

**UNIVERZITA KARLOVA**

**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**

**KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE**

**MOŽNOSTI KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZY  
PRO SEPARACI BOSWELLOVÝCH KYSELIN**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. PAVEL JÁČ, Ph.D.

HRADEC KRÁLOVÉ, 2019

Bc. JITKA POUŠKOVÁ

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

V Hradci Králové dne

Jitka Poušková

Úvodem bych chtěla velmi poděkovat panu PharmDr. Pavlu Jáčovi, Ph.D. za jeho odborné vedení, trpělivost, cenné rady a veškeré připomínky, které mi pomohly při sepisování této diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat panu Dr. Davidu Moreno-Gonzálezovi za odbornou pomoc s CE-MS experimenty. Děkuji také ostatním pracovníkům Katedry analytické chemie.

## ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Bc. Jitka Poušková

Školitel: PharmDr. Pavel Jáč, Ph.D.

Název diplomové práce: Možnosti kapilární elektroforézy pro separaci boswellových kyselin

Hlavní náplní této práce bylo popsání možností kapilární elektroforézy pro separaci boswellových kyselin v extraktu *Boswellia serrata* a ve směsi standardů boswellových kyselin. V průběhu testování byl zkoušen vliv pěti různých pufrů a přídavku některých aditiv do roztoku základního elektrolytu jako jsou například cyklodextriny, organické modifikátory nebo povrchově aktivní látky. Po vybrání vhodných složek elektrolytu byly tyto složky testovány v různých koncentracích za účelem co nejlepší separace boswellových kyselin. Všechny analýzy byly prováděny v křemenné kapiláře o vnitřním průměru 50  $\mu\text{m}$ , nejdříve s celkovou délkou 48,5 cm a efektivní délkou 40 cm, později s celkovou délkou 83,5 cm a efektivní délkou 75 cm. Vkládané napětí bylo +30 kV. Pro UV detekci byly použity vlnové délky 200 nm, 250 nm a 280 nm. Nejlepších výsledků bylo dosaženo v roztoku základního elektrolytu, který obsahoval 80 mM fosfátový pufr o pH 7,0 s přídavkem 10 % (v/v) metanolu a 80 mg/ml 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyklodextrinu. Pomocí tohoto elektrolytu byly extrakt *Boswellia serrata* i směs pěti boswellových kyselin rozděleny pouze na tři píky. Při těchto podmínkách nedošlo k rozdělení  $\alpha$ - a  $\beta$ -boswellové kyseliny a 11-keto- $\beta$ -boswellové kyseliny od 3-*O*-acetyl- $\beta$ -boswellové kyseliny. V rámci vývoje vhodné elektroforetické metody byly krátce otestovány možnosti kapilární elektroforézy spojené s hmotnostní spektrometrií pro analýzu těchto látek.

## ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical Chemistry

Candidate: Bc. Jitka Poušková

Supervisor: PharmDr. Pavel Jáč, Ph.D.

Title of the diploma thesis: The capabilities of capillary electrophoresis in the separation of boswellic acids

The main aim of this work was testing of capabilities of capillary electrophoresis for the separation of boswellic acids in *Boswellia serrata* extract as well as in a mixture of standards. The effect of five different buffers and some additive (such as cyclodextrins, organic modifiers or surfactants) in the background electrolyte was tested. The most suitable components of the background electrolyte, were examined at different concentrations to achieve complete separation of boswellic acids. First experiments were carried out in a fused silica capillary with 50  $\mu\text{m}$  internal diameter, 48.5 cm total length and 40 cm effective length, followed by the separations in a longer capillary with 83.5 cm total length and 75 cm effective length. The separation voltage was +30 kV. The UV detection was at 200 nm, 250 nm and 280 nm. The best results were achieved with the background electrolyte composed of 80 mM phosphate buffer at pH 7.0 with 10 % (v/v) of methanol and 80 mg/ml of 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin. With this electrolyte, *Boswellia serrata* extract and the mixture of five boswellic acids were separated into three peaks only. Under these conditions, no separation of  $\alpha$ - and  $\beta$ -boswellic acid and 11-keto- $\beta$ -boswellic acid and 3-*O*-acetyl- $\beta$ -boswellic acid was achieved. During the method development, the capabilities of capillary electrophoresis coupled to mass spectrometry for the analysis of boswellic acids was evaluated as well.

## OBSAH

1. Úvod.....	10
2. Cíl a popis zadání práce .....	11
3. Teoretická část.....	12
3.1 Boswelové kyseliny .....	12
3.1.1 <i>Boswellia sp.</i> .....	12
3.1.2 Biologické účinky boswelových kyselin a další využití pryskyřice z rodu <i>Boswellia</i> .....	12
3.1.3 Chemická struktura boswelových kyselin .....	13
3.1.4 Využití separačních metod v analýze boswelových kyselin.....	16
3.1.5 Analýza pentacyklických triterpenů kapilární elektroforézou .....	16
3.2 Elektromigrační metody.....	19
3.2.1 Popis základního principu a instrumentace CE.....	19
3.2.2 Separační módy v CE.....	22
3.2.3 Cyklodextriny .....	25
3.2.4 CE-MS s přídatnou kapalinou (sheath liquid interface) [15][22] .....	26
4. Experimentální část .....	28
4.1 Použité přístroje a pomůcky .....	28
4.2 Použité chemikálie .....	28
4.3 Standardy boswelových kyselin .....	29
4.4 Příprava roztoků .....	30
4.4.1 Roztoky základních elektrolytů.....	30
4.4.2 Roztoky standardů .....	33
4.5 Parametry měření .....	34
4.5.1 CE-DAD.....	34

4.5.2	CE-MS.....	34
4.6	Parametry hodnocení metody .....	35
4.6.1	Rozlišení [23].....	35
4.6.2	Výpočet pohyblivosti [15] .....	35
5.	Výsledky a diskuze .....	36
5.1	Vývoj metody, optimalizované parametry.....	36
5.1.1	Výběr pufru .....	36
5.1.2	Micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC) .....	37
5.1.3	Elektrokinetická chromatografie (EKC).....	38
5.1.4	Vliv délky kapiláry a napětí .....	42
5.1.5	Vliv koncentrace HP- $\beta$ -CD .....	43
5.1.6	Vliv organických modifikátorů .....	46
5.1.7	Vliv koncentrace pufrů.....	48
5.1.8	Cyklodextriny modifikovaná micelární elektrokinetická chromatografie (CD-MEKC) .....	52
5.1.9	CE-MS analýza.....	52
6.	Závěr .....	56
7.	Seznam použité literatury .....	58
8.	Přílohy.....	61
8.1	Výpočet a porovnání efektivních pohyblivostí.....	61
8.2	Isoabsorbance plot (DAD spektrum) .....	63

## POUŽITÉ ZKRATKY

AKBA	3- <i>O</i> -acetyl-11-keto- $\beta$ -boswellová kyselina
APFO	Perfluorooktanoát amonný
A $\alpha$ BA	3- <i>O</i> -acetyl- $\alpha$ -boswellová kyselina
A $\beta$ BA	3- <i>O</i> -acetyl- $\beta$ -boswellová kyselina
BA	Boswellová kyselina
$\alpha$ BA	$\alpha$ -boswellová kyselina
$\beta$ BA	$\beta$ -boswellová kyselina
BA <sub>s</sub>	Boswellové kyseliny
BeA	Betulinová kyselina
BGE	Roztok základního elektrolytu
BSE	Extrakt <i>Boswellia serrata</i>
BuOH	Butanol
CD	Cyklodextrin
$\beta$ -CD	$\beta$ -cyklodextrin
$\gamma$ -CD	$\gamma$ -cyklodextrin
CD-MEKC	Cyklodextriny modifikovaná micelární elektrokinetická chromatografie
CE	Kapilární elektroforéza
CE-MS	Kapilární elektroforéza spojená s hmotnostní spektrometrií
CEC	Kapilární elektrochromatografie
CZE	Kapilární zónová elektroforéza
DAD	Detektor s diodovým polem
DM- $\beta$ -CD	Dimetyl- $\beta$ -cyklodextrin
EKC	Elektrokinetická chromatografie
EOF	Elektroosmotický tok



ESI	Ionizace elektrosprejem
FS	Křemenná kapilára
GC	Plynová chromatografie
HP- $\alpha$ -CD	2-hydroxypropyl- $\alpha$ -cyklodextrin
HP- $\beta$ -CD	2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyklodextrin
HP- $\gamma$ -CD	2-hydroxypropyl- $\gamma$ -cyklodextrin
IPA	Isopropanol
KBA	11-keto- $\beta$ -boswellová kyselina
MEKC	Micelární elektrokinetická chromatografie
MeOH	Metanol
MS	Hmotnostní spektrometrie
OA	Oleanolová kyselina
RP-HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie na obrácených fázích
Rs	Rozlišení
SDC	Deoxycholát sodný
SDS	Dodecylsírán sodný
THF	Tetrahydrofuran
TLC	Tenkovrstvá chromatografie
TM- $\beta$ -CD	Heptakis(2,3,6-tri- <i>O</i> -metyl)- $\beta$ -cyklodextrin
UA	Ursolová kyselina
(U)HPLC	(Ultra) Vysokoučinná kapalinová chromatografie
UV	Ultrafialový

# 1. ÚVOD

Boswellové kyseliny (BAs) jakožto hlavní obsahové látky rostlin patřících do rodu *Boswellia* se díky svým příznivým účinkům na lidské zdraví již po dlouhou dobu používají v tradiční východní medicíně. Tyto tradice přetrvávají až do současnosti, kdy je stále možné se s boswellovými kyselinami resp. boswellií v podobě extraktu setkat jako s alternativní léčbou některých nemocí.

K analýze boswellových kyselin v různých matricích se prakticky využívají výhradně chromatografické separační metody, především vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) s UV detekcí nebo ve spojení s hmotnostní spektrometrií (MS). S menší četností se pak objevují i techniky tenkovrstvé chromatografie (TLC) či plynové chromatografie (GC). Naopak zcela minoritní využití pro separaci boswellových kyselin mají elektromigrační metody. K nim byla nalezena pouze jediná popsaná metoda zaměřená na vývoj metody kapilární elektrochromatografie (CEC) [1].

Přestože se pro separaci boswellových kyselin kapilární elektroforéza (CE) v podstatě nepoužívá, bylo popsáno několik odborných prací zabývajících se analýzou jiných, strukturně podobných, pentacyklických triterpenů pomocí CE. Jejich výsledky svědčí o možnosti úspěšného použití CE pro analýzu látek tohoto typu, tedy i boswellových kyselin.

## 2. CÍL A POPIS ZADÁNÍ PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo vyvinout CE metodu pro separaci boswellových kyselin v extraktu *Boswellia serrata* (BSE), případně ve směsích standardů zahrnujících  $\alpha$ -boswellovou kyselinu ( $\alpha$ BA),  $\beta$ -boswellovou kyselinu ( $\beta$ BA), 3-*O*-acetyl- $\alpha$ -boswellovou kyselinu ( $A\alpha$ BA), 3-*O*-acetyl- $\beta$ -boswellovou kyselinu ( $A\beta$ BA), 11-keto- $\beta$ -boswellovou kyselinu (KBA) a 3-*O*-acetyl-11-keto- $\beta$ -boswellovou kyselinu (AKBA).

Vývoj metody se zaměří na testování možností různých separačních módů jako kapilární zónová elektroforéza (CZE), micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC) a elektrokinetická chromatografie (EKC). Vzhledem k omezenému množství chromoforů u boswellových kyselin a obtížnosti UV detekce si tato práce klade za cíl i zhodnocení potenciálu další obvyklé detekční techniky – hmotnostní spektrometrie.

Tato diplomová práce tematicky navazuje na moji rešeršní bakalářskou práci [1], která shrnuje využití separačních metod pro stanovení boswellových kyselin. Z ní vyplývá, že kromě jednoho případu (CEC) zatím metody CE pro separaci boswellových kyselin nebyly použity [1].

## 3. TEORETICKÁ ČÁST

### 3.1 Boswellové kyseliny

#### 3.1.1 *Boswellia* sp.

Hlavním zdrojem boswellových kyselin je rod *Boswellia* (kadidlovník) z čeledi *Burseraceae* (březulovité). Do tohoto rodu patří asi 28 druhů, z nichž jako nejvýznamnější lze jmenovat *B. serrata* (kadidlovník pilovitý) původem z Indie, dále *B. sacra*, *B. frereana* a *B. papyrifera* rostoucí v SV Africe (Etiopie, Somálsko) a na Arabském poloostrově [2].

Kadidlovník roste v teplých a suchých výše položených tropických oblastech. Jedná se o listnatý strom s masivním kmenem a rozšiřující se korunou schopný dorůstat až do výšky 15 m. Po nařezání kůry stromu ven vytéká průhledná nažloutlá pryskyřice, která se po ztuhnutí sbírá ve formě pevných žlutohnědých krystalků [2].

Pryskyřice z *Boswellia serrata* představuje komplexní směs terpenoidů a cukrů, která zahrnuje více než 200 látek. Její složení se uvádí jako 8 – 12 % esenciálních olejů (estery, alkoholy, monoterpeny, diterpeny), 45 – 60 % polysacharidů (arabinóza, xylóza, galaktóza) a 25 – 35 % vyšších terpenoidů (zejména boswellové kyseliny). Zastoupení těchto látek a s tím i kvalita pryskyřice se u různých druhů mírně liší. Mění se také podle způsobu sběru, stáří rostliny, ročního období, lokace a dalších vnějších podmínek [3], [4].

#### 3.1.2 Biologické účinky boswellových kyselin a další využití pryskyřice z rodu *Boswellia*

Boswellové kyseliny tvoří hlavní biologicky aktivní složku pryskyřice *Boswellia serrata* a dalších druhů. Díky příznivému vlivu na lidské zdraví má využívání boswellie jako léčivé rostliny téměř dva tisíce let starou tradici především v tradiční indické medicíně (Ajurvéda). Její používání se ale objevuje i v dalších kulturách nejen při léčení nemocí, ale díky vonným látkám také jako kadidlo (*B. sacra*) při náboženských obřadech nebo jako fumigant či složka parfémů. Z pohledu medicíny má největší význam především *Boswellia serrata*, po ní následuje *Boswellia carterii* [3], [5].

*Boswellia* se využívá při léčbě různých gastrointestinálních potíží (diareja, obstipace, zvracení), onemocnění respiračního ústrojí (kašel, dušnost) a některých chronických zánětlivých onemocnění jako je revmatická artritida, osteoartritida, ulcerózní kolitida, Crohnova nemoc nebo bronchiální astma. Nejvýznamnějším účinkem, pro který se tyto rostliny používají, je protizánětlivý účinek. Příčinou protizánětlivého působení boswellových kyselin je přímá nebo nepřímá inhibice mediátorů a cest, které v těle spouští zánětlivou reakci (např. inhibice 5-lipooxygenázy). Druhým často popisovaným účinkem boswellových kyselin je protinádorová aktivita, kdy dochází k působení boswellových kyselin na různé proteiny, jejichž výsledkem je většinou indukce apoptózy. Vedle toho je také u boswellových kyselin popisována celá řada dalších příznivých účinků, například antimikrobiální, analgetický, imunomodulační, antidiabetický a další. Protektivně působí také na nervový systém, játra a kůži [4], [5], [6].

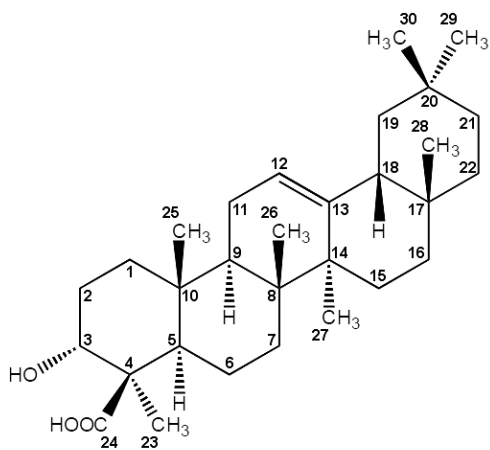
### 3.1.3 Chemická struktura boswellových kyselin

Boswellové kyseliny jsou slabě kyselé a lipofilní látky, jejich hodnoty  $pK_a$  a  $\log P$  jsou uvedeny v tabulce 1. Z chemického hlediska patří mezi pentacyklické triterpeny. Stejně jako u ostatních pentacyklických triterpenů je základní struktura boswellových kyselin tvořena 30 uhlíky, uspořádanými do pěti kruhů. Vedle celé řady různých syntetických derivátů existuje šest hlavních boswellových kyselin. Jsou to  $\alpha$ -boswellová kyselina ( $\alpha$ BA),  $\beta$ -boswellová kyselina ( $\beta$ BA), 3-O-acetyl- $\alpha$ -boswellová kyselina ( $A\alpha$ BA), 3-O-acetyl- $\beta$ -boswellová kyselina ( $A\beta$ BA), 11-keto- $\beta$ -boswellová kyselina (KBA) a 3-O-acetyl-11-keto- $\beta$ -boswellová kyselina (AKBA), jejich vzorce ukazuje obrázek 1. Strukturální rozdíl mezi  $\alpha$ -formou (oleananový typ) a  $\beta$ -formou (ursanový typ) spočívá v pozici dvou metylových skupin na 19. a 20. uhlíku.  $\beta$ -formy boswellových kyselin vykazují větší bioaktivitu než  $\alpha$ -formy. Za významnou funkční skupinu se považuje karbonylová skupina na 11. uhlíku u KBA a AKBA, která je zodpovědná za většinu účinků (př. protizánětlivý) nebo za zesílení účinků oproti ostatním boswellovým kyselinám. U AKBA je pravděpodobně efekt ještě posílen přítomností acetylové skupiny na třetím uhlíku [7].

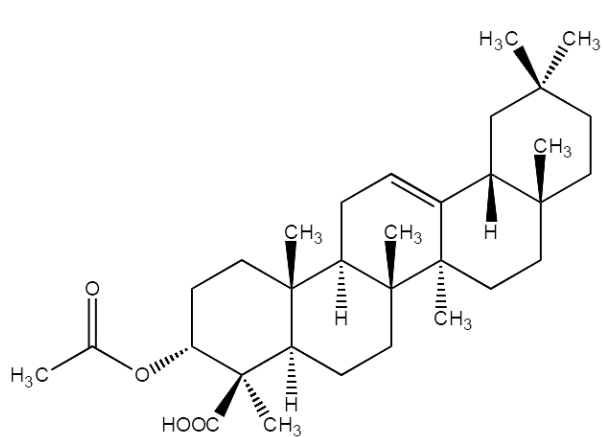
**Tabulka 1:** Predikované hodnoty  $pK_a$  a  $\log P$   $\beta$ -boswellových kyselin [8].

	$pK_a$	$\log P$
<b><math>\beta</math>BA</b>	4,57	6,58
<b>A<math>\beta</math>BA</b>	4,47	7,02
<b>KBA</b>	4,40	6,02
<b>AKBA</b>	4,32	6,46

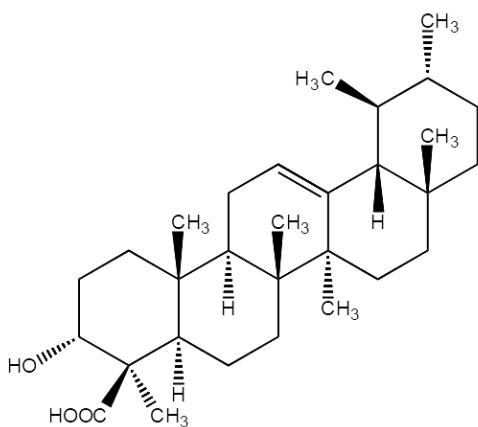
Vysvětlivka:  $\beta$ -boswellová kyselina ( $\beta$ BA), acetyl- $\beta$ -boswellová kyselina (A $\beta$ BA), 11-keto- $\beta$ -boswellová kyselina (KBA), acetyl-11-keto- $\beta$ -boswellová kyselina (AKBA)



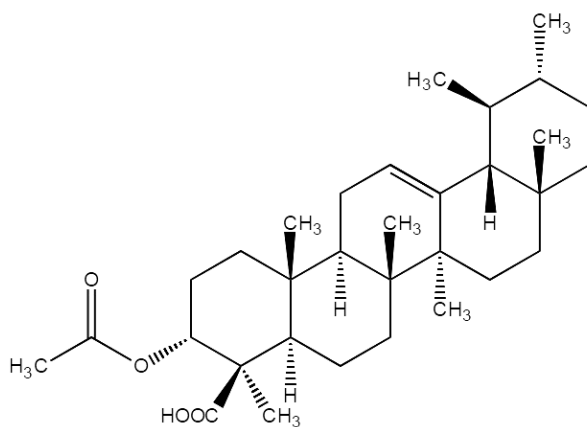
$\alpha$ -boswellová kyselina



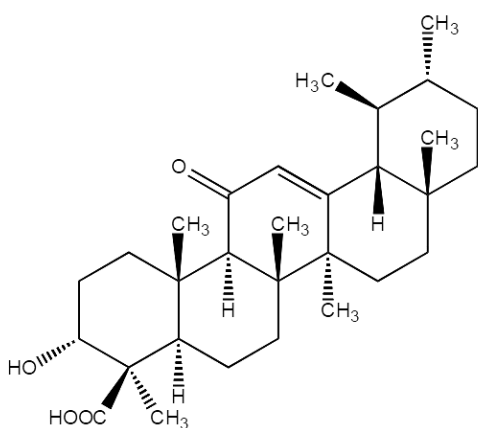
3-*O*-acetyl- $\alpha$ -boswellová kyselina



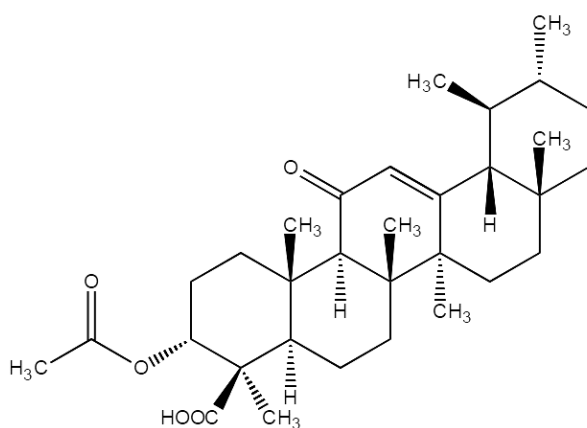
$\beta$ -boswellová kyselina



3-*O*-acetyl- $\beta$ -boswellová kyselina



11-keto- $\beta$ -boswellová kyselina



3-*O*-acetyl-11-keto- $\beta$ -boswellová kyselina

**Obrázek 1:** Chemické vzorce šesti hlavních boswellových kyselin.

### 3.1.4 Využití separačních metod v analýze boswellových kyselin

Pro separaci boswellových kyselin se díky řadě výhod velmi často používá metoda HPLC či UHPLC na reverzních fázích, v kombinaci s UV nebo citlivější MS detekcí. Kapalinová chromatografie byla využita pro analýzu látek jak v rostlinných extraktech *Boswellia sp.* nebo doplňcích stravy, tak i pro stanovení koncentrací boswellových kyselin v plazmě po perorálním podání přípravků s obsahem BAs. V některých případech byla pomocí (U)HPLC analyzována celá řada dalších triterpenických látek včetně boswellových kyselin [1].

Z dalších separačních metod byly popsány také některé příklady analýzy boswellových kyselin zejména v rostlinných extraktech s využitím tenkovrstvé chromatografie, nebo plynové chromatografie pro materiál z archeologických nalezišť (kadidlo). Nejméně byly popsány elektromigrační metody, které se v analýze boswellových kyselin téměř nepoužívají. Konkrétně byl zmíněn pouze jeden případ použití kapilární elektrochromatografie [1].

### 3.1.5 Analýza pentacyklických triterpenů kapilární elektroforézou

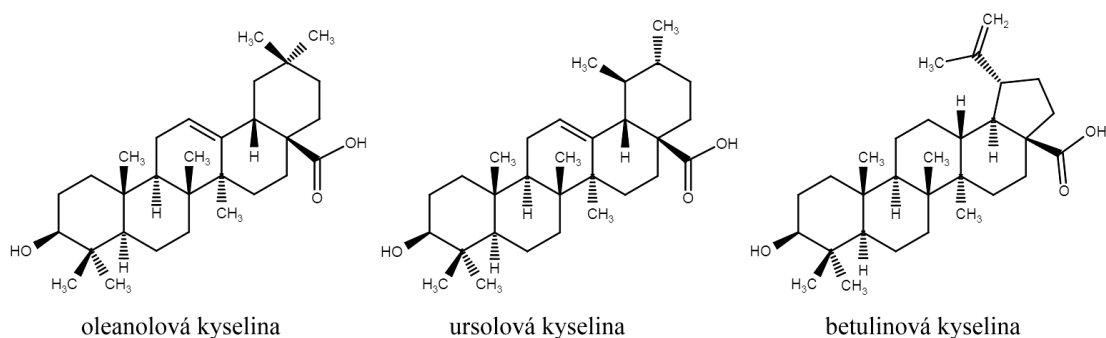
V literatuře (databázi Web of Science) nebyly nalezeny žádné publikace zabývající se separací boswellových kyselin technikou kapilární elektroforézy, s výjimkou metody, která využívá kapilární elektrochromatografii. CEC separace proběhla v křemenné kapiláře naplněné C-18 sorbentem s efektivní délkou 25 cm o vnitřním průměru 100  $\mu\text{m}$  při +25 kV. Elektrolyt pro CEC obsahoval 20 mM vodný roztok mravenčanu amonného a acetonitrilu (1:9) [9].

Z tohoto důvodu je pro srovnání v tabulce 2 uvedeno několik odborných článků, které se věnují analýze jiných pentacyklických triterpenů jako je například oleanolová kyselina (OA) a ursolová kyselina (UA), případně betulinová kyselina (BeA). První dvě se od boswellových kyselin liší pouze pozicí karboxylové skupiny. Jejich vzorce jsou zobrazeny na obrázku 2.

Pro separaci uvedených pentacyklických triterpenů (OA, UA, BeA) z jiných rostlin byly využity metody na principu cyklodextriny modifikované MEKC (CD-MEKC) a EKC, jelikož cyklodextriny mohou tvořit s triterpeny komplexy. Složení základního



elektrolytu, napětí a délka kapiláry u všech metod jsou shrnuty v tabulce 2. Ve všech metodách je základem elektrolytu tetraboritan sodný o různých koncentracích. Ačkoli každá z uvedených metod uvádí pro separaci triterpenů trochu jiné podmínky, všechny popisují úspěšné rozdělení i identifikaci látek [10] – [14].



**Obrázek 2:** Chemické vzorce dalších tří pentacyklických triterpenů.

CD-MEKC zahrnuje použití dodecylsírany sodného (SDS) (tvorba micel) a cyklodextrinu (CD) jako chirálního selektoru v elektrolytu. Pro tyto analyty autoři vybrali jako ideální cyklodextrin 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyklodextrin (HP- $\beta$ -CD) o koncentraci 15 mM [10], [11], [12]. Dalším přídavkem v elektrolytu byl metanol o nízké koncentraci (5 – 6 %, v/v) jako organický modifikátor pro zlepšení separace a symetrie píků. Ve studiích [10] a [11]<sup>1</sup> byla pro separaci vyhodnocena jako nejvýhodnější kombinace tetraboritanu sodného a dihydrogenfosforečnanu sodného, protože použitím samostatných pufrů nebylo docíleno optimálního rozlišení a tvaru píků. V práci [12] je zdůvodněn výběr metody CD-MEKC pro OA a UA na základě tvorby komplexů HP- $\beta$ -CD s analyty, jejichž různá stabilita umožňuje selektivitu separace, zatímco použitím konvenční MEKC k separaci nedošlo.

Zbylé dvě práce popisují kapilární elektroforézu bez přídavku SDS [13], [14]. Ačkoli v obou metodách autoři při analýze v elektrolytu shodně používají tetraboritan sodný (borax) a  $\beta$ -cyklodextrin, rozdíl mezi nimi je v použitých koncentracích, které se výrazně liší. Vliv vysoké koncentrace pufru (200 mM) v posledním případě [14] se také projevil výrazným prodloužením migračního času (> 40 min), oproti všem ostatním analýzám, které trvaly obvykle méně než 15 min.

<sup>1</sup> Články [10] a [11] popisují tutéž metodu, ale první z nich se zabývá vývojem a druhý její aplikací.

**Tabulka 2:** Přehled parametrů metod pro separaci pentacyklických triterpenů pomocí CE.

Analyt	Puf	CD	SDS	Metanol (v/v)	Napětí	Kapilára	Citace
OA, UA ( <i>Prunella vulgaris</i> )	10 mM tetraboritan sodný 10 mM dihydrogenfosforečnan sodný (pH 9,0)	15 mM HP-β-CD	50 mM	6 %	+20 kV	FS 58/50 cm 75 μm	[10]
BeA, OA, UA (tradiční čínská medicína)	10 mM tetraboritan sodný 10 mM dihydrogenfosforečnan sodný (pH 9,0)	15 mM HP-β-CD	50 mM	6 %	+20 kV	FS 58/50 cm 75 μm	[11]
OA, UA ( <i>Cornus officinalis</i> )	40 mM tetraboritan sodný (pH 9,3)	15 mM HP-β-CD	25 mM	5 %	+24 kV	FS 48,5/40 cm 50 μm	[12]
OA, UA, BeA ( <i>Forsythiae fructus</i> )	50 mM borax (pH 9,5)	0,5 mM β-CD	–	–	+15 kV	FS 70/60 cm 75 μm	[13]
7 triterpenů ( <i>Rubus chiingii</i> )	200 mM tetraboritan sodný	15 mM β-CD	–	12,5 %	+15 kV	FS 57/49,6 cm 50 μm	[14]

Vysvětlivka: oleanolová kyselina (OA), ursolová kyselina (UA), betulínová kyselina (BeA), cyklodextrin (CD), dodecylsírán sodný (SDS), β-cyklodextrin (β-CD), 2-hydroxypropyl-β-cyklodextrin (HP-β-CD), křemenná kapilára (FS)

## 3.2 Elektromigrační metody

### 3.2.1 Popis základního principu a instrumentace CE

Elektromigrační metody patří spolu s chromatografickými metodami mezi separační techniky. Principem elektroforetické separace je rozdílný pohyb různě nabitých částic v elektrickém poli vytvořeném mezi dvěma elektrodami. Ionty jsou díky přítomnosti elektrického pole přitahovány k elektrodě s opačným nábojem a zároveň brzděny třecí silou způsobenou viskozitou kapaliny. Pokud jsou hnací (elektrická) síla ( $F_E = QE$ ) a třecí síla ( $F_F = -6\pi\eta rv$ ) v rovnováze, platí:

$$QE = 6\pi\eta rv$$

(Rovnice 1)

$Q$  – celkový náboj částice [C]

$\eta$  – viskozita roztoku (elektrolytu) [ $\text{kg}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ ]

$E$  – intenzita elektrického pole [ $\text{V}\cdot\text{m}^{-1}$ ]

$r$  – poloměr částice [m]

$v$  – rychlost částice [ $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ ]

Z výše uvedeného vztahu vyplývá, že pohyblivost iontu je přímo úměrná velikosti náboje ( $Q$ ) a nepřímo úměrná poloměru částice ( $r$ ) a viskozitě elektrolytu ( $\eta$ ). To znamená, že při separaci budou migrovat rychleji menší částice s větším nábojem, podle rovnice:

$$\mu = \frac{Q}{6\pi\eta r}$$

(Rovnice 2)

Parametry  $Q$  a  $r$  lze při analýzách upravovat a měnit dle potřeby. Například změnou pH se změní disociace některých molekul, čímž může dojít ke změně náboje částic. Ve druhém případě je možné změnit velikost částice navázáním iontů do komplexu (např. cyklodextriny).

Výhodou elektromigračních metod je malá spotřeba vzorku a činidel spotřebovaných při separaci, poměrně vysoká účinnost separace díky plochému rychlostnímu profilu elektroosmotického toku, rychlost analýzy a široký rozsah použití. Naopak jako hlavní nevýhoda se uvádí horší reprodukovatelnost analýz a nižší citlivost na rozdíl od HPLC [15], [16].

### 3.2.1.1 Elektroosmotický tok

Kromě vlastního pohybu iontů v elektrickém poli hraje při separaci významnou roli elektroosmotický tok (EOF), který unáší veškeré částice v kapiláře směrem k výstupnímu konci kapiláry (obvykle na straně katody). EOF je hlavní hybná síla kapilární elektroforézy.

Elektroosmotický tok vzniká v důsledku kontaktu nábojů elektrolytu a kapiláry v přítomnosti elektrického pole. Díky přítomnosti silanolových skupin ( $\text{Si-O}^-$ ) získává celý povrch vnitřní stěny křemenné kapiláry záporný náboj. Kladně nabitě ionty z roztoku elektrolytu jsou přitahovány k záporně nabitě stěně křemenné kapiláry a v důsledku tohoto jevu dochází k vytvoření stabilní elektrické dvojvrstvy charakterizované zeta potenciálem, který je závislý na povrchovém náboji (tedy i na pH) a iontové síle roztoku.

Po vložení stejnosměrného napětí na kapiláru se kladně nabitá difuzní vrstva začne pohybovat směrem k elektrodě s opačným nábojem (tj. ke katodě) a díky solvataci molekul s sebou strhává i další ionty v roztoku. EOF je obvykle dostatečně silný na to, aby způsobil pohyb všech částic v kapiláře jedním směrem, tedy k detektoru, bez ohledu na jejich náboj. Za běžných podmínek tak látky migrují v pořadí: kationty  $\rightarrow$  neutrální látky  $\rightarrow$  anionty. V případě potřeby je možné EOF potlačit nebo obrátit, což je založeno na změně náboje vnitřní stěny kapiláry prostřednictvím změny pH či použitím vhodných aditiv [15], [16].

### 3.2.1.2 Popis instrumentace a průběh separace

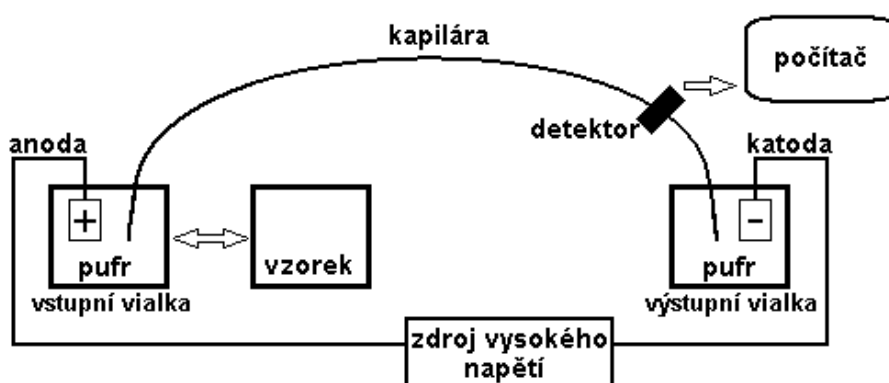
Základní uspořádání kapilární elektroforézy představuje kapiláru, jejíž oba konce jsou ponořeny do nádobek (vialek) s roztokem základního elektrolytu (BGE). Tímto roztokem je naplněný i celý vnitřek kapiláry. Do obou zásobníků elektrolytu jsou ponořené platinové elektrody napojené na zdroj vysokého napětí, který vytváří elektrické pole.

Obvykle se používá kapilára z taveného křemene o délce 25 – 100 cm, s vnitřním průměrem 25 – 100  $\mu\text{m}$  a vnějším průměrem 375  $\mu\text{m}$ . Na vnějším povrchu kapiláry je tenká vrstva polyimidu, která zvyšuje pružnost a mechanickou odolnost samotné křemenné kapiláry.

Dávkování vzorku se provádí na vstupním konci kapiláry (většinou anodický) výměnou zásobníku pufru za nádobku se vzorkem. Dávkování vzorku může být buď elektrokinetické, při kterém dochází působením napětí k migraci analytů z roztoku vzorku do kapiláry, nebo hydrodynamické, které je založeno na použití vysokého tlaku pro zavedení vzorku do kapiláry. Po ukončení dávkování se anodický konec kapiláry vrací opět do elektrolytu.

V dalším kroku se na kapiláru aplikuje napětí několika desítek kV, kterým je zahájen separační proces. Při něm dochází k rozdělování nabitých částic analytů v kapiláře podle náboje a velikosti. Důležitou úlohu v tomto případě hraje přítomnost EOF, díky kterému všechny látky doputují až na výstupní konec kapiláry.

Na výstupním konci kapiláry (obvykle katodickém) se nachází detektor. Nejběžněji se používá spektrofotometrický detektor, z dalších také například vodivostní, amperometrický či fluorescenční. Laserem indukovaná fluorescence a hmotnostní spektrometrie patří k nejsofistikovanějším detekčním technikám umožňující citlivou a selektivní detekci. Záznam analýzy se označuje jako elektroferogram, což je závislost signálu detektoru na migračním čase. Migrační čas (či pohyblivost analytu) je kvalitativní údaj a výška nebo plocha píku je nositelem kvantitativní informace [15], [16].



**Obrázek 3:** Schéma kapilární elektroforézy (převzaté a upravené podle zdroje [17] ).

### 3.2.2 Separační módy v CE

Metody kapilární elektroforézy jsou kapilární zónová elektroforéza (CZE), micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC), kapilární elektrochromatografie (CEC), kapilární gelová elektroforéza (CGE), kapilární izoelektrická fokusace (CIEF) a kapilární izotachoforéza (CITP).

#### 3.2.2.1 Kapilární zónová elektroforéza (CZE)

Kapilární zónová elektroforéza je nejjednodušší a nejčastěji používaná elektroforetická metoda. Tato metoda je vhodná pro separaci kationtů i aniontů současně. Pomocí CZE však nelze rozdělit neutrální látky, protože ty jsou jen pasivně unášeny elektroosmotickým tokem. Principem separace je již výše zmíněná rozdílná pohyblivost iontů v elektrickém poli [16].

#### 3.2.2.2 Micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC)

MEKC kombinuje principy elektroforézy a chromatografie. Podstatou této metody je přidavek povrchově aktivních látek (tenzidů) do roztoku základního elektrolytu. Tyto látky ve vodném prostředí při dosažení kritické micelární koncentrace vytváří micely (micelární fázi). Micely mají obvykle kulový tvar a molekuly tenzidu jsou uspořádány tak, že hydrofobní část směřuje dovnitř a nabitá polární hydrofilní část molekul na povrch micely. Micely mají díky svému náboji vlastní pohyblivost, a proto ovlivňují i výsledné migrační časy analytů, které s nimi interagují, tedy hydrofobní sloučeniny. Jako povrchově aktivní látky se mohou použít:

- (i) anionaktivní tenzidy jako dodecylsírany sodný nebo soli žlučových kyselin (např. cholová a deoxycholová kyselina), které mají vlastní pohyblivost proti směru EOF, tedy k anodě;
- (ii) kationaktivní tenzidy jako např. cetyltrimethylamonium bromid (CTAB) nebo dodecyltrimethylamonium bromid (DTAB), které se vzhledem ke svému náboji pohybují ke katodě;
- (iii) zwitterionty, nesoucí oba náboje, např. 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonát (CHAPS);
- (iv) neiontové tenzidy jako jsou Triton X-100 nebo oktylglykosid.

Oproti CZE je MEKC vhodná i pro separaci neutrálních látek. Kromě toho, že se ionty dělí podle svých nábojů jako při CZE, neutrální látky se při MEKC analýze navíc rozdělují i podle své polarizace mezi vodnou (polární) a micelární (nepolární) fází. Tento proces připomíná chromatografickou separaci. Micely v tomto případě zastupují stacionární fází, v MEKC se označuje jako pseudostacionární fáze. Během MEKC většina neutrálních analytů migruje kapilárou v tzv. separačním okně, mezi časy  $t_0$  a  $t_{mc}$ . V čase  $t_0$  migrují silně hydrofilní sloučeniny nenavázané v micelách společně s EOF, naopak  $t_{mc}$  je čas, ve kterém migrují micely s velmi hydrofobními neutrálními látkami. Rozdělení analytu mezi vodnou a micelární fází lze vyjádřit pomocí kapacitního faktoru ( $k'$ ):

$$k' = \frac{n_{mc}}{n_{aq}}$$

(Rovnice 3)

$n_{mc}$  – látkové množství analytu v micelární fázi [mol]

$n_{aq}$  – látkové množství analytu ve vodné fázi [mol]

Výpočet  $k'$  z experimentálních údajů:

$$k' = \frac{(t_r - t_0)}{t_0(1 - \frac{t_r}{t_{mc}})}$$

(Rovnice 4)

$t_r$  – migrační čas analytu (neutrálního) [s]

$t_0$  – migrační čas EOF [s]

$t_{mc}$  – migrační čas micely [s]

Ovlivnění selektivity může být v MEKC docíleno například změnou velikosti, náboje nebo geometrie micel, dále také změnou koncentrace a pH pufru, teplotou nebo přidáním dalších aditiv (např. chirální selektory, organické modifikátory, přidávek dalšího tenzidu) [15], [16], [18].

### 3.2.2.3 Kapilární elektrochromatografie (CEC)

Kapilární elektrochromatografie je spojení dvou separačních metod: kapilární elektroforézy a vysokoučinné kapalinové chromatografie. Jedná se o techniku instrumentálně podobnou CE. Separace probíhá v CEC kapiláře, která je typicky naplněná modifikovaným silikagelovým sorbentem (C-18). Analyty jsou unášeny

pomocí EOF k elektrodě. Díky tomuto uspořádání je zajištěna separace i neutrálních analytů, které jsou rozděleny v důsledku rozdílné interakce se stacionární fází [16].

#### **3.2.2.4 Kapilární gelová elektroforéza (CGE)**

Principem kapilární gelové elektroforézy je pohyb nabitých molekul v gelem naplněné kapiláře. Kvůli nepřítomnosti EOF v gelu lze provádět analýzu jen kladně, nebo jen záporně nabitých látek, které v elektrickém poli putují k opačně nabitě elektrodě. Přitom se rozdělují podle své molekulové hmotnosti v důsledku průchodu skrze póry gelu (sítový efekt). Větší molekuly procházejí póry hůře a jsou tedy gelem více brzděny. Tato metoda se poměrně často využívá v analýze biomolekul, například bílkovin nebo nukleových kyselin a jejich fragmentů [16].

#### **3.2.2.5 Kapilární izoelektrická fokusace (CIEF)**

Při kapilární izoelektrické fokusaci se rozdělují amfolyty, tedy látky, které podle prostředí, kde se nacházejí, mohou migrovat jako kationty nebo jako anionty či jsou neutrální a pak se nepohybují v elektrickém poli (např. aminokyseliny). Proces separace se odehrává v kapiláře s lineárním gradientem pH. V něm analyty migrují tak dlouho, dokud nedosáhnou izoelektrického bodu, tedy takové hodnoty pH, při které se příslušná dříve nabitá látka stane navenek neutrální (tj. kladný a záporný náboj jsou v rovnováze). V tomto bodě se migrace analytu ukončí a dojde k fokusaci (zaostření) zóny. Následně je provedena mobilizace zón prostřednictvím obnovení náboje, což způsobí posun všech zón směrem k detektoru [16].

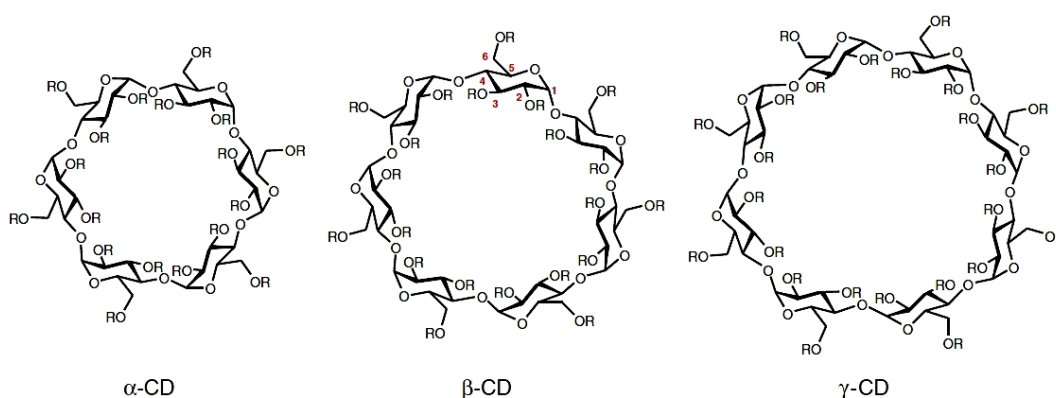
#### **3.2.2.6 Kapilární izotachoforéza (CITP)**

Na rozdíl od všech předchozích metod se u izotachoforézy využívá systému dvou elektrolytů – vedoucího a koncového. Tyto elektrolyty z obou stran ohraničují zóny analytů, přičemž vedoucí elektrolyt má největší pohyblivost a koncový elektrolyt nejmenší. Látky se při analýze řadí za sebou podle sestupné pohyblivosti a každý z analytů tak vytváří vlastní zónu o určité pohyblivosti. Vzhledem k tomu, že pro analýzu není přítomnost EOF vhodná, používají se kapiláry bez povrchového náboje, např. teflonové. Touto metodou lze separovat pouze kationty nebo anionty [16].



### 3.2.3 Cyklodextriny

Cyklodextriny (CD) patří do skupiny cyklických oligosacharidů, které vznikají enzymatickou degradací škrobu. Struktura cyklodextrinů se skládá ze šesti, sedmi nebo osmi D-glukopyranózových jednotek vzájemně spojených  $\alpha(1\rightarrow4)$  glykosidickými vazbami. Podle počtu glukózových jednotek se pak označují jako  $\alpha$ -,  $\beta$ - nebo  $\gamma$ -cyklodextriny (viz obrázek 4). Prostorové uspořádání cyklodextrinů připomíná tvar dutého komolého kužele. Vnitřní kavita má hydrofobní charakter, zatímco vnější okraje jsou hydrofilní kvůli přítomnosti hydroxylových skupin v poloze 6 na užším okraji a v polohách 2 a 3 na širším okraji struktury cyklodextrinu. Díky své struktuře jsou cyklodextriny schopné v kavitě zachytit různé molekuly a vytvořit s nimi komplexy. Derivatizací hydroxylových skupin (např. alkylací, sulfatací) vznikají modifikované cyklodextriny, které upravují původní fyzikálně chemické vlastnosti nativních cyklodextrinů [19], [20].



**Obrázek 4:** Struktura nativních cyklodextrinů [21].

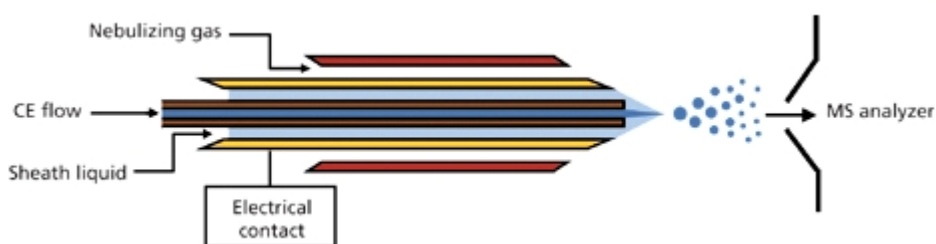
Využití cyklodextrinů je poměrně široké a dotýká se řady různých oborů. Cyklodextriny nacházejí uplatnění například ve farmaceutickém, chemickém, potravinářském či kosmetickém průmyslu. V separačních metodách se s použitím cyklodextrinů jako chirálních selektorů lze setkat u vysokoúčinné kapalinové chromatografie, plynové chromatografie, kapilární elektroforózy a superkritické fluidní chromatografie [19], [20].

CE separace s využitím cyklodextrinů se nazývá elektrokinetická chromatografie (EKC), protože proces interakce mezi analytem a CD za vzniku labilního diastereomerního komplexu je v podstatě proces chromatografický [21].

### 3.2.4 CE-MS s přídavnou kapalinou (sheath liquid interface) [15][22]

Hmotnostní spektrometrie (MS) je často používaná jako detekční technika u separačních metod (GC, HPLC i CE). Pro spojení CE-MS je nejvhodnější použití ionizace elektrosprejem (ESI). Nicméně pro ionizaci se mohou využít i další ionizační techniky jako je například fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI), chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI) nebo desorpce laserem za účasti matrice (MALDI). Podobně jako při kombinaci MS s dalšími separačními metodami se i u CE-MS objevují problémy související se spojením dvou odlišných technických zařízení (př. rozdíl napětí, tlaků, zajištění elektrického pole, uzemnění, ...). Pro zajištění správného fungování obou technik je třeba použít vhodně přizpůsobené rozhraní.

V CE se běžně využívá rozhraní s přídavnou kapalinou (sheath liquid interface). To sestává ze tří soustředných kapilár tvořící rozprašovací špičku pro ESI. Základem je vnitřní separační kapilára vycházející z CE. Po její vnější straně protéká přídavná kapalina, která zajišťuje elektrický kontakt (elektrolytu a elektrody). Přídavná kapalina musí být vodivá. Její obvyklé složení bývá vodná směs metanolu, acetonitrilu nebo isopropanolu s malým přídavkem kyseliny octové nebo mravenčí, případně amoniakem. Třetí kapilára přivádí nebulizační plyn; běžně se používá dusík.



**Obrázek 5:** Schéma CE-MS rozhraní s přídavnou kapalinou [22].

Na druhou stranu je možné i využití rozhraní bez přídavné kapaliny (sheathless interface). V tomto případě je elektrický kontakt zajištěn například použitím kapiláry ve vodivém kovovém plášti nebo použitím drátků vsunutých v kapiláre a napojených na

zdroj vysokého napětí. Další typ rozhraní bez přídavné kapaliny využívá holou kapiláru, na konci naleptanou kyselinou fluorovodíkovou, která způsobí její poréznost. To zajišťuje průnik elektrolytu do vnějšího vodivého pláště a vytvoření elektrického kontaktu mimo separační kapiláru. Nicméně i přes to, že tato rozhraní mají vysokou citlivost, v praxi se spíše preferuje použití rozhraní s přídavnou kapalinou kvůli větší robustnosti a nižší ceně.

V CE-MS by se mělo dbát i na výběr vhodného MS kompatibilního pufru. Pufry použité v ESI musí být těkavé a nesmí interferovat s procesem ionizace, tedy převedením analytů z vodného roztoku do plynné fáze před vstupem do MS analyzátoru.

## 4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Použité přístroje a pomůcky

- Kapilární elektroforéza CE 7100, Agilent Technologies, Waldbronn, Německo
- Hmotnostní spektrometr typu trojitého kvadrupólu Agilent 6495 s Agilent Jet Stream ESI zdrojem, Agilent Technologies, Waldbronn, Německo
- Křemenná kapilára s vnitřním průměrem 50  $\mu\text{m}$  a vnějším průměrem 375  $\mu\text{m}$ , Polymicro Technologies, Phoenix, USA (šarže: AEUY09A)
- Křemenná kapilára s vnitřním průměrem 50  $\mu\text{m}$  a vnějším průměrem 375  $\mu\text{m}$ , Polymicro Technologies, Phoenix, USA (šarže: BHRH02A)
- pH metr Sentron SI 400 s pH elektrodou Sentron SI (rozsah 0-14), Sentron, Holandsko
- Nylonové stříkačkové filtry o velikosti pórů 0,45  $\mu\text{m}$ , Captiva Econofilter, Agilent Technologies, Waldbronn, Německo
- Další laboratorní přístroje a pomůcky (např. analytické váhy, ultrazvuková lázeň, pipety apod.)

### 4.2 Použité chemikálie

- Kyselina octová, 99%, Penta
- Octan amonný,  $\geq 98\%$ , Sigma-Aldrich
- Uhličitan amonný,  $\geq 95\%$ , Sigma-Aldrich
- Kyselina boritá pro elektroforézu,  $\geq 99,5\%$ , Sigma
- Dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát,  $\geq 99,0\%$ , Sigma-Aldrich
- Amoniak, 25-29%, Penta
- Hydroxid sodný,  $\geq 98\%$ , Sigma-Aldrich
- Dodecylsíran sodný pro CE,  $\geq 98,5\%$ , Sigma-Aldrich
- Deoxycholát sodný,  $\geq 98,0\%$ , Fluka

- $\beta$ -cyklodextrin,  $\geq 99\%$ , Fluka
- $\gamma$ -cyklodextrin,  $\geq 99\%$ , Sigma
- 2-hydroxypropyl- $\alpha$ -cyklodextrin, Fluka (šarže: 424043/1 41402)
- 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyklodextrin, Aldrich (šarže: MKBS9923V)
- 2-hydroxypropyl- $\gamma$ -cyklodextrin, Fluka (šarže: S36315 12608B14)
- Dimetyl- $\beta$ -cyklodextrin, Beckman Coulter (šarže: S102152)
- Heptakis(2,3,6-tri-*O*-metyl)- $\beta$ -cyklodextrin,  $\geq 98\%$ , Sigma-Aldrich
- Ultračistá voda, připravená systémem Milli-Q
- Metanol, pro LC-MS, 99,9%, VWR Chemicals
- Isopropanol (2-propanol), LC-MS Chromasolv, Fluka (šarže: SZBC208CV)
- *n*-butanol, 99,8%, Lachema
- Tetrahydrofuran, pro HPLC,  $\geq 99,7\%$ , VWR Chemicals
- Perfluorooktanová kyselina, 96%, Aldrich

### 4.3 Standardy boswellových kyselin

- *Boswellia serrata* extrakt, USP referenční standard, Sigma-Aldrich (šarže: FOJ024)
- $\alpha$ -boswellová kyselina, analytický standard,  $\geq 95,0\%$ , Sigma-Aldrich
- $\beta$ -boswellová kyselina, analytický standard,  $\geq 95,0\%$ , Sigma-Aldrich
- 3-*O*-acetyl- $\alpha$ -boswellová kyselina, analytický standard,  $\geq 95,0\%$ , Sigma-Aldrich
- 3-*O*-acetyl- $\beta$ -boswellová kyselina, analytický standard,  $\geq 95,0\%$ , Sigma-Aldrich
- 11-keto- $\beta$ -boswellová kyselina, analytický standard,  $\geq 95,0\%$ , Sigma-Aldrich
- 3-*O*-acetyl-11-keto- $\beta$ -boswellová kyselina, z *Boswellia serrata*, Sigma (šarže: SZDT4016)

## 4.4 Příprava roztoků

### 4.4.1 Roztoky základních elektrolytů

#### ***Octanový pufr (50 mM; pH 4,5)***

Pro přípravu 100,00 ml octanového pufru bylo napipetováno 289,00  $\mu\text{l}$  99% kyseliny octové, která se v kádince smíchala s destilovanou vodou. Úprava pH na hodnotu 4,5 byla provedena pomocí 1 M  $\text{NH}_3$ . Poté byla směs kvantitativně převedena do 100 ml odměrné baňky a doplněna vodou po rysku.

#### ***Octanový pufr (25 mM; pH 9,0)***

K přípravě octanového pufru byl krystalický octan amonný rozpuštěn v destilované vodě (navážka 0,1927 g na 100,00 ml roztoku). pH bylo upraveno pomocí 1 M  $\text{NH}_3$  na hodnotu 9,0. Kvantitativně převedený roztok byl v odměrné baňce doplněn destilovanou vodou po rysku.

#### ***Uhličitanový pufr (25 mM; pH 8,88)***

Navážka byla rozpuštěna ve vodě (0,4803 g uhličitanu amonného na 100,00 ml 50 mM pufru). pH bylo upraveno amoniakem na hodnotu 9,0. Bylo provedeno kvantitativní převedení roztoku do odměrné baňky a doplnění vodou po rysku.

Vzhledem k vysokému proudu v průběhu analýzy ( $> 100 \mu\text{A}$ ) byl 50 mM uhličitanový pufr naředěn vodou v poměru 1:1 (v/v) na koncentraci 25 mM; výsledné pH bylo 8,88.

#### ***Borátový pufr (50; 100; 200 mM; pH 9,0)***

Pro přípravu borátového pufru byla příslušná navážka rozpuštěna v destilované vodě (např. pro 100,00 ml 50 mM pufru bylo naváženo 0,3092 g kyseliny borité). Následně bylo pH upraveno na hodnotu 9,0 pomocí 1 M  $\text{NaOH}$ . Roztok byl kvantitativně převeden do odměrné baňky a doplněn destilovanou vodou po rysku.

### ***Fosfátový pufr (20; 40; 60; 80 mM; pH 7,0)***

Fosfátový pufr byl připraven rozpuštěním navážky dihydrátu dihydrogenfosforečnanu sodného v destilované vodě (např. 20 mM pufr o objemu 100,00 ml byl připraven z navážky 0,3120 g). Úprava pH na hodnotu 7,0 byla provedena přidáním 1 M NaOH. Po kvantitativním převedení roztoku byla odměrná baňka doplněna vodou po rysku.

### ***Elektrolyt s přidavkem cyklodextrinu***

Dané množství konkrétního cyklodextrinu bylo naváženo na analytických vahách podle požadované koncentrace (v mg/ml) a poté rozpuštěno v odpovídajícím objemu příslušného pufru (obvykle 10,00 ml).

### ***Elektrolyt pro MEKC I (25 mM SDS)***

Vypočtená navážka 0,1442 g dodecylsíranu sodného (odpovídající koncentraci 25 mM SDS ve 20,00 ml pufru) byla rozpuštěna na ultrazvukové lázni v přibližně 10 ml pufru (borátového nebo fosfátového). Poté byl roztok kvantitativně převeden do odměrné baňky a doplněn do 20 ml odpovídajícím pufrem.

### ***Elektrolyt pro MEKC II (10; 20 mM SDC)***

Navážka deoxycholátu sodného (např. 0,0416 g pro 10 mM SDS) byla rozpuštěna v 10,00 ml 20 mM fosfátového pufru. Následně byl roztok vložen na 10 minut do ultrazvukové lázně pro rozpuštění.

### ***Elektrolyt pro CD-MEKC I (25 mM SDS a 20 mg/ml HP- $\beta$ -CD)***

Bylo naváženo 0,0721 g SDS a 0,200 g HP- $\beta$ -CD. Tyto navážky byly společně rozpuštěny v 10,00 ml 50 mM borátového pufru na ultrazvukové lázni po dobu 10 minut.

### ***Elektrolyt pro CD-MEKC II (25 mM SDS a 40 mg/ml HP- $\beta$ -CD)***

Vypočtené množství dodecylsíranu sodného (0,3605 g) bylo rozpuštěno v 20 mM fosfátovém pufru. Po kvantitativním převedení roztoku byla odměrná baňka doplněna

stejným pufrům po rýsku do 50 ml. V 10,00 ml tohoto připraveného roztoku s 25 mM SDS bylo rozpuštěno 0,400 g HP- $\beta$ -CD odpovídající koncentraci 40 mg/ml.

### ***Elektrolyt s organickými modifikátory***

Příslušná navážka pro přípravu 20 mM fosfátového pufru byla rozpuštěna v destilované vodě (0,1560 g dihydrogenfosforečnanu sodného na 50,00 ml pufru). Poté bylo upraveno pH roztoku na 7,0 pomocí 1 M NaOH. Před kvantitativním převedením do odměrné baňky bylo k roztoku přidáno odpovídající množství organického modifikátoru (př. pro 10% přidavek: 10,00 ml MeOH na 100,00 ml roztoku). Roztok byl kvantitativně převeden do odměrné baňky a doplněn po rýsku destilovanou vodou.

### ***Elektrolyt s organickými modifikátory a cyklodextriny***

Viz výše uvedený postup přípravy elektrolytu s organickými modifikátory. Navážka pro vybranou koncentraci cyklodextrinu byla rozpuštěna v příslušném množství takto připraveného elektrolytu.

### ***Elektrolyt pro CE-MS: APFO (100 mM; pH 9,0)***

Při CE-MS analýze byl jako základní elektrolyt použit vodný roztok perfluorooktanoátu amonného (APFO) o koncentraci 100 mM. Pro jeho přípravu byla použita 96% perfluorooktanová kyselina (2,3 ml na 100,00 ml roztoku). Poté bylo pH upraveno na hodnotu 9,0 pomocí 14,2 M hydroxidu amonného. Výsledný objem byl doplněn ultračistou vodou.

Každý BGE byl přefiltrován přes nylonový stříkačkový filtr o velikosti pórů 0,45  $\mu$ m (Captiva Econofilter, Agilent Technologies, Waldbronn, Německo) a byly jím naplněny vždy tři vialky – vstupní (inlet), výstupní (outlet) a promývací. Před analýzou byly roztoky ve vialkách odplyněny na ultrazvukové lázni po dobu 5 minut.



#### 4.4.2 Roztoky standardů

Zásobní roztoky všech uvedených standardů byly připraveny rozpuštěním příslušných navážek (přibližně 0,5 – 1,1 mg) standardů boswellových kyselin v 1,00 ml 100% metanolu, v případě extraktu bylo rozpuštěno 10 mg v 10,00 ml 100% metanolu. Koncentrace zásobních roztoků se pohybovaly přibližně mezi 0,5 – 1,1 mg/ml, jak uvádí tabulka 3. Při přípravě pracovních roztoků boswellových kyselin bylo přesné množství zásobního roztoku (vypočtené směšovací rovnicí) naředěno 100% metanolem, tak aby se výsledná koncentrace rovnala přesně 100,00 µg/ml.

**Tabulka 3:** Koncentrace zásobních roztoků standardů boswellových kyselin.

	Koncentrace pro DAD (mg/ml)	Koncentrace pro MS (mg/ml)
<b>αBA</b>	1,08	0,81
<b>βBA</b>	0,60	0,66
<b>AαBA</b>	–	0,73
<b>AβBA</b>	0,53	0,55
<b>KBA</b>	0,68	0,84
<b>AKBA</b>	0,58	0,57

Vysvětlivka: α-boswellová kyselina (αBA), β-boswellová kyselina (βBA), acetyl-α-boswellová kyselina (AαBA), acetyl-β-boswellová kyselina (AβBA), 11-keto-β-boswellová kyselina (KBA), acetyl-11-keto-β-boswellová kyselina (AKBA)

Všechny směsi boswellových kyselin byly připraveny ze zásobních roztoků standardů podle směšovací rovnice ( $c_1V_1 + c_2V_2 = c_2V_2$ ) tak, aby byla každá z boswellových kyselin přítomná v koncentraci přesně 100,00 µg/ml. Složení směsí a napipetované objemy jsou uvedeny v tabulce 4.

**Tabulka 4:** Příprava směsí boswellových kyselin.

	αBA (µl)	βBA (µl)	AβBA (µl)	KBA (µl)	AKBA (µl)	MeOH (µl)
<b>Směs 1</b>	–	167	–	147	–	686
<b>Směs 2</b>	–	–	–	147	172	681
<b>Směs 3</b>	–	167	189	–	–	644
<b>Směs 4</b>	92,5	167	–	–	–	740,5
<b>Směs 5</b>	–	–	189	147	–	664
<b>Směs 6</b>	92,5	167	189	147	172	232,5

Vysvětlivka: α-boswellová kyselina (αBA), β-boswellová kyselina (βBA), acetyl-β-boswellová kyselina (AβBA), 11-keto-β-boswellová kyselina (KBA), acetyl-11-keto-β-boswellová kyselina (AKBA)

## 4.5 Parametry měření

### 4.5.1 CE-DAD

Při vývoji metody byla používána křemenná kapilára s celkovou délkou nejprve 48,5 cm, efektivní délkou 40 cm a vnitřním průměrem 50  $\mu\text{m}$ . Později byla celková délka kapiláry prodloužena na 83,5 cm s efektivní délkou 75 cm.

Hydrodynamické dávkování vzorků bylo provedeno při tlaku 50 mbar po dobu 6 vteřin (8 s v delší kapiláře). U většiny analýz se pracovalo při napětí +30 kV. V některých případech separace probíhaly při napětí +20 kV. Frekvence sběru dat byla nastavena na 10 Hz. Detekce probíhala na katodickém konci kapiláry. UV-VIS detektor skenoval spektra od 190 do 600 nm. Analyty byly detekovány při vlnových délkách 200, 250 a 280 nm. Kapilára byla termostatována na teplotu 25°C.

Nová kapilára byla před prvním použitím promyta 1 M NaOH (1200 s), 0,1 M NaOH (1200 s) a vodou (1200 s). Každý den před měřením se při ranním promytí kapilára promývala 1 M NaOH (300 s), 0,1 M NaOH (300 s) a vodou (300 s). Mezi jednotlivými nástřiky docházelo k propláchnutí kapiláry 0,1 M NaOH (180 s), vodou (180 s) a příslušným BGE (300 s). Po poslední analýze byla vždy na konci dne kapilára promyta 100% MeOH (300 s), 0,1 M NaOH (300 s) a vodou (300 s).

### 4.5.2 CE-MS

Pro CE-MS byla použita křemenná kapilára o celkové délce 90 cm s vnitřním průměrem 50  $\mu\text{m}$  a vnějším průměrem 375  $\mu\text{m}$ . Vzorek byl dávkován tlakem 50 mbar po dobu 10 s. Napětí vkládané na kapiláru mělo hodnotu +30 kV. Proud dosahoval 30  $\mu\text{A}$ . Před analýzou se kapilára promývala 5 M amoniakem (60 s), vodou (60 s) a elektrolytem (300 s). V průběhu separace byla teplota kapiláry udržována na 25°C.

Pro spojení CE s MS detekcí bylo použito rozhraní využívající přídavnou kapalinu. Parametry iontového zdroje (ESI) byly následující: průtok sušícího plynu ( $\text{N}_2$ ) – 15 l/min při teplotě 250°C; tlak nebulizace – 15 psi; průtok přídavného plynu – 8 l/min při 200°C; napětí vložené na kapiláru bylo +3000 V. Přídavná kapalina obsahovala metanol a vodu (50:50, v/v) a 0,5 % kyseliny mravenčí. MS detekce byla provedena v pozitivním módu.

Sken iontů proběhl v rozsahu  $m/z$  50 – 600. Vyhodnocení CE-MS analýz se uskutečnilo na základě monitorování vybraných reakcí (v MRM módu).

## 4.6 Parametry hodnocení metody

### 4.6.1 Rozlišení [23]

$$RS = \frac{1,18 (t_{R2} - t_{R1})}{w_{h1} + w_{h2}}$$

(Rovnice 5)

$$t_{R2} > t_{R1}$$

$t_{R1}$  a  $t_{R2}$  – migrační časy nebo vzdálenosti podél základní linie mezi bodem nástřiku a kolmicemi spuštěnými z vrcholů dvou sousedních píků

$w_{h1}$  a  $w_{h2}$  – šířky píků v polovině jejich výšky

V tabulkách 5, 6, 7, 8, 9 a 10 první hodnota rozlišení odpovídá rozlišení mezi píkem EOF a prvním detekovaným píkem z BSE či prvním analytem ze směsi standardů.

### 4.6.2 Výpočet pohyblivosti [15]

Výpočet zdánlivé pohyblivosti:

$$\mu_a = \frac{l}{t_a E} = \frac{l L}{t_a U}$$

(Rovnice 6)

Výpočet efektivní pohyblivosti:

$$\mu_e = \mu_a - \mu_{EOF}$$

(Rovnice 7)

$\mu_a$  – zdánlivá pohyblivost [ $m^2 \cdot V^{-1} \cdot s^{-1}$ ]

$\mu_e$  – efektivní pohyblivost [ $m^2 \cdot V^{-1} \cdot s^{-1}$ ]

$\mu_{EOF}$  – pohyblivost elektroosmotického toku [ $m^2 \cdot V^{-1} \cdot s^{-1}$ ]

$U$  – aplikované napětí [V]

$l$  – efektivní délka kapiláry [m]

$L$  – celková délka kapiláry [m]

$t_a$  – migrační čas analytu [s]

$E$  – intenzita elektrického pole [ $V \cdot m^{-1}$ ]

## 5. VÝSLEDKY A DISKUZE

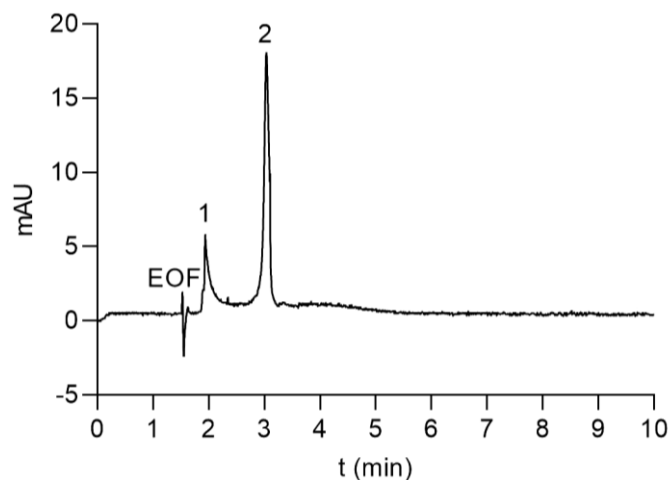
### 5.1 Vývoj metody, optimalizované parametry

Při vývoji metody kapilární elektroforézy pro analýzu boswellových kyselin se nejprve vybíraly pufrů jako BGE pro CZE, ve kterých jsou boswellové kyseliny alespoň částečně záporně nabitě a tudíž mohou migrovat jako anionty. Za účelem zvýšení selektivity metody se pracovalo s různými modifikacemi metody CE. Byly testovány např. přídavky tenzidů (MEKC), cyklodextrinů (EKC), organických modifikátorů nebo jejich kombinace. Zkoušel se zejména jejich vliv na separaci extraktu *Boswellia serrata* a také směsí různých standardů boswellových kyselin. Nakonec byly stanoveny neoptimálnější koncentrace jednotlivých složek BGE. Jako jedna z možností pro separaci boswellových kyselin byla vyzkoušena i analýza pomocí kapilární elektroforézy ve spojení s hmotnostní spektrometrií (CE-MS).

#### 5.1.1 Výběr pufru

V první fázi vývoje metody se testovalo chování boswellových kyselin v různých pufrů jako základních elektrolytech. Celkem bylo použito 5 různých pufrů – 50 mM octanový (pH 4,5), 25 mM octanový (pH 9,0), 25 mM uhličitanový (pH 8,9), 50 mM borátový (pH 9,0) a 20 mM fosfátový pufr (pH 7,0). Na základě hodnot  $pK_a$  (v tabulce 1) mají boswellové kyseliny v těchto pufrů záporný náboj a chovají se tedy jako anionty. V případě octanového pufru o pH 4,5 jsou nabitě jen částečně.

Výběr základního elektrolytu byl proveden na základě srovnání analýz extraktu *Boswellia serrata* o koncentraci 1,09 mg/ml v každém z výše uvedených pufrů. Octanový (pH 4,5) a uhličitanový pufr (pH 8,9) byly vyloučeny, protože na rozdíl od zbylých pufrů se v jejich záznamech neobjevil pík s gaussovským tvarem. Při analýze BSE v borátovém pufru byl extrakt rozdělen na dvě složky (viz obrázek 6). Ve fosfátovém (pH 7,0) a octanovém pufru (pH 9,0) nedošlo k separaci extraktu; na elektroferogramu byl jen jeden pík. Pro další práci byly vybrány pufrů borátový o pH 9,0 a fosfátový o pH 7,0. S analýzami v octanovém pufru (pH 9,0) nebylo pokračováno kvůli asymetrii píku.

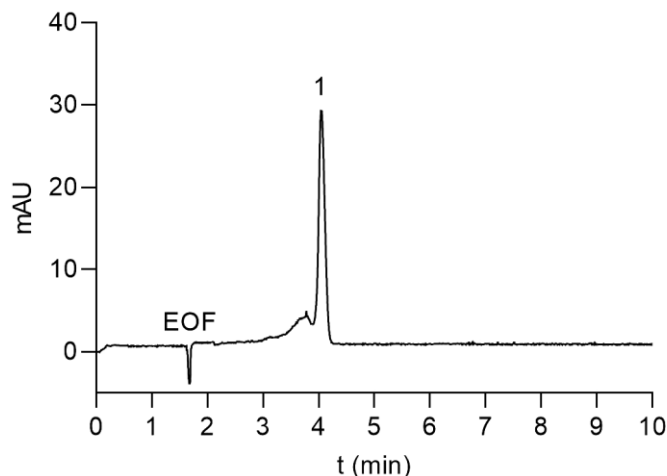


**Obrázek 6:** Elektroferogram analýzy extraktu *Boswellia serrata* (1,09 mg/ml). BGE: 50 mM borátový pufr (pH 9,0). Kapilára: 48,5/40 cm; napětí: +30 kV; detekce: 200 nm.

### 5.1.2 Micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC)

Při interakci analytů s micelami v průběhu MEKC separace dochází k rozdělování analytů mezi vodnou fází a micely a tím i ke změně chování separovaných látek a selektivity metody (např. zpomalení migrace, změna pořadí), která má podobné rysy s RP-HPLC, případně CEC jako je popsáno v článku [9]. Jelikož jsou boswellové kyseliny lipofilní látky, MEKC by pro ně měla být metodou volby.

V rámci MEKC byl použit dodecylsulfát sodný (SDS) a deoxycholát sodný (SDC). Přídavek 25 mM SDS v borátovém ani fosfátovém pufru neměl na analýzu BSE výrazný vliv. Oba elektrolyty se chovaly podobně. Extrakt nebyl rozseparovaný, pouze se asi o 1 minutu prodloužil migrační čas oproti BGE bez přídavku SDS (viz obrázek 7). Při snížení vkládaného napětí ze +30 kV na +20 kV se doba analýzy v tomto systému prodloužila, ale k separaci látek v extraktu nedošlo. Při zvětšení efektivní délky kapiláry ze 40 cm na 75 cm došlo pouze k prodloužení migračního času (při +30 kV).



**Obrázek 7:** Elektroferogram analýzy extraktu *Boswellia serrata* (1,09 mg/ml). BGE: 50 mM borátový pufr (pH 9,0) + 25 mM SDS. Kapilára: 48,5/40 cm; napětí: +30 kV; detekce: 200 nm.

Základní elektrolyt s 10 mM nebo 20 mM SDC byl testován pouze v kombinaci s 20 mM fosfátovým pufrům o pH 7,0 v 75 cm dlouhé kapiláře při +30 kV. Oproti SDS ale deoxycholát poskytoval výrazně nižší odezvu a mnohem horší tvar píku.

### 5.1.3 Elektrokinetická chromatografie (EKC)

Na základě poznatků z výše uvedených odborných článků [10] – [14], které shrnuje tabulka 2, se další práce zaměřila na studium vhodnosti EKC pro separaci boswellových kyselin. Bylo testováno několik typů dostupných cyklodextrinů, které byly použity pro separaci BSE. První testování cyklodextrinů bylo provedeno v kratší kapiláře (48,5/40 cm). Některé cyklodextriny byly později otestovány znovu v delší kapiláře (83,5/75 cm) a spolu s nimi i některé z dalších typů CD. Všechny použité CD a výsledky z těchto experimentů jsou uvedeny v tabulce 5 pro 20 mM fosfátový pufr o pH 7,0 a v tabulce 6 pro 50 mM borátový pufr o pH 9,0.

**Tabulka 5:** Testované cyklodextriny ve 20 mM fosfátovém pufru (pH 7,0) při analýze 1,09 mg/ml extraktu *Boswellia serrata*. Výsledky jsou uvedeny jako průměrná hodnota ze 3 měření (ze 2 měření v kapiláře o délce 83,5/75 cm při napětí +30 kV).

CD	Počet píků	Migrační čas (min)	Rs	Výška (mAU)	Kapilára
2,5 mg/ml $\beta$ -CD	2	2,05 4,09	1,43 8,85	5,7 4,7	48,5/40 cm
20 mg/ml HP- $\beta$ -CD	1	2,09	1,29	17,7	48,5/40 cm
5 mg/ml $\gamma$ -CD	1	2,05	2,17	49,2	48,5/40 cm
20 mg/ml HP- $\gamma$ -CD	1	2,11	2,31	55,1	48,5/40 cm
20 mg/ml HP- $\alpha$ -CD	3	6,21 6,41 12,29	22,62 0,94 31,14	1,6 1,5 14,5	83,5/75 cm
20 mg/ml HP- $\beta$ -CD	3	5,94 6,07 6,13	5,51 1,33 0,55	17,9 9,1 10,9	83,5/75 cm
20 mg/ml DM- $\beta$ -CD	5	5,61 5,69 5,76 5,80 5,84	1,29 1,23 1,10 0,90 0,71	4,6 4,0 5,9 2,4 1,5	83,5/75 cm
5 mg/ml TM- $\beta$ -CD	5	5,40 5,68 5,73 5,88 8,40	1,47 3,07 1,03 2,90 19,70	2,3 0,8 1,3 2,0 1,5	83,5/75 cm

Vysvětlivka:  $\beta$ -cyklodextrin ( $\beta$ -CD), 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyklodextrin (HP- $\beta$ -CD),  $\gamma$ -cyklodextrin ( $\gamma$ -CD), 2-hydroxypropyl- $\gamma$ -cyklodextrin (HP- $\gamma$ -CD), 2-hydroxypropyl- $\alpha$ -cyklodextrin (HP- $\alpha$ -CD), dimetyl- $\beta$ -cyklodextrin (DM- $\beta$ -CD), trimetyl- $\beta$ -cyklodextrin (TM- $\beta$ -CD)

**Tabulka 6:** Testované cyklodextriny v 50 mM borátovém pufru (pH 9,0) při analýze 1,09 mg/ml extraktu *Boswellia serrata*. Výsledky jsou uvedeny jako průměrná hodnota ze 3 měření (ze 2 měření v kapiláře o délce 83,5/75 cm při napětí +30 kV).

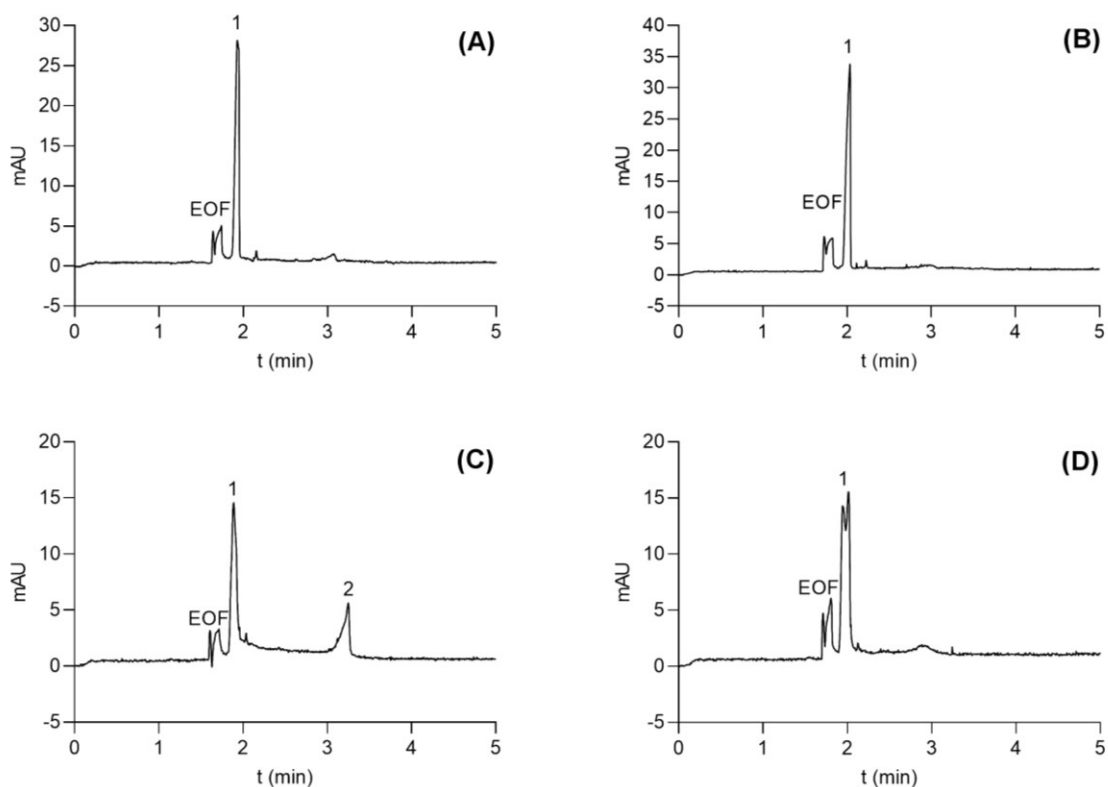
CD	Počet píků	Migrační čas (min)	Rs	Výška (mAU)	Kapilára
2,5 mg/ml $\beta$ -CD	2	1,89 3,24	1,50 10,61	11,9 4,1	48,5/40 cm
20 mg/ml HP- $\beta$ -CD	1	2,01	0,82	13,9	48,5/40 cm
5 mg/ml $\gamma$ -CD	1	1,94	1,88	27,6	48,5/40 cm
20 mg/ml HP- $\gamma$ -CD	1	2,03	1,88	34,8	48,5/40 cm
20 mg/ml HP- $\beta$ -CD	2	5,59 5,73	4,56 1,35	13,3 15,0	83,5/75 cm

Vysvětlivka:  $\beta$ -cyklodextrin ( $\beta$ -CD), 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyklodextrin (HP- $\beta$ -CD),  $\gamma$ -cyklodextrin ( $\gamma$ -CD), 2-hydroxypropyl- $\gamma$ -cyklodextrin (HP- $\gamma$ -CD)

Přídavkem cyklodextrinů se zkrátila doba analýzy. Působením gama cyklodextrinů ( $\gamma$ -CD a HP- $\gamma$ -CD) při analýze extraktu *Boswellia serrata* (1,09 mg/ml) k rozdělení boswellových kyselin nedošlo ani v borátovém pufru o pH 9,0 (viz obrázek 8A a 8B), ani ve fosfátovém pufru o pH 7,0. Všechny složky BSE migrovaly ve stejném čase a vytvořily pouze jediný pík bez žádného náznaku separace.

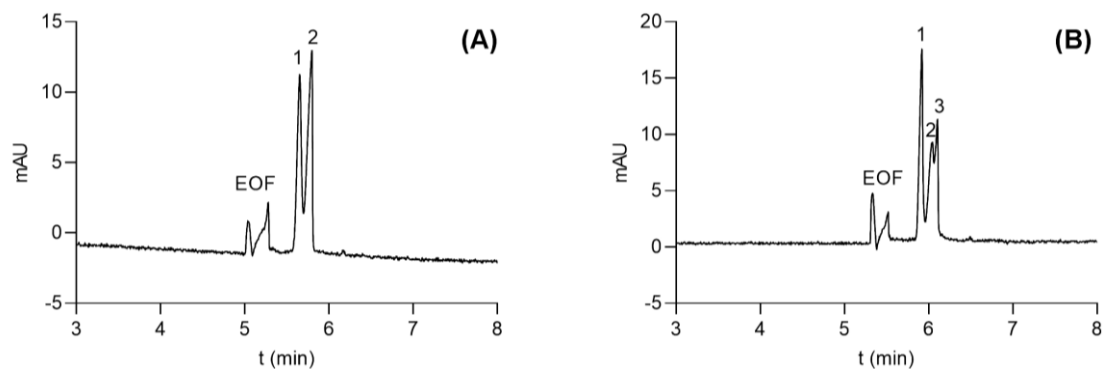
Beta cyklodextriny se obecně zdají být oproti výše zmíněným gama cyklodextrinům pro separaci BAs vhodnější. Při použití 2,5 mg/ml  $\beta$ -CD se extrakt rozdělil do dvou píků v případě obou pufrů. Zároveň se ale zmenšilo rozlišení mezi EOF a prvním píkem (viz obrázek 8C). S přídavkem  $\beta$ -CD ve fosfátovém pufru vykazoval první pík výrazné chvostování. Po přidání HP- $\beta$ -CD do BGE se extrakt sice opět zcela nerozdělil, ale na rozdíl od HP- $\gamma$ -CD zde byl patrný náznak separace na 2 složky v borátovém pufru (viz obrázek 8D) a na 3 složky ve fosfátovém.





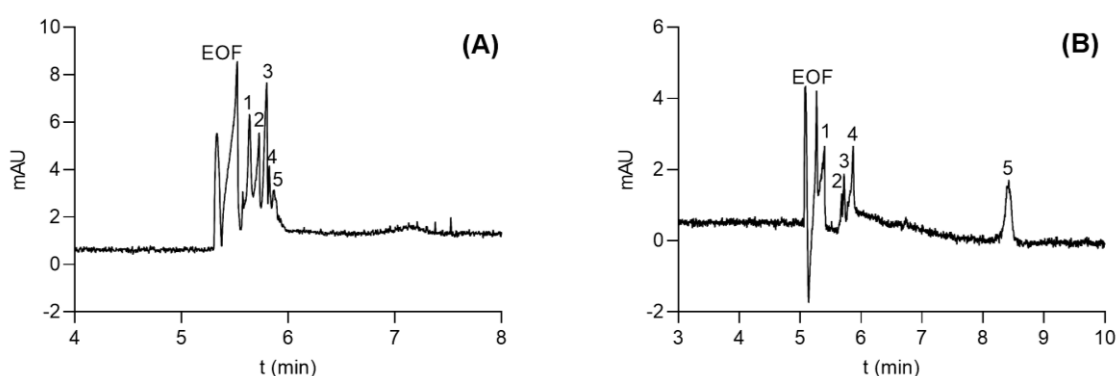
**Obrázek 8:** Elektroferogramy analýz extraktu *Boswellia serrata* (1,09 mg/ml). BGE: 50 mM borátový pufr (pH 9,0) + 5 mg/ml  $\gamma$ -CD **(A)**; 20 mg/ml HP- $\gamma$ -CD **(B)**; 2,5 mg/ml  $\beta$ -CD **(C)**; 20 mg/ml HP- $\beta$ -CD **(D)**. Kapilára: 48,5/40 cm; napětí: +30 kV; detekce: 200 nm.

Při pozdější analýze, která se uskutečnila v delší kapiláře o rozměrech 83,5/75 cm, se potvrdilo, že HP- $\beta$ -CD způsobuje lepší rozdělení BSE ve fosfátovém než borátovém pufru, jak naznačuje obrázek 9. Přestože se v obou případech zlepšilo rozlišení, počet rozdělených složek zůstal i v delší kapiláře stejný. Proto se při další optimalizaci metody upřednostnila kombinace fosfátového pufru (pH 7,0) s HP- $\beta$ -CD.



**Obrázek 9:** Elektroferogramy analýz extraktu *Boswellia serrata* (1,09 mg/ml). BGE: 50 mM borátový pufr (pH 9,0) + 20 mg/ml HP- $\beta$ -CD **(A)**; 20 mM fosfátový pufr (pH 7,0) + 20 mg/ml HP- $\beta$ -CD **(B)**. Kapilára: 83,5/75 cm; napětí: +30 kV; detekce: 200 nm.

Zbylé cyklodextriny uvedené v tabulce 5 byly testovány až později jen v delší kapiláře (83,5/75 cm) a pouze ve 20 mM fosfátovém pufru o pH 7,0. Jednalo se o HP- $\alpha$ -CD, DM- $\beta$ -CD a TM- $\beta$ -CD. Z těchto jmenovaných byl nejlepší výsledek získán při použití 20 mg/ml DM- $\beta$ -CD, protože BSE byl částečně rozseparován až na 5 píků, které by mohly odpovídat boswellovým kyselinám (viz obrázek 10A). Zajímavé separace bylo dosaženo s přidavkem 5 mg/ml TM- $\beta$ -CD v BGE (viz obrázek 10B). Problémem těchto cyklodextrinů bylo velmi malé rozlišení mezi EOF a prvním píkem, ale i dalšími píky mezi sebou. Proto nebyly v dalším průběhu práce tyto dva CD dále testovány. Použitím HP- $\alpha$ -CD k rozdělení boswellových kyselin nedošlo a signál měl nízkou citlivost.



**Obrázek 10:** Elektroferogramy analýz extraktu *Boswellia serrata* (1,09 mg/ml). BGE: 20 mM fosfátový pufr (pH 7,0) + 20 mg/ml DM- $\beta$ -CD **(A)**; 5 mg/ml TM- $\beta$ -CD **(B)**. Kapilára: 83,5/75 cm; napětí: +30 kV; detekce: 200 nm.

#### 5.1.4 Vliv délky kapiláry a napětí

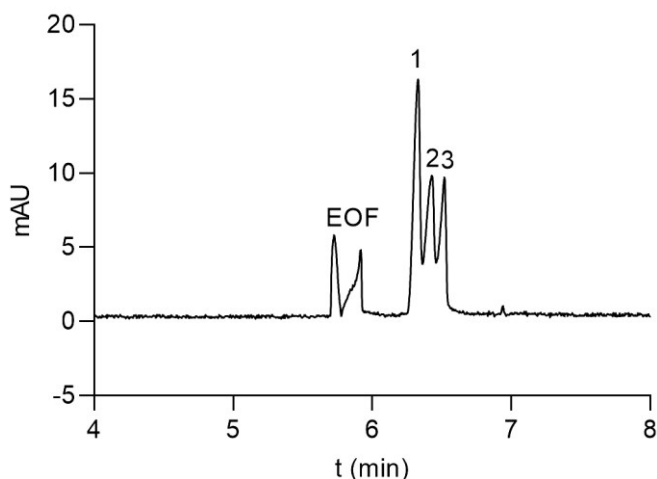
Působením cyklodextrinů se zkrátil migrační čas analytů a došlo tak ke snížení rozlišení mezi EOF a prvním píkem. Kvůli tomu musela být prodloužena kapilára (jak již bylo několikrát zmíněno v předchozích kapitolách) téměř na dvojnásobek, ze 40 cm na 75 cm efektivní délky. Obecně totiž platí, že při zvětšení délky kapiláry se prodlouží čas analýzy. Díky delší kapiláře také vzniká větší prostor pro interakce analytů s CD, což se na elektroferogramu projeví lepším rozdělením píků. Z toho důvodu již byla dále používána jen delší kapilára (83,5/75 cm).

Kromě délky kapiláry bylo dalším testovaným parametrem vkládané napětí. Ačkoli většina analýz probíhala při +30 kV, experimentálně se srovnávalo i napětí o hodnotách +20 kV a +30 kV. Snížení napětí teoreticky vede k tomu, že se prodlužuje doba analýzy, ale na druhou stranu se zároveň snižuje separační účinnost.

Ze získaných výsledků uvedených v předchozích kapitolách vyplývá, že prodloužení kapiláry na celkovou délku 83,5 cm a efektivní délku 75 cm mělo poměrně významný pozitivní vliv na separaci látek obsažených v BSE, zatímco snížením napětí z +30 kV na +20 kV se mírně zhoršilo rozlišení píků. Na základě těchto poznatků bylo rozhodnuto, že pro další testování bude nejlepší používat křemennou kapiláru o délce 83,5/75 cm při napětí +30 kV.

### 5.1.5 Vliv koncentrace HP- $\beta$ -CD

V další fázi byly testovány různé koncentrace HP- $\beta$ -CD v rozmezí 5 – 100 mg/ml ve 20 mM fosfátovém pufru o pH 7,0. Nejnižší koncentrace, tedy 5 mg/ml, byla nedostatečná, protože extrakt *Boswellia serrata* (1,09 mg/ml) byl rozdělen pouze na dva píky. S vyššími koncentracemi HP- $\beta$ -CD se začalo objevovat i dělení druhého píku. Při dalším zvyšování koncentrace se pak extrakt částečně rozdělil do tří píků. Od koncentrace 40 mg/ml se začalo zhoršovat rozlišení mezi prvním a druhým píkem a při koncentraci 100 mg/ml tyto píky splynuly v jeden. Na druhou stranu ale se vzrůstající koncentrací HP- $\beta$ -CD bylo při 250 nm patrné postupné oddělování AKBA od KBA. Proto byla jako vhodná koncentrace zvolena 40 – 60 mg/ml HP- $\beta$ -CD (viz obrázek 11). Jak ukazuje tabulka 7, s narůstající koncentrací se prodlužoval migrační čas a měnilo se rozlišení píků. Citlivost analýzy se s různými koncentracemi výrazně neměnila.



**Obrázek 11:** Elektroferogram analýzy extraktu *Boswellia serrata* (1,09 mg/ml). BGE: 20 mM fosfátový pufr (pH 7,0) + 40 mg/ml HP- $\beta$ -CD. Kapilára: 83,5/75 cm; napětí: +30 kV; detekce: 200 nm.

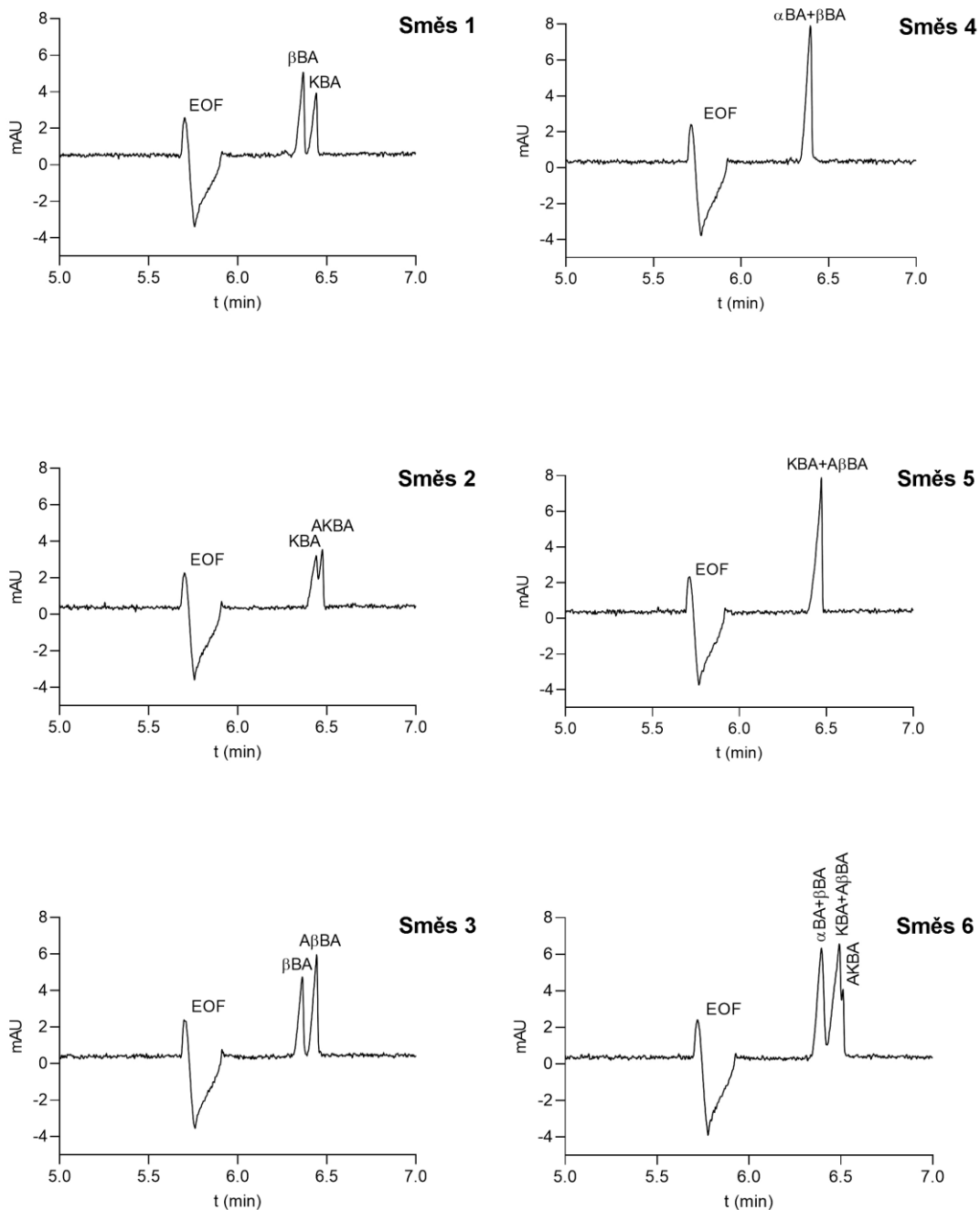
**Tabulka 7:** Vliv koncentrace 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyklodextrinu (HP- $\beta$ -CD) ve 20 mM fosfátovém pufru (pH 7,0) při analýze 1,09 mg/ml extraktu *Boswellia serrata*. Výsledky jsou uvedeny jako průměrná hodnota ze 2 měření v kapiláře o délce 83,5/75 cm při napětí +30 kV.

Koncentrace HP- $\beta$ -CD	Migrační čas (min)	Rs	Výška (mAU)
5 mg/ml	5,81	5,47	7,5
	5,94	1,13	9,8
20 mg/ml	5,99	6,38	15,3
	6,12	1,29	8,2
	6,18	0,56	9,9
40 mg/ml	6,31	5,55	14,9
	6,40	0,98	8,8
	6,50	1,10	8,3
60 mg/ml	6,73	5,17	13,4
	6,82	0,84	9,3
	6,92	1,13	8,3
80 mg/ml	7,08	4,66	10,4
	7,15	0,65	7,8
	7,25	1,11	5,9
100 mg/ml	7,48	4,89	10,9
	7,53	0,54	7,0
	7,63	1,56	4,9

Pro ověření schopnosti rozdělení standardů různých boswellových kyselin mezi sebou byly připraveny jejich směsi podle tabulky 4 v kapitole 4.4.2. Směsi byly testovány ve 20 mM fosfátovém pufru o pH 7,0 se 40 mg/ml HP- $\beta$ -CD v kapiláře o délce 83,5/75 cm při +30 kV. Separace těchto směsí ukazuje obrázek 12. Důležitým faktorem pro identifikaci KBA a AKBA byla schopnost absorpce při 250 nm, kterou mají pouze tyto dvě látky (a to díky přítomnosti karbonylové skupiny v poloze 11).

Pro směsi 1 – 3 byly vybrány takové kombinace látek, u kterých se předpokládala separace na základě již získaných výsledků z analýz BSE. Ve směsi 1 ( $\beta$ BA+KBA) a směsi 3 ( $\beta$ BA+A $\beta$ BA) se  $\beta$ -boswellová kyselina dobře oddělila až na základní linii od KBA ( $R_s=1,73$ ) a také od A $\beta$ BA ( $R_s=1,72$ ). Zatímco KBA a AKBA ve směsi 2 byly při této koncentraci HP- $\beta$ -CD rozděleny jen částečně ( $R_s=0,98$ ). Naopak u směsí 4 a 5 separace při tomto složení BGE neproběhla vůbec. Jednalo se totiž o směs izomerů  $\alpha$ BA s  $\beta$ BA a směs KBA s A $\beta$ BA. Zatímco  $\alpha$ BA a  $\beta$ BA nelze nijak od sebe rozlišit, ve druhém případě lze přítomnost dvou látek rozeznat díky jejich různým absorpčním spektrům, protože

každá látka má jiné absorpční maximum (210 nm pro A $\beta$ BA a 254 nm pro KBA). Poslední šestá směs pěti boswellových kyselin ( $\alpha$ BA+ $\beta$ BA+A $\beta$ BA+KBA+AKBA) byla nečekaně rozdělena jen na dva píky s náznakem dělení AKBA od druhého píku.



**Obrázek 12:** Elektroferogramy analýz šesti směsí standardů boswellových kyselin (100  $\mu$ g/ml). BGE: 20 mM fosfátový pufr (pH 7,0) + 40 mg/ml HP- $\beta$ -CD. Kapilára: 83,5/75 cm; napětí: +30 kV; detekce: 200 nm.

### 5.1.6 Vliv organických modifikátorů

Pro další úpravu selektivity separace se mohou využívat organické modifikátory. Pro toto testování byla vybrána 4 organická rozpouštědla. Jednalo se o isopropanol (IPA), tetrahydrofuran (THF), butanol (BuOH) a metanol (MeOH). Jednotlivé modifikátory byly přidány k BGE v koncentraci 10 % (v/v). Kvůli nižší rozpustnosti butanolu ve vodě (vodném roztoku BGE) byl použit jen 5% přídavek BuOH. Jako roztok základního elektrolytu, do něhož bylo přidáno organické rozpouštědlo, byl použit 20 mM fosfátový pufr o pH 7,0 s 20 mg/ml HP- $\beta$ -CD. Analýza extraktu *Boswellia serrata* o koncentraci 1,02 mg/ml probíhala při +30 kV v kapiláře dlouhé 83,5/75 cm.

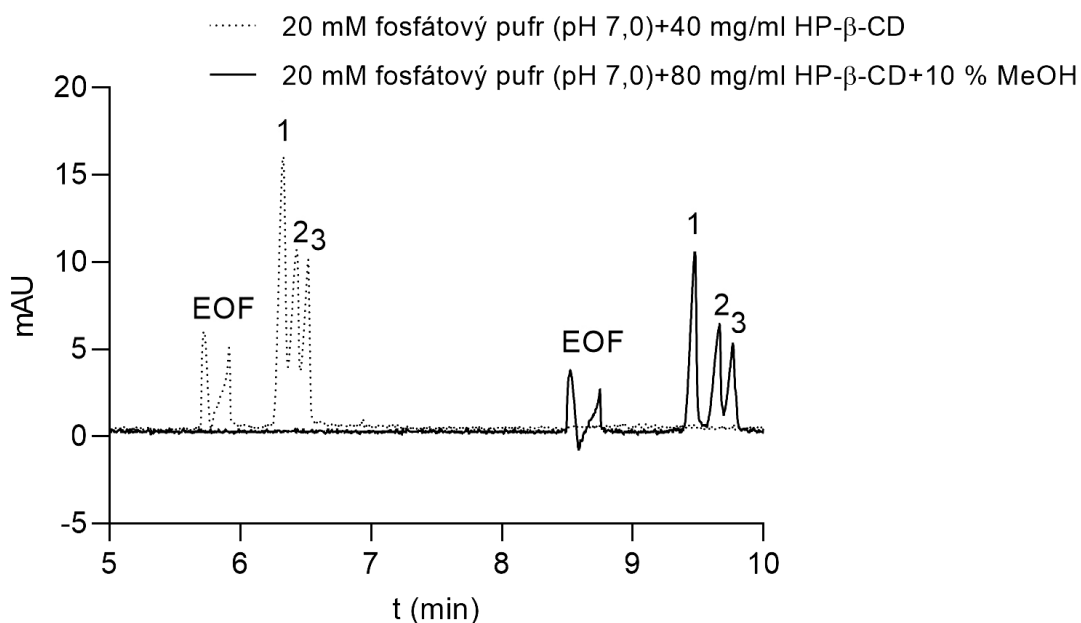
Obecně působením organických modifikátorů se mírně snížil proud a také se prodloužila doba analýza. Kvůli vysokému šumu, nízké citlivosti a asymetrii píků byly vyřazeny THF a BuOH. V případě IPA nebyl extrakt rozseparován. Záznam měl podobu 1 píku pouze s náznakem separace. Při použití 10 % MeOH se výsledek podobal záznamu bez organických modifikátorů, nicméně s větším rozlišením prvního a druhého píku ( $R_s=1,96$ ), ale na druhou stranu s nižším rozlišením druhého a třetího píku ( $R_s=0,37$ ).

Vzhledem k získaným výsledkům byl zvolen jako nejlepší organický modifikátor MeOH. Tabulka 8 zobrazuje srovnání separace extraktu v BGE s přídavkem a bez přídávku 10 % metanolu při různých koncentracích HP- $\beta$ -CD. Je patrný nárůst migračních časů při zvyšující se koncentraci HP- $\beta$ -CD a také prodloužení doby analýz při použití metanolu. Po přidání 10 % metanolu do BGE se také změnilo rozlišení jednotlivých píků, a proto musela být zvýšena koncentrace HP- $\beta$ -CD, kvůli zlepšení oddělení druhého a třetího píku. Nejlepších výsledků bylo dosaženo s přídavkem 80 mg/ml HP- $\beta$ -CD a 10 % (v/v) MeOH v BGE, jak ukazuje obrázek 13.

**Tabulka 8:** Srovnání tří různých koncentrací 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyklodextrinu (HP- $\beta$ -CD) bez a s přidavkem 10 % metanolu ve 20 mM fosfátovém pufru (pH 7,0) při analýze 1,02 mg/ml extraktu *Boswellia serrata*. Výsledky jsou uvedeny jako průměrná hodnota ze 2 měření v kapiláře o délce 83,5/75 cm při napětí +30 kV.

Koncentrace HP- $\beta$ -CD	Bez metanolu			S 10 % (v/v) metanolu		
	Migrační čas (min)	Rs	Výška (mAU)	Migrační čas (min)	Rs	Výška (mAU)
20 mg/ml	5,99	6,38	15,3	8,04	10,14	12,6
	6,12	1,29	8,2	8,25	1,96	6,9
	6,18	0,56	9,9	8,28	0,37	7,2
40 mg/ml	<b>6,31</b>	<b>5,55</b>	<b>14,9</b>	8,60	6,18	14,4
	<b>6,40</b>	<b>0,98</b>	<b>8,8</b>	8,83	1,48	8,1
	<b>6,50</b>	<b>1,10</b>	<b>8,3</b>	8,90	0,54	9,7
80 mg/ml	7,08	4,66	10,4	<b>9,48</b>	<b>9,42</b>	<b>10,1</b>
	7,15	0,65	7,8	<b>9,67</b>	<b>2,07</b>	<b>6,0</b>
	7,25	1,11	5,9	<b>9,77</b>	<b>1,10</b>	<b>4,8</b>

Tučně zvýrazněné výsledky z tabulky 8 jsou zobrazeny ve formě elektroferogramů na obrázku 13.



**Obrázek 13:** Srovnání dvou elektroferogramů analýz extraktu *Boswellia serrata* (1,02 mg/ml) v 20 mM fosfátovém pufru (pH 7,0) se 40 nebo 80 mg/ml HP- $\beta$ -CD bez a s přidavkem 10 % metanolu. Kapilára: 83,5/75 cm; napětí: +30 kV; detekce: 200 nm.

Ve stejném BGE (20 mM fosfátový pufr o pH 7,0 s 10 % MeOH a 80 mg/ml HP- $\beta$ -CD) byla analyzována i směs pěti standardů boswellových kyselin ( $\alpha$ BA+ $\beta$ BA+A $\beta$ BA+KBA+AKBA), každý o koncentraci 100  $\mu$ g/ml. Oproti BSE byla směs (podobně jako v předchozí kapitole) znovu hůře rozdělená. Výrazně horší separace se na rozdíl od BSE ve směsi opět ukázala mezi druhým a třetím píkem.

Koncentrace 20 % (v/v) metanolu byla vyhodnocena jako příliš vysoká, protože jejím důsledkem se ještě více prohloubil efekt metanolu na separaci BSE a zcela zaniklo rozdělení druhého a třetího píku. Místo toho vznikl jen jeden pík s náznakem separace.

### **5.1.7 Vliv koncentrace pufrů**

Při další optimalizaci byly ještě testovány i vyšší koncentrace borátového pufru o pH 9,0 (100 – 200 mM) a fosfátového pufru o pH 7,0 (40 – 80 mM).

#### **5.1.7.1 Borátový pufr**

V samotném borátovém pufru o koncentraci 50 mM se podařilo rozdělit složky BSE do dvou píků. Při vyšších koncentracích se snížilo rozlišení mezi těmito píky. S přidávkem HP- $\beta$ -CD (20, 40 a 80 mg/ml) v BGE byly elektroferogramy při různých koncentracích borátového pufru i HP- $\beta$ -CD velmi podobné. Záznam z analýzy BSE obsahoval vždy dva úzké píky, u kterých se v závislosti na rostoucích koncentracích pufru a cyclodextrinu měnily migrační časy a mírně se zvětšovalo rozlišení, jak lze vidět v tabulce 9. Závěrem lze konstatovat, že změna koncentrace borátového pufru ani v kombinaci s vysokou koncentrací HP- $\beta$ -CD nemá výrazný vliv na separaci extraktu *Boswellia serrata*.



**Tabulka 9:** Srovnání tří různých koncentrací borátového pufru (pH 9,0) při analýze 1,02 mg/ml extraktu *Boswellia serrata* bez a s přidavkem 20 mg/ml HP- $\beta$ -CD (v 50 mM borátovém pufru) nebo 40 mg/ml HP- $\beta$ -CD (ve 100 a 200 mM borátovém pufru). Výsledky jsou uvedeny jako průměrná hodnota ze 2 měření v kapiláře o délce 83,5/75 cm při napětí +30 kV.

Koncentrace borátového pufru	Bez HP- $\beta$ -CD			S 20 či 40 mg/ml HP- $\beta$ -CD		
	Migrační čas (min)	Rs	Výška (mAU)	Migrační čas (min)	Rs	Výška (mAU)
50 mM	5,62	30,15	4,4	5,59	4,56	13,3
	5,67	0,49	7,1	5,73	1,35	15,0
	9,16	19,13	9,0			
100 mM	7,13	6,16	8,3	7,07	2,09	11,7
				7,31	2,28	14,8
200 mM	9,22	6,81	3,3	8,85	2,86	13,1
	9,38	0,70	3,9	9,16	3,02	14,5

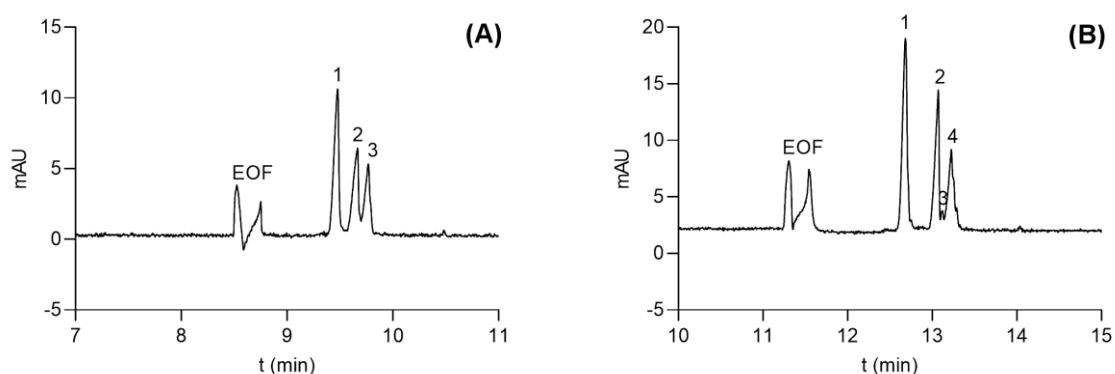
### 5.1.7.2 Fosfátový pufr

Vzhledem k výsledkům předchozích analýz byl pro testování narůstající koncentrace fosfátového pufru o pH 7,0 při všech analýzách použit BGE, který obsahoval 80 mg/ml HP- $\beta$ -CD a 10 % metanolu. Pro srovnání separačních schopností tohoto BGE byl analyzován extrakt *Boswellia serrata* (1,02 mg/ml) i směs pěti boswellových kyselin (100  $\mu$ g/ml).

U vyšších koncentrací fosfátového pufru se oproti 20 mM fosfátovému pufru prodloužil migrační čas, zlepšilo se rozlišení a mírně se i zvýšila citlivost, která se ale s narůstající koncentrací pufru již dále neměnila, jak je patrné z tabulky 10. Rozdíl mezi použitím nejnižší (20 mM) a nejvyšší (80 mM) koncentrace fosfátového pufru při analýze BSE ukazuje obrázek 14. Zvyšování koncentrace fosfátového pufru napomohlo většímu oddělení píků mezi sebou v BSE a zejména ve směsi 5 BAs (viz obrázek 15B), kde došlo k výraznému zlepšení rozlišení a oddělení třetího píku.

**Tabulka 10:** Srovnání analýzy extraktu *Boswellia serrata* (1,02 mg/ml) a směsi standardů pěti boswellových kyselin (100 µg/ml) při narůstající koncentraci fosfátového pufru (pH 7,0). BGE obsahuje vždy 80 mg/ml HP-β-CD a 10 % MeOH. Výsledky jsou uvedeny jako průměrná hodnota ze 2 měření v kapiláře o délce 83,5/75 cm při napětí +30 kV.

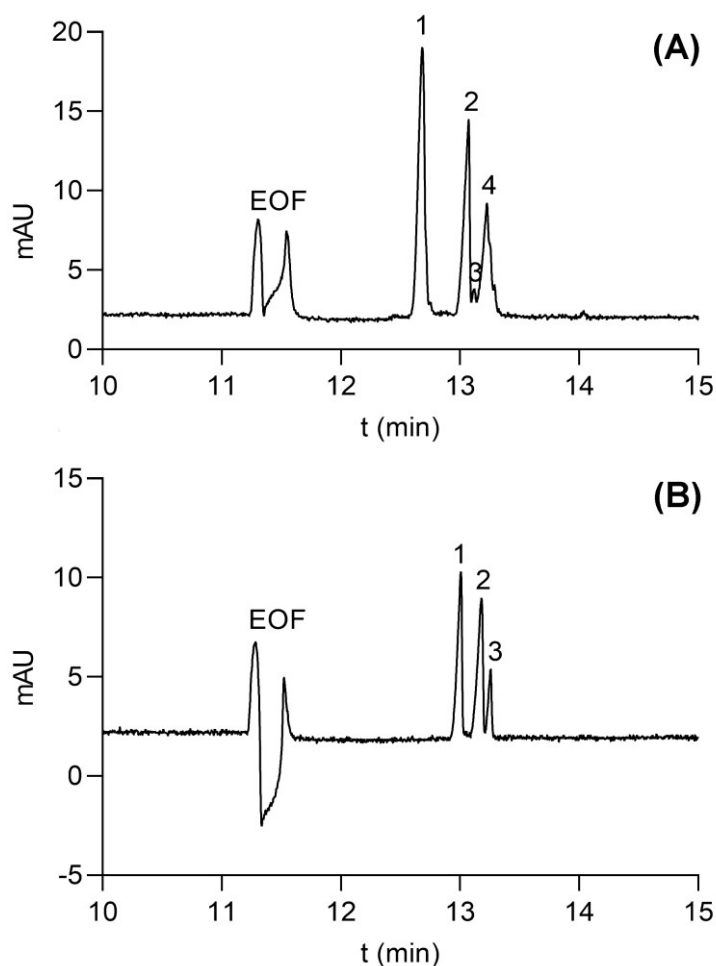
Koncentrace fosfátového pufru	BSE			Směs 5 BAs		
	Migrační čas (min)	Rs	Výška (mAU)	Migrační čas (min)	Rs	Výška (mAU)
20 mM	9,69	6,87	9,7	9,74	13,93	5,4
	9,89	1,83	5,7	9,89	1,17	6,0
	10,00	0,97	5,1			
40 mM	11,08	9,30	15,3	11,26	21,92	7,3
	11,34	2,72	9,5	11,41	2,00	6,3
	11,47	1,27	6,7	11,46	0,79	3,2
60 mM	12,03	11,12	15,6	12,30	23,38	7,8
	12,36	3,71	11,4	12,46	2,10	6,7
	12,50	1,35	6,5	12,52	0,92	3,2
80 mM	12,67	10,82	16,3	13,01	23,28	8,9
	13,06	4,13	11,9	13,19	2,26	7,5
	13,11	0,60	1,6	13,26	1,08	3,5
	13,21	1,10	6,7			



**Obrázek 14:** Elektroferogramy analýz extraktu *Boswellia serrata* (1,02 mg/ml). BGE: 20 mM fosfátový pufr (pH 7,0) + 10 % MeOH + 80 mg/ml HP-β-CD (A); 80 mM fosfátový pufr (pH 7,0) + 10 % MeOH + 80 mg/ml HP-β-CD (B). Kapilára: 83,5/75 cm; napětí: +30 kV; detekce: 200 nm.

U extraktu se již od koncentrace 40 mM začal objevovat náznak dalšího dělení posledních dvou píků. Při koncentraci 80 mM byl už navíc patrný malý pík (na obrázku 14B a obrázku 15A je označen číslem 3). Na druhou stranu směs 5 BAs i při nejvyšší použité koncentraci, tedy 80 mM fosfátového pufru, byla rozdělená stále jen na tři píky bez jakýchkoli známek dalšího dělení (viz obrázek 15B).

Navíc se objevila neshoda v migračních časech a rozložení píků v BSE a ve směsi 5 boswellových kyselin, jak je vidět na obrázku 15. Byly proto dodatečně proměřeny i jednotlivé standardy BAs ve stejném roztoku základního elektrolytu (60 mM fosfátový pufr s 10 % MeOH a 80 mg/ml HP- $\beta$ -CD). Na základě výpočtu a porovnání efektivních pohyblivostí podle rovnice 7 byly jako píky boswellových kyselin v extraktu identifikovány pouze poslední dva píky (na obrázku 15A odpovídají píkům 2 a 4) s průměrnou hodnotou pohyblivosti  $-4,20 \times 10^{-9}$  a  $-4,51 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  (viz příloha 8.1). První pík v záznamu BSE s efektivní pohyblivostí  $3,43 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  pravděpodobně neodpovídá žádné z boswellových kyselin, jak je patrné i z porovnání isoabsorbančních 2D elektroferogramů (viz příloha 8.2). Jeho přítomnost může být způsobena například důsledkem toho, že extrakt *Boswellia serrata* jako přírodní produkt obsahuje řadu dalších látek, jak je popsáno v teoretické části této práce.

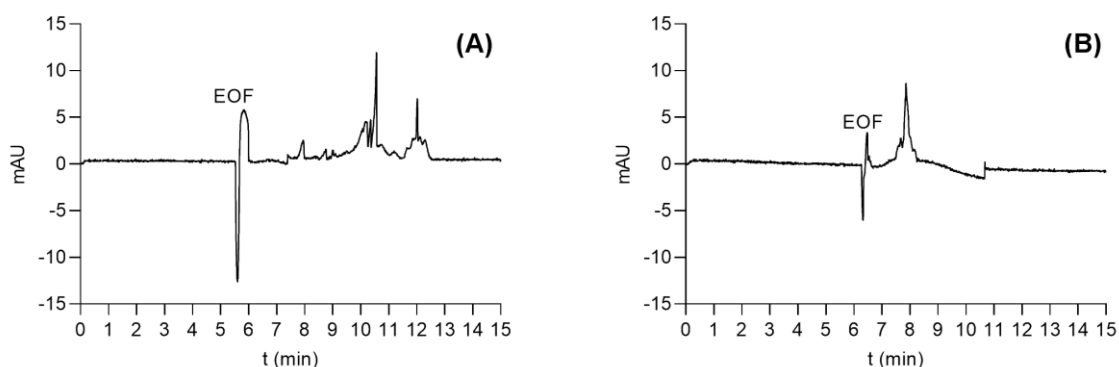


**Obrázek 15:** Srovnání dvou elektroferogramů analýz extraktu *Boswellia serrata* (1,02 mg/ml) **(A)** a směsi 5 standardů BAs (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) **(B)**. BGE: 80 mM fosfátový pufr (pH 7,0) + 10 % MeOH + 80 mg/ml HP- $\beta$ -CD. Kapilára: 83,5/75 cm; napětí: +30 kV; detekce: 200 nm.

### 5.1.8 Cyklodextriny modifikovaná micelární elektrokinetická chromatografie (CD-MEKC)

Na základě některých výše zmíněných odborných prací byla v průběhu vývoje metody zkoušena kombinace MEKC s přidavkem CD [10], [11], [12]. Jednalo se o 25 mM SDS s 20 mg/ml HP- $\beta$ -CD v 50 mM borátovém pufru o pH 9,0 a 25 mM SDS se 40 mg/ml HP- $\beta$ -CD ve 20 mM fosfátovém pufru o pH 7,0 v kapiláře o délce 83,5/75 cm při napětí +30 kV.

Zatímco ve fosfátovém pufru k separaci extraktu vesměs nedošlo (viz obrázek 16B), BSE v borátovém pufru měl mírnou tendenci se rozdělit na více látek než při použití samotného SDS nebo cyklodextrinu (viz obrázek 16A). Nicméně výsledné elektroferogramy byly velmi špatně hodnotitelné, a to zejména kvůli špatným tvarům píků.



**Obrázek 16:** Elektroferogramy analýz extraktu *Boswellia serrata* (1,09 mg/ml). BGE: 50 mM borátový pufr (pH 9,0) + 25 mM SDS + 20 HP- $\beta$ -CD **(A)**; 20 mM fosfátový pufr (pH 7,0) + 25 mM SDS + 40 mg/ml HP- $\beta$ -CD **(B)**. Kapilára: 83,5/75 cm; napětí: +30 kV; detekce: 200 nm.

### 5.1.9 CE-MS analýza

CE-MS experimenty byly provedeny ve 100 mM APFO o pH 9,0. APFO je povrchově aktivní látka, tudíž je schopná tvořit micely a je možné ji využít pro MEKC separace. Vzhledem k tomu, že APFO je těkavá sloučenina, může být použita i při MS detekci.

Na začátku MS analýzy byl proměřován extrakt *Boswellia serrata* o koncentraci 10 µg/ml v negativním i pozitivním módu kvůli zjištění chování boswellových kyselin v tomto prostředí. Vzhledem k tomu, že v negativním módu u BSE nebyl zaznamenán žádný signál, všechny další analýzy byly poté prováděny pouze v pozitivním módu.

Pro identifikaci jednotlivých sloučenin byly připraveny a analyzovány všechny standardy boswellových kyselin ( $\alpha$ BA,  $\beta$ BA, A $\alpha$ BA, A $\beta$ BA, KBA, AKBA), každý o koncentraci 10 µg/ml. V tabulce 11 jsou uvedeny výsledné hodnoty získané optimalizací (prekurzorové a produktové ionty a kolizní energie) pro každý ze standardů. Jako prekurzorové ionty uvedených boswellových kyselin byly vybrány  $[M+H]^+$  ionty s výjimkou acetylovaných forem (A $\alpha$ BA a A $\beta$ BA), pro které byl jako prekurzorový ion vybrán amonný adukt  $[M+NH_4]^+$ , a to z důvodu vyšší intenzity signálu amonných aduktů.

**Tabulka 11:** Monoisotopické hmoty standardů, m/z prekurzorových a produktových iontů a hodnoty kolizní energie pro CE-MS experimenty.

	Monoisotopická hmotnost (g/mol)	m/z prekurzorového iontu	m/z produktového iontu	Kolizní energie (V)
$\alpha$ BA $\beta$ BA	456,36	457,2	128,9	26
		457,2	211	18
		457,2	229	18
A $\alpha$ BA A $\beta$ BA	498,37	516,2*	393,4	22
		516,2*	439,3	10
		516,2*	481,4	10
KBA	470,34	471,3	95	48
		471,3	159	48
		471,3	265	32
AKBA	512,35	513,4	95	54
		513,4	119	18
		513,4	233	34

Vysvětlivka:  $\alpha$ -boswellová kyselina ( $\alpha$ BA),  $\beta$ -boswellová kyselina ( $\beta$ BA), acetyl- $\alpha$ -boswellová kyselina (A $\alpha$ BA), acetyl- $\beta$ -boswellová kyselina (A $\beta$ BA), 11-keto- $\beta$ -boswellová kyselina (KBA), acetyl-11-keto- $\beta$ -boswellová kyselina (AKBA)

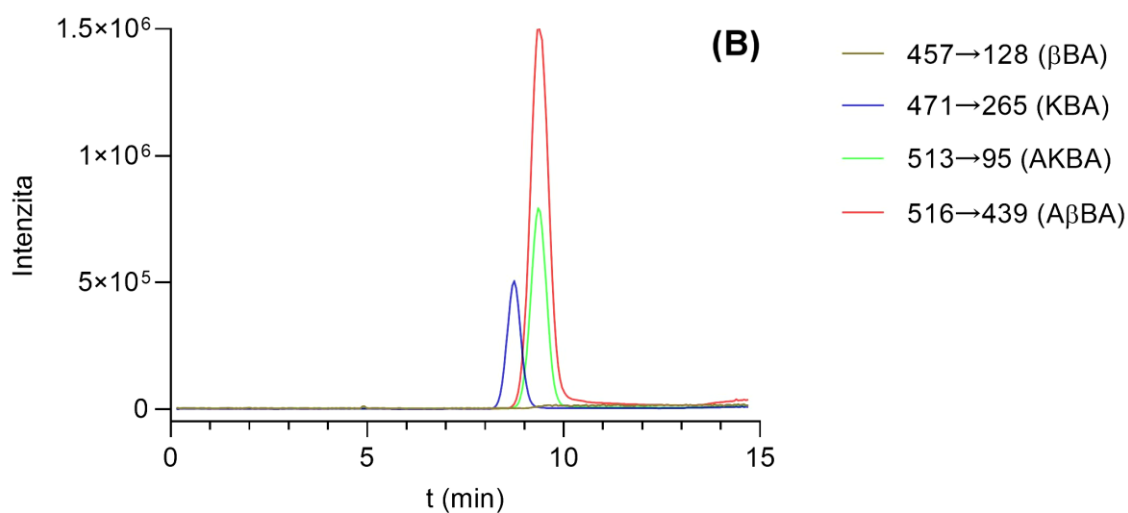
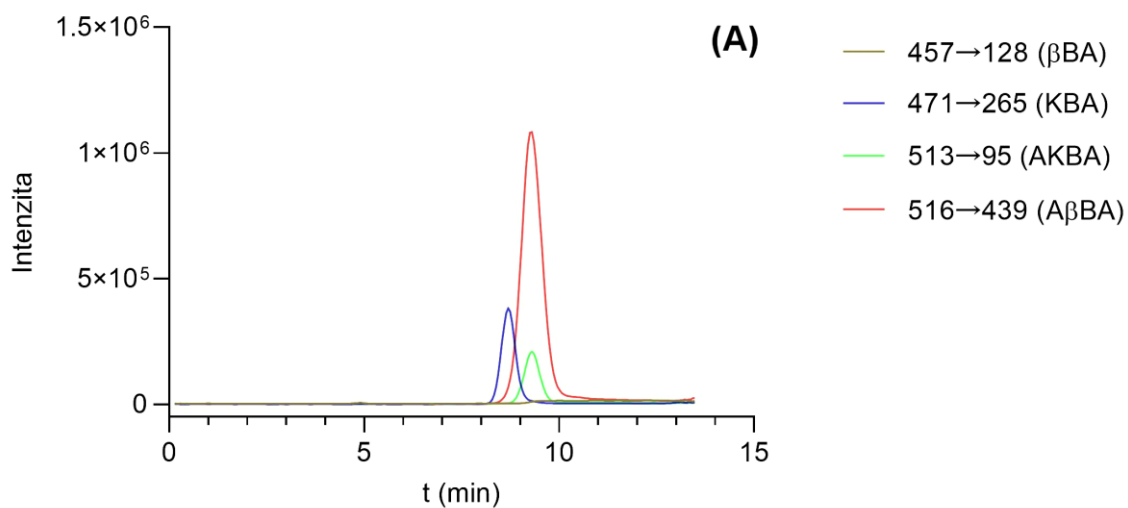
\* amonný prekurzorový ion  $[M+NH_4]^+$

Při proměření standardů se ukázalo, že  $\alpha$ BA a  $\beta$ BA nejsou detekovatelné. Žádný signál nebyl získán ani při desetkrát vyšší koncentraci (100  $\mu$ g/ml). Na záznamech zbylých standardů boswellových kyselin se objevily píky již při koncentraci 10  $\mu$ g/ml a intenzita odezvy byla cca  $10^6$ .

Všech šest standardů, každý o koncentraci 10  $\mu$ g/ml, bylo smícháno dohromady a tato směs byla analyzována. Ukázalo se, že za těchto podmínek se boswellové kyseliny rozdělí do dvou skupin (píků). První pík patří jen KBA, ve druhém píku jsou zastoupeny všechny acetylované formy boswellových kyselin, které mají shodný migrační čas. Ačkoli  $A\alpha$ BA,  $A\beta$ BA a AKBA migrují ve stejném čase, je možné od sebe ve směsi rozlišit AKBA a zbytek acetylovaných BAs na základě znalosti jejich MRM přechodů.  $\alpha$ BA a  $\beta$ BA poskytovaly příliš slabý signál a ve směsi nebyly patrné.

V extraktu *Boswellia serrata* za těchto podmínek došlo k rozdělení látek do dvou píků. Stejně jako ve směsi šesti standardů boswellových kyselin patřil první pík KBA a druhý pík acetylovaným formám, které se v záznamu překrývají. Při koncentraci 10  $\mu$ g/ml BSE byla dosažena poměrně nízká citlivost, z důvodů nižších koncentrací jednotlivých zastoupených látek v porovnání se směsí standardů. Odezva detektoru se zlepšila při zvýšení koncentrace na 100  $\mu$ g/ml.

Na obrázku 17 jsou ukázány záznamy separace získané CE-MS analýzou BSE (100  $\mu$ g/ml) a směsi standardů boswellových kyselin (10  $\mu$ g/ml). Pro přehlednost obrázek zobrazuje pouze nejintenzivnější MRM přechody  $\beta$ -boswellových kyselin.



**Obrázek 17:** Záznamy CE-MS analýzy extraktu *Boswellia serrata* (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) **(A)** a směsi standardů boswellových kyselin (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) **(B)**. BGE: 100 mM APFO (pH 9,0). Kapilára: 90 cm.

## 6. ZÁVĚR

Pro separaci boswellových kyselin bylo vyzkoušeno několik různých technik elektromigračních metod, a to CZE, MEKC, EKC, CD-MEKC a MEKC-MS. Experimentálně byl otestován vliv různých pufrů a aditiv jako jsou tenzidy, cyklodextriny či organické modifikátory v roztoku základního elektrolytu na separaci analytů v extraktu *Boswellia serrata*. Kromě toho byly sledovány parametry jako separační napětí či délka kapiláry. U BGE, které poskytovaly slibné výsledky, se navíc sledoval i vliv změny koncentrace příslušných složek BGE na výslednou separaci.

Ukázalo se, že nejlepší volbou pro separaci boswellových kyselin bylo přidání HP- $\beta$ -CD do BGE. Toto dokazuje také pět zmíněných odborných článků popisující metody CE pro separaci strukturně podobných pentacyklických triterpenů (oleanolová a ursolová kyselina) [10] – [14]. V nich autoři používali buď HP- $\beta$ -CD nebo  $\beta$ -CD, ale oproti této práci v nižších koncentracích (15 mM  $\approx$  20,7 mg/ml HP- $\beta$ -CD). V již publikovaných metodách [10], [11], [12], kde byl použitý HP- $\beta$ -CD, obsahoval BGE navíc přídavek SDS (25 nebo 50 mM), jehož použití v mé diplomové práci nebylo úspěšné. Nicméně je třeba dodat, že se moje práce a odborné články rozcházejí v použitém pufru. Zatímco ve všech pracích byl základem elektrolytu borátový pufr, případně v kombinaci s fosfátovým, pro tuto metodu byl zvolen fosfátový pufr o pH 7,0 kvůli lepším výsledkům z počátečních experimentů. Prakticky všechny práce se ale shodují v nízkém přídavku metanolu, který má příznivý vliv na rozlišení a symetrii píků.

Na základě řady experimentů byly nakonec stanoveny nejlepší dosažitelné podmínky separace některých boswellových kyselin v extraktu *Boswellia serrata*: 80 mM fosfátový pufr (pH 7,0) s přídavkem 80 mg/ml HP- $\beta$ -CD a 10 % (v/v) metanolu. Analýza probíhala při +30 kV v křemenné kapiláře o celkové délce 83,5 cm a efektivní délce 75 cm s vnitřním průměrem 50  $\mu$ m.

V této práci je také jako jedna z možností pro separaci boswellových kyselin okrajově zmíněna kapilární elektroforéza ve spojení s hmotnostní spektrometrií, konkrétně šlo o MEKC-MS. Pomocí této metody nebyly boswellové kyseliny rozděleny vůbec, s výjimkou 11-keto- $\beta$ -boswellové kyseliny, která byla částečně oddělená od acetylovaných forem. Nicméně na základě znalosti MRM přechodů bylo možné



jednotlivé boswellové kyseliny (kromě  $\alpha$ BA a  $\beta$ BA) ve směsi alespoň rozeznat. Jelikož se ale v rámci této práce jednalo pouze o předběžné testování CE-MS, pro získání lepších výsledků by bylo potřeba optimalizovat celou řadu dalších parametrů.

Cíl práce, tedy vyvinout metodu pro separaci boswellových kyselin, byl splněn jen částečně. Pomocí finální CE metody se nepodařilo rozseparovat všech šest hlavních boswellových kyselin. Stávající metodou bylo docíleno rozdělení BAs jen do tří složek (píků), protože nedošlo k oddělení  $\alpha$ - a  $\beta$ -izomerů od sebe. Při metodě EKC migrovaly z boswellových kyselin nejrychleji  $\alpha$ BA a  $\beta$ BA. Při prováděných analýzách se ukázalo, že KBA měla shodný migrační čas s A $\beta$ BA (a tedy i s A $\alpha$ BA). Při vyšších koncentracích pufru či HP- $\beta$ -CD se od zbylých boswellových kyselin oddělovala ještě AKBA, která ve směsi tvořila vlastní poslední pík.

Pro následující vývoj metody by se nejspíš mělo pokračovat s další optimalizací, například vliv změny pH pufru, jiných koncentrací pufru a ostatních aditiv a úprava dalších podmínek separace. Zvážit by se také mohly kombinace různých cyklodextrinů nebo pufrů jako uvádí autoři článků [10] a [11], případně podrobněji otestovat separace s využitím DM- $\beta$ -CD či TM- $\beta$ -CD.

## 7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] POUŠKOVÁ J. Využití separačních metod pro stanovení boswellových kyselin – rešeršní práce. Hradec Králové, 2017. Bakalářská práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové.
- [2] BRENDLER T., BRINCKMANN J. A. a SCHIPPMANN U. Sustainable supply, a foundation for natural product development: The case of Indian frankincense (*Boswellia serrata* Roxb. ex Colebr.). *Journal of Ethnopharmacology*. 2018, 225, 279-286. DOI: 10.1016/j.jep.2018.07.017.
- [3] AMMON H. Boswellic Acids in Chronic Inflammatory Diseases. *Planta Medica*. 2006, 72(12), 1100-1116. DOI: 10.1055/s-2006-947227.
- [4] SHAH B. A., QAZI G. N. a TANEJA S. C. Boswellic acids: a group of medicinally important compounds. *Natural Product Reports*. 2009, 26(1), 72-89. DOI: 10.1039/B809437N.
- [5] QURISHI Y., HAMID A., ZARGAR M. A., SINGH S. K., SAXENA A. K. Potential role of natural molecules in health and disease: Importance of boswellic acid. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2010, 4(25), 2778-2786.
- [6] VUDDANDA P. R., SINGH S. a VELAGA S. Boswellic acid – Medicinal use of an ancient herbal remedy. *Journal of Herbal Medicine*. 2016, 6(4), 163-170. DOI: 10.1016/j.hermed.2016.08.002.
- [7] DU Z., LIU Z., NING Z., LIU Y., SONG Z., WANG C. a LU A. Prospects of Boswellic Acids as Potential Pharmaceuticals. *Planta Medica*. 2015, 81(04), 259-271. DOI: 10.1055/s-0034-1396313.
- [8] *The Human Metabolome Database* (online). Citováno 23. 4. 2019. Dostupné z: <http://www.hmdb.ca/>
- [9] GANZERA M., STÖGGL W. M., BONN G. K., KHAN I. A. a STUPPNER H. Capillary electrochromatography of boswellic acids in *Boswellia serrata* Roxb. *Journal of Separation Science*. 2003, 26(15-16), 1383-1388. DOI: 10.1002/jssc.200301562.
- [10] DU H. a CHEN X. Q. A comparative study of the separation of oleanolic acid and ursolic acid in *Prunella vulgaris* by high-performance liquid chromatography and

cyclodextrin-modified micellar electrokinetic chromatography. Journal of the Iranian Chemical Society. 2009, 6(2), 334-340. DOI: 10.1007/BF03245842.

[11] DU H., CHEN X a YANG J. S. CD-MEKC method to analyze triterpene acids in traditional chinese medicines. Journal of the Brazilian Chemical Society. 2009, 20(7), 1268-1274. DOI: 10.1590/S0103-50532009000700011.

[12] ZHANG G., QI Y., LOU Z., LIU C., WU X. a CHAI Y. Determination of oleanolic acid and ursolic acid in cornel by cyclodextrin-modified micellar electrokinetic chromatography. Biomedical Chromatography. 2005, 19(7), 529-532. DOI: 10.1002/bmc.475.

[13] REN T. a XU Z. Study of isomeric pentacyclic triterpene acids in traditional Chinese medicine of *Forsythiae Fructus* and their binding constants with  $\beta$ -cyclodextrin by capillary electrophoresis. Electrophoresis. 2018, 39(7), 1006-1013. DOI: 10.1002/elps.201700408.

[14] GUO Q. L., GAO J. Y. a YANG J. S.. Analysis of Bioactive Triterpenes from *Rubus chingii* by Cyclodextrin-Modified Capillary Electrophoresis. Chromatographia. 2005, 62(3-4), 145-150. DOI: 10.1365/s10337-005-0591-y.

[15] LAUER H. H., ROZING G. P.: High Performance Capillary Electrophoresis. A Primer. Second Edition, Agilent Technologies. 2014.

[16] ŠTULÍK K. Analytické separační metody. Praha: Karolinum. 2004. ISBN 80-246-0852-9.

[17] Capillary electrophoresis. Wikipedia (online). Citováno 27. 4. 2019. Dostupné z: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Capillaryelectrophoresis.png>

[18] HANCU G., SIMON B., RUSU A., MIRCIA E., GYÉRESI Á. Principles of Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography Applied in Pharmaceutical Analysis. Advanced Pharmaceutical Bulletin. 2013, 3(1), 1–8. DOI:10.5681/apb.2013.001

[19] CRINI G., FOURMENTIN S., FENYVESI É., TORRI G., FOURMENTIN M. a MORIN-CRINI N. Cyclodextrins, from molecules to applications. Environmental Chemistry Letters. 2018, 16(4), 1361-1375. DOI: 10.1007/s10311-018-0763-2.

- [20] ŘEZANKA P., NAVRÁTILOVÁ K., ŘEZANKA M., KRÁL V. a SÝKORA D. Application of cyclodextrins in chiral capillary electrophoresis. *Electrophoresis*. 2014, 35(19), 2701-2721. DOI: 10.1002/elps.201400145.
- [21] SCRIBA G. K. E. Chiral Recognition Mechanisms in Analytical Separation Sciences. *Chromatographia*. 2012, 75(15-16), 815-838. DOI: 10.1007/s10337-012-2261-1.
- [22] DE JONG G. J., SOMSEN G. W. a HASELBERG R. Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry for the Analysis of Biopharmaceuticals. *LCGC Europe (online)*. 2012, 25 (10), 551–562. Dostupné z: <http://www.chromatographyonline.com/capillary-electrophoresis-mass-spectrometry-analysis-biopharmaceuticals?id=&sk=&date=&pageID=2>
- [23] Lékopis 1997; doplněk 2001 (online). Citováno 23. 10. 2018. Dostupné z: [http://www.lekopis.cz/Kap\\_2\\_2\\_47.htm](http://www.lekopis.cz/Kap_2_2_47.htm)

## 8. PŘÍLOHY

### 8.1 Výpočet a porovnání efektivních pohyblivostí

**Podmínky separace:**

BGE: 60 mM fosfátový pufr (pH 7,0) + 10 % MeOH + 80 mg/ml HP- $\beta$ -CD

Kapilára: křemenná, 83,5/75 cm

Napětí: +30 kV

<b>BSE</b>		<b>Pík EOF</b>	<b>Pík 1 (?)</b>	<b>Pík 2 (<math>\alpha</math>BA a <math>\beta</math>BA)</b>	<b>Pík 3 (KBA a A<math>\beta</math>BA)</b>
1. analýza	$t_m$ (min)	10,76	12,04	12,37	12,51
	$\mu_a$ ( $m^2 \cdot V^{-1} \cdot s^{-1}$ )	$3,23 \times 10^{-8}$	$2,89 \times 10^{-8}$	$2,81 \times 10^{-8}$	$2,78 \times 10^{-8}$
	$\mu_e$ ( $m^2 \cdot V^{-1} \cdot s^{-1}$ )	–	$-3,44 \times 10^{-9}$	$-4,21 \times 10^{-9}$	$-4,53 \times 10^{-9}$
2. analýza	$t_m$ (min)	10,75	12,02	12,35	12,49
	$\mu_a$ ( $m^2 \cdot V^{-1} \cdot s^{-1}$ )	$3,24 \times 10^{-8}$	$2,89 \times 10^{-8}$	$2,82 \times 10^{-8}$	$2,79 \times 10^{-8}$
	$\mu_e$ ( $m^2 \cdot V^{-1} \cdot s^{-1}$ )	–	$-3,41 \times 10^{-9}$	$-4,19 \times 10^{-9}$	$-4,50 \times 10^{-9}$
<b>Průměrná <math>\mu_e</math> (<math>m^2 \cdot V^{-1} \cdot s^{-1}</math>)</b>			$-3,43 \times 10^{-9}$	$-4,20 \times 10^{-9}$	$-4,51 \times 10^{-9}$

<b>SMĚS 5 BAs</b>		<b>Pík EOF</b>	<b>Pík 1 (<math>\alpha</math>BA a <math>\beta</math>BA)</b>	<b>Pík 2 (KBA a A<math>\beta</math>BA)</b>	<b>Pík 3 (AKBA)</b>
1. analýza	$t_m$ (min)	10,73	12,32	12,47	12,54
	$\mu_a$ ( $m^2 \cdot V^{-1} \cdot s^{-1}$ )	$3,24 \times 10^{-8}$	$2,82 \times 10^{-8}$	$2,79 \times 10^{-8}$	$2,78 \times 10^{-8}$
	$\mu_e$ ( $m^2 \cdot V^{-1} \cdot s^{-1}$ )	–	$-4,19 \times 10^{-9}$	$-4,55 \times 10^{-9}$	$-4,69 \times 10^{-9}$
2. analýza	$t_m$ (min)	10,72	12,29	12,45	12,51
	$\mu_a$ ( $m^2 \cdot V^{-1} \cdot s^{-1}$ )	$3,25 \times 10^{-8}$	$2,83 \times 10^{-8}$	$2,80 \times 10^{-8}$	$2,78 \times 10^{-8}$
	$\mu_e$ ( $m^2 \cdot V^{-1} \cdot s^{-1}$ )	–	$-4,14 \times 10^{-9}$	$-4,50 \times 10^{-9}$	$-4,64 \times 10^{-9}$
<b>Průměrná <math>\mu_e</math> (<math>m^2 \cdot V^{-1} \cdot s^{-1}</math>)</b>			$-4,16 \times 10^{-9}$	$-4,52 \times 10^{-9}$	$-4,66 \times 10^{-9}$

<b><math>\alpha</math>BA</b>		<b>Pík EOF</b>	<b>Pík 1 (<math>\alpha</math>BA)</b>
1. analýza	$t_m$ (min)	10,44	11,92
	$\mu_a$ ( $m^2 \cdot V^{-1} \cdot s^{-1}$ )	$3,33 \times 10^{-8}$	$2,92 \times 10^{-8}$
	$\mu_e$ ( $m^2 \cdot V^{-1} \cdot s^{-1}$ )	–	$-4,14 \times 10^{-9}$
2. analýza	$t_m$ (min)	10,44	11,90
	$\mu_a$ ( $m^2 \cdot V^{-1} \cdot s^{-1}$ )	$3,33 \times 10^{-8}$	$2,92 \times 10^{-8}$
	$\mu_e$ ( $m^2 \cdot V^{-1} \cdot s^{-1}$ )	–	$-4,11 \times 10^{-9}$
<b>Průměrná <math>\mu_e</math> (<math>m^2 \cdot V^{-1} \cdot s^{-1}</math>)</b>			<b><math>-4,13 \times 10^{-9}</math></b>

<b><math>\beta</math>BA</b>		<b>Pík EOF</b>	<b>Pík1 (<math>\beta</math>BA)</b>
1. analýza	$t_m$ (min)	10,47	11,96
	$\mu_a$ ( $m^2 \cdot V^{-1} \cdot s^{-1}$ )	$3,32 \times 10^{-8}$	$2,91 \times 10^{-8}$
	$\mu_e$ ( $m^2 \cdot V^{-1} \cdot s^{-1}$ )	–	$-4,13 \times 10^{-9}$
2. analýza	$t_m$ (min)	10,46	11,95
	$\mu_a$ ( $m^2 \cdot V^{-1} \cdot s^{-1}$ )	$3,33 \times 10^{-8}$	$2,91 \times 10^{-8}$
	$\mu_e$ ( $m^2 \cdot V^{-1} \cdot s^{-1}$ )	–	$-4,16 \times 10^{-9}$
<b>Průměrná <math>\mu_e</math> (<math>m^2 \cdot V^{-1} \cdot s^{-1}</math>)</b>			<b><math>-4,14 \times 10^{-9}</math></b>

<b>A<math>\beta</math>BA</b>		<b>Pík EOF</b>	<b>Pík 1 (A<math>\beta</math>BA)</b>
1. analýza	$t_m$ (min)	10,47	12,10
	$\mu_a$ ( $m^2 \cdot V^{-1} \cdot s^{-1}$ )	$3,32 \times 10^{-8}$	$2,88 \times 10^{-8}$
	$\mu_e$ ( $m^2 \cdot V^{-1} \cdot s^{-1}$ )	–	$-4,48 \times 10^{-9}$
2. analýza	$t_m$ (min)	10,45	12,09
	$\mu_a$ ( $m^2 \cdot V^{-1} \cdot s^{-1}$ )	$3,33 \times 10^{-8}$	$2,88 \times 10^{-8}$
	$\mu_e$ ( $m^2 \cdot V^{-1} \cdot s^{-1}$ )	–	$-4,53 \times 10^{-9}$
<b>Průměrná <math>\mu_e</math> (<math>m^2 \cdot V^{-1} \cdot s^{-1}</math>)</b>			<b><math>-4,51 \times 10^{-9}</math></b>

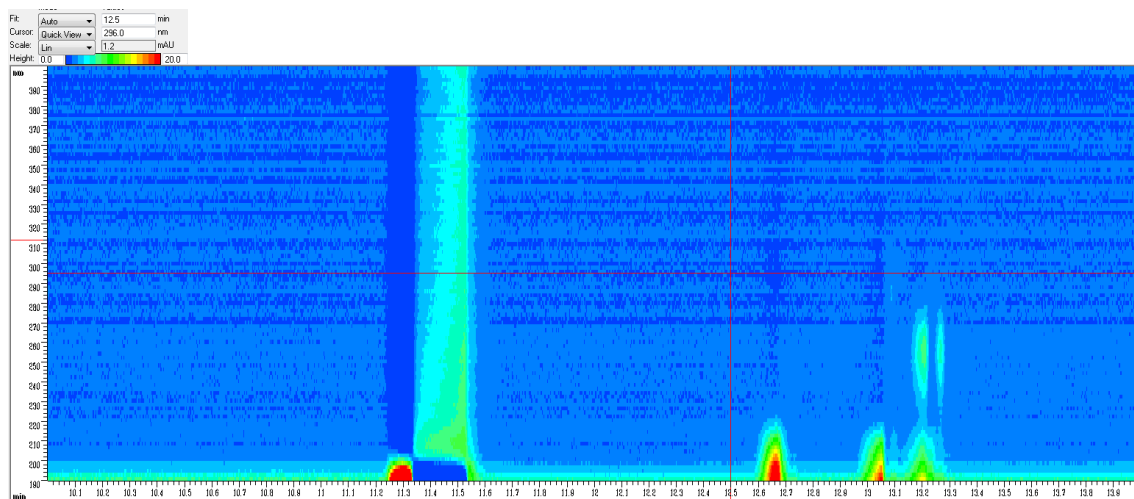
<b>KBA</b>		<b>Pík EOF</b>	<b>Pík 1 (KBA)</b>
1. analýza	$t_m$ (min)	10,46	12,10
	$\mu_a$ ( $m^2 \cdot V^{-1} \cdot s^{-1}$ )	$3,33 \times 10^{-8}$	$2,88 \times 10^{-8}$
	$\mu_e$ ( $m^2 \cdot V^{-1} \cdot s^{-1}$ )	–	$-4,51 \times 10^{-9}$
2. analýza	$t_m$ (min)	10,45	12,08
	$\mu_a$ ( $m^2 \cdot V^{-1} \cdot s^{-1}$ )	$3,33 \times 10^{-8}$	$2,88 \times 10^{-8}$
	$\mu_e$ ( $m^2 \cdot V^{-1} \cdot s^{-1}$ )	–	$-4,49 \times 10^{-9}$
<b>Průměrná <math>\mu_e</math> (<math>m^2 \cdot V^{-1} \cdot s^{-1}</math>)</b>			<b><math>-4,50 \times 10^{-9}</math></b>

<b>AKBA</b>		<b>Pík EOF</b>	<b>Pík 1 (AKBA)</b>
1. analýza	$t_m$ (min)	10,43	12,14
	$\mu_a$ ( $m^2 \cdot V^{-1} \cdot s^{-1}$ )	$3,33 \times 10^{-8}$	$2,87 \times 10^{-8}$
	$\mu_e$ ( $m^2 \cdot V^{-1} \cdot s^{-1}$ )	–	$-4,69 \times 10^{-9}$
2. analýza	$t_m$ (min)	10,44	12,13
	$\mu_a$ ( $m^2 \cdot V^{-1} \cdot s^{-1}$ )	$3,33 \times 10^{-8}$	$2,87 \times 10^{-8}$
	$\mu_e$ ( $m^2 \cdot V^{-1} \cdot s^{-1}$ )	–	$-4,65 \times 10^{-9}$
<b>Průměrná <math>\mu_e</math> (<math>m^2 \cdot V^{-1} \cdot s^{-1}</math>)</b>			<b><math>-4,67 \times 10^{-9}</math></b>

## 8.2 Isoabsorbance plot (DAD spektrum)

*Extrakt Boswellia serrata (1,02 mg/ml)*

*BGE: 80 mM fosfátový pufr (pH 7,0) + 10 % MeOH + 80 mg/ml HP- $\beta$ -CD, inj. 2*



*Směs 5 boswellových kyselin (100  $\mu$ g/ml)*

*BGE: 80 mM fosfátový pufr (pH 7,0) + 10 % MeOH + 80 mg/ml HP- $\beta$ -CD, inj. 1*

