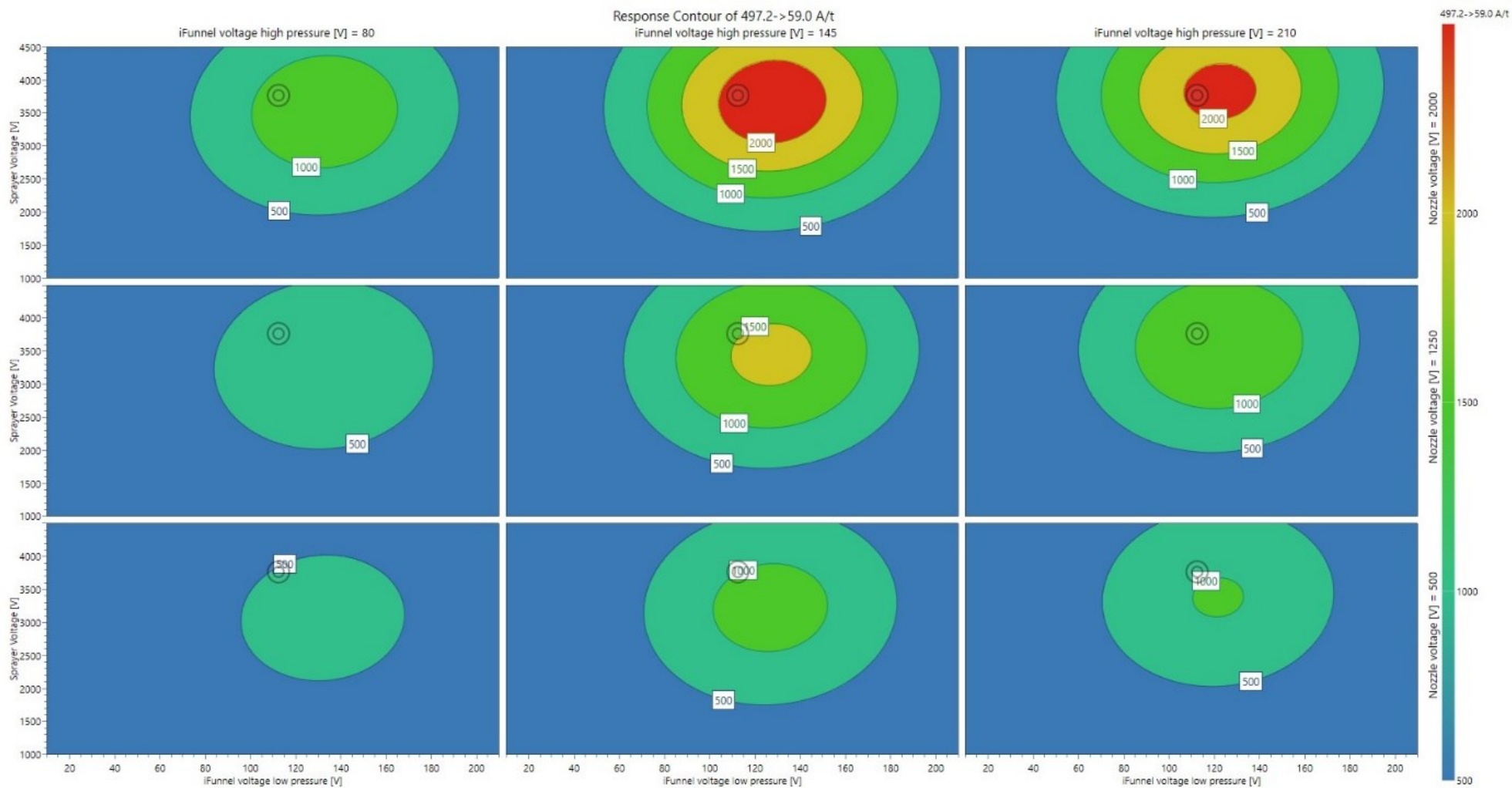
Pro S/N platí obdobně jako u A/t, že FLP má nejvýraznější vliv, nicméně vliv dalších faktorů je více variabilní než pro A/t. Nelze tedy zobecnit trendy do několika skupin, jako u odezev pro A/t. Odezva S/N pro diklofenak byla z další optimalizace odstraněna pro nízkou shodu s modelem, a protože odezvy některých jeho experimentálních bodů byly softwarem Modde vyhodnoceny jako odlehlé hodnoty. Na *obrázku 16* a *obrázku 17* jsou vrstevnicové grafy pro odezvu A/t a S/N u A α /A β BA. Odezva A/t v grafu na *obrázku 16* se zvětšuje s rostoucím FLP a SV jen v určitém intervalu. Noz musí být nastaven na nejvyšší hodnotu (2000 V) pro dosažení nejvyšší odezvy, zatímco FHP zvyšuje odezvu již od středních hodnot (145 V). V grafu na *obrázku 17* pro odezvu S/N všechny rostoucí faktory zvyšují odezvu jen do určitého bodu, poté se zvyšující se hodnotou faktorů odezva opět klesá. Odezva S/N pro A α /A β BA by tak měla optimum v prostředních hodnotách pro Noz a FHP a cca ve 2/3 nastavení pro FLP a SV.



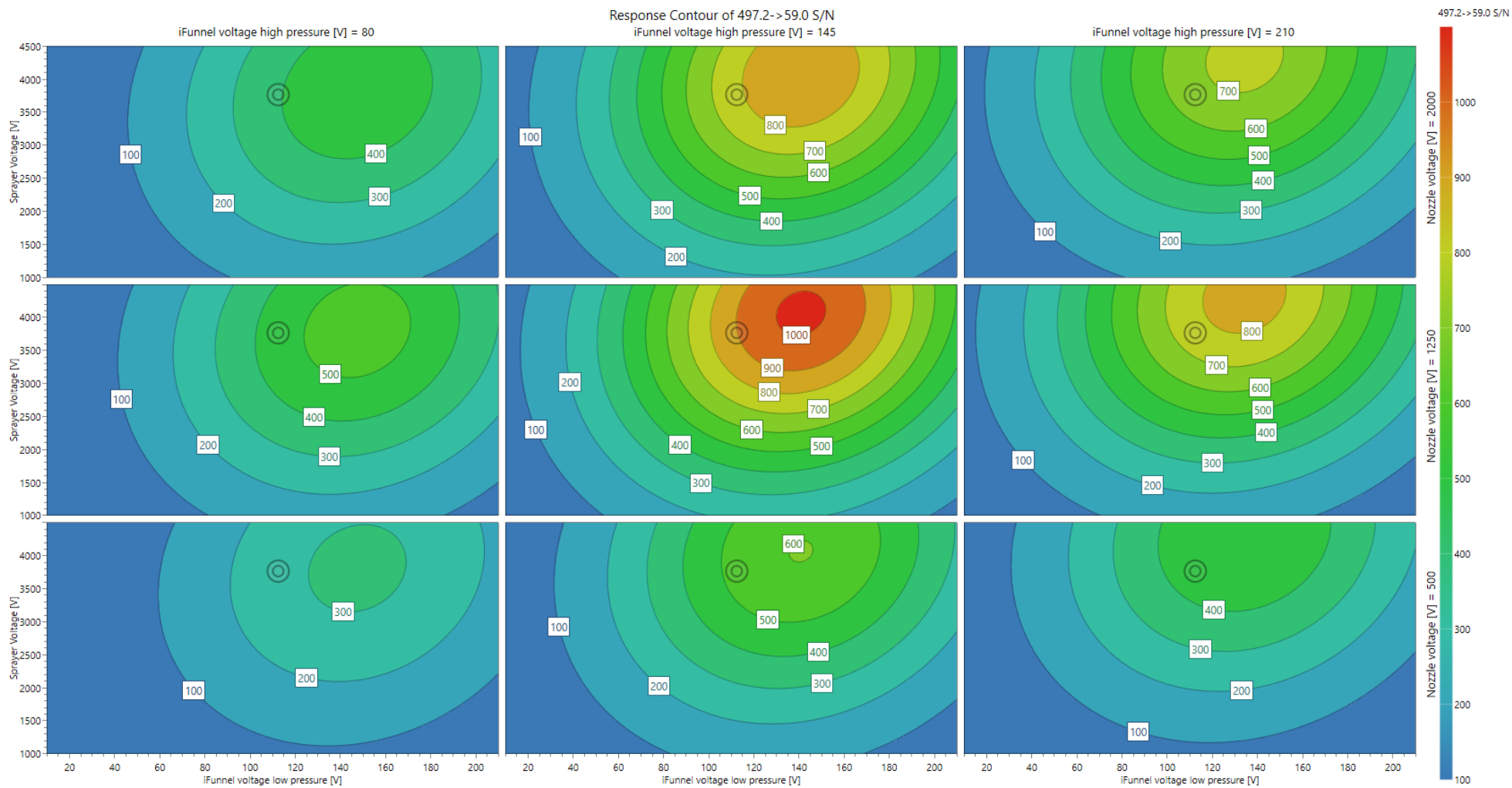
Obrázek 14 Souhrn hodnot koeficientů (95 % interval spolehlivosti) pro odezvy A/t boswellových kyselin. GT – teplota sušícího plynu, SGT – teplota přidavného plynu, SGF – průtok přidavného plynu, Noz – napětí na trysce, SV – napětí na ESI kapiláře, FHP – napětí na vysokotlaké iontové nálevce, FLP – napětí na nízkotlaké iontové nálevce, GF – průtok sušícího plynu. Hodnoty koeficientů faktorů >0 na ose y zvyšují odezvu, zatímco koeficienty faktorů <0 odezvu snižují



Obrázek 15 Souhrn hodnot koeficientů (95 % interval spolehlivosti) pro odezvy A/t NSAID. GT – teplota sušícího plynu, SGT – teplota přidavného plynu, SGF – průtok přidavného plynu, Noz – napětí na trysce, SV – napětí na ESI kapiláře, FHP – napětí na vysokotlaké iontové nálevce, FLP – napětí na nízkotlaké iontové nálevce, GF – průtok sušícího plynu. Hodnoty koeficientů faktorů >0 na ose y zvyšují odezvu, zatímco koeficienty faktorů <0 odezvu snižují.



Obrázek 16 Vrstevnicový graf pro odezvu A/t u $A\alpha/\beta BA$. Na ose y – napětí na ESI kapiláře (SV), na ose x – napětí na nízkotlaké iontové nálevce (FLP), nahoře ve třech úrovních – napětí na vysokotlaké iontové nálevce (FHP), vpravo ve třech úrovních – napětí na trysce (Noz). Odezva se zvětšuje s rostoucím Noz. FHP, FLP a SV zvětšují odezvu jen v určitém intervalu.



Obrázek 17 Vrstevnicový graf pro odezvu S/N u A α /A β BA. Na ose y – napětí na ESI kapiláře (SV), na ose x – napětí na nízkotlaké iontové nálevce (FLP), nahoře ve třech úrovních – napětí na vysokotlaké iontové nálevce (FHP), vpravo ve třech úrovních – napětí na trysce (Noz). Všechny rostoucí faktory zvyšují odezvu jen v určitém intervalu, poté se zvyšujícími se faktory odezva klesá.

V kapitole 8.7 je souhrn požadavků pro nalezení optimálního nastavení parametrů iontového zdroje tak, aby byla maximalizována jak odezva A/t, tak i odezva S/N. Tímto nastavením iontového zdroje by mělo být nalezeno kompromisní optimum pro všechny analyty. Zadané hodnoty pro minimální požadovanou a cílovou požadovanou odezvu byly zvoleny vizuálním vyhodnocením vrstevnicových grafů v softwaru Modde.

Díky variabilitě vlivů faktorů mezi A/t a S/N a širokém spektru optimalizovaných látek není zcela možné zvolit robustní nastavení, ve kterém by všechny látky v rozmezí nastavení optimalizačního nástroje programu MODDE poskytovaly požadovanou odezvu (obvykle co nejvyšší) pro oba parametry bez určitého rizika selhání. Optimalizační nástroj navrhl 20 optim, z nichž nalezené optimum 9 je shrnuto v *tabulce 4*. Výsledné nastavení je tedy kompromisem, který má za cíl poskytnout uspokojivou odezvu i přes to, že nastavení není pro některé látky optimální.

Tabulka 4 Finální hodnoty parametrů iontového zdroje po optimalizaci.

Faktor	jednotka	Navržené nastavení optimalizačním nástrojem	Skutečné nastavení
Napětí na ESI kapiláře	V	3766,51	3750
Napětí na trysce	V	1988,83	2000
Napětí na vysokotlaké iontové nálevce	V	199,303	199
Napětí na nízkotlaké iontové nálevce	V	112,412	112
Průtok sušícího plynu	l/min	-	11
Teplota sušícího plynu	°C	-	120
Průtok přídavného plynu	l/min	-	4
Teplota přídavného plynu	°C	-	110

Tabulka 5 Naměřené hodnoty při optimálním nastavení (zelené sloupce) v porovnání s hodnotami predikovanými softwarem MODDE. (modré sloupce). Ve žlutých sloupcích je poměr naměřené/predikované, ukazující míru shody mezi navrhovanými optimálními podmínkami a skutečně naměřenými hodnotami (n=9).

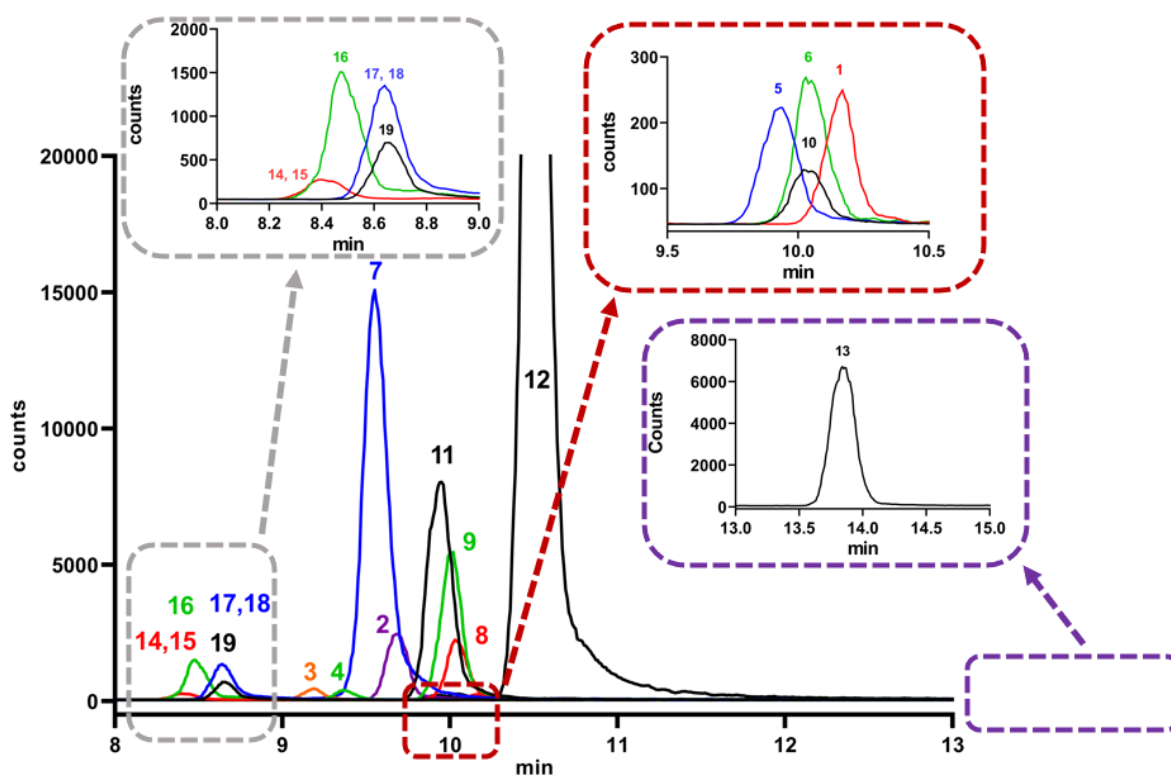
	Naměřené		Predikované		Poměr naměřené/predikované	
	A/t (RSD)	S/N (RSD)	A/t	S/N	A/t	S/N
AKBA	687 (9,8 %)	107 (35,7 %)	870	675	79 %	16 %
A α /A β BA	1493 (9,9 %)	431 (25,2 %)	2191	723	68 %	60 %
KBA	1668 (9,6 %)	598 (35,1 %)	2637	852	63 %	70 %
α / β BA	299 (11,7 %)	165 (48,6 %)	525	180	57 %	91 %
Meloxikam	8671 (8,4 %)	5405 (39,4 %)	10144	12581	85 %	43 %
Piroxikam	5290 (4,5 %)	2384 (19,7 %)	5015	6195	105 %	38 %
Indometacin	317 (12,7 %)	1121 (49,6 %)	452	2322	70 %	48 %
Sulindak	387 (11,2 %)	388 (26,8 %)	524	1417	74 %	27 %
Fenylbutazon	16750 (3,6 %)	5135 (20,0 %)	15310	3321	109 %	155 %
Diklofenak	1977 (10,2 %)	548 (24,7 %)	2384	-	83 %	-
K. niflumová	45082 (11,0 %)	4462 (24,7 %)	49830	6862	90 %	65 %
Karprofen	2180 (17,3 %)	1347 (20,0 %)	3958	4280	55 %	31 %
K. tiaprofenová	81 (8,0 %)	241 (39,2 %)	80	234	100 %	103 %
Ibuprofen	161 (7,1 %)	155 (26,1 %)	134	159	120 %	97 %
Ketoprofen	176 (9,1 %)	286 (31,1 %)	206	245	85 %	117 %
Flurbiprofen	197 (8,3 %)	330 (30,7 %)	239	342	82 %	97 %
K. salicylová	6480 (7,0 %)	925 (16,3 %)	7230	1041	90 %	89 %

Nastavení iontového zdroje navržené optimalizačním nástrojem bylo třeba v některých případech upravit tak, aby bylo technicky nastavitelné. Například napětí na ESI kapiláře 3766,5 V nelze softwarově nastavit, proto byla zvolena nejbližší možná hodnota, tj. 3750 V (viz *tabulka 4*).

Odchyly mezi predikovanou hodnotou odezev a naměřenými daty s optimálním nastavením iontového zdroje jsou shrnuty v *tabulce 5*. Jak je z výsledků patrné, tak shoda pro A/t v rozmezí ± 20 % byla dosažena u 10 analytů, což je uspokojivý výsledek. U zbylých analytů je míra shody mezi predikcí a naměřenými daty nižší a pohybuje se mezi 55-79 %.

Opakovatelnost odezvy A/t (n = 9) byla v rozmezí 4-17 %, s tím, že většina analytů vykazovala RSD okolo 10 %. Z tohoto výsledku je patrné, že je třeba zlepšit opakovatelnost metody, jak bude diskutováno v další části této práce.

Pro odezvu S/N je míra shody predikované odezvy v optimu s naměřenými daty výrazně nižší. Pouze pro 6 analytů se liší v rozmezí ± 20 %, zatímco pro zbylé sloučeniny byla výrazně nižší (16 % pro AKBA) nebo výrazně vyšší (např. 155 % fenybutazon). To souvisí i s faktem, že tato odezva je výrazně méně opakovatelná. To se ukázalo jak při analýze triplikátu v rámci centrálního kompozitního designu, tak i při analýze s optimálním nastavením iontového zdroje, kdy se RSD pro odezvu S/N pohybuje v rozmezí od 16 % do 50 %. Z tohoto důvodu je také predikční síla modelu pro S/N nižší. Retrospektivně by při další optimalizaci bylo vhodnější pracovat jen s odezvou A/t.



Obrázek 18 TIC záznam směsi boswellových kyselin a nesteroidních antiflogistik při nastavení iontového zdroje optimalizovaného pomocí centrálně kompozitního designu (optimum 9). Označení píků: 1 – ibuprofen, 2 – karprofen, 3 – sulindak, 4- indometacin, 5 – ketoprofen, 6 – flurbiprofen, 7 – fenybutazon, 8 – diklofenak, 9 – piroxikam, 10 – k. tiaprofenová, 11 – meloxicam, 12 – niflumová kyselina, 13 – k. salicylová, 14 a 15 – α/β BA, 16 – KBA, 17 a 18 – A α /A β BA, 19 – AKBA.

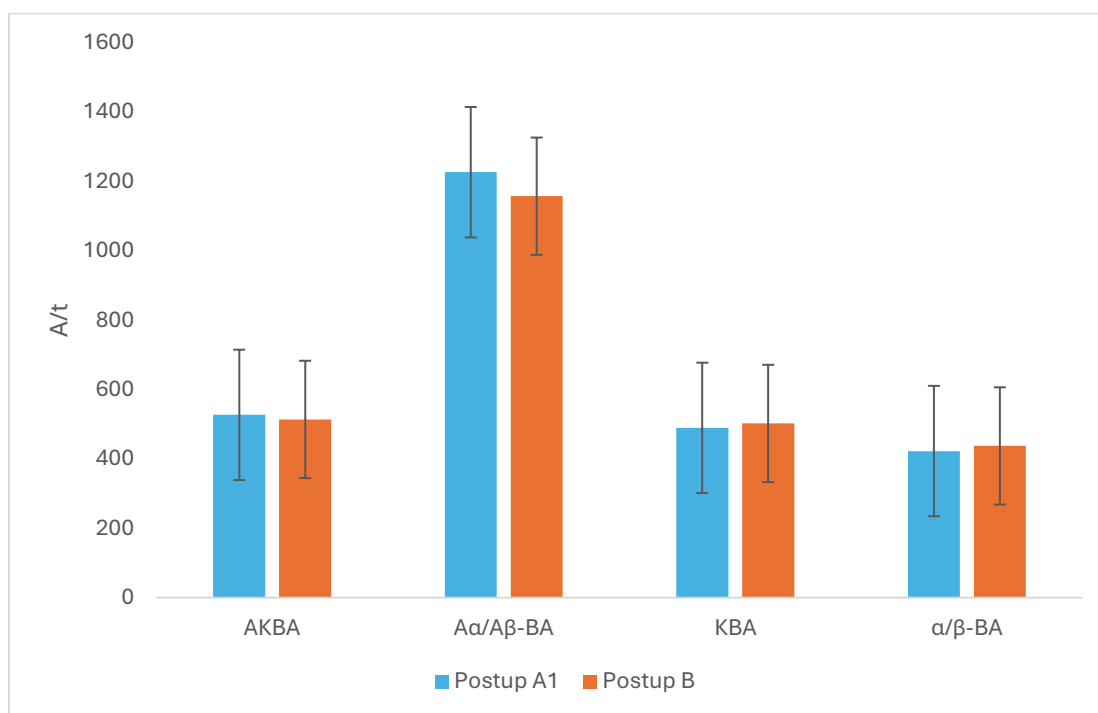
5.3. Výběr extrakčního postupu pro extrakci boswellových kyselin z doplňků stravy.

Byly zvažovány dva postupy extrakce boswellových kyselin, které byly inspirovány existujícími extrakčními metodami v literatuře a miniaturizovány pro potřeby této práce [34], [35]. Tyto postupy jsou uvedené v kapitole 4.3.6. Oběma postupy, A1 i B byly připraveny 3 vzorky. Každý vzorek byl analyzován v triplikátu. K výběru extrakčního postupu byl použit doplněk stravy Arthr.boswell společnosti Nutricius s deklarovaným obsahem 65 % extraktu v 350 mg kadidlovníku pilovitého v jedné tabletě.

Tabulka 6 Srovnání výsledků extrakčních postupů. U každého postupu je uveden průměr hodnot korigovaná plochy píku (A/t) či poměr signálu k šumu (S/N) ze tří vzorků o třech opakováních pro všechny boswellové kyseliny; dále jejich směrodatné odchylky (SD) a relativní směrodatné odchylky. (RSD)

Postup A1	AKBA	Aα/AβBA	KBA	α/βBA
A/t	526,928	1226,530	489,433	422,607
SD	35,098	149,714	23,550	74,876
RSD	7 %	12 %	5 %	18 %
S/N	188,433	389,267	203,067	318,411
SD _{S/N}	53,685	84,886	72,421	98,583
RSD _{S/N}	28 %	22 %	36 %	31 %
Postup B	AKBA	Aα/AβBA	KBA	α/βBA
A/t	513,871	1157,338	502,260	437,394
SD	31,621	145,563	38,495	67,747
RSD	6 %	13 %	8 %	15 %
S/N	194,144	424,711	309,044	319,300
SD _{S/N}	36,460	122,665	70,807	118,851
RSD _{S/N}	19 %	29 %	23 %	37 %

Na základě výsledků (*tabulka 6 a obrázek 19*) lze konstatovat, že oba extrakční postupy poskytují velmi podobné výsledky jak z hlediska výsledných korigovaných ploch, tak i přesnosti. Pro extrakci boswellových kyselin z doplňků stravy byl nakonec vybrán postup A1, kvůli snadné manuální proveditelnosti a menší časové náročnosti.



Obrázek 19 Grafické srovnání extrakčních postupů pro průměry korigovaných ploch boswellových kyselin. Extrakční postup A1 je zobrazen modře, postup B oranžově. Na ose y je hodnota korigované plochy. Chybové úsečky vyjadřují směrodatnou odchylku.

5.4. Optimalizace dalších parametrů pro zlepšení opakovatelnosti metody

5.4.1. Optimalizace složení přídavné kapaliny

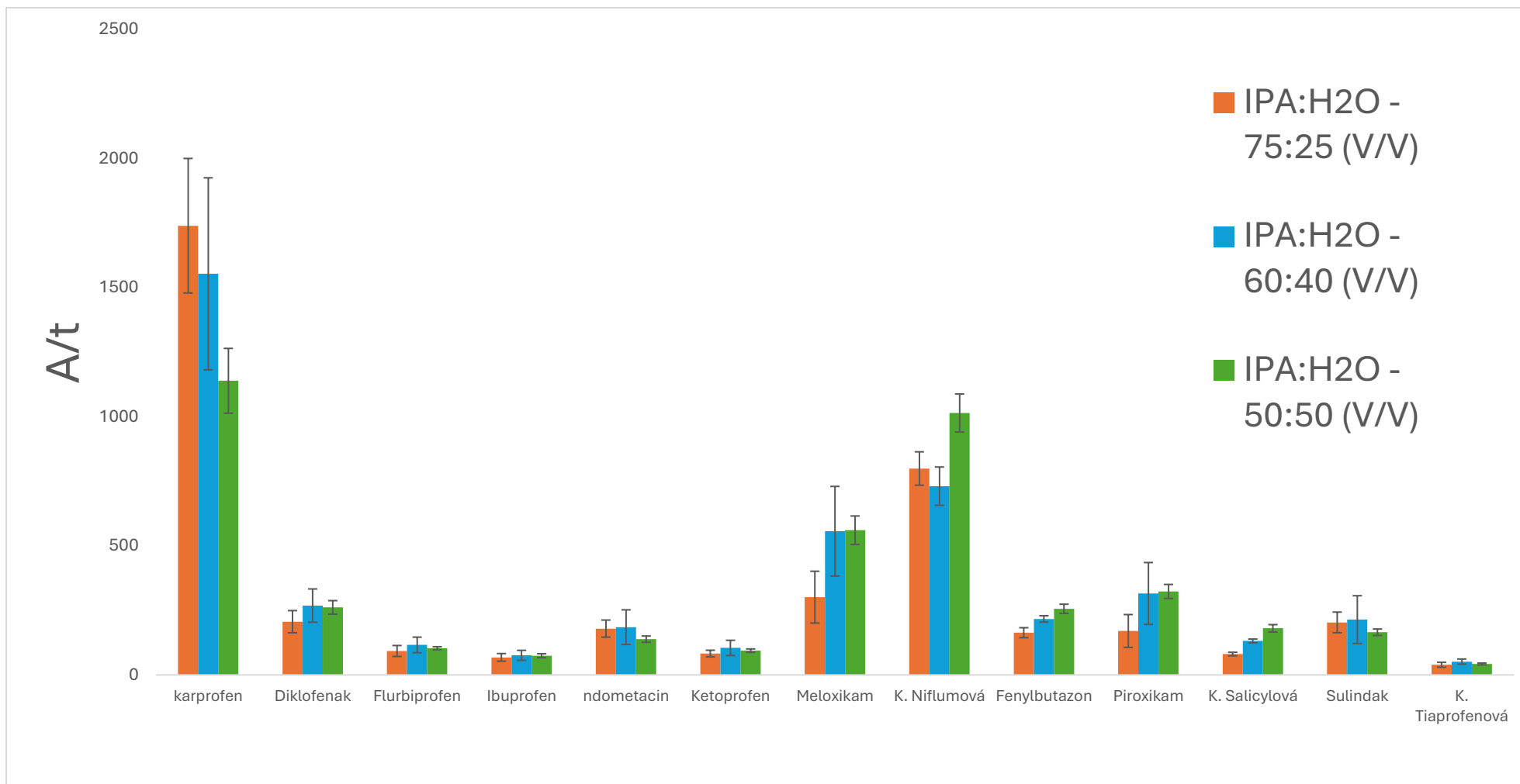
Poměr organické a vodné fáze v přídavné kapalině má velký vliv na ionizaci analytů. Dosavadní složení SL bylo 75:25 (v/v) isopropylalkohol: ultračistá voda. Tento poměr poskytoval dobrou odezvu a dobrou citlivost detekce. Další pokusy ovšem ukázaly, že tento poměr není pro nesteroidní antiflogistika vhodný z hlediska opakovatelnosti. Tento experiment zkoumal vliv tří různých poměrů IPA a H₂O; původní 75:25 (v/v), 60:40 (v/v) a vyvážený poměr 50:50 (v/v). Experiment byl spuštěn v sekvenci od nejnižšího poměru IPA po nejvyšší, každý poměr byl spuštěn v šesti replikátech (n=6), neboť se posuzovala především opakovatelnost analýzy. K experimentu byly využity standardy nesteroidních antiflogistik o koncentracích: 10 µg/ml (pro karprofen, flurbiprofen, ibuprofen, indometacin, ketoprofen, sulindak, k. tiaprofenovou), 2 µg/ml (pro diklofenak), 0,8 µg/ml (pro meloxicam a piroxikam) a 0,2 µg/ml (pro k. niflumovou, fenybutazon a k. salicylovou).

Intenzita signálu je u látek: ketoprofen, ibuprofen, kyselina tiaprofenová, flurbiprofen, diklofenak, sulindak a indometacin nejlepší při poměru 60:40 (v/v), který je následován poměrem 50:50 (v/v). U sulindaku a indometacinu je abundance signálu vyšší při poměru 75:25 (v/v) než při 50:50 (v/v).

Piroxikam, meloxikam, kyselina salicylová, fenylobutazon a kyselina niflumová měly nejlepší abundanci signálu při poměru 50:50 (v/v). Abundance signálu karprofenu byla nejlepší při poměru 75:25 (v/v) a zhoršovala se s klesajícím množstvím isopropylalkoholu v SL. U všech analytů zlepšoval vyrovnaný poměr isopropylalkoholu a vody opakovatelnost vyjádřenou jako RSD, s výjimkou kyseliny salicylové a fenylobutazonu (rozdíl 1-2 % ve prospěch poměru 60:40 (V/V)). pro další měření byla tedy vybrána přídatná kapalina skládající se z 50:50 poměru isopropylalkoholu: H₂O (*tabulka 7 a obrázek 20*).

Tabulka 7 Souhrnné srovnání vlivu přídatné kapaliny o složení IPA: H₂O ve třech různých poměrech na korigovanou plochu a opakovatelnost.

	Průměr A/t			SD			RSD		
	75:25	60:40	50:50	75:25	60:40	50:50	75:25	60:40	50:50
Karprofen	1740	1553	1139	260	372	125	15,0 %	23,9 %	11,0 %
Diklofenak	206	269	261	43	64	26	20,8 %	24,0 %	10,1 %
Flurbiprofen	93	116	103	21	30	6	22,8 %	26,0 %	5,6 %
Ibuprofen	68	76	74	15	19	8	21,8 %	25,4 %	10,4 %
Indometacin	179	185	139	33	67	12	18,5 %	36,2 %	8,8 %
Ketoprofen	83	105	94	13	29	7	15,4 %	28,1 %	7,1 %
Meloxikam	301	557	560	100	173	55	33,3 %	31,2 %	9,8 %
Kyselina niflumová	799	731	1014	65	74	74	8,1 %	10,1 %	7,3 %
Fenylobutazon	164	217	256	19	12	18	11,9 %	5,7 %	6,9 %
Piroxikam	170	315	323	64	120	27	37,4 %	38,0 %	8,4 %
Kyselina salicylová	81	132	181	7	7	14	8,6 %	5,5 %	7,9 %
Sulindak	204	214	165	40	93	13	19,7 %	43,2 %	7,6 %
Kyselina tiaprofenová	39	52	42	9	10	4	23,8 %	19,4 %	8,5 %



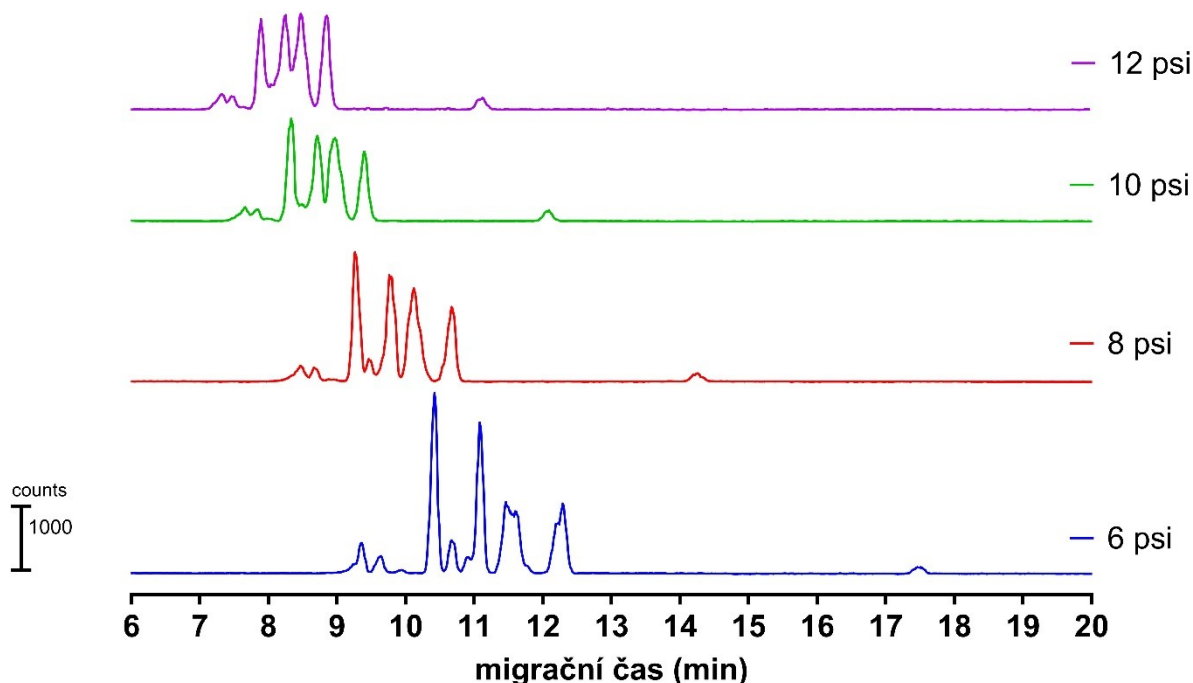
Obrázek 20 Porovnání korigovaných ploch A/t a opakovatelnosti odezvy NSAID při různém složení přídavné kapaliny. Na ose y je hodnota A/t , chybové úsečky vyjadřují RSD ($n=6$).

5.4.2. Optimalizace nebulizačního tlaku

Tlak nebulizačního plynu má vliv na tvorbu elektrospreje a ionizaci analytů, proto byly provedeny experimenty s cílem zjistit optimální hodnotu nebulizačního tlaku, který byl před těmito experimenty nastaven na 12 psi.

Rozsah testovaných nebulizačních tlaků byl 12 psi – 6 psi klesající vždy po 2 psi, zkoumal se tedy vliv na čtyřech různých úrovních. Každá z hodnot byla analyzována v replikátu šesti analýz (n=6). Byly použity roztoky standardů nesteroidních antiflogistik o koncentracích: 10 µg/ml (pro karprofen, flurbiprofen, ibuprofen, indometacin, ketoprofen, sulindak, k. tiaprofenovou), 2 µg/ml (pro diklofenak), 0,8 µg/ml (pro meloxicam a piroxikam) a 0,2 µg/ml (pro k. niflumovou, fenylobutazon a k. salicylovou) a roztok *Boswellia serrata* USP extraktu o koncentraci 360 µg/ml.

Při snižování nebulizačního tlaku nedošlo ani k zásadnímu zlepšení opakovatelnosti vyjádřené jako RSD, ani k zásadní změně abundance signálu (viz *tabulka 8*). Ze záznamu je patrná korelace mezi snižováním nebulizačního tlaku a zpomalením migračního času, což má za následek zvýšení rozlišení mezi jednotlivými analyty, viz elektroferogramy na *obrázku 21*. Tento pozorovaný efekt lze zdůvodnit snížením hydrodynamického toku BGE v separační kapiláře (v anglosaské literatuře označovaném jako „suction effect“) se snižujícím se nebulizačním tlakem [36]. Pro další práci bylo proto pokračováno s nebulizačním tlakem 6 psi.



Obrázek 21 Vliv nebulizačního tlaku na separaci. Zobrazeny jsou TIC záznamy.

Tabulka 8 Srovnání A/t a RSD u různých hodnot nebulizačního tlaku.

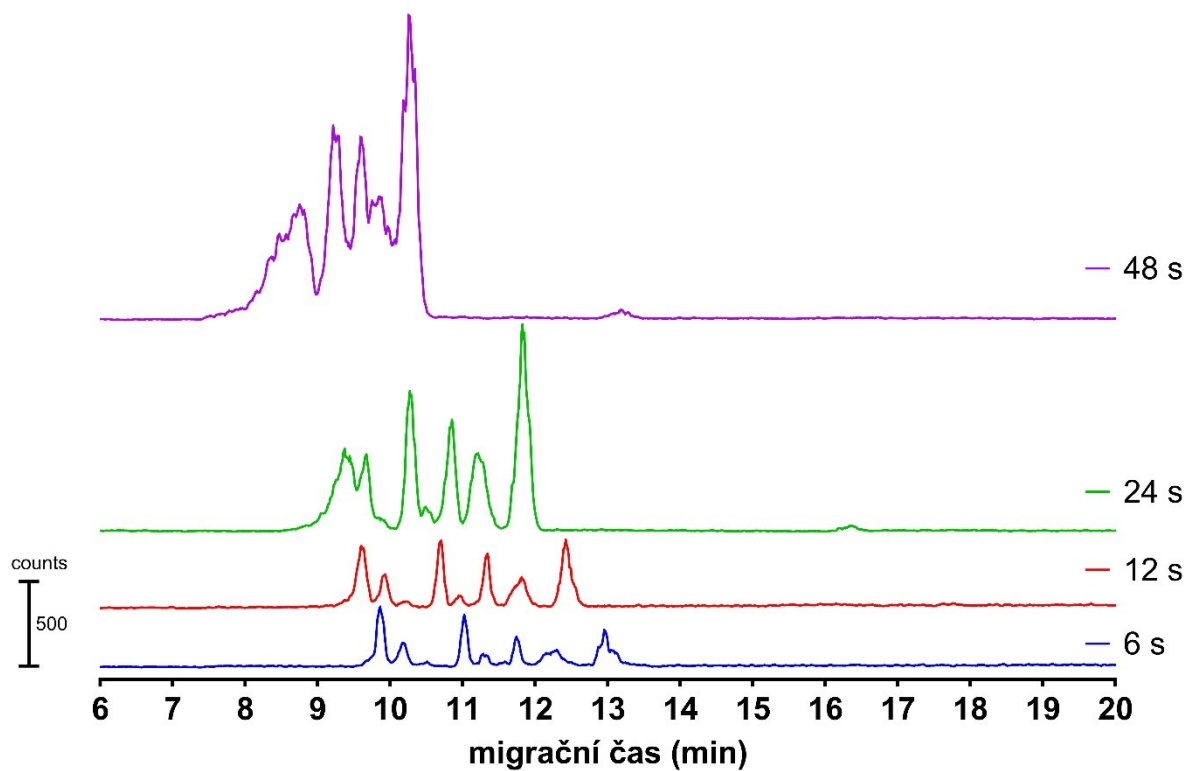
	A/t				RSD			
	6 psi	8 psi	10 psi	12 psi	6 psi	8 psi	10 psi	12 psi
Karprofen	1118	1134	1089	1128	11,0 %	4,0 %	8,6 %	11,6 %
Diklofenak	202	205	208	223	9,1 %	7,5 %	6,6 %	5,5 %
Flurbiprofen	88	82	83	88	13,2 %	6,8 %	8,7 %	7,5 %
Ibuprofen	66	58	53	61	6,4 %	11,0 %	9,7 %	11,5 %
Indometacin	171	123	122	133	13,3 %	8,1 %	11,0 %	13,6 %
Ketoprofen	85	70	74	84	10,6 %	8,5 %	11,1 %	8,6 %
Meloxicam	299	433	496	467	4,5 %	12,4 %	10,4 %	12,4 %
Kyselina niflumová	427	451	532	851	10,9 %	14,2 %	5,4 %	11,7 %
Fenylbutazon	109	140	169	220	8,2 %	14,1 %	6,1 %	8,4 %
Piroxikam	187	211	256	250	8,3 %	8,7 %	7,8 %	14,8 %
Kyselina salicylová	59	90	120	148	10,3 %	4,0 %	6,3 %	9,8 %
Sulindak	202	164	159	143	10,8 %	6,2 %	9,6 %	15,9 %
Kyselina tiaprofenová	40	38	38	39	6,7 %	7,5 %	7,4 %	7,7 %
KBA	324	230	206	202	6,4 %	4,5 %	6,7 %	10,2 %
A α /A β BA	140	110	126	150	11,4 %	7,5 %	3,9 %	9,3 %
α / β BA	95	68	75	84	5,9 %	6,8 %	5,6 %	11,8 %
AKBA	62	51	50	52	11,9 %	14,2 %	8,0 %	6,0 %

5.4.3. Optimalizace doby nástřiku vzorku

Doba nástřiku je velmi důležitý parametr ovlivňující citlivost metody. S delší dobou nástřiku se do kapiláry totiž dostane větší množství analytů. Pokud je ovšem doba nástřiku příliš dlouhá, nemusí se stihnout jednotlivé analyty dostatečně separovat. Původní doba nástřiku 6 s byla postupně zdvojnásobována až do hodnoty 48 s. Výsledná experimentální sekvence se skládala z analýz s dobou dávkování vzorku 6 s, 12 s, 24 s a 48 s. Každá z těchto hodnot byla v sekvenci spuštěna 6 \times (n=6). Byly použity roztoky standardů nesteroidních antiflogistik o koncentracích: 0,5 μ g/ml (pro karprofen, flurbiprofen, ibuprofen, indometacin, ketoprofen, sulindak, k. tiaprofenovou), 0,1 μ g/ml (pro diklofenak), 0,04 μ g/ml (pro meloxicam a piroxikam) a 0,001 μ g/ml (pro k. niflumovou, fenylbutazon a k. salicylovou) a roztok *Boswellia serrata* USP extraktu o koncentraci 500 μ g/ml.

Výsledky ukazují, že rostoucí doba nástřiku, resp. množství dávkovaného vzorku zhoršuje separaci, zároveň se také zkracuje migrační čas, protože čím déle je vzorek dávkován, tím větší část kapiláry zaplňuje. RSD průměrů A/t obecně při zvyšování času klesá, citlivost naopak roste. Tento jev lze předpokládat, protože je dávkováno větší množství vzorku, je také zároveň možné, že navíc dochází k zakoncentrování principem FASS. Při dávkování po dobu 48 s ovšem dochází k deformaci proudového záznamu, protože nezanedbatelný příspěvek málo vodivého rozpouštědla ze vzorku (methanol) způsobuje lokální změnu vodivosti ve větším objemu kapiláry, a to může mít negativní vliv na kvalitu separace vyjádřenou jako účinnost a rozlišení.

Pro další experimenty byla vybrána doba nástřiku 12 s jakožto kompromis mezi citlivostí, opakovatelností nástřiku a rozlišením separace analytů.



Obrázek 22 Srovnání TIC záznamů při zvyšující se době nástřiku. Při dávkování po dobu 48 s je jasně vidět negativní vliv délky doby nástřiku na separaci analytů.

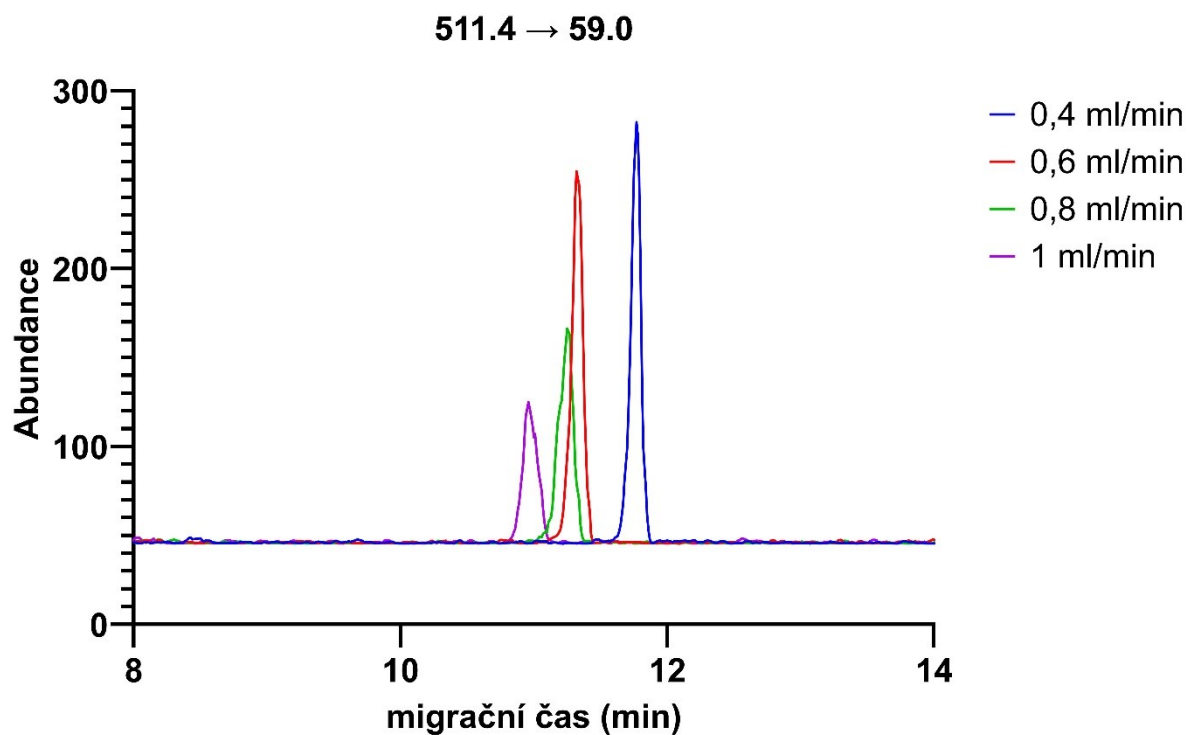
Tabulka 9 Srovnání průměrů A/t a RSD při různých dobách nástřiku vzorku

	A/t				RSD			
	6 s	12 s	24 s	48 s	6 s	12 s	24 s	48 s
Karprofen	80	158	463	991	20,5 %	2,1 %	6,8 %	3,1 %
Diklofenak	16	32	77	192	10,0 %	8,1 %	3,8 %	1,4 %
Flurbiprofen	7	15	38	84	22,1 %	13,6 %	5,6 %	1,9 %
Ibuprofen	6	12	28	52	12,6 %	18,8 %	2,6 %	8,4 %
Indometacin	14	27	60	138	26,0 %	12,2 %	5,6 %	10,2 %
Ketoprofen	7	14	34	75	16,3 %	23,6 %	10,4 %	11,5 %
Meloxicam	15	29	123	218	20,8 %	6,9 %	4,1 %	4,0 %
Kyselina niflumová	36	65	249	537	47,3 %	5,9 %	8,2 %	6,4 %
Fenylbutazon	6	10	43	57	40,8 %	4,9 %	7,7 %	8,3 %
Piroxikam	11	25	81	129	30,2 %	2,1 %	6,6 %	6,9 %
Kyselina salicylová	2	5	24	56	16,1 %	2,2 %	13,2 %	4,5 %
Sulindak	18	32	87	159	20,1 %	9,1 %	8,1 %	6,9 %
Kyselina tiaprofenová	3	7	15	36	21,5 %	5,6 %	3,8 %	1,7 %
KBA	237	373	733	1229	5,8 %	8,6 %	1,5 %	9,2 %
A α /A β BA	60	96	250	491	8,1 %	15,8 %	11,1 %	0,4 %
α / β BA	40	72	184	339	7,1 %	13,6 %	6,0 %	6,0 %
AKBA	45	84	198	358	2,1 %	3,8 %	2,8 %	3,1 %

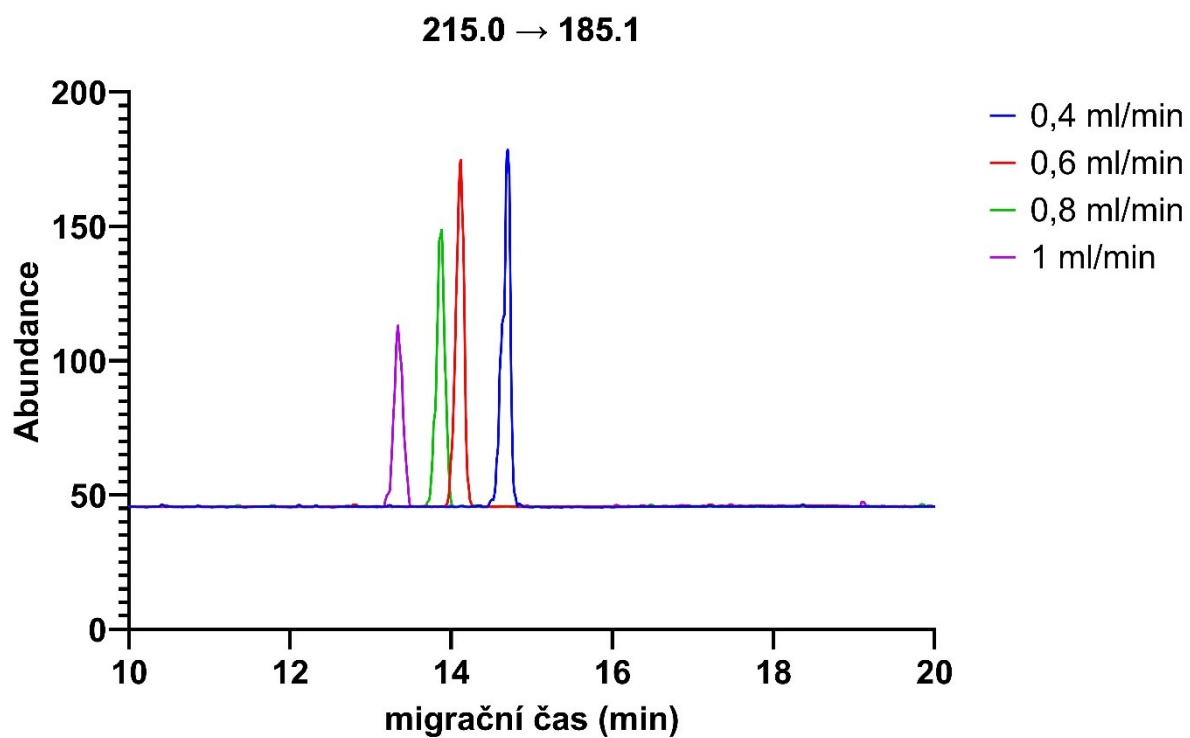
5.4.4. Optimalizace průtoku přidavné kapaliny při ionizaci

Jak bylo uvedeno v kapitole 3.3.6. další velmi důležitý parametr ovlivňující ionizaci při použití rozhraní s přidavnou tekutinou je rychlost průtoku přidavné kapaliny. Byl testován průtok v rozsahu od 0,4 ml/min do 1 ml/min s pravidelnými přírůstky po 0,2 ml/min. Experiment tedy tvořily 4 nastavení průtoku, každé po šesti opakováních (n=6). Použité vzorky byly *boswellia serrata* USP extrakt o koncentraci 1 mg/ml a roztoky standardů nesteroidních antiflogistik o koncentracích: 10 μ g/ml (pro karprofen, flurbiprofen, ibuprofen, indometacin, ketoprofen, sulindak, k. tiaprofenovou), 2 μ g/ml (pro diklofenak), 0,8 μ g/ml (pro meloxicam a piroxikam) a 0,2 μ g/ml (pro k. niflumovou, fenylbutazon a k. salicylovou).

Výsledky ukázaly variabilitu vlivu tohoto parametru pro různé analyty. Trendem ovšem bylo snižování citlivosti s rostoucím průtokem, což je pravděpodobně způsobeno větší mírou naředění analytů migrujících ze separační kapiláry přidavnou kapalinou [37]. Průtok 0,6 ml/min zvýšil opakovatelnost, resp. měl nejnižší RSD v porovnání s ostatními nastaveními u 10 látek ze 17 (zvýrazněno zelenou barvou v *tabulce 10*). Analogicky bylo při průtoku 0,8 ml/min dosaženo nejlepších hodnot RSD u 6 sloučenin. U krajních testovaných hodnot, tedy při 0,4 ml/min a 1 ml/min bylo RSD nejnižší jen u jednoho analytu. Se zvyšujícím průtokem se také marginálně snižuje migrační čas. V rámci snahy o co nejlepší opakovatelnost byl pro další experimenty vybrán průtok 0,6 ml/min, protože mírný pokles v citlivosti metody byl vyhodnocen jako akceptovatelný (viz *tabulka 10 a obrázek 23 a obrázek 24*).



Obrázek 23 Srovnání SRM záznamů kvantitativního přechodu AKBA s rozdílným průtokem přídavné kapaliny



Obrázek 24 Srovnání SRM záznamů kvantitativního přechodu kyseliny tiaprofenové s rozdílným průtokem přídavné kapaliny

Tabulka 10 Srovnání A/t a RSD u různých průtoků SL. Žluté buňky v A/t sloupcích indikují u kterého průtoku byla nejvyšší hodnota A/t. Zelené buňky u RSD sloupců indikují u kterého průtoku byla nejnižší hodnota RSD.

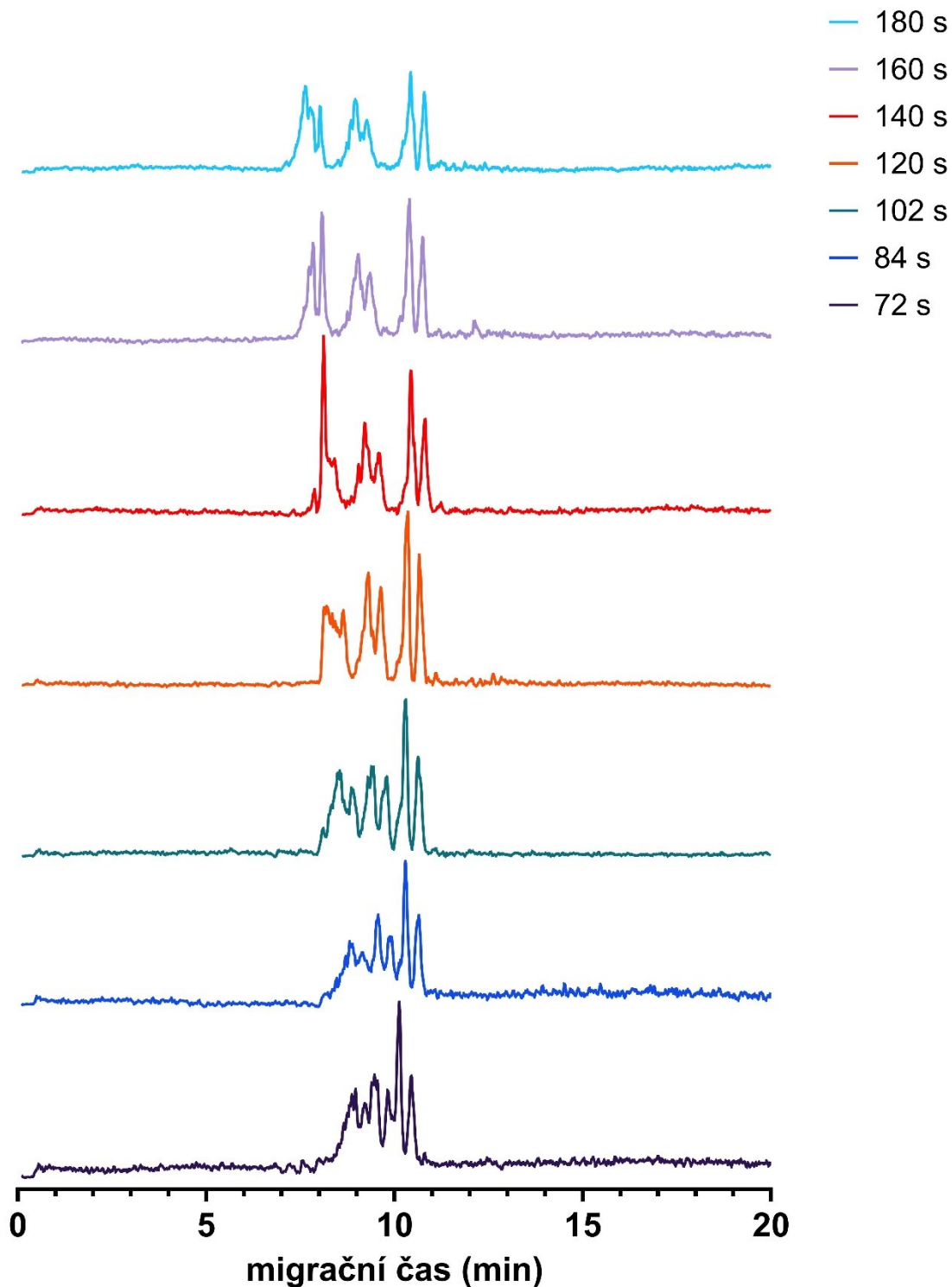
	A/t				RSD			
	0,4 ml/min	0,6 ml/min	0,8 ml/min	1 ml/min	0,4 ml/min	0,6 ml/min	0,8 ml/min	1 ml/min
Karprofen	1861	1598	1577	1195	13,2 %	8,0 %	11,5 %	9,4 %
Diklofenak	314	303	295	249	15,0 %	9,1 %	13,7 %	10,8 %
Flurbiprofen	153	148	134	119	13,5 %	11,9 %	14,6 %	11,9 %
Ibuprofen	122	111	97	88	18,7 %	10,9 %	8,7 %	12,4 %
Indometacin	242	237	211	171	11,8 %	9,7 %	12,6 %	18,0 %
Ketoprofen	147	147	130	118	10,5 %	6,6 %	11,6 %	9,2 %
Meloxicam	417	414	452	251	11,2 %	4,2 %	13,3 %	8,8 %
Kyselina niflumová	333	406	299	331	10,7 %	12,1 %	6,6 %	6,3 %
Fenylbutazon	141	130	144	85	13,0 %	7,9 %	5,6 %	9,3 %
Piroxikam	292	313	310	192	14,0 %	2,9 %	19,6 %	7,7 %
Kyselina salicylová	57	60	61	62	9,4 %	10,9 %	7,1 %	10,9 %
Sulindak	351	356	315	276	17,2 %	12,1 %	10,0 %	12,7 %
Kyselina tiaprofenová	64	65	63	54	11,7 %	7,6 %	12,4 %	15,3 %
KBA	646	602	579	468	14,5 %	15,8 %	12,2 %	16,3 %
A α /A β BA	243	251	251	215	9,2 %	15,1 %	9,2 %	15,4 %
α / β BA	170	231	236	204	17,7 %	9,2 %	10,9 %	15,4 %
AKBA	111	100	99	80	8,1 %	12,4 %	14,2 %	17,0 %

5.5. Multisegmentová analýza

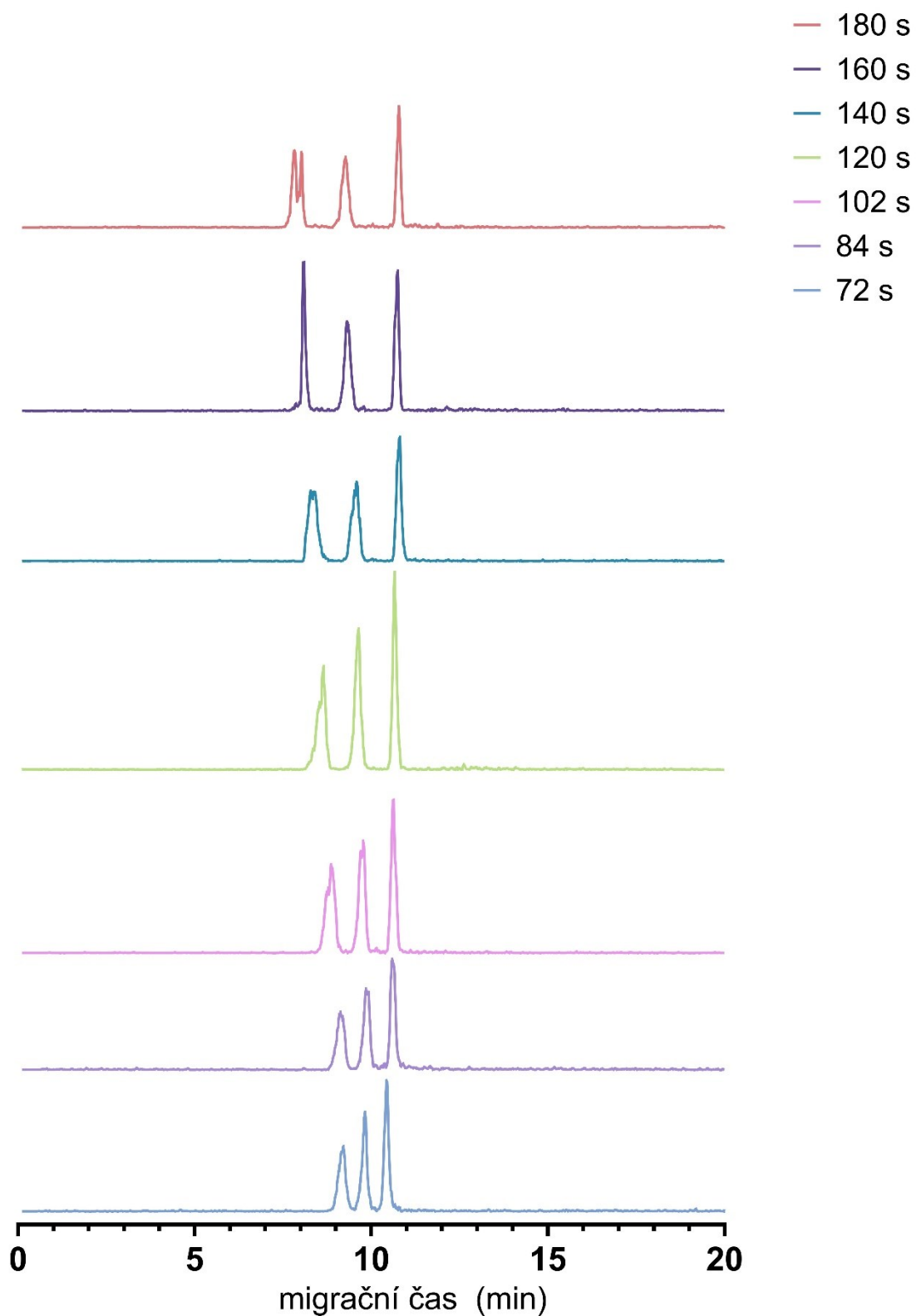
Jako jedno z možných řešení pro zlepšení opakovatelnosti metody mezi jednotlivými nástřiky byla otestována kapilární elektroforéza s hmotností detekcí s multisegmentovým nástřikem (MSI-CE-MS). Inspirací pro tyto experimenty byla předchozí práce Azab a kolektivu [32].

V tomto experimentu byl testován multisegmentový nástřik s cílem zjistit, zdali je lepší opakovatelnost metody mezi replikáty jednoho vzorku s konvenčním dávkováním, nebo několikanásobným dávkováním vzorku v rámci jedné multisegmentové analýzy. Experiment spočíval v nástřiku třech segmentů vzorku po dobu 12 s za předem optimalizovaných podmínek. Proměnnou zde byl čas potřebný pro nadávkování základního elektrolytu pro oddělení jednotlivých segmentů vzorku. V prvním pokusu s dávkováním zóny BGE po dobu 24 s mezi segmenty vzorku zdaleka nedošlo k separaci jednotlivých segmentů. V druhém pokusu proto byla prodloužena doba nástřiku základního elektrolytu v rozmezí 36 s–84 s nárůsty po 12 s. Výsledky tohoto pokusu ukázaly, že je žádoucí ještě další prodloužení zóny BGE mezi jednotlivými segmenty vzorku. Následně byla zóna BGE dávkována po dobu 72 s, 84 s, 102 s, 120 s, 140 s, 160 s a 180 s. Pro experimenty byl nejprve použit roztok *Boswellia serrata* USP extraktu o koncentraci 100 μ g/ml.

Přijatelné rozlišení mezi jednotlivými vzorky bylo dosaženo až při nadávkování zóny BGE po dobu 120 s (viz obrázek 25 a příslušný TIC záznam). Se zvětšujícími zónami oddělujícího BGE ovšem dochází ke štěpení píků prvního segmentu analytů vzorku viz SRM záznam $A\alpha/A\beta$ BA na obrázku 26.



Obrázek 25 Srovnání TIC záznamů boswellových kyselin multisegmentové analýzy s nástřikem oddělující zóny základního elektrolytu po dobu v rozmezí od 72 s po 180 s.



Obrázek 26 Srovnání SRM záznamu kyselin acetyl-alfa/acetyl-beta-boswellových s nástřikem oddělující zóny základního elektrolytu po dobu v rozmezí od 72 s po 180 s.

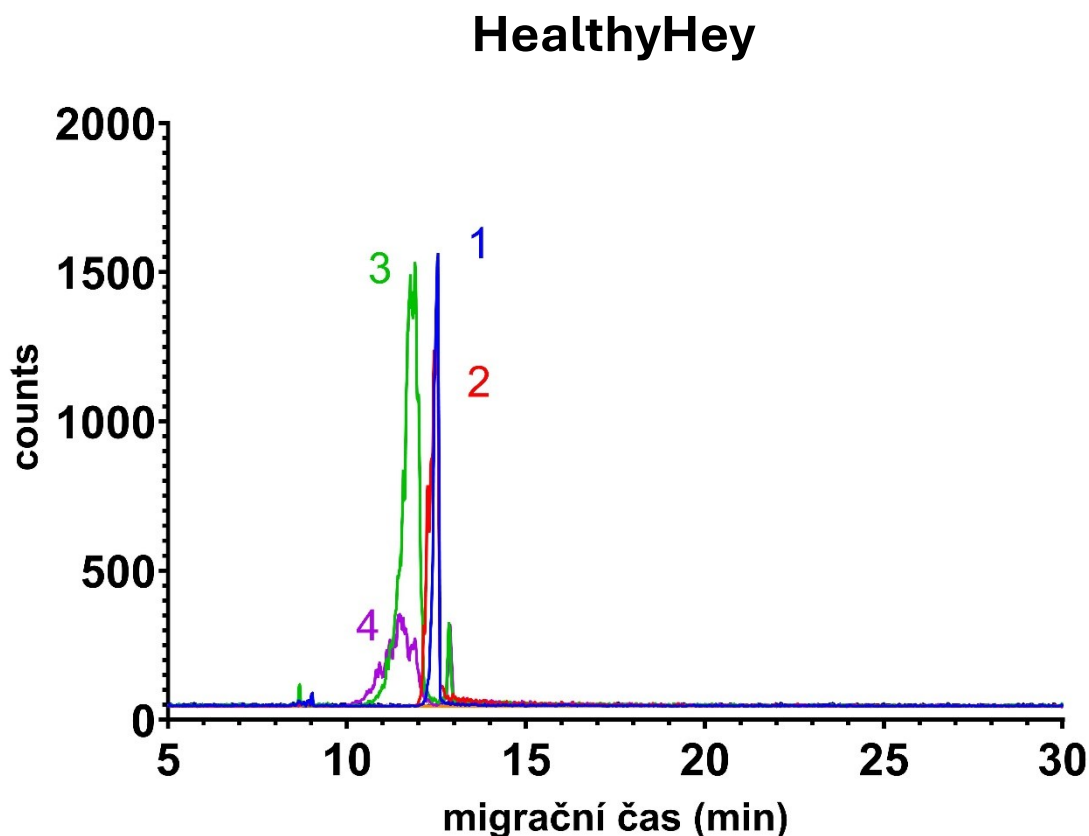
Tabulka 11 Srovnání multisegmentové analýzy pro A α BA/A β BA. A/t je průměrná hodnota pro tři píky v jednom multisegmentovém experimentu.

Aa/AbBA		V jedné analýze		
		A/t	SD	RSD
72 s	Nástřík 1	135	11	7,9 %
	Nástřík 2	119	12	10,1 %
	Nástřík 3	126	7	5,5 %
84 s	Nástřík 1	130	6	4,8 %
	Nástřík 2	128	6	4,8 %
	Nástřík 3	141	5	3,4 %
102 s	Nástřík 1	186	22	12,0 %
	Nástřík 2	180	21	11,7 %
	Nástřík 3	194	33	17,0 %
120 s	Nástřík 1	202	16	7,9 %
	Nástřík 2	195	23	11,6 %
	Nástřík 3	181	16	9,0 %
140 s	Nástřík 1	161	36	22,2 %
	Nástřík 2	157	25	16,1 %
	Nástřík 3	160	28	17,2 %
160 s	Nástřík 1	151	15	10,3 %
	Nástřík 2	153	18	12 %
	Nástřík 3	141	24	17 %
180 s	Nástřík 1	142	40	28 %
	Nástřík 2	141	37	26 %
	Nástřík 3	145	39	27 %

K zásadnímu zlepšení opakovatelnosti tímto způsobem analýzy nedošlo. Naopak se se zvyšující se délkou dávkování BGE mezi segmenty vzorku opakovatelnost zhoršuje. To je pravděpodobně způsobeno přílišným naplněním kapiláry, přičemž elektroforetický systém není schopný spolehlivě a opakovatelně separovat analyty, protože pro první a druhý segment vzorku je snižená celková doba separace. U kratších zón BGE s přijatelnou opakovatelností SRM záznamů je zase zhoršená celková separace všech analytů na záznamu celkového proudu iontů a mohlo by tak dojít k překryvu izobarických iontů, které MS nedovede rozlišit. K úplné separaci jednotlivých vzorků docházelo až od 140–160 s dávkování zóny BGE. Vzhledem k množství sledovaných analytů není možné metodu použít, protože i při velmi dlouhé zóně BGE by se nesteroidní antiflogistika jednoho nástříku dostávala do MS spolu se zónou dalšího nástříku. V metodě je tedy ve výsledku dále používaný klasický singulární nástřík vzorku do kapiláry.

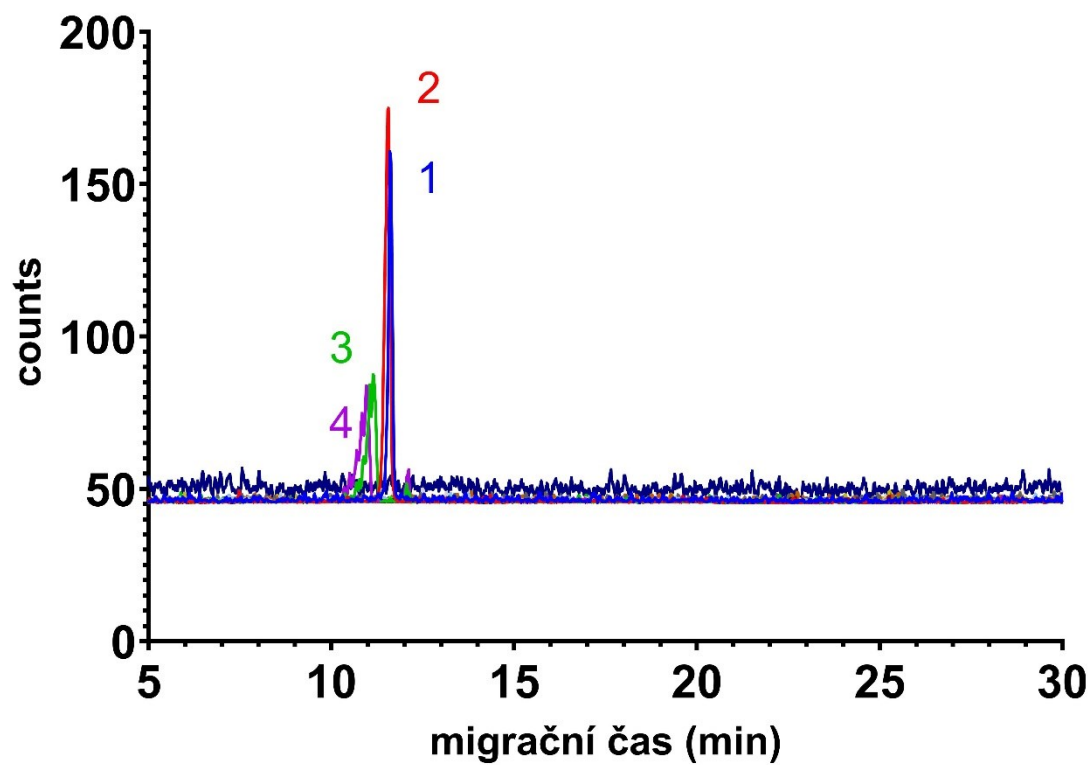
5.6. Pilotní analýza doplňků stravy obsahující boswellové kyseliny

Metodou vyvíjenou a optimalizovanou v této práci byly předběžně analyzovány tři doplňky stravy s obsahem boswellových kyselin. Dva z těchto doplňků stravy byly dostupné skrze obchodníky prodávající tyto doplňky v České republice přes internet, z nichž jeden byl vyráběn na Ukrajině a druhý v USA. Třetí doplněk pochází z Indie. Doplňky stravy byly analyzovány při nastavení iontového zdroje optimalizovaného pomocí DoE (viz optimalizace), době nástřiku vzorku po dobu 12 s při 50 mbar, nebulizačním tlaku 6 psi. Přídavná kapalina byla tvořena směsí isopropylalkoholu a ultračisté vody v poměru 50:50 (v/v). Průtok SL byl nastaven na 0,6 ml/min. Sledovány byly SRM přechody boswellových kyselin, a kvantitativní i kvalitativní přechody nesteroidních antiflogistik. Vzorky byly extrahovány extrakčním postupem A2 (viz kapitola 4.3.6).



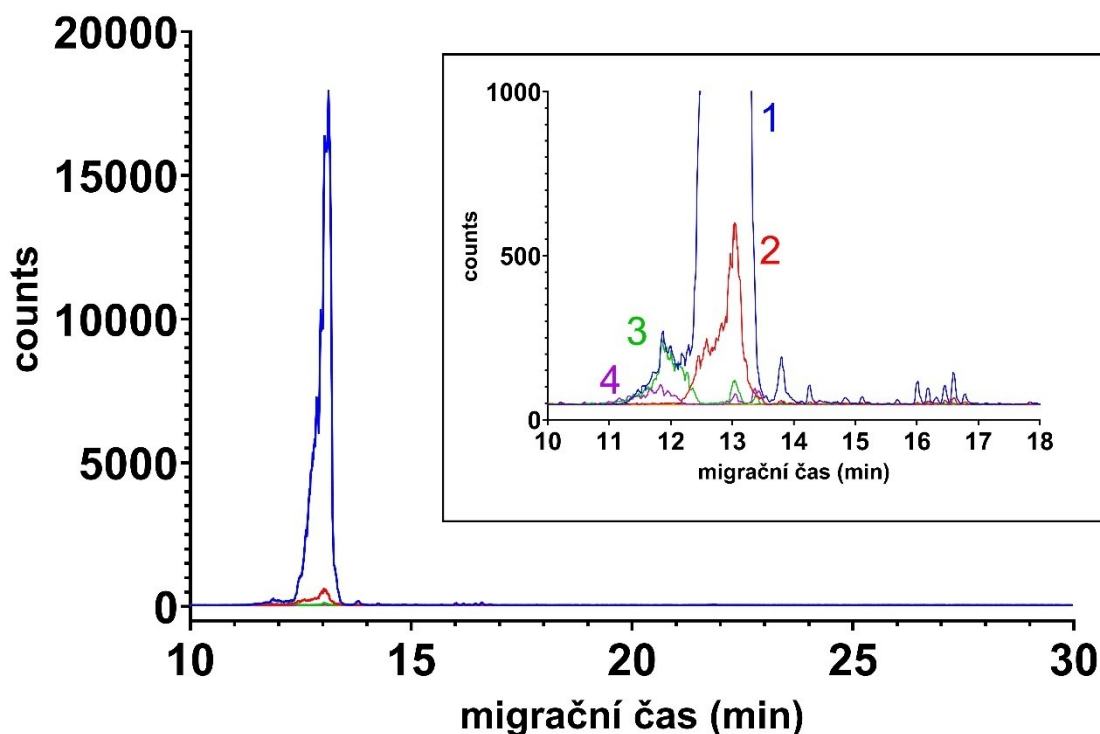
Obrázek 27 SRM záznam všech přechodů (viz příloha 8.2) u doplňku stravy společnosti HealthyHey. Označení píků: 1 – AKBA; 2 – A α /A β BA; 3 – KBA; 4 – α / β BA

ELIT-PHARM



Obrázek 28 SRM záznam všech přechodů (viz příloha 8.2) u doplňku stravy společnosti ELIT-PHARM. Označení píků: 1 – AKBA; 2 – A α /A β BA; 3 – KBA; 4 – α / β BA

Swanson



Obrázek 29 SRM záznam všech přechodů (viz příloha 8.2) u doplňku stravy společnosti Swanson. Označení píků: 1 – AKBA; 2 – $A\alpha/A\beta$ BA; 3 – KBA; 4 – α/β BA

V žádném doplňku stravy nebyly detekovány nedeklarované přísady nesteroidních antiflogistik zahrnuté ve vyvinuté metodě. Avšak doplněk stravy společnosti ELIT-PHARM obsahoval pouze velmi malé množství boswellových kyselin v porovnání s přípravkem společnosti HeathyHey. Vezmeme-li v úvahu rozdílné dávkování přípravku ELIT-PHARM, kdy se užívají 3 tablety denně, v porovnání s jednou tabletou denně u přípravku společnosti HeathyHey, i tak se celkový obsah boswellových kyselin vztahených na denní dávku jeví v přípravku ELIT-PHARM jako nižší. Tyto předběžné závěry by ale bylo potřeba ověřit až bude metoda plně validována. Přípravek firmy Swanson obsahoval také malé množství boswellových kyselin s výjimkou AKBA, které obsahoval cca 40× víc než zbylých boswellových kyselin, což se dá očekávat vzhledem k tomu, že tento přípravek je dle dat výrobce standardizován na 30 % AKBA. Tyto pilotní data ukazují potenciál nově vyvinuté metody pro kontrolu jakosti doplňků stravy s obsahem extraktu *Boswellia serrata*. A to jak z pohledu poměru různých forem boswellových kyselin, tak i z hlediska přísady nedeklarovaných složek jako jsou třeba NSAID.

6. Závěr

V této diplomové práci je popsána optimalizace vybraných parametrů pro novou CE-MS metodu umožňující současnou separaci boswellových kyselin a potenciálních adulterantů ze skupiny NSAID. Jedná se o první takovou metodu. Dosud nebyly boswellové kyseliny pomocí CE (s výjimkou CEC) separovány.

Nastavení parametrů iontového zdroje bylo optimalizováno pomocí DoE. Sledované faktory byly napětí na ESI kapiláře, napětí na trysce, napětí vysokotlaké a nízkotlaké iontové nálevky (iontová optika), průtok a teplota sušícího plynu a teplota a průtok přídavného plynu. Optimalizovanými odezvami byly: (1) korigovaná plocha; (2) poměr signálu k šumu.

Screening byl proveden frakčním faktoriálním designem a ukázal, že nejvíce signifikantními faktory byly: napětí na ESI kapiláře, napětí na trysce a napětí nízkotlaké a vysokotlaké iontové nálevky. Tyto faktory byly následně optimalizovány pomocí centrálně kompozitního designu a bylo nalezeno kompromisní optimální nastavení parametrů iontového zdroje pro všech 32 odezev. Konečná nastavení iontového zdroje pro analýzu v negativním módu jsou: napětí na ESI kapiláře: 3750 V; napětí na trysce: 2000 V; napětí vysokotlaké iontové nálevky: 199 V; napětí nízkotlaké iontové nálevky: 112 V; průtok sušícího plynu: 11 l/min; teplota sušícího plynu: 120 °C; průtok přídavného plynu: 4 l/min; teplota přídavného plynu: 110 °C.

Mezi testovanými extrakčními postupy nebyl pozorován zásadní rozdíl, a tak byl vybrán postup A z důvodu snadnějšího provedení.

Dále byl vybrán optimální poměr složení přídavné kapaliny, který je 50 % isopropylalkoholu v ultračisté vodě. Optimální průtok přídavné kapaliny byl stanoven na 0,6 ml/min. Byla testována doba nástřiku v rozsahu od 6 do 48 s. Vybrána byla nakonec doba nástřiku 12 s. Tyto experimenty vedly ke zlepšení opakovatelnosti metody. Tlak nebulizéru byl změněn z 12 psi na 6 psi, což vedlo ke zlepšení rozlišení.

Byla otestována metoda multisegmentové analýzy, při které ovšem nedošlo ke zlepšení parametrů hodnocení metody, zvláště opakovatelnosti. Proto dále tento metodologický přístup nebyl používán.

Byla provedena pilotní analýza tří doplňků stravy s deklarovaným obsahem boswellových kyselin. Adulterace vybranými nesteroidními antiflogistiky nebyla zjištěna. V příštích analýzách by bylo vhodné provádět také „full-scan“ analýzu, aby mohly být detekovány i jiné hypotetické adulterace. Zajímavé by bylo převedení stávající metody na hmotnostní analyzátor Q-TOF, používaný k hmotnostní spektrometrii s vysokým rozlišením (HRMS). CE-Q-TOF analýza by totiž měla odhalit více typů adulterací; případně i další složky, které se v extraktu *Boswellia serrata* mohou přirozeně nacházet.

V budoucnu bude třeba metodu validovat včetně stanovení matricových efektů, správnosti a přesnosti metody. Jelikož je stále potřeba zlepšit opakovatelnost metody, je nutné do metody zahrnout izotopicky značené vnitřní standardy nesteroidních antiflogistik. Izotopicky značené vnitřní standardy boswellových kyselin nejsou komerčně dostupné.

Metoda by mohla být rozšířena o steroidní protizánětlivá léčiva, která jsou strukturně podobná boswellovým kyselinám a jejich přítomnost jako adulterantů v rostlinných přípravcích byla detekována [3], [4], [5].

Další z možných cest a cílů budoucího vývoje metody je kompletní separace boswellových kyselin, neboť současná metoda není schopna separovat páry α BA/ β BA a A α BA/A β BA. Kromě toho tyto doplňky stravy mohou obsahovat i jiné terpenické struktury, které by vylepšená selektivita metody mohla umožnit detekovat.

Na závěr by také měly být zváženy možnosti analýzy polykompozitních doplňků stravy se substráty jako např. chondroitin-sulfát, či glukosamin-sulfát, které se často vyskytují v doplňcích stravy cílící na pohybový aparát a deklarující zároveň určitý obsah boswellových kyselin.

7. Použitá literatura

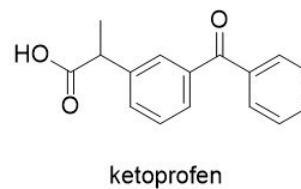
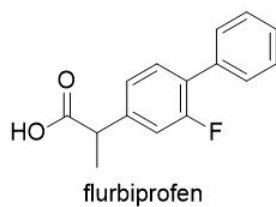
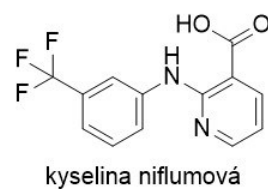
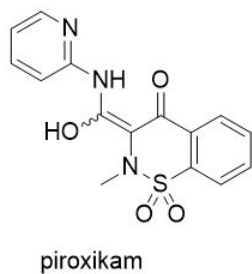
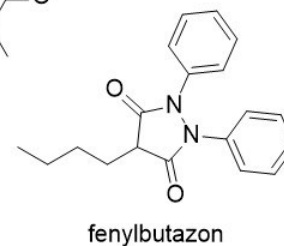
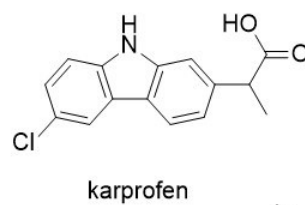
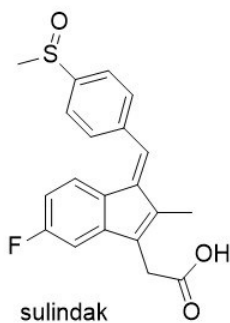
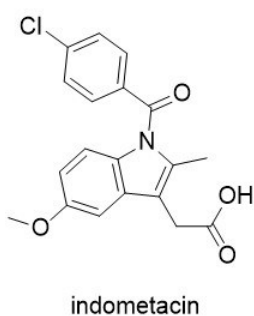
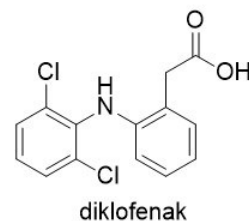
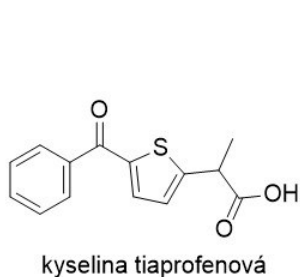
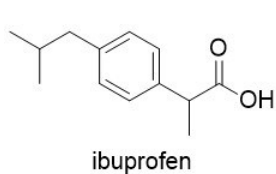
- [1] T. Efferth and F. Oesch, “Anti-inflammatory and anti-cancer activities of frankincense: Targets, treatments and toxicities,” *Semin Cancer Biol*, vol. 80, pp. 39–57, 2022, doi: 10.1016/j.semcancer.2020.01.015.
- [2] C. L. C. Almeida-Da-silva *et al.*, “Effects of Frankincense Compounds on Infection, Inflammation, and Oral Health,” *Molecules*, vol. 27, no. 13, 2022, doi: 10.3390/molecules27134174.
- [3] L. Vaclavik, A. J. Krynitsky, and J. I. Rader, “Mass spectrometric analysis of pharmaceutical adulterants in products labeled as botanical dietary supplements or herbal remedies: A review,” *Anal Bioanal Chem*, vol. 406, no. 27, pp. 6767–6790, 2014, doi: 10.1007/s00216-014-8159-z.
- [4] A. A. Savaliya, B. Prasad, D. K. Rajjada, and S. Singh, “Detection and characterization of synthetic steroidal and non-steroidal anti-inflammatory drugs in Indian ayurvedic/herbal products using LC-MS/TOF,” *Drug Test Anal*, vol. 1, no. 8, pp. 372–381, 2009, doi: 10.1002/dta.75.
- [5] C. Y. Zhang, D. L. Chang, and S. L. Chen, “Simultaneous determination of five nonsteroidal anti-inflammatory drugs and two glucocorticoids in adulterated traditional herbal medicines for the treatment of rheumatism,” *Anal Lett*, vol. 44, no. 10, pp. 1769–1782, 2011, doi: 10.1080/00032719.2010.526268.
- [6] J. Meins, C. Artaria, A. Riva, P. Morazzoni, M. Schubert-Zsilavec, and M. Abdel-Tawab, “Survey on the Quality of the Top-Selling European and American Botanical Dietary Supplements Containing Boswellic Acids,” *Planta Med*, vol. 82, no. 6, pp. 573–579, 2016, doi: 10.1055/s-0042-103497.
- [7] L. Jahodář, *Farmaceuticky významné semenné rostliny*. Praha: Karolinum, 2022.
- [8] Council of Europe, *European Pharmacopoeia*, 11th ed. Strasbourg, France: Council of Europe, 2023.
- [9] The United States Pharmacopeial Convention, *The United States Pharmacopeia - National Formulary*; Rockville, Maryland, USA, 2023.
- [10] A. Al-Harrasi, A. L. Khan, N. U. Rehman, and R. Csuk, “Biosynthetic diversity in triterpene cyclization within the *Boswellia* genus,” *Phytochemistry*, vol. 184, p. 112660, Apr. 2021, doi: 10.1016/J.PHYTOCHEM.2021.112660.
- [11] D. Kosolapov, P. Jáč, P. Riasová, J. Poušková, M. Polášek, and L. Nováková, “Advances and Challenges in the Analysis of Boswellic Acids by Separation Methods,” *Crit Rev Anal Chem*, 2024, doi: 10.1080/10408347.2024.2312502.
- [12] M. Ganzera, W. M. Stöggl, G. K. Bonn, I. A. Khan, and H. Stuppner, “Capillary electrochromatography of boswellic acids in *Boswellia serrata* Roxb.,” *J Sep Sci*, vol. 26, no. 15–16, pp. 1383–1388, 2003, doi: 10.1002/jssc.200301562.
- [13] C. Xu, B. Wang, Y. Pu, J. Tao, and T. Zhang, “Techniques for the analysis of pentacyclic triterpenoids in medicinal plants,” *J Sep Sci*, vol. 41, no. 1, pp. 6–19, 2018, doi: 10.1002/jssc.201700201.

- [14] J. Švihovec *et al.*, *Farmakologie*, 1. vydání. Praha: Grada Publishing, 2018.
- [15] M. Fillet, I. Bechet, V. Piette, and J. Crommen, "Separation of nonsteroidal anti-inflammatory drugs by capillary electrophoresis using nonaqueous electrolytes," *Electrophoresis*, vol. 20, no. 9, pp. 1907–1915, Jul. 1999, doi: 10.1002/(SICI)1522-2683(19990701)20:9<1907::AID-ELPS1907>3.0.CO;2-L.
- [16] A. Macià, F. Borrull, M. Calull, and C. Aguilar, "Capillary electrophoresis for the analysis of non-steroidal anti-inflammatory drugs," *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, vol. 26, no. 2, pp. 133–153, 2007, doi: 10.1016/j.trac.2006.11.011.
- [17] G. Bonvin, J. Schappler, and S. Rudaz, "Non-aqueous capillary electrophoresis for the analysis of acidic compounds using negative electrospray ionization mass spectrometry," *J Chromatogr A*, vol. 1323, pp. 163–173, 2014, doi: 10.1016/j.chroma.2013.11.011.
- [18] Lauer H. H. and Rozing G. P., *High Performance Capillary Electrophoresis. A primer.*, Second. Agilent Technologies, 2014. Accessed: Sep. 01, 2024. [Online]. Available: <https://www.agilent.com/cs/library/primers/public/5990-3777EN.pdf>
- [19] D. A. Skoog *et al.*, *Analytická chemie*, Vydání: první. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2019.
- [20] G. De Jong, *Capillary electrophoresis - mass spectrometry (CE-MS): principles and applications*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., 2016.
- [21] R. Karlíček, *Analytická chemie pro farmaceuty*, 4., nezměn. vyd. in Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. Praha: Karolinum, 2013.
- [22] "Agilent iFunnel Technology | Agilent." Accessed: Sep. 03, 2024. [Online]. Available: <https://www.agilent.com/en/video/ifunnel-video>
- [23] Rozing G., Brunnert H., Aldridge S., and Wenz C., *CE/MS Principles and Practices. A guidebook for novices and practitioners*. USA: Agilent Technologies, 2019. Accessed: Sep. 01, 2024. [Online]. Available: <https://www.agilent.com/cs/library/primers/public/guidebook-CEMS-principles-7100-CE-5994-0112EN-agilent.pdf>
- [24] B. H. Lapizco-Encinas, Y. V. Zhang, P. P. Gqamana, J. Lavicka, and F. Foret, "Capillary electrophoresis as a sample separation step to mass spectrometry analysis: A primer," *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, vol. 164, 2023, doi: 10.1016/j.trac.2023.117093.
- [25] Mordehai A. and Fjeldstead J., "Agilent Jet Stream Thermal Gradient Focusing Technology. Technical note.," 2009, *Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA*. Accessed: Sep. 01, 2024. [Online]. Available: https://www.agilent.com/cs/library/technicaloverviews/public/5990-3494en_lo%20CMS.pdf
- [26] "CESI 8000 PLUS HIGH PERFORMANCE SEPARATION – ESI MODULE CESI 8000.," 2018, *AB Sciex, Framingham, MA 01701 USA*. Accessed: Sep. 01, 2024. [Online]. Available: <https://www.sciex.com/content/dam/SCIEX/pdf/brochures/cesi-8000-brochure-2018.pdf>

- [27] B. Benedetti, V. Caponigro, and F. Ardini, "Experimental Design Step by Step: A Practical Guide for Beginners," *Crit Rev Anal Chem*, vol. 52, no. 5, pp. 1015–1028, 2022, doi: 10.1080/10408347.2020.1848517.
- [28] L. Peng *et al.*, "Design of experiment techniques for the optimization of chromatographic analysis conditions: A review," *Electrophoresis*, vol. 43, no. 18–19, pp. 1882–1898, 2022, doi: 10.1002/elps.202200072.
- [29] C. M. Riley, T. W. Rosanske, and S. R. R. Riley, *Specification of drug substances and products : development and validation of analytical methods*, 2nd ed. in Progress in Pharmaceutical and Biomedical Analysis. Amsterdam: Elsevier, 2014.
- [30] Kosolapov D., Nováková L., and Jáč P., "DEVELOPMENT OF CE-MS METHOD FOR THE SIMULTANEOUS ANALYSIS OF BOSWELLIC ACIDS AND NONSTEROIDAL ANTI - INFLAMMATORY DRUGS," in *13th Postgraduate and Postdoc Conference*, Hradec Králové, Feb. 2023. Accessed: Sep. 01, 2024. [Online]. Available: <https://www.faf.cuni.cz/PGS-PostDoc-Conference-2023/>
- [31] M. Yamamoto, R. Ly, B. Gill, Y. Zhu, J. Moran-Mirabal, and P. Britz-McKibbin, "Robust and High-Throughput Method for Anionic Metabolite Profiling: Preventing Polyimide Aminolysis and Capillary Breakages under Alkaline Conditions in Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry," *Anal Chem*, vol. 88, no. 21, pp. 10710–10719, 2016, doi: 10.1021/acs.analchem.6b03269.
- [32] S. Azab, R. Ly, and P. Britz-McKibbin, "Robust Method for High-Throughput Screening of Fatty Acids by Multisegment Injection-Nonaqueous Capillary Electrophoresis–Mass Spectrometry with Stringent Quality Control," *Anal Chem*, vol. 91, no. 3, pp. 2329–2336, Feb. 2019, doi: 10.1021/acs.analchem.8b05054.
- [33] J. Poušková, "Možnosti kapilární elektroforézy pro separaci boswellových kyselin," 2019, *Diplomová práce (Mgr.)–Univerzita Karlova. Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2019.*
- [34] S. A. Shah, I. S. Rathod, B. N. Suhagia, S. S. Pandya, and V. K. Parmar, "A simple high-performance liquid chromatographic method for the estimation of boswellic acids from the market formulations containing *Boswellia serrata* extract," *J Chromatogr Sci*, vol. 46, no. 8, pp. 735–738, 2008, doi: 10.1093/chromsci/46.8.735.
- [35] M. Ganzera and I. A. Khan, "A reversed phase high performance liquid chromatography method for the analysis of boswellic acids in *Boswellia serrata*," *Planta Med*, vol. 67, no. 8, pp. 778–780, 2001, doi: 10.1055/s-2001-18346.
- [36] M. Mokaddem, P. Gareil, J.-E. Belgaied, and A. Varenne, "A new insight into suction and dilution effects in capillary electrophoresis coupled to mass spectrometry via an electrospray ionization interface. Part I-Suction effect," *Electrophoresis*, vol. 29, no. 10, pp. 1957–1964, 2008, doi: 10.1002/elps.200700880.
- [37] M. Mokaddem, P. Gareil, J.-E. Belgaied, and A. Varenne, "New insight into suction and dilution effects in CE coupled to MS via an ESI interface. II - Dilution effect," *Electrophoresis*, vol. 30, no. 10, pp. 1692–1697, 2009, doi: 10.1002/elps.200800480.

8. Příloha

8.1. Chemické struktury nesteroidních antiflogistik monitorovaných v této práci

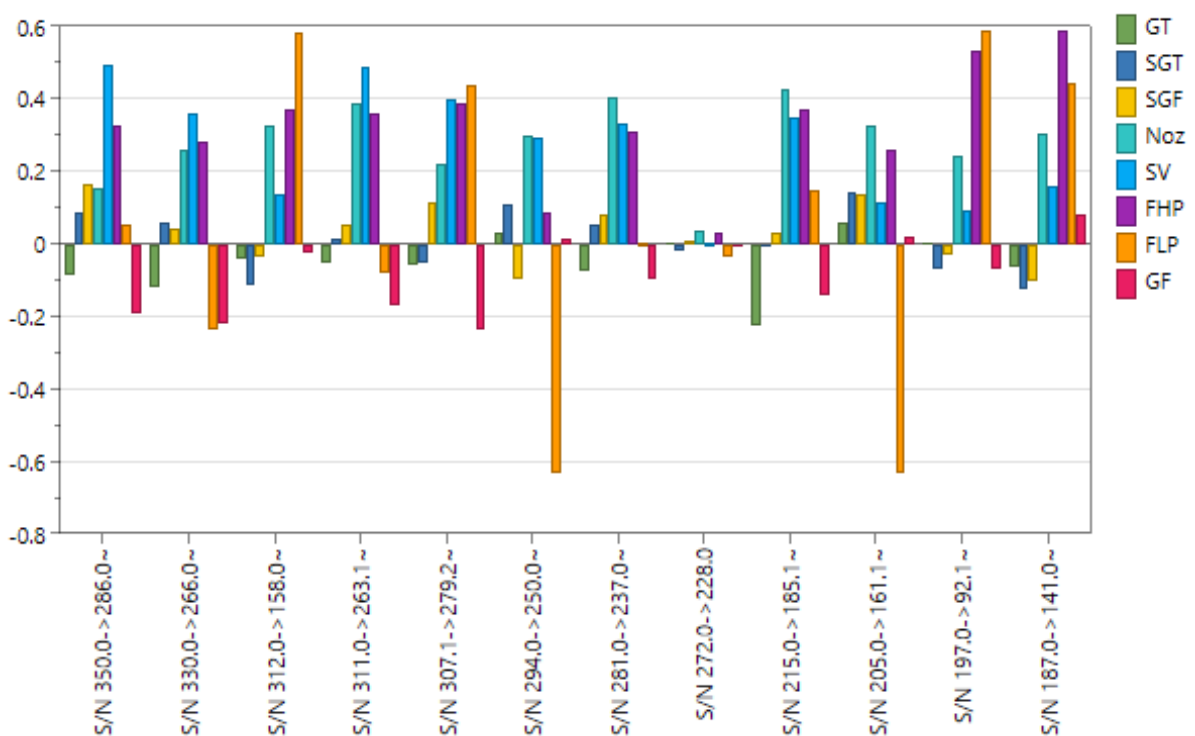
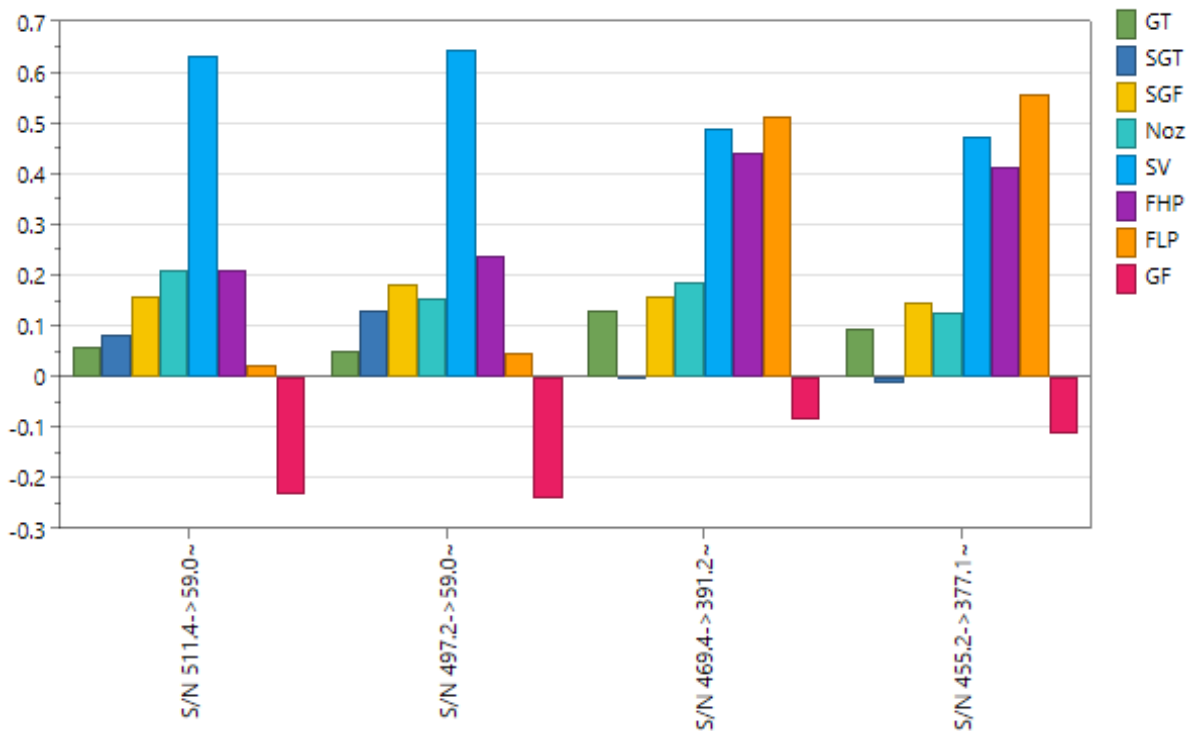


8.2. Seznam SRM přechodů pro jednotlivé analyty

	Charakter prekurzorového iontu	Prekurzorový iont [m/z]	Produktový iont (kvantitativní přechod) [m/z]	Produktový iont (kvalitativní přechod) [m/z]	Kolizní energie (kvantitativní přechod) [eV]	Kolizní energie (kvalitativní přechod) [eV]
AKBA	[M-H] ⁻	551,4	59	-	20	-
AαBA, AβBA	[M-H] ⁻	497,2	59	-	20	-
KBA	[M-H] ⁻	469,4	391,2	-	45	-
αBA, βBA	[M-H] ⁻	455,2	377,1	-	40	-
Meloxicam	[M-H] ⁻	350	286	146	10	20
Piroxikam	[M-H] ⁻	330	266	146	10	20
Indometacin	[M-CO ₂ -H] ⁻	312	158	270	20	10
Sulindak	[M-CO ₂ -H] ⁻	311	263,1	296	30	20
Fenylbutazon	[M-H] ⁻	307,1	279,2	131,2	20	20
Diklofenak	[M-H] ⁻	294	228	214,2	10	20
K. niflumová	[M-H] ⁻	281	237	217	20	20
Karprofen	[M-H] ⁻	272	228	226	10	20
K. tiaprofenová	[M-CO ₂ -H] ⁻	215	185,1	110	30	20
Ibuprofen	[M-H] ⁻	205	161,1	-	2	-
Ketoprofen	[M-C ₃ H ₄ O-H] ⁻	197	92,1	77	30	30
Flurbiprofen	[M-C ₃ H ₄ O-H] ⁻	187	141	139	30	30
K. salicylová	[M-H] ⁻	137	93,2	-	16	-

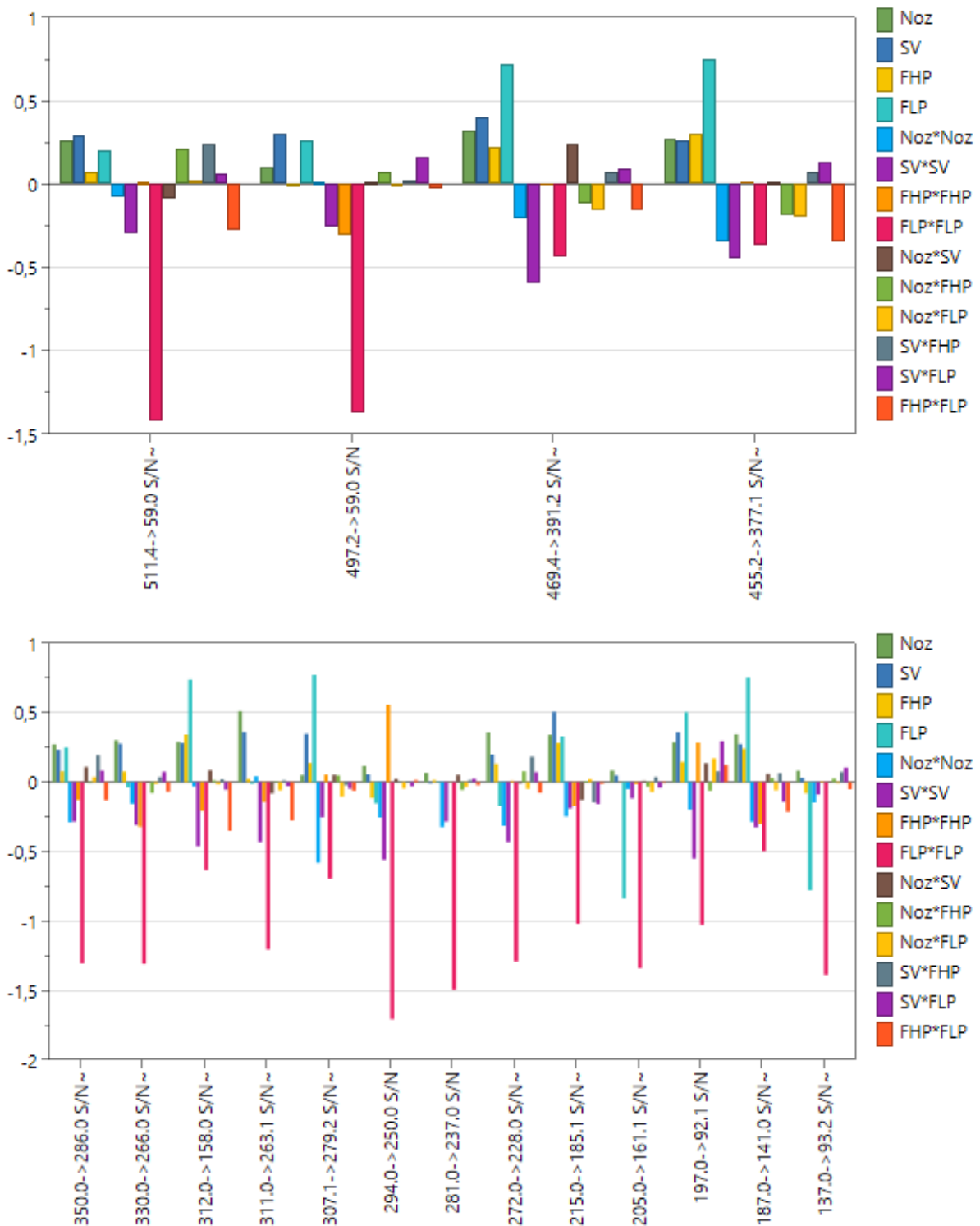
Seznam SRM přechodů a kolizních energií potřebných pro fragmentaci daného přechodu [eV].
Analyty, u kterých nebyl identifikován spolehlivý kvalitativní přechod mají v daném řádku pomlčku.

8.3. Souhrny hodnot koeficientů pro odezvy S/N analytů ve screeningovém experimentu



Souhrn hodnot koeficientů (95 % interval spolehlivosti) pro odezvy S/N BA (nahore) a NSAID (dole) . GT – teplota sušícího plynu, SGT – teplota přidavného plynu, SGF – průtok přidavného plynu, Noz – napětí na trysce, SV – napětí na ESI kapiláře, FHP – napětí na vysokotlaké iontové nálevce, FLP – napětí na nízkotlaké iontové nálevce, GF – průtok sušícího plynu. Hodnoty koeficientů faktorů >0 na ose y zvyšují odezvu, zatímco koeficienty faktorů <0 odezvu snižují.

8.4. Souhrny hodnot koeficientů pro odezvy S/N analytů v optimalizačním experimentu



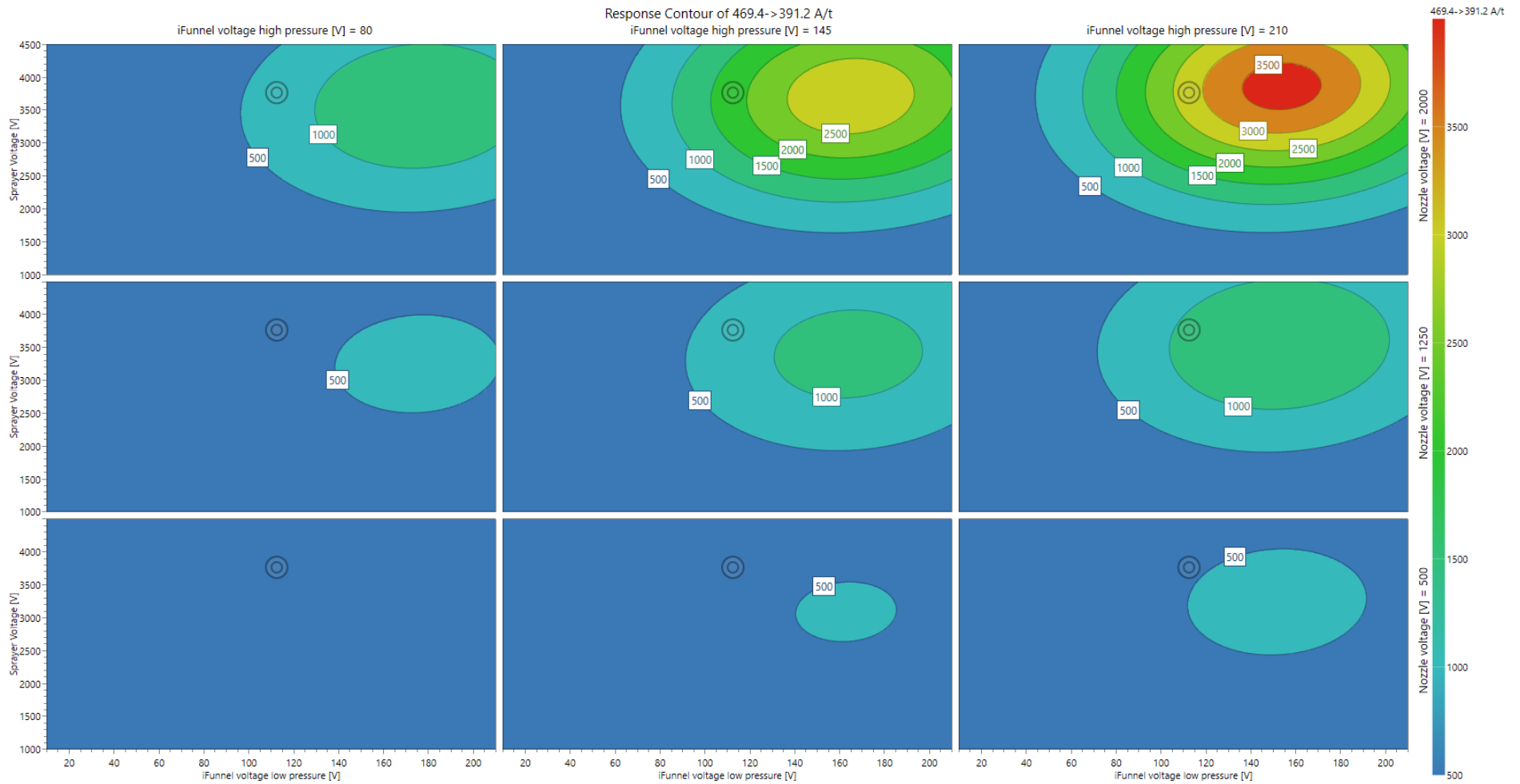
Souhrn hodnot koeficientů (95 % interval spolehlivosti) pro odezvy S/N BA (nahore) a NSAID (dole). GT – teplota sušícího plynu, SGT – teplota přídavného plynu, SGF – průtok přídavného plynu, Noz – napětí na trysce, SV – napětí na ESI kapiláře, FHP – napětí na vysokotlaké iontové nálevce, FLP – napětí na nízkotlaké iontové nálevce, GF – průtok sušícího plynu. Hodnoty koeficientů faktorů >0 na ose y zvyšují odezvu, zatímco koeficienty faktorů <0 odezvu snižují.

8.5. Hodnoty Q2 a R2 u optimalizačního experimentu pomocí centrálního kompozitního designu

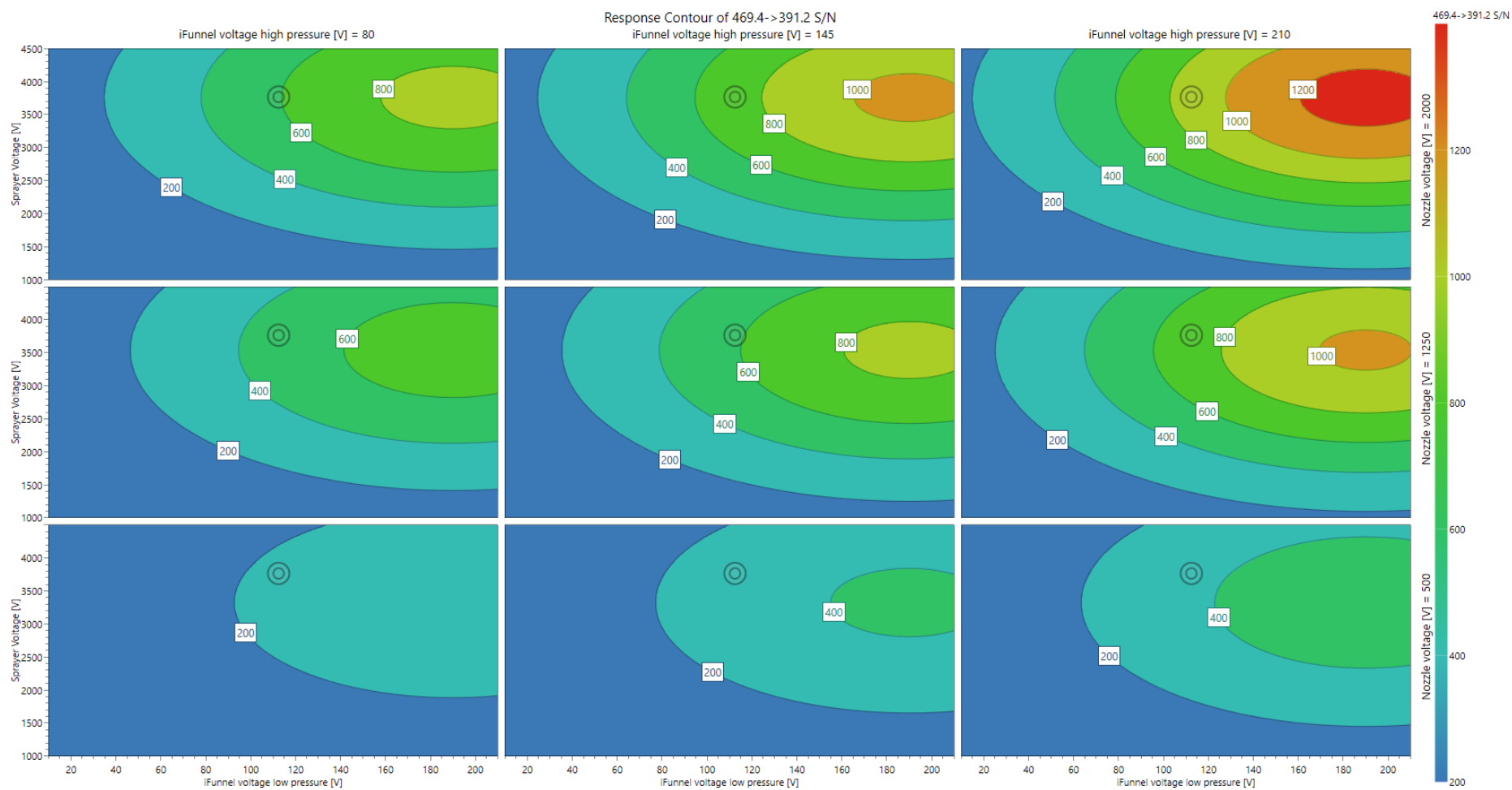
	Q2	R2
AKBA A/t	0,969	0,985
AKBA S/N	0,706	0,889
A α /A β BA A/t	0,962	0,99
A α /A β BA S/N	0,852	0,957
KBA A/t	0,935	0,985
KBA S/N	0,913	0,96
α / β BA A/t	0,968	0,991
α / β BA S/N	0,686	0,881
Meloxicam A/t	0,934	0,98
Meloxicam S/N	0,84	0,946
Piroxikam A/T	0,966	0,991
Piroxikam S/N	0,892	0,955
Indometacin A/t	0,976	0,993
Indometacin S/N	0,946	0,979
Sulindak A/t	0,914	0,975
Sulindak S/N	0,777	0,912
Fenylbutazon A/t	0,97	0,991
Fenylbutazon S/N	0,807	0,916
Diklofenak A/t	0,961	0,985
K. niflumová A/t	0,972	0,993
K. niflumová S/N	0,721	0,873
Karprofen A/t	0,969	0,991
Karprofen S/N	0,943	0,98
K. tiaprofenová A/t	0,927	0,972
K. tiaprofenová S/N	0,746	0,915
Ibuprofen A/t	0,983	0,992
Ibuprofen S/N	0,98	0,992
Ketoprofen A/t	0,958	0,988
Ketoprofen S/N	0,69	0,862
Flurbiprofen A/t	0,961	0,991
Flurbiprofen S/N	0,857	0,953
K. salicylová A/t	0,968	0,986
K. salicylová S/N	0,924	0,962

Odezvy byly logaritmičsky transformovány s výjimkou diklofenaku, kyseliny niflumové a ketoprofenu

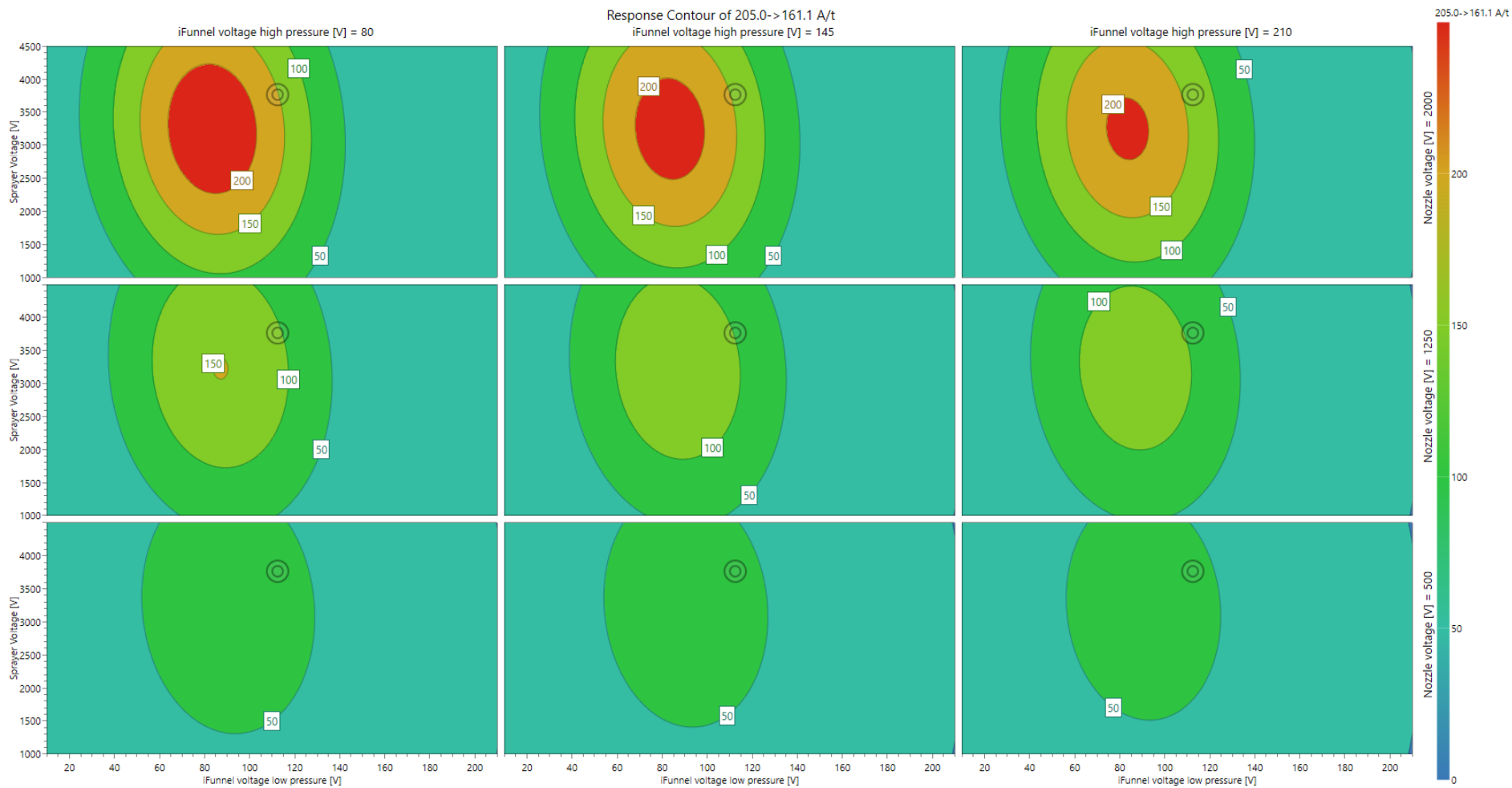
8.6. Vrstevnicové grafy ukazující trendy vlivu zkoumaných faktorů na odezvu při optimalizaci.



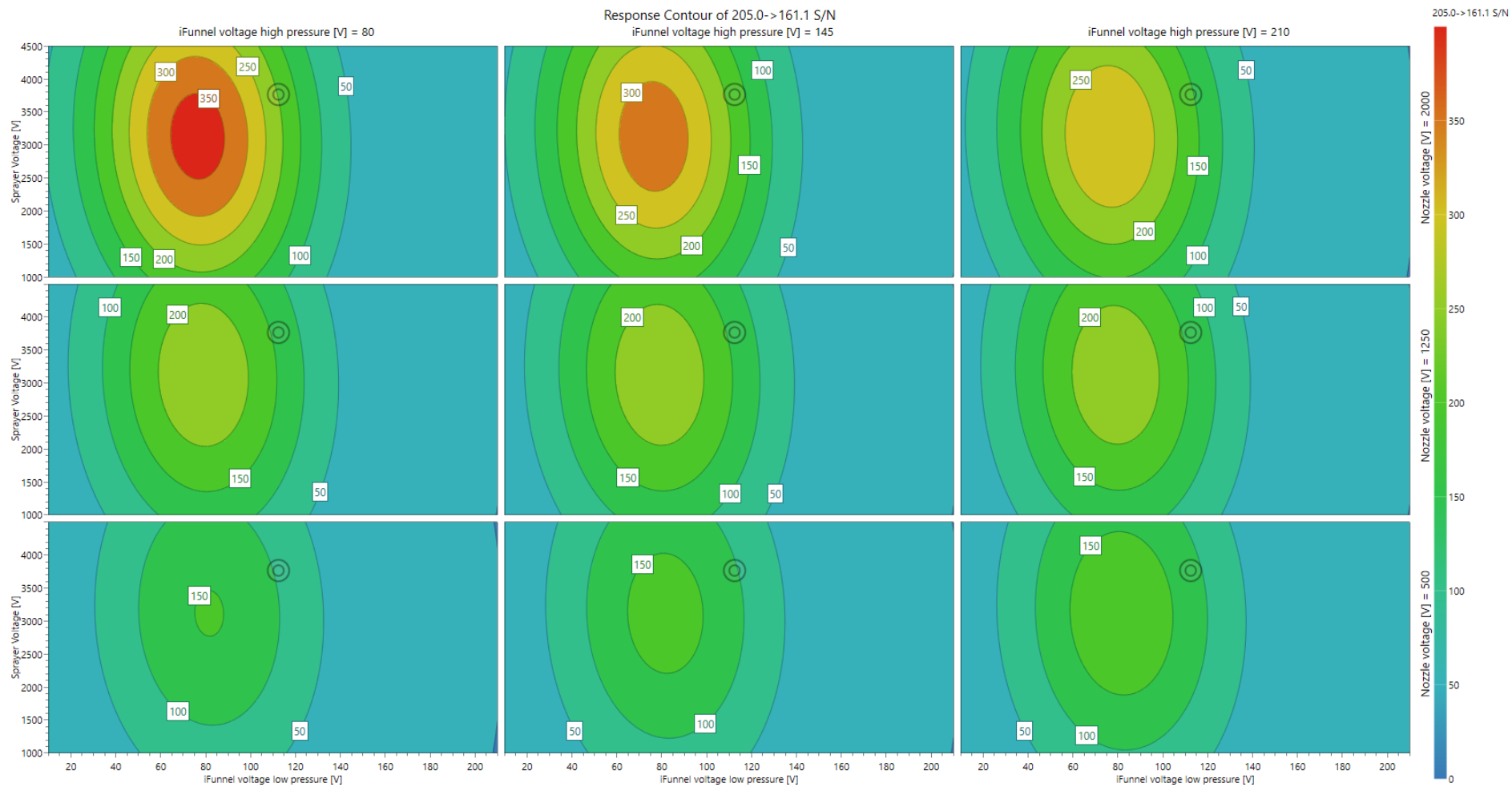
Vrstevnicový graf pro odezvu A/t u KBA. Na ose y – napětí na ESI kapiláře (SV), na ose x – napětí na nízkotlaké iontové nálevce (FLP), nahoře ve třech úrovních – napětí na vysokotlaké iontové nálevce (FHP), vpravo ve třech úrovních – napětí na trysce (Noz). Odezva se zvětšuje s rostoucím Noz a FHP. FLP a SV zvyšují odezvu jen v určitém intervalu.



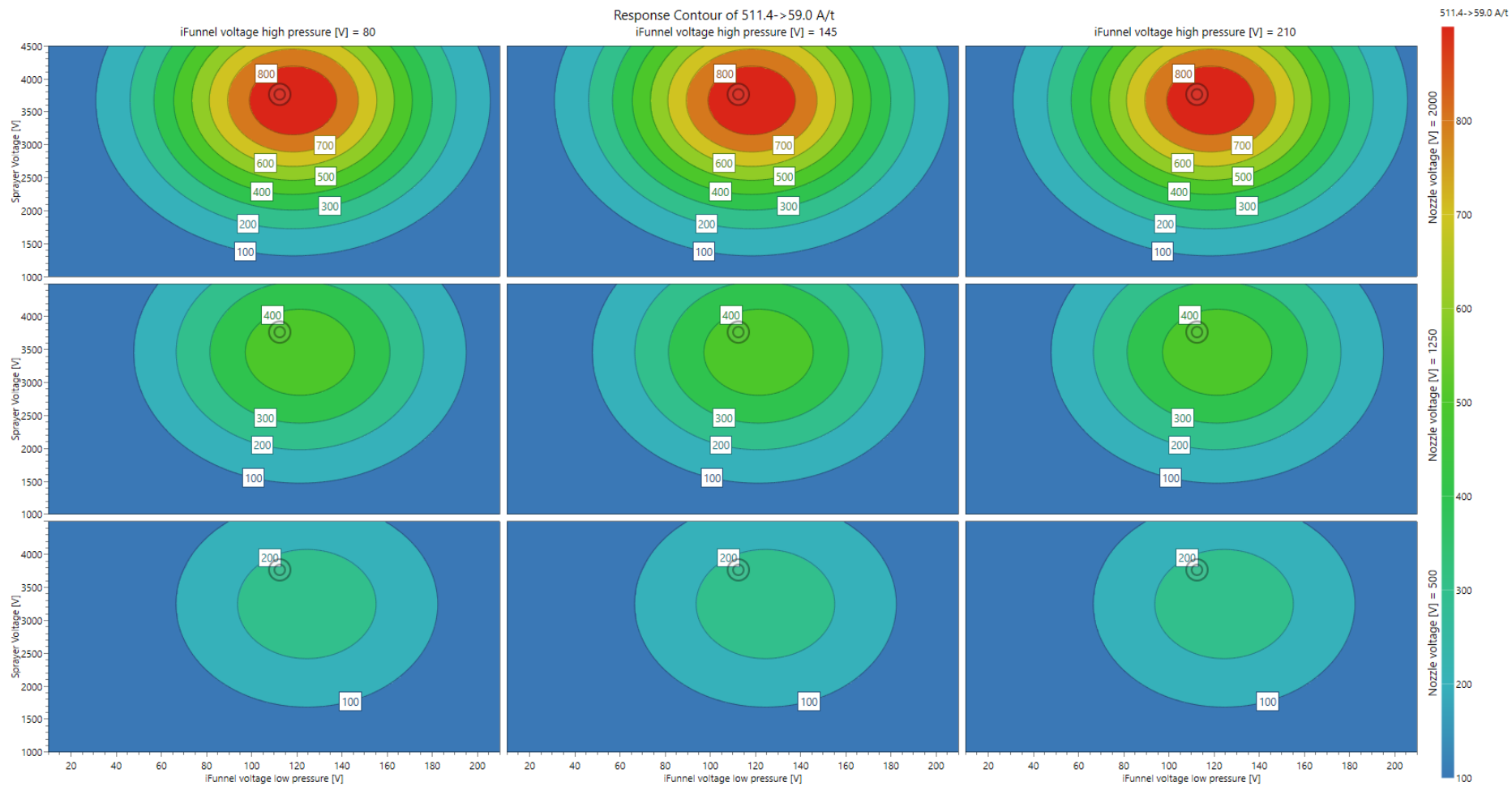
Vrstevnicový graf pro odezvu S/N u KBA. Na ose y – napětí na ESI kapiláře (SV), na ose x – napětí na nízkotlaké iontové nálevce (FLP), nahoře ve třech úrovních – napětí na vysokotlaké iontové nálevce (FHP), vpravo ve třech úrovních – napětí na trysce (Noz). Odezva se zvětšuje s rostoucím Noz a FHP. FLP a SV zvyšují odezvu s rostoucí hodnotou jen v určitém intervalu.



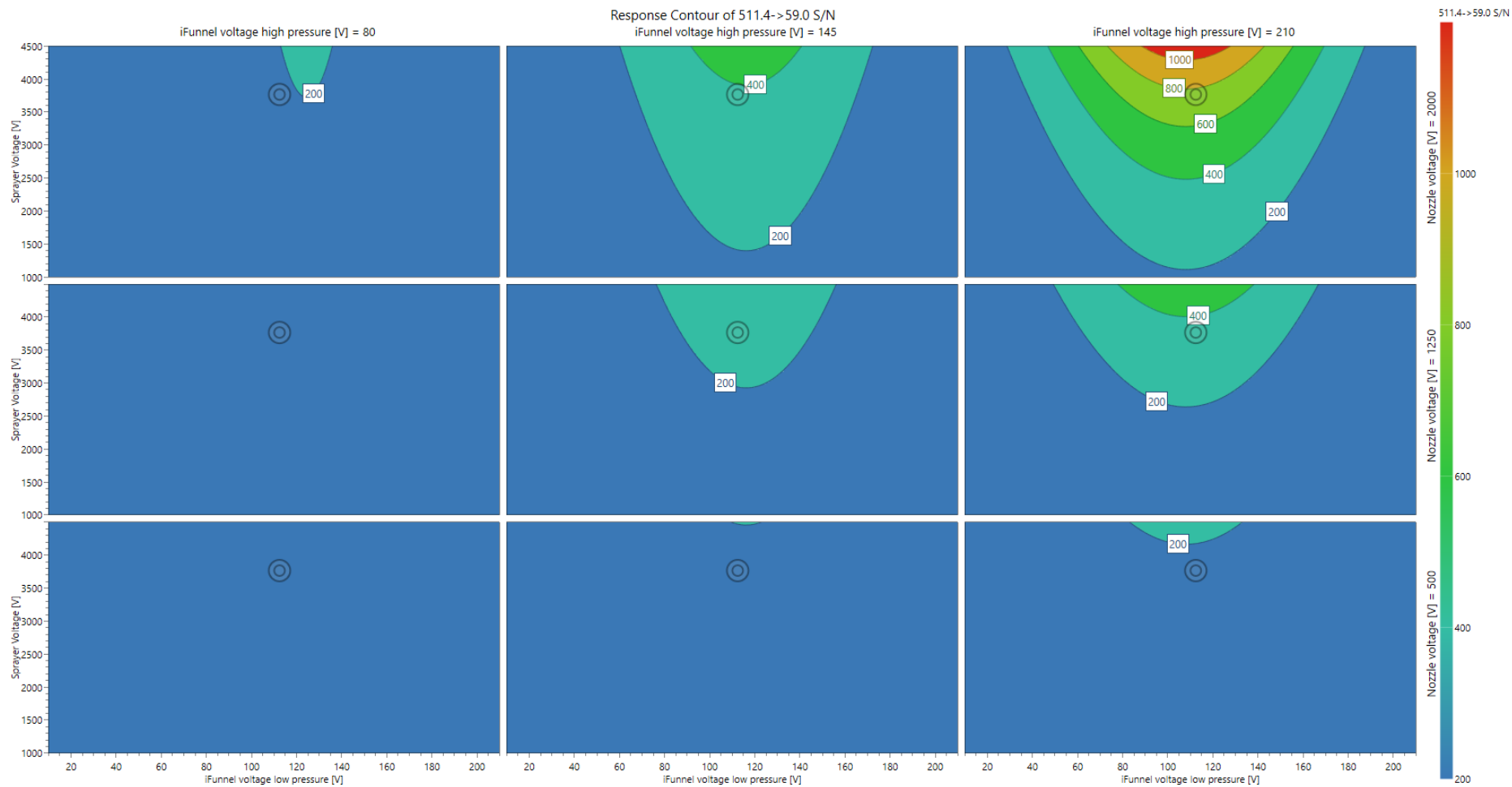
Vrstevnicový graf pro odezvu A/t u ibuprofenu. Na ose y – napětí na ESI kapiláře (SV), na ose x – napětí na nízkotlaké iontové nálevce (FLP), nahoře ve třech úrovních – napětí na vysokotlaké iontové nálevce (FHP), vpravo ve třech úrovních – napětí na trysce (Noz). Odezva roste s klesajícím FHP, zatímco s Noz roste. FLP a SV zvětšují odezvu jen v určitém intervalu.



Vrstevnicový graf pro odezvu S/N u ibuprofenu. Na ose y – Napětí na ESI kapiláře (SV), na ose x – napětí na nízkotlaké iontové nálevce (FLP), nahoře ve třech úrovních – napětí na vysokotlaké iontové nálevce (FHP), vpravo ve třech úrovních – napětí na trysce (Noz). Odezva roste s klesajícím FHP, zatímco s Noz roste. FLP a SV zvětšují odezvu jen v určitém intervalu.



Vrstevnicový graf pro odezvu A/t u AKBA. Na ose y – napětí na ESI kapiláře (SV), na ose x – napětí na nízkotlaké iontové nálevce (FLP), nahoře ve třech úrovních – napětí na vysokotlaké iontové nálevce (FHP), vpravo ve třech úrovních – napětí na trysce (Noz). Odezva roste se zvyšujícím se Noz. FLP a SV zvětšují odezvu jen v určitém intervalu. FHP nemá na odezvu prakticky žádný vliv.



Vrstevnicový graf pro odezvu S/N u AKBA. Na ose y – Napětí na ESI kapiláře (SV), na ose x – napětí na nízkotlaké iontové nálevce (FLP), nahoře ve třech úrovních – napětí na vysokotlaké iontové nálevce (FHP), vpravo ve třech úrovních – napětí na trysce (Noz). Odezva roste se zvyšujícím se Noz a FHP. V určitém intervalu roste se zvyšujícím se FLP a SV, maximum odezvy ovšem leží mimo rozsah nastavení faktorů.

8.7. Nastavení optimalizačního nástroje softwaru MODDE

Odezvy	Minimální požadovaná odezva	Cílová požadovaná odezva	Cíl	Predikovaná odezva optima 9
AKBA A/t	700	800	Maximalizovat	870
AKBA S/N	600	800	Maximalizovat	675
A α /A β BA A/t	1500	2000	Maximalizovat	2191
A α /A β BA S/N	800	1000	Maximalizovat	723
KBA A/t	3000	3500	Maximalizovat	2637
KBA S/N	1000	1200	Maximalizovat	852
α / β BA A/t	600	700	Maximalizovat	525
α / β BA S/N	350	450	Maximalizovat	180
Meloxicam A/t	6000	8000	Maximalizovat	10144
Meloxicam S/N	8000	10000	Maximalizovat	12581
Piroxicam A/T	2500	4000	Maximalizovat	5015
Piroxicam S/N	5000	7000	Maximalizovat	6195
Indometacin A/t	300	350	Maximalizovat	452
Indometacin S/N	1500	2000	Maximalizovat	2322
Sulindak A/t	300	400	Maximalizovat	524
Sulindak S/N	1200	1400	Maximalizovat	1417

Odezvy	Minimální požadovaná odezva	Cílová požadovaná odezva	Cíl	Predikovaná odezva optima 9
Fenylbutazon A/t	12000	16000	Maximalizovat	15310
Fenylbutazon S/N	3000	7000	Maximalizovat	3321
Diklofenak A/t	1500	2500	Maximalizovat	2384
K. niflumová A/t	35000	45000	Maximalizovat	49830
K. niflumová S/N	6000	7000	Maximalizovat	6862
Karprofen A/t	2500	3500	Maximalizovat	3958
Karprofen S/N	2000	3000	Maximalizovat	4280
K. tiaprofenová A/t	50	70	Maximalizovat	80
K. tiaprofenová S/N	150	200	Maximalizovat	234
Ibuprofen A/t	150	200	Maximalizovat	134
Ibuprofen S/N	200	300	Maximalizovat	159
Ketoprofen A/t	150	200	Maximalizovat	206
Ketoprofen S/N	200	250	Maximalizovat	245
Flurbiprofen A/t	200	250	Maximalizovat	239
Flurbiprofen S/N	300	500	Maximalizovat	342
K. salicylová A/t	7000	9000	Maximalizovat	7230
K. salicylová S/N	800	1000	Maximalizovat	1041

Nastavení optimalizačního nástroje softwaru MODDE. Rozmezí požadovaných odezev byla nastavena na základě výsledků optimalizačního experimentu pomocí vrstevnicových grafů, aby byla získána co největší odezva pro jednotlivé analyty (Cíl – Maximalizace). V zeleném sloupci jsou predikované hodnoty odezev při navrženém optimálním nastavení iontového zdroje (optimum 9).

8.8. Odezvy naměřené v optimalizačním experimentu

Exp.:	AKBA	A α /A β BA	KBA	α / β BA	melox.	pirox.	indo.	sul.	fenylb.	dikl.	nifl.	kar.	tia.	ibu.	keto.	flurbi.	sal.
N1	1	4	1	0	48	27	0	0	60	10	210	6	0	2	0	0	94
N2	2	2	2	1	36	24	0	1	40	21	211	18	0	6	1	0	98
N3	2	3	0	0	29	21	0	1	52	12	177	6	0	3	0	0	48
N4	15	14	14	1	105	80	1	6	133	70	456	50	1	20	1	1	107
N5	1	3	4	1	43	22	0	0	89	9	244	4	0	1	0	0	105
N6	2	3	6	1	61	40	2	2	95	17	357	26	1	4	1	1	140
N7	6	25	17	4	140	58	2	2	294	27	797	24	0	5	1	1	153
N8	25	50	67	13	291	168	11	14	432	82	1268	110	3	17	5	4	210
N9	4	20	51	20	89	15	7	1	1173	0	367	2	0	0	5	5	2
N10	3	11	54	11	101	19	18	2	1015	1	369	7	2	0	10	11	1
N11	20	99	152	44	208	34	17	3	2011	1	689	9	2	0	6	8	4
N12	62	164	664	91	280	87	81	12	3359	12	1733	27	7	0	42	39	9
N13	4	9	35	14	33	7	7	0	741	1	221	1	1	0	5	6	1
N14	4	10	94	17	135	23	27	4	1541	1	511	8	2	0	21	24	1
N15	17	66	179	54	123	33	32	3	3196	5	1013	5	3	0	19	21	4
N16	73	202	1752	288	493	95	178	18	6861	6	1716	34	10	0	92	95	0
N17	144	699	239	71	3401	1547	39	38	6089	597	20143	443	14	40	29	31	4429
N18	925	2005	1723	280	9872	5454	278	448	13036	2786	47398	4642	75	219	170	167	8989
N19	59	175	87	26	2577	1242	35	38	3569	534	13731	808	11	47	30	31	4782
N20	287	800	427	106	3316	1739	86	122	5742	891	19791	1207	24	75	56	61	3530
N21	279	744	294	70	3718	2050	37	112	5034	1433	21841	1676	21	155	47	41	5227
N22	347	1103	924	204	6412	2900	159	161	10882	1157	32882	1796	41	84	92	108	6764
N23	10	27	21	2	152	93	4	5	327	57	1175	50	2	13	4	2	257
N24	60	233	753	180	685	119	106	10	7808	6	2082	32	6	0	56	64	7
N25	335	1086	558	139	5372	2943	105	162	8092	1286	31492	1866	34	110	78	88	6722
N26	456	1573	715	165	7101	3337	139	182	11559	1645	41960	2411	40	135	98	110	7572
N27	384	1227	609	136	6793	3272	116	168	9323	1316	31398	1896	33	112	77	86	6567

Exp.:	AKBA	A α /A β BA	KBA	α / β BA	melox.	pirox.	indo.	sul.	fenylb.	dikl.	nifl.	kar.	tia.	ibu.	keto.	flurbi.	sal.
N1	1	4	1	0	48	27	0	0	60	10	210	6	0	2	0	0	94
N2	2	2	2	1	36	24	0	1	40	21	211	18	0	6	1	0	98
N3	2	3	0	0	29	21	0	1	52	12	177	6	0	3	0	0	48
N4	15	14	14	1	105	80	1	6	133	70	456	50	1	20	1	1	107
N5	1	3	4	1	43	22	0	0	89	9	244	4	0	1	0	0	105
N6	2	3	6	1	61	40	2	2	95	17	357	26	1	4	1	1	140
N7	6	25	17	4	140	58	2	2	294	27	797	24	0	5	1	1	153
N8	25	50	67	13	291	168	11	14	432	82	1268	110	3	17	5	4	210
N9	4	20	51	20	89	15	7	1	1173	0	367	2	0	0	5	5	2
N10	3	11	54	11	101	19	18	2	1015	1	369	7	2	0	10	11	1
N11	20	99	152	44	208	34	17	3	2011	1	689	9	2	0	6	8	4
N12	62	164	664	91	280	87	81	12	3359	12	1733	27	7	0	42	39	9
N13	4	9	35	14	33	7	7	0	741	1	221	1	1	0	5	6	1
N14	4	10	94	17	135	23	27	4	1541	1	511	8	2	0	21	24	1
N15	17	66	179	54	123	33	32	3	3196	5	1013	5	3	0	19	21	4
N16	73	202	1752	288	493	95	178	18	6861	6	1716	34	10	0	92	95	0
N17	144	699	239	71	3401	1547	39	38	6089	597	20143	443	14	40	29	31	4429
N18	925	2005	1723	280	9872	5454	278	448	13036	2786	47398	4642	75	219	170	167	8989
N19	59	175	87	26	2577	1242	35	38	3569	534	13731	808	11	47	30	31	4782
N20	287	800	427	106	3316	1739	86	122	5742	891	19791	1207	24	75	56	61	3530
N21	279	744	294	70	3718	2050	37	112	5034	1433	21841	1676	21	155	47	41	5227
N22	347	1103	924	204	6412	2900	159	161	10882	1157	32882	1796	41	84	92	108	6764
N23	10	27	21	2	152	93	4	5	327	57	1175	50	2	13	4	2	257
N24	60	233	753	180	685	119	106	10	7808	6	2082	32	6	0	56	64	7
N25	335	1086	558	139	5372	2943	105	162	8092	1286	31492	1866	34	110	78	88	6722
N26	456	1573	715	165	7101	3337	139	182	11559	1645	41960	2411	40	135	98	110	7572
N27	384	1227	609	136	6793	3272	116	168	9323	1316	31398	1896	33	112	77	86	6567

Zelená tabulka – naměřené hodnoty odezvy A/t. Modrá tabulka – naměřené hodnoty S/N. Zkratky: melox. – meloxicam, pirox. – piroxicam, indo. – indometacin, sul. – sulindak, fenylb. – fenylbutazon, dikl. – diklofenak, nifl. – k. niflumová, kar. – karprofen, tia. – k. tiaprofenová, ibu. – ibuprofen, keto. – ketoprofen, flurbi. – flurbiprofen, sal. – k. salicylová