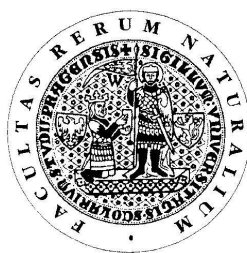


UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Analytická chemie



Jan Krajíček

Analýza derivátů pterinu kapilární zónovou elektroforézou

Analysis of pterine derivatives by capillary zone
electrophoresis

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Doc. RNDr. Zuzana Bosáková, CSc.

Praha 2012

Tato diplomová práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620857 a GAČR, projekt č. P505/11/1459.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce, ani její podstatná část, nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědom toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci mimo Univerzitu Karlovu v Praze, je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 17. května 2012

Na tomto místě bych chtěl poděkovat své školitelce Doc. RNDr. Zuzaně Bosákové, CSc. za ochotu, odborné vedení a všestrannou pomoc. Dále bych chtěl poděkovat pracovníkům z Katedry analytické chemie, kteří mi pomáhali a Doc. Mgr. Alici Exnerové, Ph.D. a Prof. RNDr. Pavlu Štysovi, CSc. za poskytnutí erythropterinu a vzorků plošnice *Graphosoma semipunctatum*.

Název práce: Analýza derivátů pterinu kapilární zónovou elektroforézou

Abstrakt: Pteriny patří do důležité skupiny látek fungující jako inhibitory, senzitizerý, enzymy, koenzymy, pigmenty atd. a spolu s karotenoidy a anthrachoninony jsou zodpovědné za charakteristické zbarvení ploštic. Tato práce byla zaměřena na vývoj kapilární elektroforetické separační metody pro analýzu šesti vybraných derivátů pterinu (biopterinu, neopterinu, isoxanthopterinu, leukopterinu, xanthopterinu a erythropterinu) a jejich následnou identifikaci ve třech formách ploštice *Graphosoma semipunctatum*. Separace byly realizovány v křemenné nemodifikované kapiláře termostatované na teplotu 30 °C. Separační elektrolyt se skládal z kyseliny borité, tris(hydroxymethyl)aminometanu a disodné soli ethylendiamintetraoctové kyseliny. V rámci optimalizační procedury byl studován vliv pH pufru, koncentrace jednotlivých složek základního elektrolytu, velikosti separačního napětí a vlnové délky UV detekce na elektromigrační chování a citlivost detekce. Za optimalizovaných separačních podmínek byly analyzovány organické extrakty ze tří forem ploštice *Graphosoma semipunctatum*.

Klíčová slova: kapilární elektroforéza, deriváty pterinu, modelová směs, reálný vzorek štítku ploštice, různé formy, identifikace.

Title: Analysis of pterine derivatives by capillary zone electrophoresis

Abstract: Pterins belong to an important group of compounds, acting as inhibitors, sensitizers, enzymes, coenzymes, pigments etc. and together with carotenoids and anthraquinones are responsible for characteristic coloration of bugs. This work was focused on the development of a capillary electrophoretic separation method for the analysis of six pterine derivatives, namely biopterine, neopterin, isoxanthopterin, leukopterin, xanthopterin and erythropterine and on their identification in the real samples. Separation was conducted in an uncoated fused-silica capillary thermostated at 30 °C. Separation electrolyte contained boric acid, tris(hydroxymethyl)aminomethane and disodium salt of ethylenediaminetetraacetic acid. The effects of buffer pH, concentration of electrolyte components, separation voltage and wavelength of UV detection on electromigration behavior and detection sensitivity were studied. Under the optimized separation conditions, organic extracts of the three forms of *Graphosoma semipunctatum* bugs were analyzed.

Keywords: capillary electrophoresis, derivatives pterine, mixture model, real sample label bug, different forms, identification.

Obsah

1	Seznam zkratek a symbolů	8
2	Úvod.....	11
3	Teoretická část	13
3.1	Historie, rozdělení a vlastnosti derivátů pterinu	13
3.2	Pteriny ve funkci výstražného zabarvení ploštic.....	15
3.3	Studované analyty	16
3.4	Metody stanovení.....	19
3.4.1	Kapilární zónová elektroforéza	20
3.5	Kapilární elektroforéza	20
3.5.1	Princip elektroforézy	21
3.5.2	Faktory ovlivňující účinnost separace	27
3.5.3	Instrumentace	29
4	Experimentální část.....	30
4.1	Použité chemikálie	30
4.2	Deriváty pterinu a vzorky ploštic	30
4.3	Přístrojové vybavení.....	30
4.4	Příprava separačních pufrů a zásobních roztoků derivátů pterinu	31
4.5	Příprava extraktů štítků ploštic <i>Graphosoma semipunctatum</i>	31
4.6	Podmínky měření a postup práce	31
4.7	Statistické vyhodnocení výsledků	32
5	Výsledky a diskuze	33
5.1	Optimalizace pH, koncentrací složek pufru a separačního napětí	33
5.1.1	pH Separačního elektrolytu.....	33
5.1.2	Koncentrace chelatonu 3.....	36
5.1.3	Koncentrace TRISu	38
5.1.4	Koncentrace kyseliny borité.....	41
5.1.5	Velikost separačního napětí	43
5.2	Absorpční spektra derivátů pterinu	44
5.2.1	Erythropterin	47
5.3	Separace modelové směsi všech derivátů pterinu	48

5.4	Identifikace derivátů pterinu v reálných vzorcích ploštic <i>Graphosoma</i>	
	<i>semipunctatum</i>	49
5.4.1	Světlá forma	49
5.4.2	Oranžová forma	51
5.4.3	Červená forma	54
5.4.4	Shrnutí.....	55
6	Závěr.....	56
7	Seznam literatury	57

1 Seznam zkratek a symbolů

BIO	biopterin
CAS Reg.No.	registrační číslo Chemical Abstract
CE	kapilární elektroforéza
CZE	kapilární zónová elektroforéza
DMSO	dimethylsulfoxid
EOF	elektroosmotický tok
ERY	erythropterin
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
ISO	isoxanthopterin
LEU	leukopterin
LIF	laserem indukovaná fluorescence
NEO	neopterin
SERS	povrchem zesílený Ramanův rozptyl
TRIS	tris(hydroxymethyl)aminomethan
UV	ultrafialová oblast
VIS	viditelná oblast
XAN	xanthopterin
<i>A</i>	absorbance
<i>c</i>	koncentrace
<i>d_i</i>	vnitřní průměr
<i>E</i>	intenzita elektrického pole
<i>H</i>	výškový ekvivalent teoretického patra
<i>I</i>	procházející proud
<i>L_C</i>	celková délka separační kapiláry
<i>L_D</i>	délka kapiláry od vstupního konce k detektoru
<i>M_r</i>	relativní molekulová hmotnost
<i>N</i>	počet teoretických pater
<i>n</i>	počet měření

pK_a	záporný dekadický logaritmus disociační konstanty
$pK_{a,1}$	záporný dekadický logaritmus disociační konstanty do prvního stupně
$pK_{a,2}$	záporný dekadický logaritmus disociační konstanty do druhého stupně
$pK_{a,3}$	záporný dekadický logaritmus disociační konstanty do třetího stupně
Q_i	celkový náboj iontu
R	rozlišení
$R_{1,2}$	rozlišení dvou sousedních zón
r_i	poloměr iontu
s	směrodatná odchylka
s_r	relativní směrodatná odchylka
$t_{\text{celk.}}$	celková doba separace
t_{eof}	migrační čas značkovače elektroosmotického toku
t_{mig}	migrační čas
$t_{\text{mig},1}$	migrační čas první látky
$t_{\text{mig},2}$	migrační čas druhé látky
$t_{\text{mig},i}$	migrační čas i -té látky
U	separační napětí
$w_{0,5,i}$	šířka píku v polovině jeho výšky i -té látky
w_1	šířka píku při základně první látky
w_2	šířka píku při základně druhé látky
w_i	šířka píku při základně i -té látky
x_i	naměřená hodnota
\tilde{x}	medián
$v_{\text{ef},i}$	elektroforetická rychlost i -tého iontu
ϵ_0	permitivita vakua
ϵ_r	relativní permitivita kapaliny
η	viskozita separačního roztoku
λ	vlnová délka
$\mu_{\text{ef},i}$	elektroforetická pohyblivost i -tého iontu
$\mu_{\text{eff},i}$	efektivní elektroforetická pohyblivost i -tého iontu

μ_{eof}	pohyblivosť elektroosmotického toku
v_{eof}	rychlosť elektroosmotického toku
ξ	zeta-potenciál

2 Úvod

Pterin a jeho deriváty patří do skupiny heterocyklických sloučenin, které se vyskytují v řadě biologických systémů. Mají důležité biologické funkce jako inhibitory¹, senzitivizéry^{2,3}, enzymy⁴, koenzymy⁵, senzory⁶ a dále fungují jako pigmenty⁷⁻¹¹ nebo toxiny¹². Relativně vysoké koncentrace derivátů pterinu se nacházejí jako pigmenty u hmyzu, plazů, obojživelníků, krabů, mořského planktonu nebo v lidských tělních tekutinách¹³.

Listová kyselina, konjugovaný pterin a vitamin ze skupiny B, vystupuje jako koenzym při reakcích souvisejících se syntézou purinových a pyrimidinových bází. Tetrahydrobiopterin vystupuje jako koenzym při metabolických reakcích hydroxylace některých aminokyselin a je důležitý pro metabolismus oxidu dusnatého^{5,14}.

Oxidativní stres zahrnuje zvýšení koncentrace kyslíkových, eventuálně dusíkových radikálů, a to je příčina mnoha akutních a chronických onemocnění. Deriváty pterinu jsou schopny modulovat oxidativní stres, protože tyto volné radikály vychytávají¹⁵⁻¹⁷.

Zvýšené koncentrace derivátů pterinu (biopterinu, neopterinu nebo onkopterinu) byly nalezeny v séru nebo v moči u pacientů trpících např. rakovinou štítné žlázy a prsu, autismem, Alzheimerovou nebo Parkinsonovou chorobou. Příčiny změn koncentrací derivátů pterinu v různých fyziologických a patologických stavech nejsou doposud plně objasněny z důvodu jejich obtížné kvantifikace v lidských tělních tekutinách. Pravděpodobně se každá skupina nádorových chorob vyznačuje různými změnami koncentrací derivátů pterinu. V budoucnu by mohly tyto deriváty sloužit jako biomarkery těchto onemocnění a sledování jejich koncentrací v tělních tekutinách by umožnilo zahájit včasnou léčbu ještě před klinickými projevy^{12,18-25}.

Červeno-oranžový erythropterin a žlutý xanthopterin obsahují některé druhy motýlů a tyto deriváty jim propůjčují typické zbarvení²⁶. Některé druhy hmyzu využívají tohoto výrazného zbarvení k ochraně před vizuálně se orientujícími predátory – ptáky²⁷. Z pigmentů, které byly doposud analyzovány u zvířat, mají pteriny nejvyšší obsah dusíku¹⁵.

Některé deriváty pterinu jsou součástí výstražného zbarvení štítků ploščic. Odstín zbarvení se může měnit s jednotlivými formami ploščic, ale i s lokalitou jejich

výskytu nebo s ročním obdobím jejich sběru. Doposud však nebylo známo, zda je odstín zbarvení dán přítomností rozdílných pterinů nebo pouze jejich různým poměrem ve štítku. Vývojem účinné analytické metody pro separaci pěti derivátů pterinu, konkrétně biopterinu, isoxanthopterinu, leukopterinu, xanthopterinu a erythropterinu, které se mohou vyskytovat ve štítcích plošnice *Graphosoma semipunctatum* jsem se zabýval již v rámci své bakalářské práce, ve které byla k tomuto účelu využita metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie v reverzním módu²⁸. Všechny studované deriváty však v tomto systému vykazovaly velmi rychlou retenci doprovázenou nízkou separační účinností a tento systém se ukázal být pro separaci studovaných derivátů nevhodný.

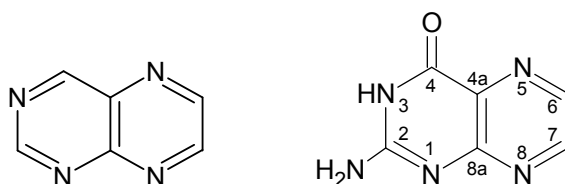
Cílem této diplomové práce bylo otestovat vhodnost použití kapilární elektroforézy pro separaci výše zmíněných analytů, rozšířených o neopterin, a vyvinutou metodu aplikovat na analýzu pigmentů ze štítků tří forem plošnice *Graphosoma semipunctatum*.

3 Teoretická část

3.1 Historie, rozdělení a vlastnosti derivátů pterinu

Z dostupných pramenů se historie pterinu začíná psát již v roce 1889. Prvním izolovaným derivátem pterinu byl žlutý xanthopterin z křídel motýlů čeledi *Pieridae*²⁹. Skupině těchto pigmentů se začalo později říkat pteridiny z řeckého slova *πτερό* = křídlo³⁰.

Základním skeletem těchto heterocyklických sloučenin je pteridin, který se skládá z pyrimidinu a pyrazinu (obr. 3.1).



Obr. 3.1: Strukturní vzorce pteridinu (vlevo) a oxidovaného pterinu (vpravo)

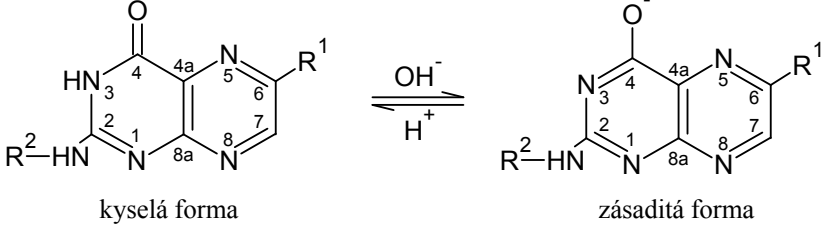
Pteriny lze rozdělit do dvou skupin podle velikosti postranního řetězce, a to na nekonjugované, které mají na pteridinovém cyklu navázány malé substituenty a konjugované, obsahující velké substituenty s p-aminobenzoovou kyselinou, např. listová kyselina nebo riboflavin. Přehled některých nekonjugovaných pterinů je uveden v tabulce 3.1. V přírodě se rovněž vyskytují isopteriny, např. xanthopterin a isoxanthopterin, lišící se polohou oxo skupiny v pozici 6 a 7. Pteriny se mohou vyskytovat ve třech oxidačních stavech, a to 7,8-dihydro-, 5,6,7,8-tetrahydro- a plně oxidované (aromatické) formě. Redukované formy pterinů působí jako silné lapače reaktivních forem kyslíku a jejich antioxidační účinky lze zvýšit interakcí s určitými kationty kovů např. Zn^{2+} , Cd^{2+} nebo Hg^{2+} . Oxidované formy pterinů vykazují silnou fluorescenci, která se může lišit v různých oblastech pH. Xanthopterin vykazuje v kyselé oblasti červenou fluorescenci, zatímco v alkalické oblasti modrou fluorescenci³⁰⁻³³.

Pteriny se na světle rozkládají na různé deriváty, jsou tedy fotosenzitivními sloučeninami. Vzdušným kyslíkem podléhají redukované formy derivátů pterinu oxidaci, zvláště v přítomnosti iontů některých kovů. Z mateřské sloučeniny nevzniká oxidací pouze plně oxidovaná forma, ale v důsledku různých přesmyků, které probíhají

během oxidace, vznikají i různé deriváty pterinu^{30,31}.

Substituované pteriny jsou prakticky ve vodě nerozpustné díky přítomnosti aminových a oxo skupin, které jsou schopny tvořit intramolekulární vodíkové vazby. Rozpustnost ve vodě lze zvýšit derivatizací, která zabrání tvorbě těchto vazeb, např. alkyací aminové či amidové skupiny^{12,35}.

Tabulka 3.1: Přehled některých nekonjugovaných pterinů a jejich pK_a hodnot. Kde pK_a je záporný dekadický logaritmus disociační konstanty při teplotě 25 °C.

			
R^1	R^2	Sloučenina	pK_a
-H	-H	pterin	7,90 ^a
-CHO	-H	6-formylpterin	7,30 ^a
-COOH	-H	6-karboxypterin	7,90 ^a
-(CHOH) ₂ -CH ₃	-H	rhamnopterin	8,00 ^a
-CO-CHOH-CH ₃	-H	sepiapterin	9,95 ^b
-CHOH-CHOH-CH ₃	-H	biopterin	8,10 ^a
-CHOH-CHOH-CH ₃	-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -NH ₂	onkopterin	- ^c
-CHOH-CHOH-CH ₂ OH	-H	neopterin	8,00 ^a

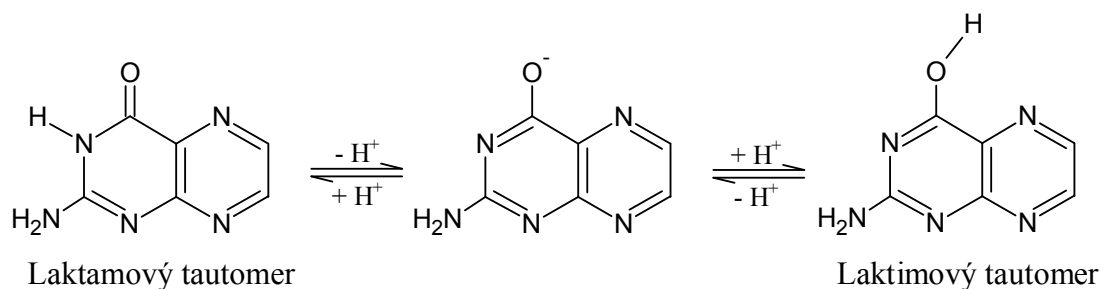
^a[35]

^b[32]

^cNepublikovaná hodnota

Ve vodných roztocích se pteriny chovají jako slabé kyseliny a většina pterinů může existovat ve více acidobazických formách. V prostředí při pH 4 – 12 obecně platí, že dominantní rovnováha se ustavuje mezi dvěma formami, a to kyselou formou s amidovou skupinou a zásaditou formou s fenolátovou skupinou, pK_a této rovnováhy je přibližně 8. Při pH okolo 5, respektive 10, se deriváty pterinu nacházejí z více než 99 % v kyselé, respektive zásadité formě^{36,37}.

Pteriny existují v několika tautomerních strukturách, ale pouze dvě struktury se považují za významné – laktamová a laktimová (obr. 3.2).



Obr. 3.2: Významné tautomerní formy pterinů³⁸

Tautomerní rovnováha je posunutá ve prospěch laktamového (oxo-) tautomeru, který má nejnižší energii a je nejstabilnější. Proto se pteriny ve vodných roztocích chovají jako slabé kyseliny³⁸⁻⁴⁰.

Vzhledem k fyzikálně-chemickým vlastnostem derivátů pterinu (citlivost na světlo, nízká rozpustnost a nízká koncentrace např. v biologických tekutinách) je analýza derivátů obtížná.

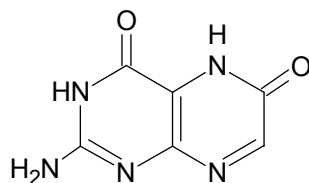
3.2 Pteriny ve funkci výstražného zbarvení ploštic

Aposematismus je jev, při kterém živý organismus, disponující nějakým výstražným signálem, se ho snaží aktivně použít a tím odradit potenciálního predátora od útoku. Organismy využívají různé strategie, jimiž se před predátory brání, ať již zvukovými, pachovými nebo optickými. Právě optické signály jsou nejběžnější a jsou tvořeny různými výraznými barvami (nejčastěji červenou nebo žlutou), které jsou kombinovány do charakteristických vzorů na kontrastním pozadí. Výstražný signál je účinnější, je-li vzor symetrický, tvořený většími a výraznějšími komponentami. Běžným vzorem jsou kruhové skvrny na těle organismu např. u motýlů nebo podélné skvrny např. na štítcích některých ploštic. Za charakteristické zbarvení ploštic jsou zodpovědné deriváty pterinu, karotenoidy a anthrachinony. Velikost a tvar skvrn jsou na každé plošticí mírně odlišné a je známo, že se jejich barva mění s ročním obdobím²⁷ (obr. 3.3).



Obr. 3.3: Barevné formy *Graphosoma semipunctatum*, zleva červená, světlá a oranžová forma^{41,42}

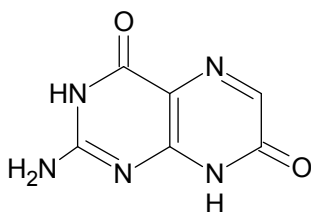
3.3 Studované analyty



Xanthopterin

2-aminopteridin-4,6(3H,5H)-dion

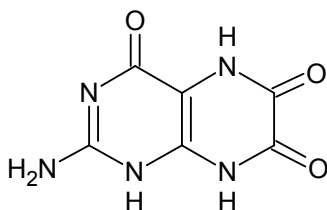
Xanthopterin je žlutá krystalická látka, která se vyskytuje hlavně v křídlech motýlů a v moči savců. Vykazuje podobnost s močovou kyselinou, a proto poskytuje murexidovou reakci³³. Ovlivňuje růst a diferenciaci buněk, např. inhibuje růst lymfocytů stimulovaných konkanavalinem (látka rostlinného původu patřící k lektinům⁴³). Některé mikroorganismy jsou schopny převést xanthopterin na listovou kyselinu (konjugovaný pterin a vitamin ze skupiny B)^{44,45}.



Isoxanthopterin

2-aminopteridin-4,7(3H,8H)-dion

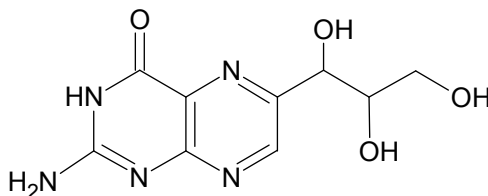
Isoxanthopterin je bezbarvá krystalická látka. Spolu s xanthopterinem patří mezi isopteriny a u obou byla prokázána silná aktivita proti karcinomu mléčné žlázy u myši^{30,46}.



Leukopterin

2-aminopteridin-4,6,7(1H,5H,8H)-trion

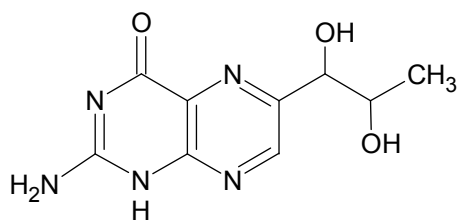
Leukopterin je bezbarvá krystalická látka obsažená v křídlech bělásků. Má vysoký bod tání a je společný oxidační produkt xanthopterinu a isoxanthopterinu^{33,47}. Dříve se předpokládalo, že leukopterin je močová kyselina, protože také poskytuje murexidovou reakci²⁹.



Neopterin

2-aminopteridin-6(1,2,3-trihydroxypropyl)-4(3H)-on

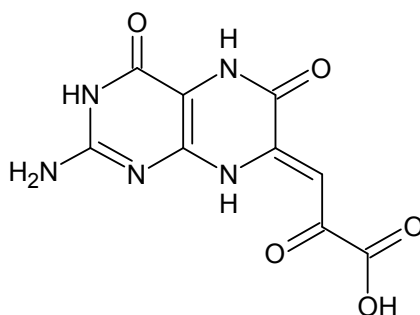
Spolu s biopterinem patří mezi nejvýznamnější deriváty pterinu v lidském organismu. Poprvé byl izolován v roce 1963 z larev včel, včelích dělnic a mateří kašičky⁴⁸. Zvýšená koncentrace neopterinu doprovází řadu onemocnění a souvisí s aktivací imunitního systému. U pacientů trpících maligními a virovými onemocněními byla koncentrace neopterinu poprvé stanovena metodou HPLC a později metodou radioimunoanalýzy⁴⁹.



Biopterin

2-aminopteridin-6(1,2-dihydroxypropyl)-4(1H)-on

Biopterin je nejrozšířenějším derivátem pterinu a poprvé byl objeven v moči savců. Biosyntéza biopterinu a vůbec všech pterinů začíná hydrolytickým štěpením guanosin trifosfátu. Jeho redukovaná forma, tetrahydrobiopterin, je kofaktorem některých monooxygenas aromatických aminokyselin³⁰. Porucha metabolismu biopterinu je spojena s řadou onemocnění, např. hyperfenylalaninemií nebo schizofrenií^{50,51}.



Erythropterin

3-[2-aminopteridine-4,6(3H,5H,8H)-dion]-2-oxo-propenová kyselina

Erythropterin je červenooranžové barvivo, které se nejčastěji vyskytuje v pigmentových granulích epidermálních buněk u hmyzu⁵². Tabulka 3.2 shrnuje důležité konstanty z hlediska analýzy derivátů pterinu.

Tabulka 3.2: Konstanty studovaných analytů nalezené v Reaxys. Xanthopterin (XAN), isoxanthopterin (ISO), biopterin (BIO), neopterin (NEO), leukopterin (LEU), erythropterin (ERY), registrační číslo v Chemical Abstract (CAS Reg. No.). Kde M_r je relativní molekulová hmotnost, pK_a záporný dekadický logaritmus disociační konstanty při teplotě 25 °C a rozp. je rozpustnost ve vodě při teplotě 20 °C.

Analyt	CAS Reg. No.	M_r	$pK_{a,1}$	$pK_{a,2}$	$pK_{a,3}$	rozp. g.dm ⁻³
XAN	119-44-8	179,138	1,91	6,84	9,46	0,025
ISO	529-69-1	179,138	- ^a	- ^a	- ^a	0,005
BIO	22150-76-1	237,218	2,43	7,77	-	0,190
NEO	2009-64-5	253,217	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a
LEU	492-11-5	195,137	7,40	9,50	13,00	0,001
ERY	7449-03-8	265,185	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a

^a Nepublikovaná hodnota

3.4 Metody stanovení

Deriváty pterinu se nejčastěji stanovují v moči, plazmě, séru nebo mozkomíšním moku³⁰, kde se jejich koncentrace pohybuje v rozmezí $10^{-6} - 10^{-9}$ mol.dm⁻³. V současné době se pro stanovení derivátů pterinu nejvíce využívají chromatografické metody, a to papírová chromatografie¹⁰, reverzní^{9,20,53,54}, iontově-párová⁵⁵, hydrofilní interakční⁵⁶, iontoměničová^{57,58} a chirální⁵⁹ vysokoúčinná kapalinová chromatografie.

Díky přirozené fluorescenci derivátů pterinu se nejčastěji používá fluorescenční detekce a analýzy se často provádí za přítomnosti pufru. Bylo prokázáno, že některé anionty (fosfátové, acetátové) mohou za určitých experimentálních podmínek (pH, koncentrace aniontu) významně snížit emisní záření derivátů pterinu ve vodných roztocích, a to vede k chybné interpretaci a závěrům⁶⁰.

K separaci derivátů pterinu v různých oxidačních stavech je vhodné použít iontově-párovou nebo iontoměničovou chromatografii, zatímco pro plně oxidované formy pterinu je výhodnější použít chromatografii na reverzních fázích. Pro přímé stanovení oxidovaných i redukovaných forem pterinu v biologických vzorcích se využívá elektrochemická detekce³⁰.

Pro analýzu derivátů pterinu se také využívají spektrometrické metody, např. povrchem zesílený Ramanův rozptyl – metoda SERS⁶¹ nebo synchronní fluorescenční spektrometrie⁶². Biopterin a neopterin lze stanovit radioimunoanalýzou nebo metodou ELISA a v současné době jsou již dostupné komerční sety³⁰.

3.4.1 Kapilární zónová elektroforéza

V práci Futiana a kol.²² byly pomocí kapilární elektroforézy analyzovány různé deriváty pterinu v moči u zdravých pacientů a pacientů s rakovinou. Nalezené limity detekce byly velmi nízké – méně než $1 \cdot 10^{-10}$ mol.dm⁻³. Jako standardy byly použity: 6,7-dimethylpterin, xanthopterin, biopterin, neopterin, 6-(hydroxymethyl)pterin, pterin, isoxanthopterin a pterin-6-karboxylová kyselina.

Analýzy byly prováděny v křemenné kapiláře o vnitřním průměru 50 μm, délce k detektoru 35 cm a celkové délce 60 cm. Separační elektrolyt se skládal z 2 mmol.dm⁻³ disodné soli ethylendiamintetraoctové kyseliny, 0,1 mol.dm⁻³ kyseliny borité a 0,1 mol.dm⁻³ tris(hydroxymethyl)aminomethanu. Vzorky byly dávkovány elektrokineticky, po dobu 10 s při napětí 20 kV. Následné separace byly prováděny při 20 kV s detekcí založenou na laserem indukované fluorescenci.

Separace derivátů pterinů pomocí kapilární elektroforézy byla závislá na pH základního elektrolytu. K oddělení biopterinu od neopterinu, nejvýznamnějších derivátů pterinu, které jsou vylučovány močí, docházelo pouze při pH > 8. Dále bylo zjištěno, že migrační chování a separační účinnost ovlivňuje teplota. Ze studie vyplývá, že koncentrace disodné soli ethylendiamintetraoctové kyseliny hraje významnou roli v oddělení isopterinů, a to isoxanthopterinu a xanthopterinu. Její přídavek do separačního elektrolytu zamezí vzájemné interakci těchto dvou isopterinů, bohužel přesný mechanismus interakce disodné soli ethylendiamintetraoctové kyseliny a molekul isoxanthopterinu a xanthopterinu není doposud znám.

3.5 Kapilární elektroforéza

Kapilární elektroforéza – CE patří mezi elektromigrační metody a používá se k dělení látek pomocí vloženého elektrického pole. Díky vysokému elektrickému odporu separační kapiláry lze aplikovat vysoké elektrické pole v řádu stovek Vcm⁻¹. Velkou výhodou použití vysokého elektrického pole je krátká doba analýzy a vysoká účinnost separace^{63,64}.

Složky vzorku se dělí na základě jejich rozdílné rychlosti migrace v separačním elektrolytu. Pokud by se uvažovala směs kationtů a aniontů, kationty budou putovat směrem k záporné elektrodě – katodě a anionty ke kladné elektrodě – anodě⁶⁵.

Nejjednodušší variantou kapilární elektroforézy je kapilární zónová

elektroforéza – CZE. Dále byla vypracována celá řada separačních technik, které rozšiřují možnosti prosté CZE jako je např. kapilární gelová elektroforéza, micelární elektrokinetická kapilární chromatografie, kapilární izotachoforéza a další⁶⁶.

Aplikační spektrum kapilární elektroforézy je v současné době široké, od separace malých anorganických iontů např. Na^+ , Ca^{2+} , Cl^- , SO_4^{2-} až po separaci biomolekul jako je např. DNA nebo proteiny. Přidáním dalších aditiv např. organických modifikátorů, chirálních selektorů, látek schopných komplexace s molekulami analytu atd. do separačního elektrolytu, lze dosáhnout odlišných separačních mechanismů a tím zvýšit selektivitu separace. Analýzy lze provádět jak ve vodném, tak i nevodném prostředí. Tato metoda se neustále vyvíjí a v řadě případů přebírá úkoly, které byly dříve řešené výhradně metodou HPLC^{63,65}.

3.5.1 Princip elektroforézy

Princip elektroforézy spočívá v migraci nabitých částic v elektrickém poli, které se vytváří vkládáním vysokého napětí dosahujícího desítek tisíc voltů mezi elektrody. Transportními jevy uplatňujícími se v elektroforéze a obecně v elektromigračních metodách je elektroforetická pohyblivost (mobilita) samotných látek a elektroosmotický tok.

Elektroforetická pohyblivost $\mu_{ef,i}$ ($\text{m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$) je rozhodujícím faktorem pro separaci v kapilární elektroforéze a je definována jako rychlost nabitě částice v elektrickém poli o jednotkové intenzitě. Je přímo úměrná celkovému náboji iontů a nepřímo úměrná jeho poloměru a viskozitě separačního roztoku⁶³:

$$v_{ef,i} = \mu_{ef,i} E \quad (3-1)$$

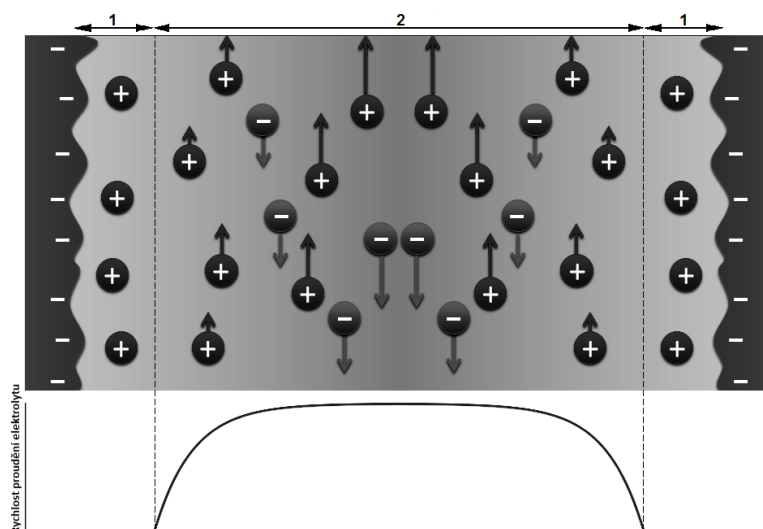
$$\mu_{ef,i} = \frac{Q_i}{6\pi\eta r_i} \quad (3-2)$$

kde $v_{ef,i}$ je elektroforetická rychlost daného i -tého iontu [ms^{-1}], $\mu_{ef,i}$ je elektroforetická pohyblivost daného i -tého iontu [$\text{m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$], E intenzita elektrického pole [Vm^{-1}], která je dána podílem aplikovaného napětí a celkové délky separační kapiláry, Q_i celkový náboj iontu [C], η viskozita separačního roztoku [$\text{kgm}^{-1}\text{s}^{-1}$] a r_i poloměr i -tého iontu [m].

Z toho tedy vyplývá, že malé a vysoce nabité ionty mají vysokou elektroforetickou pohyblivost, zatímco velké a málo nabité ionty ji mají nízkou. Při nadávkování vzorku jsou všechny částice v jednom místě a během separace se dostávají do popředí částice s větší pohyblivostí a tím dochází k jejich oddělení⁶³.

V roztocích silných elektrolytů se nazývá aktuální elektroforetická pohyblivost a v případě slabých elektrolytů je závislá na podílu disociovaných částic, čili je určena stupněm disociace. Ten je závislý na pH separačního elektrolytu – pak se nazývá efektivní elektroforetická pohyblivost $\mu_{\text{eff},i}$, přičemž elektroforetická pohyblivost aniontů je záporná a kationtů kladná. Každá látka tedy vykazuje různou elektroforetickou pohyblivost a ta je kvalitativní charakteristikou pro dané prostředí a teplotu. Dalším transportním jevem je elektroosmotický tok – EOF⁶⁶.

Stěny křemenných kapilár obsahují siloxanové skupiny $\equiv\text{Si}-\text{O}-\text{Si}\equiv$, které v kontaktu s roztoky o vyšším pH hydrolyzují na silanolové skupiny $\equiv\text{Si}-\text{OH}$ a následně disociují na $\equiv\text{Si}-\text{O}^-$, čímž se na stěně kapiláry vytváří záporně nabitá vrstva. Ke stěně jsou přitaženy uvolněné protony, které vytvářejí pozitivně nabitou vrstvu. Vzniká tak stabilní elektrická dvojvrstva (tzv. Helmholtzova vrstva) a difuzní vrstva (obr. 3.4). Potenciál mezi stěnou separační kapiláry a vrstvou těsně k ní přiléhající se nazývá zeta-potenciál. V okamžiku vložení vnějšího napětí se začnou ionty pohybovat k opačně nabitě elektrodě, a protože jsou solvatované, strhávají celý objem roztoku přítomný v separační kapiláře^{63,64}.



Obr. 3.4: Helmholtzova vrstva (1), difuzní vrstva (2) a profil toku kapilárou

Směr EOF závisí na polaritě nábojů v elektrické dvojvrstvě a jeho rychlost na velikosti zeta-potenciálu, intenzitě elektrického pole, relativní permitivitě a viskozitě separačního roztoku⁶³:

$$v_{eof} = \mu_{eof} E \quad (3-3)$$

$$\mu_{eof} = \frac{\varepsilon_r \varepsilon_0 \zeta}{\eta} \quad (3-4)$$

kde v_{eof} je rychlost elektroosmotického toku [ms^{-1}], μ_{eof} elektroosmotická mobilita [$\text{m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$], E intenzita elektrického pole [Vm^{-1}], která je dána podílem aplikovaného napětí a celkové délky separační kapiláry, ε_r relativní permitivita kapaliny, ε_0 permitivita vakua, ζ zeta-potenciál [V] a η viskozita separačního roztoku [$\text{kgm}^{-1}\text{s}^{-1}$].

Elektroosmotický tok působí jako neselektivní síla – unáší všechny částice přítomné v separačním elektrolytu stejnou rychlostí. Velkou výhodou je, že způsobuje menší rozmytí zón analytů, díky plochému profilu toku kapaliny kapilárou (obr. 3.4). Ve výsledném záznamu elektroforetických separací – elektroferogramech - tak získáváme užší píky a dosahujeme vyšší separační účinnosti oproti HPLC, kdy je profil toku kapaliny kolonou parabolický^{63,66}.

Ve většině případů je EOF dost silný i k transportu aniontů ke katodě. Neutrální látky se pohybují jen rychlostí elektroosmotického toku, přičemž kationty se pohybují rychleji a anionty pomaleji. Detektorovým okénkem jako první v pořadí procházejí nejmenší kationty s nejvyšším nábojem, pak neutrální látky a nakonec anionty, přičemž jejich pořadí je opačné než u kationtů, čili jako poslední procházejí nejmenší a nejvíce nabitě anionty. Celková pohyblivost částic, někdy též nazývaná zdánlivá, je dána součtem elektroosmotické a jejich vlastní elektroforetické pohyblivosti⁶³.

Pohyblivost elektroosmotického toku lze vypočítat na základě zjištění migračního času neutrální látky, tzv. značkovač EOF a pro tyto účely se používá např. methanol, thiomčovina nebo mesityloxid⁶³:

$$\mu_{eof} = \frac{L_D L_C}{t_{eof} U} \quad (3-5)$$

a podobně pohyblivost i -tého nabitého iontu:

$$\mu_{eff,i} = \left(\frac{1}{t_{mig,i}} - \frac{1}{t_{eof}} \right) \frac{L_D L_C}{U} \quad (3-6)$$

kde μ_{eof} je pohyblivost elektroosmotického toku [$\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$], $\mu_{eff,i}$ efektivní elektroforetická pohyblivost daného i -tého iontu [$\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$], L_D délka kapiláry od vstupního konce k detektoru [cm], L_C celková délka kapiláry [cm], t_{eof} migrační čas značkovače elektroosmotického toku [s], $t_{mig,i}$ migrační čas i -té nabitě látky [s] a U separační napětí [V].

Důležitým cílem analýzy je dosažení dobrého rozdělení analyzovaných látek. Toto rozdělení lze kvantitativně vyjádřit jako rozlišení $R_{1,2}$ a vyjadřuje míru kvality separace dvou sousedních zón. Čím je jeho hodnota vyšší, tím lepšího rozdělení dosáhneme. Dvě sousední zóny jsou od sebe plně separované, je-li jejich rozlišení $R_{1,2} \geq 1,5$ ⁶³:

$$R_{1,2} = \frac{t_{mig,2} - t_{mig,1}}{0,5(w_1 + w_2)} \quad (3-7)$$

kde $R_{1,2}$ je rozlišení dvou sousedních zón, $t_{mig,1}$ migrační čas první látky [s], $t_{mig,2}$ migrační čas druhé látky [s], w_1 šířka píku při základně první látky [s] a w_2 šířka píku při základně druhé látky [s].

V kapilární elektroforéze je potřeba rychlost elektroosmotického toku kontrolovat, např. čím je pH separačního elektrolytu větší, tím dochází k větší disociaci ionogenních silanolových skupin a k rozprostření většího negativního náboje na stěně

separační kapiláry. Rychlost elektroosmotického toku je větší a z toho vyplývá, že ionty mohou opouštět separační kapiláru dříve, než dojde k jejich rozdělení. Některé metody ovlivnění rychlosti elektroosmotického toku jsou uvedeny v tabulce 3.3. Rychlost elektroosmotického toku lze nejsnadněji ovlivnit změnou intenzity elektrického pole, ale tato metoda ovlivnění rychlosti může mít negativní vliv na účinnost, rozlišení a čas separace. Z tohoto důvodu se dává přednost změně pH pufru, avšak tato změna může mít vliv na náboj molekul analytu, a tudíž na jejich elektroforetickou pohyblivost. Pro úspěšnou separaci je potřeba najít takové podmínky, aby rychlost elektroosmotického toku a elektroforetické pohyblivosti iontů analytu byly optimální⁶⁴.

Tabulka 3.3: Hlavní parametry ovlivňující rychlost elektroosmotického toku.

Změna	Výsledek	Poznámka
Velikost elektrického pole	Vyšší elektrické pole produkuje vyšší rychlost EOF	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Účinnost a rozlišení se můžou snížit, když je rychlost EOF nízká ▪ Vysoká rychlost EOF má za následek vysoké Joulovo teplo
pH pufru	Při nízkém/vysokém pH je EOF pomalý/rychlý	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Nejvhodnější změna rychlosti EOF ▪ Může se měnit náboj nebo struktura rozpuštěných látek
Iontová síla nebo koncentrace pufru	Jejich vyšší hodnota sníží zeta-potenciálu a rychlost EOF	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Vysoká iontová síla generuje vysoký proud a Joulovo teplo ▪ Nízká iontová síla může způsobovat adsorpci vzorku na stěně kapiláry ▪ Když je vodivost elektrolytu odlišná od vodivosti vzorku může způsobovat nesymetričnost píků
Teplota	Změna viskozity	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Separální kapiláry je nutno termostatovat
Přídavek organického modifikátoru	Změna zeta-potenciálu a viskozity, obvykle snížení rychlosti EOF	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Možnost ovlivnění selektivity separace
Přídavek povrchově aktivní látky	Adsorpce na stěnu separační kapiláry	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Anionaktivní látky mohou zvýšit rychlost EOF ▪ Kationaktivní látky mohou snížit rychlost nebo obrátit směr EOF ▪ Mohou významně ovlivnit selektivitu separace

3.5.2 Faktory ovlivňující účinnost separace

Separční účinnost je charakterizována počtem teoretických pater N , popřípadě výškovým ekvivalentem teoretického patra H . Z elektroferogramu jí lze vypočítat na základě migračního času zóny a šířky píku při základně, eventuálně šířky píku v polovině jeho výšky. Při daném čase odpovídají užší píky vyššímu počtu teoretických pater a tedy lepší separční účinnosti⁶³:

$$N = 16 \cdot \left(\frac{t_{mig,i}}{w_i} \right)^2 = 5,545 \cdot \left(\frac{t_{mig,i}}{w_{0,5;i}} \right)^2 \quad (3-8)$$

$$H = \frac{L_D}{N} \quad (3-9)$$

kde N je počet teoretických pater, $t_{mig,i}$ migrační čas i -té nabitě látky [s], w_i šířka píku i -té nabitě látky při základně [s], $w_{0,5;i}$ šířka píku i -té nabitě látky v polovině jeho výšky [s], H výškový ekvivalent teoretického patra [cm] a L_D délka kapiláry od vstupního konce k detektoru [cm].

Po nadávkování vzorku migruje každý analyzovaný iont podle své elektroforetické pohyblivosti jako nezávislá zóna. Rozšiřování takových zón je výsledkem působení několika různých dějů. V ideálním případě k tomuto rozšiřování přispívá pouze molekulární difuze, v praxi ale také přispívají k rozšiřování zón i další jevy jako je např. Joulovo teplo a s ním spojený teplotní gradient, délka dávkované zóny, interakce molekul vzorku se stěnami separační kapiláry, rozdíly v elektrické vodivosti vzorku a separačního elektrolytu (elektrodisperze) nebo nestejná úroveň hladin elektrolytu ve vialkách⁶⁴.

Limitujícím faktorem v kapilární elektroforeze je používání vysokých napětí ve snaze zrychlit analýzu. Důsledkem elektrického proudu procházejícího separačním elektrolytem vzniká Joulovo teplo, jehož důsledkem je ohřívání separačního elektrolytu. Pokud není zajištěn dostatečný odvod tepla přes kapilární stěnu, dochází k rozdílu teplot ve středu kapiláry a u jejích stěn. Vznikají tak různé teplotní gradienty, jejichž důsledkem jsou lokální změny viskozity separačního elektrolytu a následné rozšiřování zón vzorku. Zvýšení teploty závisí na rozměrech kapiláry, vodivosti pufru a

aplikovaného napětí na elektrody⁶⁴.

Existuje celá řada možností, jak snížit tvorbu Joulova tepla, např. snížením aplikovaného napětí na elektrody, snížením vodivosti separačního elektrolytu (snížení iontové síly nebo koncentrace pufru), zmenšením vnitřního průměru kapiláry nebo jejího termostatování. I tyto regulace Joulova tepla mají své nevýhody, např. zmenšení vnitřního průměru kapiláry není praktické z hlediska detekce, dávkování vzorku a možného ucpání kapiláry. Vnitřní průměry kapilár se obvykle pohybují v rozmezí 25 – 50 μm ^{63,64}.

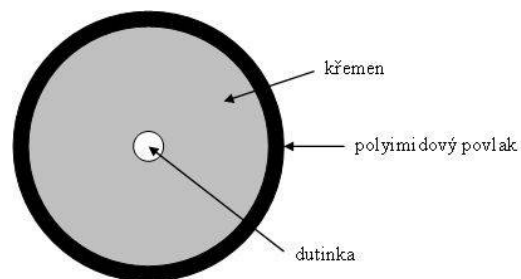
Po nadávkování vzorku je důležité, aby délka zóny byla co nejmenší. Délka zóny závisí na difuzním koeficientu daného analytu a době, kterou stráví v kapiláře. Délka nadávkované zóny by měla pohybovat v rozmezí 1 – 2 % z celkové délky separační kapiláry⁶⁴.

Interakcí molekul analytu se stěnami separační kapiláry dochází obvykle ke změnám migračního chování separovaných zón. Vzhledem k tomu, že stěny separační kapiláry obsahují ionizovatelné skupiny, dochází k hromadění separovaných iontů opačného náboje v blízkosti stěn separační kapiláry a to vede ke zvýšené sorpci. Sorpce vede k rozmývání zón a projevuje se nesymetričností píků v elektroferogramech. Existuje několik metod, jak sorpci potlačit. Jednou z možností je změna pH separačního elektrolytu tak, aby stěny separační kapiláry i separované ionty nesly náboj stejného znaménka, a tudíž se vzájemně odpuzovaly. Další možností je deaktivace stěn separační kapiláry jejím pokrytím různými hydrofilními polymery nebo detergenty. Tímto způsobem ale bývá zároveň ovlivněna rychlost elektroosmotického toku⁶⁴.

Rozdíly mezi elektrickou vodivostí zóny vzorku a použitým separačním elektrolytem mají vliv na tvar separované zóny. Pokud má zóna vzorku vyšší, respektive nižší elektrickou vodivost než separační elektrolyt dochází k tzv. elektrodisperzi, projevující se v elektroferogramech „tailujícími“, respektive „frontujícími“ píky, zhoršujícími rozlišení. Pro snížení elektrodisperze lze např. zředit vzorek⁶⁴.

3.5.3 Instrumentace

Samotná separace probíhá v křemenné kapiláře s velmi malým vnitřním průměrem, která je na obou koncích ponořena do nádobek (vialek) naplněných separačním elektrolytem. Křemenná kapilára má obvykle vnější průměr 360 μm a vnitřní průměr 25 – 100 μm . Samotná kapilára je ještě obalena polyimidovou vrstvou, která zajišťuje její pružnost a umožňuje její ohýbání, aniž by se zlomila⁶⁵ (obr. 3.5).



Obr. 3.5: Křemenná kapilára⁶⁵

Velkou výhodou je v kapilární elektroforéze malá spotřeba vzorku – v řádech nanolitřů. Vzorek lze dávkovat třemi způsoby, a to tlakem, rozdílem hladin elektrolytu v nádobkách (princip spojitých nádob) nebo elektrokineticky. Nejběžnější je dávkování tlakem, kdy je vstupní konec kapiláry ponořen do vialky s roztokem a je aplikován zvýšený tlak po dobu několika sekund. Méně používané dávkování je elektrokinetické, kdy je opět vstupní konec kapiláry ponořen do vialky s roztokem a na místo tlaku je aplikováno napětí. Nevýhodou tohoto dávkování je možná diskriminace některých iontů^{63,65}.

Jelikož je průměr kapilár velmi malý, detektory pro kapilární elektroforézu musí být velmi citlivé. Nejpoužívanější je absorpční fotometrický nebo fluorescenční detektor např. s detekcí založenou na laserem indukované fluorescenci, který je velmi citlivý, avšak drahý. V současné době se také využívá spojení kapilární elektroforézy s hmotnostní detekcí, které umožňuje získat informaci o struktuře látek a jejich následnou identifikaci⁶³.

4 Experimentální část

4.1 Použité chemikálie

- Chelaton 3 – dihydrát disodné soli ethylendiamintetraoctové kyseliny ($\geq 99\%$, Lachema, ČR)
- Kyselina boritá ($\geq 99,5\%$, Penta, ČR)
- TRIS – tris(hydroxymethyl)aminomethan ($> 98\%$, Lach-Ner, ČR)
- DMSO – dimethylsulfoxid ($> 99\%$, Lachema, ČR)
- Hydroxid sodný ($> 98\%$, Lach-Ner, ČR)
- Deionizovaná voda Milli Q, Millipore (Milford, USA)

4.2 Deriváty pterinu a vzorky ploštic

- Biopterin ($\geq 98\%$, Sigma Aldrich, Německo)
- Leukopterin ($\geq 95\%$, Sigma Aldrich, Německo)
- Xanthopterin ($\geq 97,5\%$, Fluka, Švýcarsko)
- Isoxanthopterin ($\geq 97,5\%$, Fluka, Švýcarsko)
- Erythropterin (Serva Feinbiochemica, Německo, poskytnut doc. Mgr. Alicí Exnerovou, Ph.D.)
- Neopterin ($\geq 97,5\%$, Sigma Aldrich, Německo)
- Červená, světlá a oranžová forma ploštic *Graphosoma semipunctatum* (poskytnuta doc. Mgr. Alicí Exnerovou, Ph.D. a Prof. RNDr. Pavlem Štysem, CSc., Katedra zoologie, PřF UK, Praha, původ Kypr)

4.3 Přístrojové vybavení

Deriváty pterinu byly váženy na analytických vahách APX – 100 (Denver Instruments, Německo). Požadované pH elektrolytů bylo upravováno pomocí pH metru 3510 (Jenway, Velká Británie) a elektrolyty byly odplyněny v ultrazvuku LC30H (Elma, ČR). Centrifugace vzorků ploštic byla prováděna pomocí centrifugy Force 7 (Denver Instruments, Německo).

Spektra derivátů pterinu byly proměřeny na komerčním přístroji HP^{3D}CE systém s diode-array detektorem (Agilent Technologies, Německo) a elektroforetická měření

byla prováděna na PrinCE 250 autosampler (PrinCE Technologies B.V., Nizozemsko) s UV-VIS spektrometrickým detektorem Spectra 100 (Therma Separation Products, USA).

Ke sběru a vyhodnocení dat byly použity programy Clarity 2.8.1.584 (DataApex, Česká republika), Origin 8 (OriginLab Corporation, USA) a Microsoft Excel 2003 (Microsoft Corporation, USA).

4.4 Příprava separačních pufrů a zásobních roztoků derivátů pterinu

Na základě literárních údajů²² byl použit separační pufr, který se skládal z kyseliny borité, chelatonu 3 a TRISu. Požadované pH bylo upravováno přidáváním $1,5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ NaOH.

Biopterin byl připraven rozpuštěním 0,5 mg látky v 10 ml DMSO. Ostatní deriváty byly připraveny rozpuštěním 1 mg příslušné látky v 10 ml DMSO. Byly uchovávány v tmavých vialkách obalených aluminiovou fólií, aby byly chráněny před světlem a při teplotě 5 °C.

4.5 Příprava extraktů štítků ploštic *Graphosoma semipunctatum*

Štítky červené (5,0 mg), oranžové (5,6 mg) a světlé (4,2 mg) formy ploštic *Graphosoma semipunctatum* byly rozdrceny a rozpuštěny v 0,5 ml DMSO. Vzniklý roztok byl v tmavé vialce na 2 hodiny vložen do ultrazvuku za současného zahřívání na 50 °C. Vialka byla následně obalena aluminiovou fólií a uložena do temna při teplotě 5 °C. Minimální doba extrakce v temnu byla 96 hodin a k odstranění nerozpuštěných pevných částic nemohla být použita filtrace, protože bylo zjištěno, že dochází k záchytu pterinů na filtru⁶⁷. Roztoky proto byly pouze centrifugovány při 9000 otáčkách za minutu po dobu 10 minut. Supernatant byl poté odlit do tmavých vialek a uchováván v temnu při teplotě 5 °C jako zásobní roztok reálného vzorku.

4.6 Podmínky měření a postup práce

Elektroforetické separace byly prováděny v nemodifikované křemenné kapiláře firmy CACO (Slovensko) o parametrech: vnitřní průměr $d_i = 50 \text{ } \mu\text{m}$, délka kapiláry od vstupního konce k detekčnímu okénku $L_D = 55 \text{ cm}$ a celková délka kapiláry $L_C = 70 \text{ cm}$. Kapilára byla termostatována na teplotu 30 °C.

Na počátku měření byla kapilára kondicionována následujícím způsobem: promytí

deionizovanou vodou (2 min), 1 mol.dm⁻³ NaOH (4 min), opět deionizovanou vodou (2 min), elektrolytem (6 min) a následně bylo na elektrody vloženo napětí 20 kV (10 min) pro ustálení elektroosmotického toku. Mezi každou analýzou byla kapilára promývána deionizovanou vodou (2 min), 0,1 mol.dm⁻³ NaOH (1 min) a elektrolytem (2 min). Po posledním denním měření byla kapilára promývána deionizovanou vodou (2 min), 1 mol.dm⁻³ NaOH (3 min), opět deionizovanou vodou (6 min) a vzduchem (6 min). Pro všechna promývání byl použit tlak 1000 mbar.

Značkovačem elektroosmotického toku byl dimethylsulfoxid, ve kterém byly analyty a reálné vzorky rozpuštěny.

Standardy derivátů pterinu a vzorky ploštic byly dávkovány elektrokineticky po dobu 10 s při napětí 20 kV.

4.7 Statistické vyhodnocení výsledků

Střední hodnota souboru měření byla odhadnuta použitím mediánu \tilde{x} . Směrodatná odchylka s a relativní směrodatná odchylka s_r byly vypočítány v programu Microsoft Excel 2003 podle vztahu (4-1), respektive (4-2):

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n}} \quad (4-1)$$

$$s_r = \frac{s}{\tilde{x}} \quad (4-2)$$

kde s je směrodatná odchylka, x_i naměřená hodnota, \tilde{x} medián a s_r relativní směrodatná odchylka.

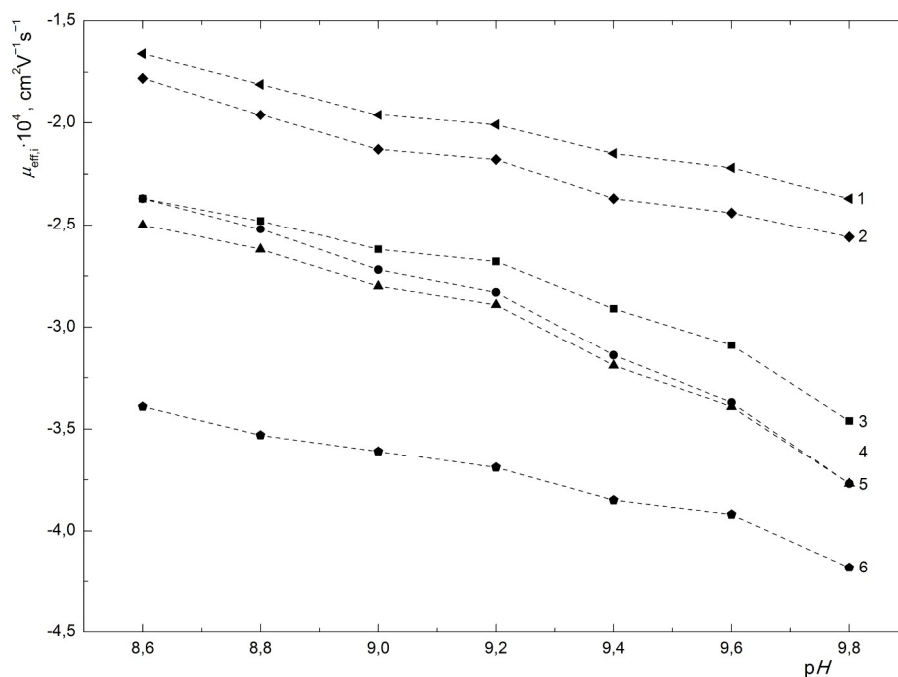
5 Výsledky a diskuze

5.1 Optimalizace pH, koncentrací složek pufru a separačního napětí

5.1.1 pH Separačního elektrolytu

Jak již bylo popsáno v kapitole pojednávající o vlastnostech derivátů pterinu (str. 14), pteriny se chovají jako slabé kyseliny. V alkalickém prostředí nesou negativní náboj, čili budou migrovat za značkovačem elektroosmotického toku. Jejich elektroforetická pohyblivost je záporná a bude se zvětšovat s rostoucí alkalitou prostředí.

Vliv pH pufru na elektroforetickou pohyblivost derivátů pterinu byl sledován v třísložkovém pufru, který se skládal z kyseliny borité, chelatonu 3 a TRISu. Vliv hodnoty pH pufru byl sledován v poměrně úzkém intervalu od 8,6 do 9,8. Závislosti efektivních elektroforetických pohyblivostí na pH jednotlivých derivátů pterinů jsou ukázány na obr. 5.1.

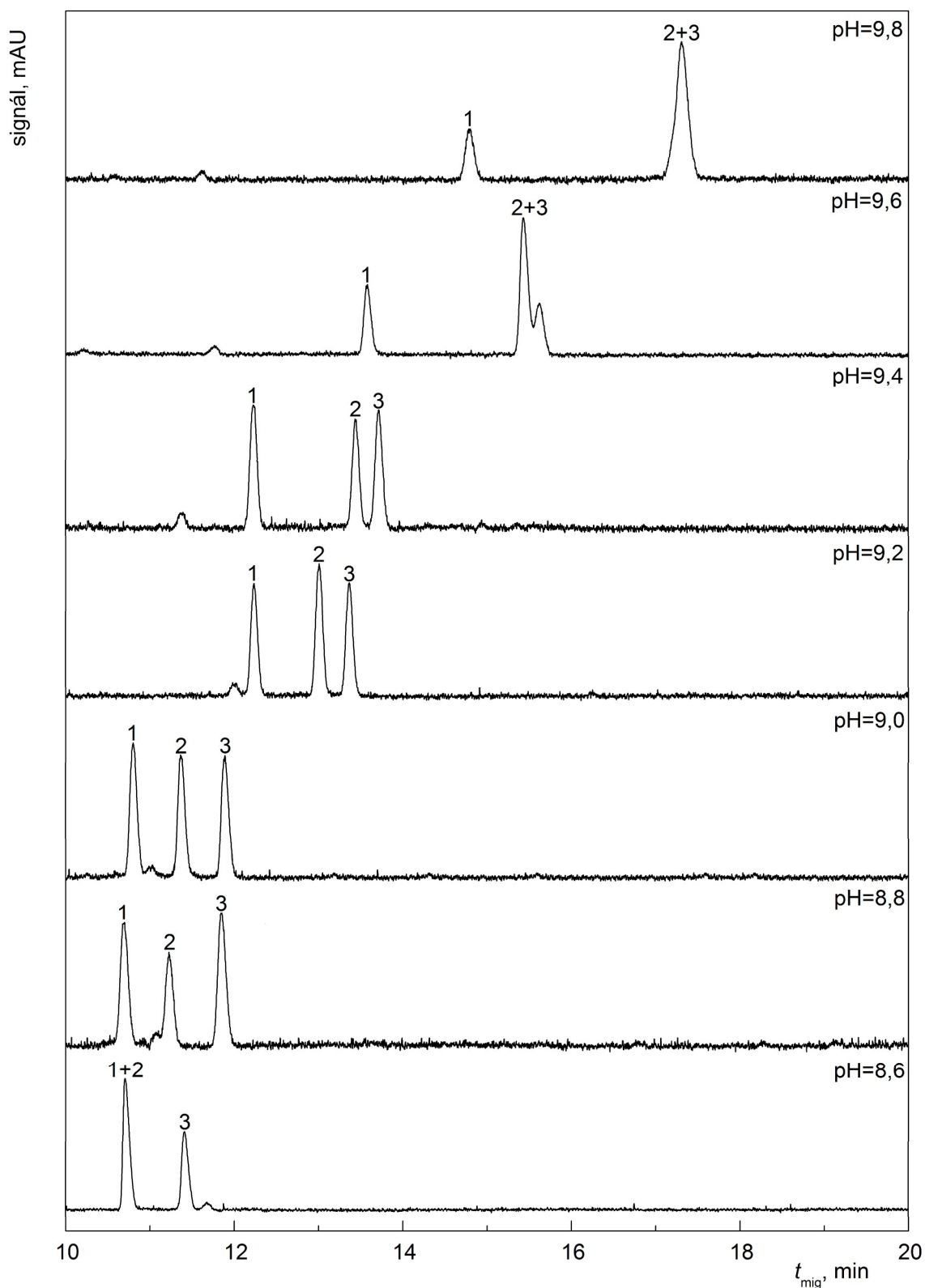


Obr. 5.1: Závislosti efektivních elektroforetických pohyblivostí na pH v separačních elektrolytech skládajících se ze 100 mmol.dm⁻³ kyseliny borité, 2 mmol.dm⁻³ chelatonu 3 a 100 mmol.dm⁻³ TRISu. Závislost 1 – biopterin, 2 – neopterin, 3 – isoxanthopterin, 4 – leukopterin, 5 – xanthopterin a 6 – erythropterin.

Z obrázku 5.1 je vidět, že se vzrůstající hodnotou pH pufru dochází ke vzrůstající záporné hodnotě efektivní elektroforetické pohyblivosti derivátů pterinu, a to je ve shodě s předpokladem jejich větší disociovanosti.

Zatímco u biopterinu, neopterinu a erythropterinu nedochází v žádném proměřovaném pH separačního elektrolytu ke komigraci, isoxanthopterin, leukopterin a xanthopterin (závislost 3, 4 a 5 na obr. 5.1) jsou si strukturně velmi podobné a k jejich oddělení dochází pouze v úzkém rozmezí pH separačního elektrolytu jak je demonstrováno na obr. 5.2.

Z toho je zřejmé, že vhodné pH leží mezi hodnotami 8,8 – 9,4 a z hlediska rozlišení je vhodné pH 8,8 a 9,0. Leukopterin se v separačním elektrolytu o pH 8,8 přibližně po 30 minutovém stání začne vylučovat ve formě sraženiny, a proto byl pro další optimalizaci zvolen elektrolyt o pH 9,0. V tomto elektrolytu separace směsi všech derivátů pterinu nepřesáhla 28 minut a procházející proud byl 20 μA .

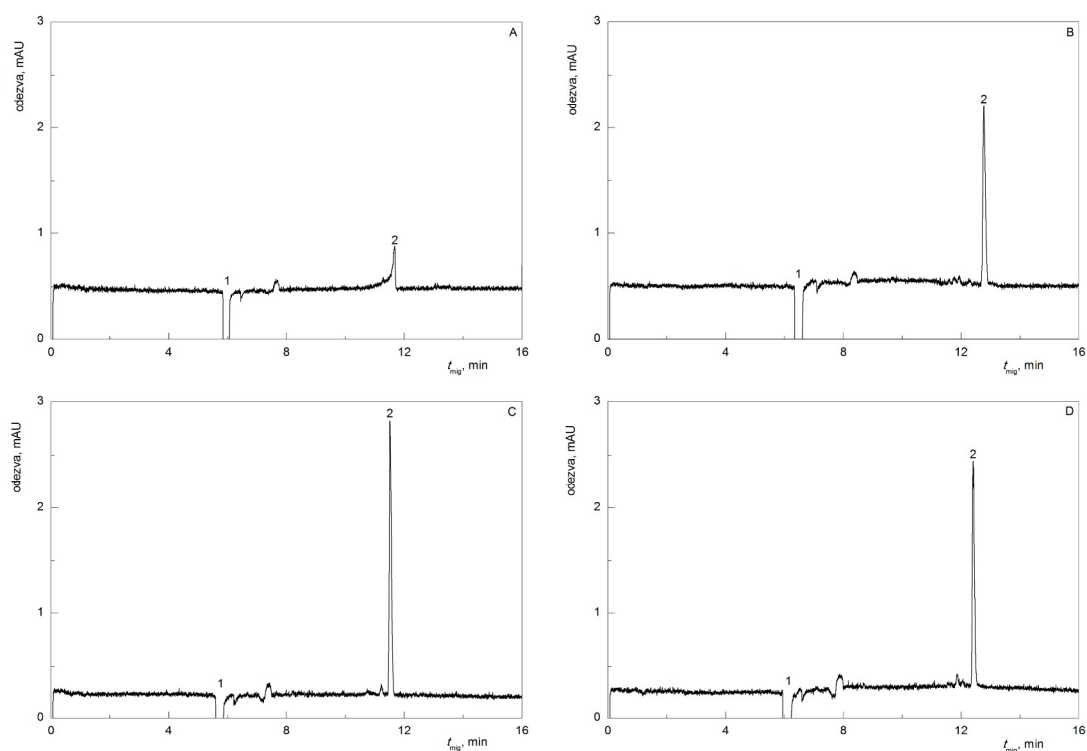


Obr. 5.2: Elektroferogramy separace isoxanthopterinu (1), leukopterinu (2) a xanthopterinu (3) při různých hodnotách pH v elektrolytu skládajícího se ze $100 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ kyseliny borité, $2 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ chelatonu 3 a $100 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ TRISu. Elektrokinetické dávkování 10 s při 20 kV, separace při 20 kV s UV detekcí při 290 nm.

5.1.2 Koncentrace chelatonu 3

Koncentrace chelatonu 3 v tříložkovém separačním elektrolytu (kyselina boritá, chelaton 3 a TRIS) je v porovnání s koncentrací kyseliny borité a TRISu 50krát menší, a proto byla optimalizována jako první. Změna koncentrace chelatonu 3 ovlivňuje elektroforetickou pohyblivost jednotlivých látek minimálně (tab. 5.1), přesto má velký vliv na účinnost celé separace a na citlivost detekce.

Jako příklad je zde uvedena analýza xanthopterinu (obr. 5.3) v koncentračním rozmezí 0 – 3 mmol.dm⁻³ chelatonu 3. Účinnost separací a rozlišení sousedních píků je sumarizováno v tabulkách 5.2 a 5.3.



Obr. 5.3: Elektroforetický záznam měření xanthopterinu v elektrolytu skládajícího se ze 100 mmol.dm⁻³ kyseliny borité, 100 mmol.dm⁻³ TRISu a (A) 0 mmol.dm⁻³, (B) 1 mmol.dm⁻³, (C) 2 mmol.dm⁻³, (D) 3 mmol.dm⁻³ chelatonu 3 o pH 9,0. Elektrokinetické dávkování 10 s při 20 kV, měření při 20 kV s UV detekcí při 290 nm. Pík 1 – DMSO, 2 – xanthopterin.

Tabulka 5.1: Vliv koncentrace chelatonu 3 na efektivní elektroforetické pohyblivosti μ_{eff} derivátů pterinu v separačních elektrolytech skládajících se ze 100 mmol.dm⁻³ kyseliny borité, 100 mmol.dm⁻³ TRISu a chelatonu 3 v koncentračním rozmezí 1 – 3 mmol.dm⁻³ při pH 9,0. BIO – biopterin, NEO – neopterin, ISO – isoxanthopterin, LEU – leukopterin, XAN – xanthopterin a ERY – erythropterin.

	$c_{\text{chelaton 3}} [\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}]$		
	1	2	3
	$\mu_{\text{eff}} \cdot 10^4 [\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}]$		
BIO	-1,90	-1,96	-1,87
NEO	-2,07	-2,13	-2,03
ISO	-2,56	-2,62	-2,53
LEU	-2,64	-2,72	-2,61
XAN	-2,72	-2,80	-2,70
ERY	-3,60	-3,61	-3,59

Tabulka 5.2: Účinnost separace v separačních elektrolytech skládajících se ze 100 mmol.dm⁻³ kyseliny borité, 100 mmol.dm⁻³ TRISu a chelatonu 3 v koncentračním rozmezí 1 – 3 mmol.dm⁻³ při pH 9,0. N – počet teoretických pater, BIO – biopterin, NEO – neopterin, ISO – isoxanthopterin, LEU – leukopterin, XAN – xanthopterin a ERY – erythropterin.

	$c_{\text{chelaton 3}} [\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}]$		
	1	2	3
	N		
BIO	69 000	98 000	85 000
NEO	48 000	69 000	56 000
ISO	91 000	127 000	105 000
LEU	87 000	106 000	96 000
XAN	94 000	116 000	108 000
ERY	88 000	84 000	90 000

Tabulka 5.3: Rozlišení sousedních píků v separačních elektrolytech skládajících se ze 100 mmol.dm⁻³ kyseliny borité, 100 mmol.dm⁻³ TRISu a chelatonu 3 v koncentračním rozmezí 1 – 3 mmol.dm⁻³ při pH 9,0. R – rozlišení, BIO – biopterin, NEO – neopterin, ISO – isoxanthopterin, LEU – leukopterin, XAN – xanthopterin a ERY – erythropterin.

	$c_{\text{chelaton 3}} [\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}]$		
	1	2	3
$R_{\text{BIO,NEO}}$	2,5	2,9	3,1
$R_{\text{NEO,ISO}}$	8,9	10,2	12,3
$R_{\text{ISO,LEU}}$	2,0	2,7	2,7
$R_{\text{LEU,XAN}}$	2,2	2,4	2,8
$R_{\text{XAN,ERY}}$	30,8	33,5	42,5

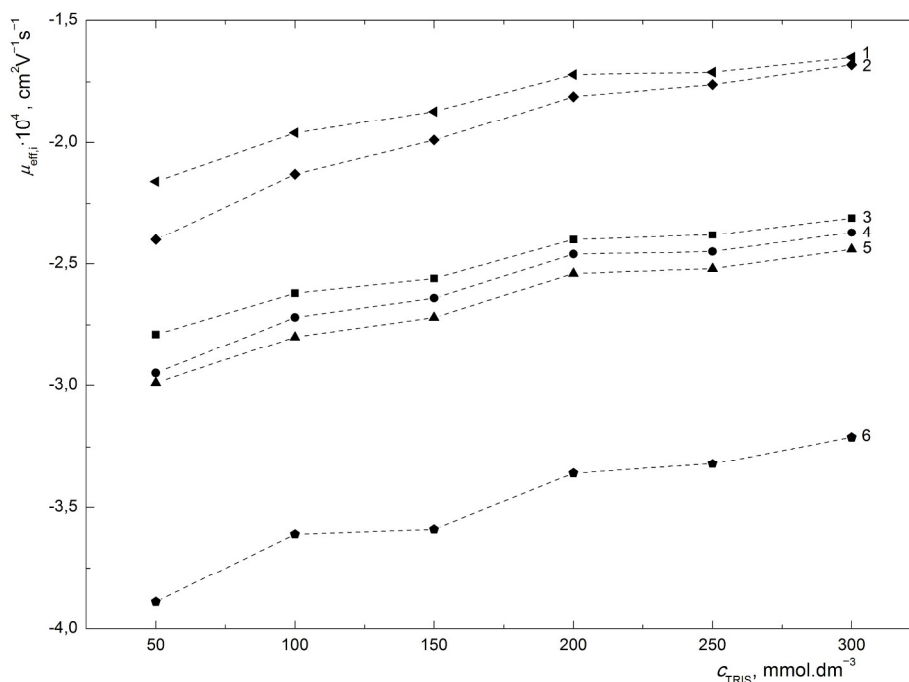
Z tabulky 5.2 je vidět, že při použití 2 mmol.dm^{-3} chelatonu 3 je dosaženo nejvyšší separační účinnosti s výjimkou erythropterinu. V jeho případě jsou však počty teoretických pater ve všech proměřovaných koncentracích chelatonu 3 přibližně stejné. Také rozlišení sousedních píků se zvyšuje (tab. 5.3). Důležité je rozlišení mezi isoxanthopterinem, leukopterinem a xanthopterinem.

Tyto tři deriváty pterinu vykazují podobné elektroforetické chování a je obtížné nalézt prostředí, ve kterém by byly dostatečně oddělené. Do dalšího optimalizačního procesu byla vybrána 2 mmol.dm^{-3} koncentrace chelatonu 3.

5.1.3 Koncentrace TRISu

V rámci tohoto optimalizačního kroku byla studována koncentrace TRISu v rozmezí $50 - 300 \text{ mmol.dm}^{-3}$ v tříložkovém separačním elektrolytu (kyselina boritá, chelaton 3 a TRIS). Výsledky separací jsou sumarizovány v tabulkách 5.4 a 5.5 z hlediska počtu teoretických pater a rozlišení sousedních píků.

Na obrázku 5.4 jsou uvedeny závislosti efektivních elektroforetických pohyblivostí jednotlivých derivátů pterinu na koncentraci TRISu a z tohoto obrázku je vidět, že s rostoucí koncentrací TRISu dochází ke snížení záporných efektivních elektroforetických pohyblivostí jednotlivých derivátů pterinu.



Obr. 5.4: Závislosti efektivních elektroforetických pohyblivostí na koncentraci TRISu v separačních elektrolytech skládajících se ze 100 mmol.dm⁻³ kyseliny borité, 2 mmol.dm⁻³ chelatonu 3 a TRISu v koncentračním rozmezí 50 – 300 mmol.dm⁻³ při pH 9,0. Závislost 1 – biopterin, 2 – neopterin, 3 – isoxanthopterin, 4 – leukopterin, 5 – xanthopterin a 6 – erythropterin.

Tabulka 5.4: Vliv koncentrace TRISu na účinnost separace v separačních elektrolytech skládajících se ze 100 mmol.dm⁻³ kyseliny borité, 2 mmol.dm⁻³ chelatonu 3 a TRISu v koncentračním rozmezí 50 – 300 mmol.dm⁻³ při pH 9,0. N – počet teoretických pater, BIO – biopterin, NEO – neopterin, ISO – isoxanthopterin, LEU – leukopterin, XAN – xanthopterin a ERY – erythropterin.

	c_{TRIS} [mmol.dm ⁻³]					
	50	100	150	200	250	300
	N					
BIO	51 000	98 000	53 000	45 000	-	-
NEO	73 000	69 000	61 000	83 000	-	-
ISO	84 000	127 000	84 000	116 000	138 000	139 000
LEU	118 000	106 000	120 000	124 000	96 000	149 000
XAN	125 000	116 000	102 000	120 000	134 000	136 000
ERY	132 000	84 000	100 000	169 000	168 000	140 000

- analyty komigrují

Tabulka 5.5: Rozlišení sousedních píků v separačních elektrolytech skládajících se ze 100 mmol.dm⁻³ kyseliny borité, 2 mmol.dm⁻³ chelatonu 3 a TRISu v koncentračním rozmezí 50 – 300 mmol.dm⁻³ při pH 9,0. *R* – rozlišení, BIO – biopterin, NEO – neopterin, ISO – isoxanthopterin, LEU – leukopterin, XAN – xanthopterin a ERY – erythropterin.

	<i>c</i> _{TRIS} [mmol.dm ⁻³]					
	50	100	150	200	250	300
<i>R</i> _{BIO,NEO}	3,9	2,9	2,1	2,3	1,2	1,0
<i>R</i> _{NEO,ISO}	7,9	10,2	12,8	17,9	23,5	26,8
<i>R</i> _{ISO,LEU}	3,3	2,7	2,7	2,6	2,8	3,3
<i>R</i> _{LEU,XAN}	1,7	2,4	2,5	2,5	3,7	3,7
<i>R</i> _{XAN,ERY}	31,4	33,5	32,8	41,4	54,9	58,1

Z obrázku 5.4 je vidět, že zvýšení koncentrace TRISu nemá žádnou výraznější změnu na pohyblivost zón isoxanthopterinu, leukopterinu a xanthopterinu. Jejich záporné efektivní elektroforetické pohyblivosti klesají přibližně stejně, kromě proměřované koncentrace 50 mmol.dm⁻³ TRISu, kdy se zóna leukopterinu přiblíží k zóně xanthopterinu a je možné, že při nižší koncentraci TRISu začnou tyto zóny komigrovat.

S rostoucí koncentrací TRISu se začnou k sobě přibližovat zóny negativně nabitého biopterinu a neopterinu (obr. 5.4). Při proměřované koncentraci 250 a 300 mmol.dm⁻³ TRISu už obě zóny komigrují, jak je vidět na základě rozlišení v tabulce 5.5. Tyto koncentrace byly z dalšího optimalizačního procesu vyloučeny.

Z další optimalizace byla vyloučena i koncentrace 200 mmol.dm⁻³ TRISu. V tomto elektrolytu je sice dosaženo nejvyšší separační účinnosti u erythropterinu, ale to je částečně z toho důvodu, že analýza směsi všech derivátů pterinu trvá přibližně 36 minut a zóna erythropterinu prochází detektorovým okénkem jako poslední. Separační účinnost biopterinu je v tomto elektrolytu nejnižší. Na základě rozlišení (tab. 5.5) není vhodná ani koncentrace 50 mmol.dm⁻³ TRISu. V tomto pufru je rozlišení zóny leukopterinu a xanthopterinu nízké.

Rozlišení kritické trojice podobně migrujících derivátů pterinu (isoxanthopterinu, leukopterinu a xanthopterinu) je v pufru o koncentraci TRISu 100 a 150 mmol.dm⁻³ přibližně stejné. V pufru o koncentraci TRISu 100 mmol.dm⁻³ je dosaženo lepšího rozlišení mezi biopterinem a neopterinem a lepší separační účinnosti u biopterinu, neopterinu, isoxanthopterinu a xanthopterinu. Proto byla pro další měření vybrána koncentrace TRISu 100 mmol.dm⁻³. V tomto separačním elektrolytu separace

směsi všech derivátů pterinu nepřesáhla 28 minut a procházející proud byl 20 μA .

5.1.4 Koncentrace kyseliny borité

Byla proměřována koncentrace kyseliny borité v rozmezí 50 – 250 $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ v tříložkovém separačním elektrolytu (kyselina boritá, chelaton 3 a TRIS) a výsledky jsou sumarizovány v tabulkách 5.6 – 5.8.

S rostoucí koncentrací kyseliny borité docházelo k mírnému zvyšování záporných efektivních elektroforetických pohyblivostí derivátů pterinu (tab. 5.6).

Tabulka 5.6: Vliv koncentrace kyseliny borité na efektivní elektroforetické pohyblivosti μ_{eff} derivátů pterinu v separačních elektrolytech skládajících se ze 100 $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ TRISu, 2 $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ chelatonu 3 a kyseliny borité v koncentračním rozmezí 50 – 250 $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ při pH 9,0. BIO – biopterin, NEO – neopterin, ISO – isoxanthopterin, LEU – leukopterin, XAN – xanthopterin a ERY – erythropterin.

	$c_{\text{kys. boritá}} [\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}]$				
	50	100	150	200	250
	$\mu_{\text{eff}} \cdot 10^4 [\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}]$				
BIO	-1,90	-1,96	-2,10	-2,24	-2,36
NEO	-1,99	-2,13	-2,33	-2,49	-2,62
ISO	-2,60	-2,62	-2,73	-2,84	-2,95
LEU	-2,70	-2,72	-2,83	-2,95	-3,06
XAN	-2,79	-2,80	-2,92	-3,03	-3,13
ERY	-3,59	-3,61	-3,82	-3,92	-4,03

Tabulka 5.7: Účinnost separace v separačních elektrolytech skládajících se ze 100 mmol.dm⁻³ TRISu, 2 mmol.dm⁻³ chelatonu 3 a kyseliny borité v koncentračním rozmezí 50 – 250 mmol.dm⁻³ při pH 9,0. *N* – počet teoretických pater, BIO – biopterin, NEO – neopterin, ISO – isoxanthopterin, LEU – leukopterin, XAN – xanthopterin a ERY – erythropterin.

	<i>c</i> _{kys. boritá} [mmol.dm ⁻³]				
	50	100	150	200	250
	<i>N</i>				
BIO	-	98 000	49 000	76 000	84 000
NEO	-	69 000	64 000	84 000	91 000
ISO	102 000	127 000	83 000	109 000	54 000
LEU	121 000	106 000	103 000	120 000	122 000
XAN	113 000	116 000	110 000	128 000	124 000
ERY	103 000	84 000	75 000	106 000	80 000

- analyty komigrují

Tabulka 5.8: Rozlišení sousedních píků v separačních elektrolytech skládajících se ze 100 mmol.dm⁻³ TRISu, 2 mmol.dm⁻³ chelatonu 3 a kyseliny borité v koncentračním rozmezí 50 – 250 mmol.dm⁻³ pH 9,0. *R* – rozlišení, BIO – biopterin, NEO – neopterin, ISO – isoxanthopterin, LEU – leukopterin, XAN – xanthopterin a ERY – erythropterin.

	<i>c</i> _{kys. boritá} [mmol.dm ⁻³]				
	50	100	150	200	250
<i>R</i> _{BIO,NEO}	1,1	2,9	3,9	6,0	7,7
<i>R</i> _{NEO,ISO}	10,5	10,2	12,8	10,3	9,6
<i>R</i> _{ISO,LEU}	2,7	2,7	2,6	3,8	4,2
<i>R</i> _{LEU,XAN}	1,8	2,4	2,5	3,0	3,4
<i>R</i> _{XAN,ERY}	21,8	33,5	34,5	41,8	48,7

Na základě efektivních elektroforetických pohyblivostí (tab. 5.6) a rozlišení (tab. 5.8) není vhodné použití 50 mmol.dm⁻³ kyseliny borité. V tomto elektrolytu dochází ke komigraci zón biopterinu a neopterinu. Z dalšího optimalizačního procesu byla vyloučena koncentrace 250 mmol.dm⁻³ kyseliny borité, protože separace směsi všech derivátů pterinu trvala přibližně 58 minut a v tomto separačním elektrolytu procházel poměrně vysoký proud 55 μA.

Při porovnání účinnosti separace (tab. 5.7) v posledních třech elektrolytech (100, 150 a 200 mmol.dm⁻³ kyselina boritá) není vhodné použití 150 mmol.dm⁻³ kyseliny borité. V tomto elektrolytu je nejnižší účinnost separace u všech derivátů pterinu. Biopterin a isoxanthopterin mají nejvyšší separační účinnost při použití

100 mmol.dm⁻³ kyseliny borité. V případě neopterinu, leukopterinu, xanthopterinu a erythropterinu je dosaženo nejvyšší separační účinnosti při použití 200 mmol.dm⁻³ kyseliny borité.

U vyšší koncentrace kyseliny borité je dosaženo vyššího rozlišení (tab. 5.8) u biopterinu a neopterinu. Rozlišení neopterinu a isoxanthopterinu je stejné u 100 a 200 mmol.dm⁻³ kyseliny borité a u podobně migrujících derivátů pterinu (isoxanthopterinu, leukopterinu a xanthopterinu) je vyšší při použití vyšší koncentrace kyseliny borité.

Celková doba separace směsi derivátu pterinu byla pro 100 mmol.dm⁻³ kyseliny borité přibližně 28 minut a pro 200 mmol.dm⁻³ kyseliny borité 48 minut. Během separací procházel proud 20 µA, respektive 32 µA. Pro další optimalizační proces byly vybrány obě proměřované koncentrace kyseliny borité.

5.1.5 Velikost separačního napětí

V posledním kroku optimalizace byly proměřovány dva třísložkové elektrolyty, které se skládaly ze 100 mmol.dm⁻³ TRISu, 2 mol.dm⁻³ chelatonu 3 a 100 nebo 200 mmol.dm⁻³ kyseliny borité při pH 9,0.

Vkládané napětí na elektrody se pohybovalo v rozmezí 20 – 30 kV. Výsledky separací z hlediska rozlišení, doby analýzy a procházejícího proudu jsou sumarizovány v tabulce 5.9.

Tabulka 5.9: Rozlišení sousedních píků R , celková doba separace $t_{\text{celk.}}$ a procházející proud I v separačních elektrolytech skládajících se ze 100 mmol.dm^{-3} TRISu, 2 mol.dm^{-3} chelatonu 3 a 100 nebo 200 mmol.dm^{-3} kyseliny borité při pH 9,0. BIO – biopterin, NEO – neopterin, ISO – isoxanthopterin, LEU – leukopterin, XAN – xanthopterin, ERY – erythropterin a U separační napětí.

$c_{\text{kys. boritá}} [\text{mmol.dm}^{-3}]$	100			200		
$U [\text{kV}]$	20	25	30	20	25	30
$R_{\text{BIO,NEO}}$	2,9	2,9	2,9	6,0	5,8	5,0
$R_{\text{NEO,ISO}}$	10,2	10,8	12,2	10,3	11,5	12,3
$R_{\text{ISO,LEU}}$	2,7	2,8	3,1	3,8	4,5	5,2
$R_{\text{LEU,XAN}}$	2,4	2,4	2,0	3,0	2,9	2,0
$R_{\text{XAN,ERY}}$	33,5	31,4	30,6	41,8	36,7	33,0
$t_{\text{celk.}} [\text{min}]$	28	20	14	48	30	25
$I [\mu\text{A}]$	20	26	35	32	48	68

Porovnáním obou elektrolytů z hlediska celkové doby separace a procházejícího proudu (tab. 5.9) je výhodnější použití 100 mmol.dm^{-3} kyseliny borité. V tomto elektrolytu se zkrátila doba separace o polovinu, zatímco při použití 200 mmol.dm^{-3} kyseliny borité se taky zkrátila doba separace přibližně o polovinu, ale celková doba separace při 30 kV je přibližně stejná jako separace při 20 kV s použitím 100 mmol.dm^{-3} kyseliny borité. Použitím vyšší proměřované koncentrace kyseliny borité se procházející proud zvýšil dvojnásobně.

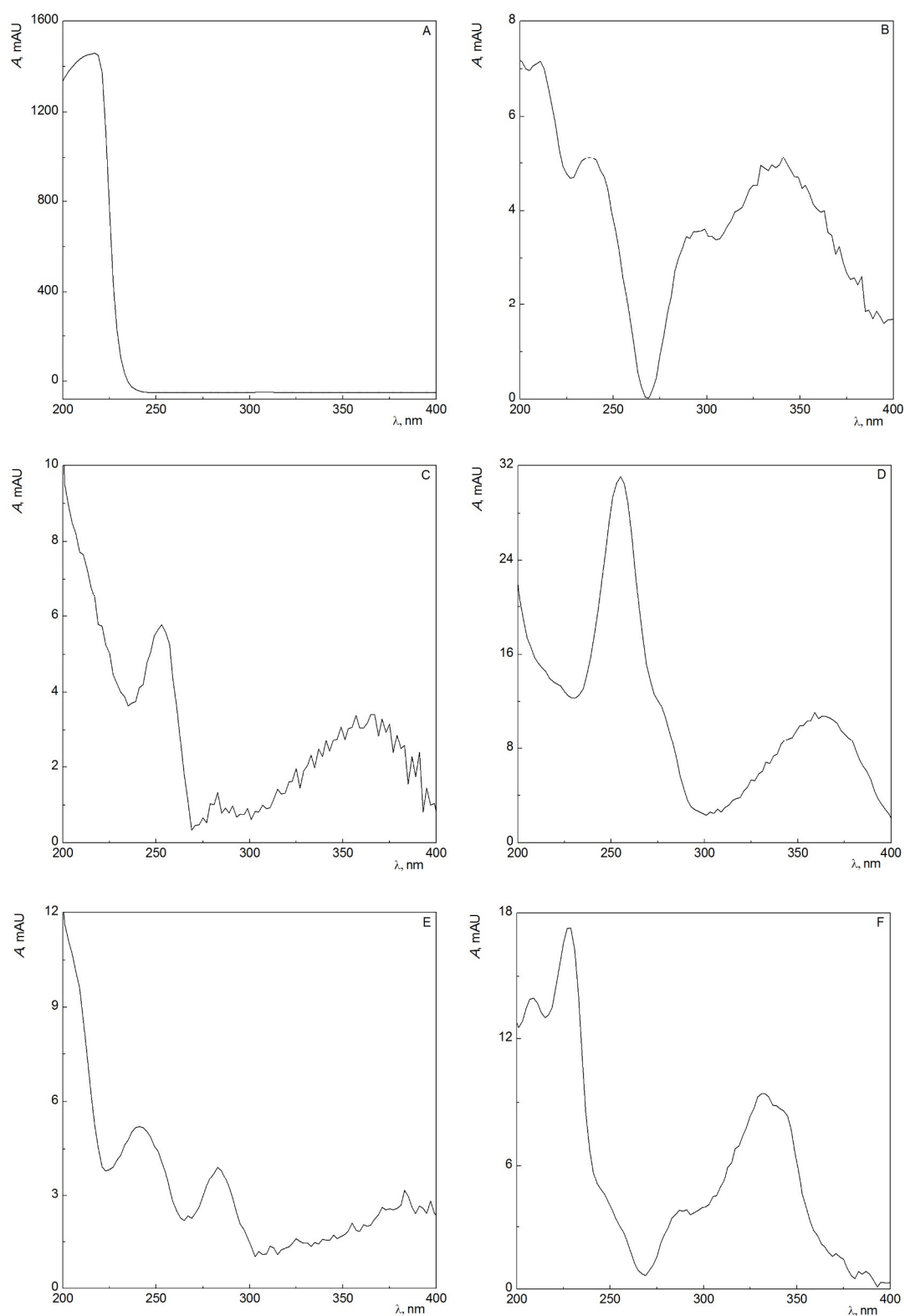
Zvýšením separačního napětí nedošlo ke snížení rozlišení sousedních migrujících zón. Rozlišení biopterinu a neopterinu zůstalo stejné a u podobně migrujících derivátů pterinu (isoxanthopterinu, leukopterinu a xanthopterinu) se mírně k sobě přiblížily zóny leukopterinu a xanthopterinu.

5.2 Absorpční spektra derivátů pterinu

V optimalizačních měřeních byla pro UV detekci použita vlnová délka 290 nm, která byla zvolena na základě literatury⁶⁸. Po dokončení optimalizace (100 mmol.dm^{-3} kyselina boritá, 2 mmol.dm^{-3} chelaton 3 a 100 mmol.dm^{-3} TRIS, pH 9,0, elektrokinetické dávkování 10 s při 20 kV, separace při 20 kV), byla za využití přístroje HP^{3D}CE v módu UV detekce s diodovým polem zaznamenána spektra jednotlivých derivátů pterinu v rozmezí 200 – 400 nm analýzou příslušných píků v elektroferogramu, získaných za optimalizovaných podmínek s výjimkou erythropterinu.

Jednotlivá spektra (závislosti absorbance A na vlnové délce λ) jsou uvedena na obrázku 5.5. Podobné vlnové délky příslušející lokálním maximum vykazuje biopterin s neopterinem a leukopterin s xanthopterinem. Absorpční maximum isoxanthopterinu leží přibližně v lokálních minimech proměřených derivátů pterinu. Jako kompromis byla zvolena vlnová délka 250 nm. Tato vlnová délka leží přibližně mezi lokálními absorpčními maximy biopterinu, neopterinu, leukopterinu a xanthopterinu. Je vidět, že dimethylsulfoxid (obr. 5.5) vykazuje vysoký nárůst absorbance při vlnové délce kratší než 237 nm, což je pro detekci při 250 nm výhodné.

Bohužel se nepodařilo získat spektrum erythropterinu, protože koncentrace zóny byla pod rozlišovací schopností přístroje. Přesto změna vlnové délky z 290 na 250 nm přinesla zlepšení citlivosti detekce (viz dále).

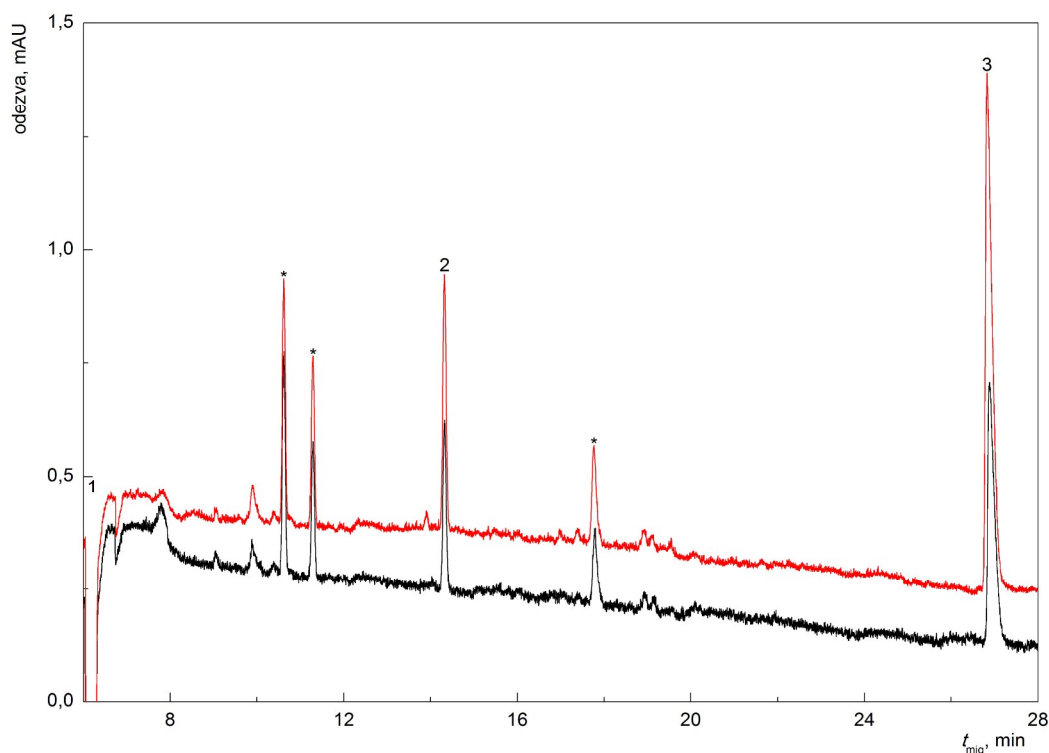


Obr. 5.5: Absorpční spektra derivátů pterinu a rozpouštědla při 30 °C v separačním elektrolytu skládajícího se ze 100 mmol.dm⁻³ kyseliny borité, 2 mmol.dm⁻³ chelatonu 3 a 100 mmol.dm⁻³ TRISu o pH 9,0. (A) dimethylsulfoxid, (B) leukopterin, (C) neopterin, (D) biopterin, (E) xanthopterin a (F) isoxanthopterin.

5.2.1 Erythropterin

Tento derivát pterinu není komerčně dostupný a u poskytnuté látky nebyla uvedena čistota. Na obrázku 5.6 je ilustrován elektroferogram poskytnutého erythropterinu. Je vidět, že látka není čistá a obsahuje kromě hlavního píku, který odpovídá erythropterinu, ještě několik dalších nečistot.

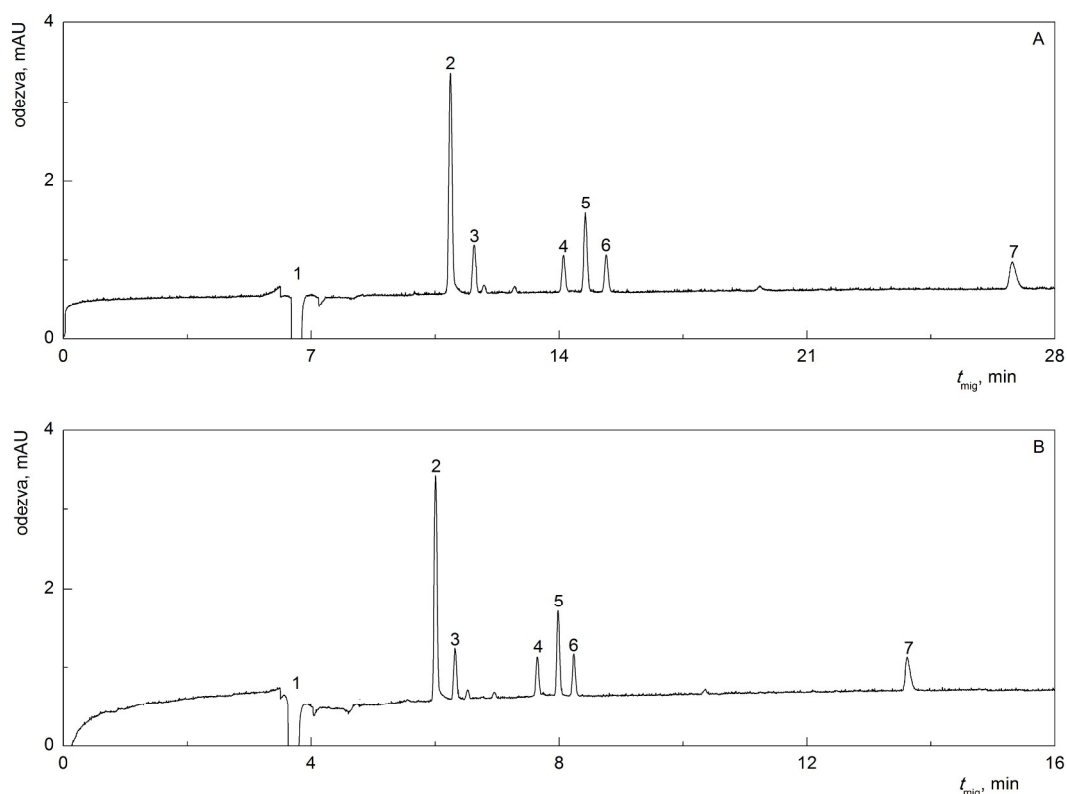
Erythropterin migruje jako poslední a z obrázku 5.6 je vidět, že změna vlnové délky detekce z 290 nm (černý záznam) na 250 nm (červený záznam) výrazně zvýšila odezvu a tedy citlivost měření zejména pro pík erythropterinu. Ve vzorku byl metodou standardního přídatku identifikován i leukopterin (pík 2) a ostatní neidentifikované píky jsou označeny hvězdičkou.



Obr. 5.6: Elektroforetický záznam separace erythropterinu při 290 nm (černý záznam) a 250 nm (červený záznam) v separačním elektrolytu skládajícího se ze 100 mmol.dm⁻³ kyseliny borité, 2 mmol.dm⁻³ chelatonu 3 a 100 mmol.dm⁻³ TRISu, pH 9,0. Elektrokinetické dávkování 10 s při 20 kV, separace při 20 kV. Pík 1 – dimethylsulfoxid, 2 – leukopterin, 3 – erythropterin a * – nečistoty.

5.3 Separace modelové směsi všech derivátů pterinu

Studium vlivu vkládaného napětí na migraci jednotlivých derivátů pterinu ukázalo, že nemá výrazný vliv na rozlišení mezi sousedními píky. Separace lze provádět v celém rozmezí testovaného separačního napětí. Separace při 30 kV je výhodnější pro erythropterin, protože má ze všech derivátů pterinů nejnižší odezvu a nedojde tak k velkému rozmytí jeho zóny jako při použití 20 kV. Z tohoto důvodu byla identifikace derivátů pterinu ve vzorcích ploštic prováděna při 20 a 30 kV. Elektroferogramy separace směsi všech derivátů pterinu při obou napětích jsou uvedeny v obrázku 5.7. Průměrné efektivní elektroforetické pohyblivosti spolu s relativními směrodatnými odchylkami jsou uvedeny v tabulce 5.10.



Obr. 5.7: Elektroforetický záznam separace směsi všech derivátů pterinu v separačním elektrolytu skládajícího se ze $100 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ kyseliny borité, $2 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ chelatonu 3 a $100 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ TRISu, pH 9,0. Elektrokinetické dávkování 10 s při 20 kV, separace při (A) 20 kV a (B) 30 kV, UV detekce při 250 nm. Koncentrace derivátů pterinu ve směsi $4,2 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$. Pík 1 – dimethylsulfoxid, 2 – biopterin, 3 – neopterin, 4 – isoxanthopterin, 5 – leukopterin, 6 – xanthopterin a 7 – erythropterin.

Tabulka 5.10: Průměrné efektivní elektroforetické pohyblivosti μ_{eff} derivátů pterinu a jejich relativní směrodatné odchylky s_r ; separační elektrolyt: 100 mmol.dm⁻³ kyselina boritá, 2 mmol.dm⁻³ chelaton 3 a 100 mmol.dm⁻³ TRISu, pH 9,0. BIO – biopterin, NEO – neopterin, ISO – isoxanthopterin, LEU – leukopterin, XAN – xanthopterin a ERY – erythropterin, n počet měření a U separační napětí.

$n = 4$	U [kV]			
	20		30	
	$\mu_{\text{eff}} \cdot 10^4$ [cm ² V ⁻¹ s ⁻¹]	s_r %	$\mu_{\text{eff}} \cdot 10^4$ [cm ² V ⁻¹ s ⁻¹]	s_r %
BIO	-1,92	0,21	-2,20	0,38
NEO	-2,08	0,21	-2,36	0,44
ISO	-2,57	0,20	-2,97	0,39
LEU	-2,67	0,21	-3,07	0,42
XAN	-2,75	0,18	-3,15	0,37
ERY	-3,65	0,15	-4,18	0,37

Jak je vidět z tabulky 5.10, opakovatelnost měření efektivních elektroforetických pohyblivostí je pro obě testovaná napětí velmi dobrá. Hodnoty relativních směrodatných odchylek jsou pro všechny deriváty velmi nízké a pohybují se v desetinách procent.

5.4 Identifikace derivátů pterinu v reálných vzorcích ploštic

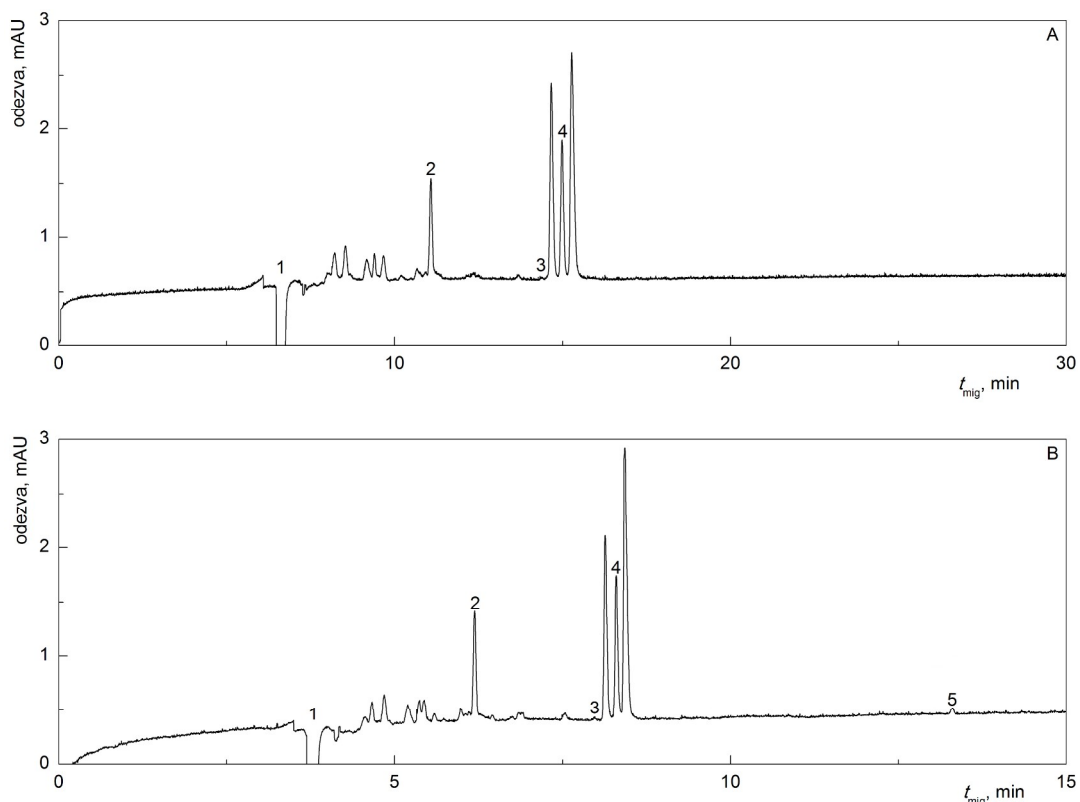
Graphosoma semipunctatum

Příprava extraktů jednotlivých forem ploštic je uvedena v kapitole 4.5 (str. 31). V následujících kapitolách je popsána identifikace derivátů pterinu ve světlé, oranžové a červené formě ploštic *Graphosoma semipunctatum*. Dávkován byl vždy vzorek, který se skládal z 10 μ l extraktu a 20 μ l separačního elektrolytu.

Na základě optimalizace byly všechny separace prováděny při těchto podmínkách: separační elektrolyt skládající se ze 100 mmol.dm⁻³ kyseliny borité, 2 mmol.dm⁻³ chelatonu 3 a 100 mmol.dm⁻³ TRISu o pH 9,0. Elektrokinetické dávkování po dobu 10 s při 20 kV, separace při 20 kV a 30 kV, UV detekce při 250 nm.

5.4.1 Světlá forma

Elektroferogramy separace při 20 kV a 30 kV jsou uvedeny v obrázku 5.8 a efektivní elektroforetické pohyblivosti spolu s relativními směrodatnými odchylkami jsou sumarizovány v tabulce 5.11.



Obř. 5.8: Elektroforetický záznam separace světlé formy plořice *Graphosoma semipunctatum* v separačním elektrolytu ze 100 mmol.dm⁻³ kyseliny borité, 2 mmol.dm⁻³ chelatonu 3 a 100 mmol.dm⁻³ TRISu, pH 9,0. Elektrokinetické dávkování 10 s při 20 kV, separace při (A) 20 kV a (B) 30 kV, UV detekce při 250 nm. Pík 1 – dimethylsulfoxid, 2 – biopterin, 3 – isoxanthopterin, 4 – leukopterin a 5 – erythropterin.

Tabulka 5.11: Průměrné efektivní elektroforetické pohyblivosti μ_{eff} derivátů pterinu a jejich relativní směrodatné odchylky s_r ; separační elektrolyt: 100 mmol.dm⁻³ kyselina boritá, 2 mmol.dm⁻³ chelaton 3 a 100 mmol.dm⁻³ TRISu, pH 9,0. BIO – biopterin, ISO – isoxanthopterin, LEU – leukopterin a ERY – erythropterin, n počet měření, U separační napětí

$n = 4$	U [kV]			
	20		30	
	$\mu_{\text{eff}} \cdot 10^4$ [cm ² V ⁻¹ s ⁻¹]	s_r %	$\mu_{\text{eff}} \cdot 10^4$ [cm ² V ⁻¹ s ⁻¹]	s_r %
BIO	-1,93	0,25	-2,21	0,18
ISO	-2,59	0,35	-2,98	0,20
LEU	-2,68	0,24	-3,08	0,08
ERY	-	-	-4,17	0,25

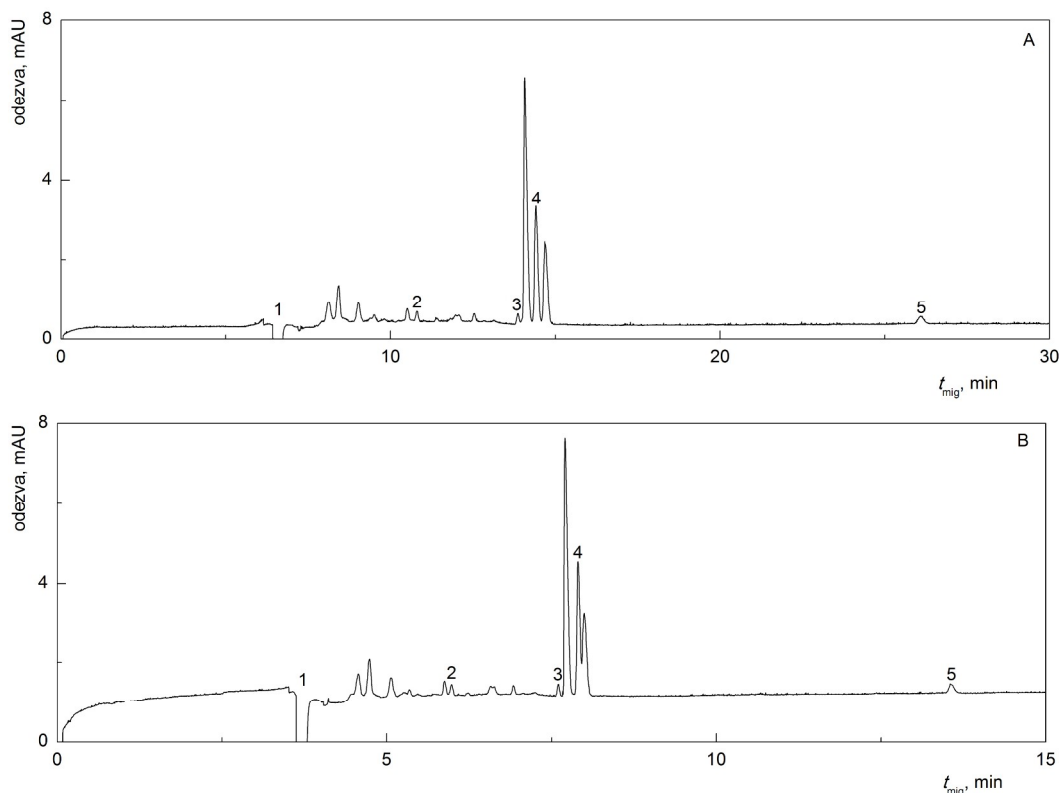
- pod rozlišovací schopností detektoru

Pro identifikaci erythropterinu je nutná separace při 30 kV. Jeho koncentrace je v této formě natolik nízká, že separací při 20 kV nelze vůbec jeho pík v elektroferogramu rozlišit.

Na základě srovnání efektivních elektroforetických mobilit derivátů pterinu ve vzorku ploštice a modelové směsi (viz tabulka 5.10, str. 49) a na základě standardního přídatku jednotlivých derivátů pterinu do reálné směsi, byl ve světlé formě ploštice *Graphosoma semipunctatum* identifikován biopterin, isoxanthopterin, leukopterin a erythropterin.

5.4.2 Oranžová forma

Elektroferogramy separace při 20 kV a 30 kV jsou uvedeny v obrázku 5.9 a efektivní elektroforetické pohyblivosti spolu s relativními směrodatnými odchylkami jsou sumarizovány v tabulce 5.12.



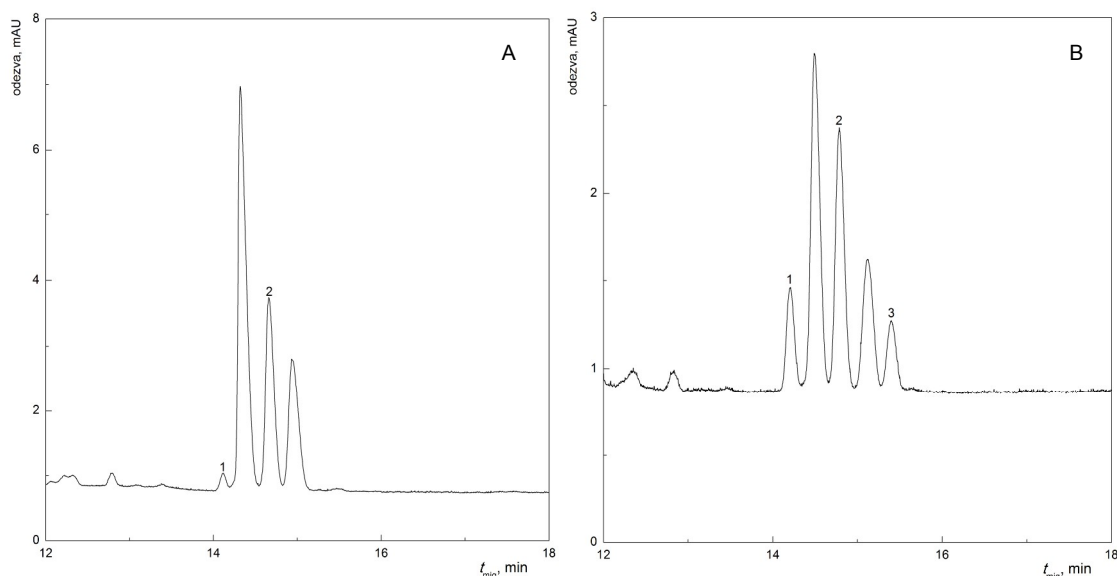
Obr. 5.9: Elektroforetický záznam separace oranžové formy plošnice *Graphosoma semipunctatum* v separačním elektrolytu skládajícího se ze $100 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ kyseliny borité, $2 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ chelatonu 3 a $100 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ TRISu, pH 9,0. Elektrokinetické dávkování 10 s při 20 kV, separace při (A) 20 kV a (B) 30 kV, UV detekce při 250 nm. Pík 1 – dimethylsulfoxid, 2 – biopterin, 3 – isoxanthopterin, 4 – leukopterin a 5 – erythropterin.

Tabulka 5.12: Efektivní elektroforetické pohyblivosti μ_{eff} derivátů pterinu a jejich relativní směrodatné odchylky s_r v separačním elektrolytu skládajícího se ze $100 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ kyseliny borité, $2 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ chelatonu 3 a $100 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ TRISu, pH 9,0. BIO – biopterin, ISO – isoxanthopterin, LEU – leukopterin a ERY – erythropterin, n počet měření a U separační napětí.

$n = 4$	U [kV]			
	20		30	
	$\mu_{\text{eff}} \cdot 10^4$ [$\text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$]	s_r %	$\mu_{\text{eff}} \cdot 10^4$ [$\text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$]	s_r %
BIO	-1,90	0,09	-2,18	0,08
ISO	-2,55	0,13	-2,95	0,13
LEU	-2,65	0,11	-3,06	0,08
ERY	-3,63	0,16	-4,19	0,10

Na základě srovnání efektivních elektroforetických mobilit derivátů pterinu ve vzorku ploštice a modelové směsi (viz tabulka 5.10, str. 49) a na základě standardního přídavku jednotlivých derivátů pterinu do reálné směsi, byl v oranžové formě ploštice *Graphosoma semipunctatum* identifikován biopterin, isoxanthopterin, leukopterin a erythropterin.

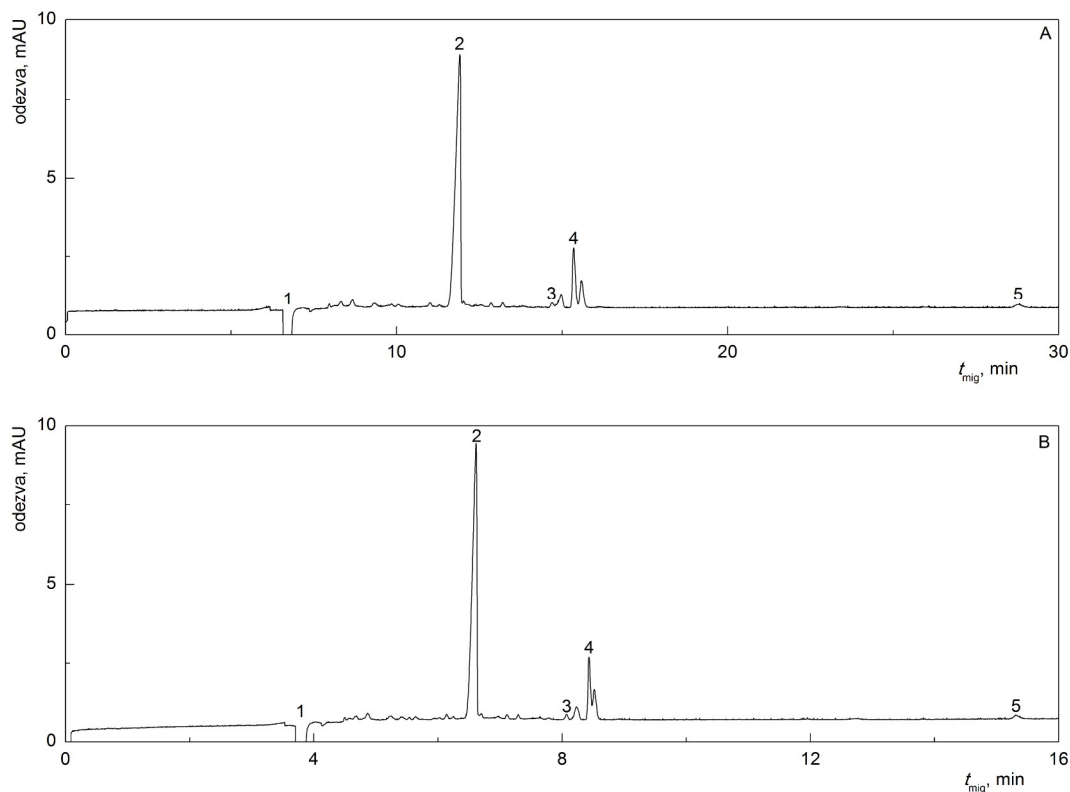
Obrázek 5.10 ilustruje separaci oranžové formy ploštice před a po standardním přídavku isoxanthopterinu, leukopterinu a xanthopterinu. K 10 μl extraktu ploštice bylo pipetováno 20 μl separačního elektrolytu a vždy po 10 μl 0,025 $\text{mg}\cdot\text{cm}^{-3}$ příslušných derivátů pterinu. Extrakt ze štítu ploštice obsahuje ještě další dvě neidentifikované látky, jejichž píky jsou však dostatečně odděleny od píků studovaných analytů.



Obr. 5.10: Elektroforetický záznam separace oranžové formy ploštice *Graphosoma semipunctatum* (A) před a (B) po standardním přídavku derivátů pterinu. Standardní přídavek (10 μl 0,025 $\text{mg}\cdot\text{cm}^{-3}$ příslušného derivátu pterinu) byl pipetován k 10 μl extraktu ploštice a 20 μl separačního elektrolytu. Separační elektrolyt se skládal z 100 $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ kyseliny borité, 2 $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ chelatonu 3 a 100 $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ TRISu, pH 9,0. Elektrokinetické dávkování 10 s při 20 kV, separace při 20 kV a UV detekce při 250 nm. Pík 1 – isoxanthopterin, 2 – leukopterin a 3 – xanthopterin.

5.4.3 Červená forma

Elektroferogramy separace při 20 kV a 30 kV jsou uvedeny v obrázku 5.11 a efektivní elektroforetické pohyblivosti spolu s relativními směrodatnými odchylkami jsou sumarizovány v tabulce 5.13.



Obr. 5.11: Elektroforetický záznam separace červené formy plošnice *Graphosoma semipunctatum* v separačním elektrolytu skládajícího se ze $100 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ kyseliny borité, $2 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ chelatonu 3 a $100 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ TRISu, pH 9,0. Elektrokinetické dávkování 10 s při 20 kV, separace při (A) 20 kV a (B) 30 kV, UV detekce při 250 nm. Pík 1 – dimethylsulfoxid, 2 – biopterin, 3 – isoxanthopterin, 4 – leukopterin a 5 – erythropterin.

Tabulka 5.13: Efektivní elektroforetické pohyblivosti μ_{eff} derivátů pterinu a jejich relativní směrodatné odchylky s_r v separačním elektrolytu skládajícího se ze 100 mmol.dm⁻³ kyseliny borité, 2 mmol.dm⁻³ chelatonu 3 a 100 mmol.dm⁻³ TRISu, pH 9,0. BIO – biopterin, ISO – isoxanthopterin, LEU – leukopterin a ERY – erythropterin, n počet měření a U separační napětí.

$n = 4$	U [kV]			
	20		30	
	$\mu_{\text{eff}} \cdot 10^4$ [cm ² V ⁻¹ s ⁻¹]	s_r %	$\mu_{\text{eff}} \cdot 10^4$ [cm ² V ⁻¹ s ⁻¹]	s_r %
BIO	-1,95	0,23	-2,19	0,17
ISO	-2,54	0,18	-2,96	0,23
LEU	-2,66	0,22	-3,09	0,23
ERY	-3,66	0,24	-4,20	0,36

Na základě srovnání efektivních elektroforetických mobilit derivátů pterinu ve vzorku plošnice a modelové směsi (viz tabulka 5.10, str. 49) a na základě standardního přídavku jednotlivých derivátů pterinu do reálné směsi, byl v červené formě plošnice *Graphosoma semipunctatum* identifikován biopterin, isoxanthopterin, leukopterin a erythropterin.

5.4.4 Shrnutí

Ve všech třech formách plošnice *Graphosoma semipunctatum* byl nalezen biopterin, isoxanthopterin, leukopterin a erythropterin. Při porovnání jednotlivých elektroferogramů (v rámci ploch píků příslušejících jednotlivým derivátům) je patrné, že ve světlé formě je všech identifikovaných derivátů pterinu nejméně. Ze všech studovaných derivátů jsou barevné pouze dva, a to xanthopterin (žlutý) a erythropterin (červeno-oranžový). Xanthopterin nebyl nalezen ani v jednom reálném vzorku, což se shoduje s dostupnou literaturou⁸. Z toho vyplývá, že jednotlivé barevné formy jsou dány rozdílným zastoupením erythropterinu a ostatních třech derivátů, tedy biopterinu, isoxanthopterinu a leukopterinu. Například v červené formě plošnice je majoritním píkem biopterin, v oranžové formě je ho nejméně. Dva neidentifikované píky, které migrují mezi trojicí derivátů pterinu (obr. 5.10, str. 53) jsou v červené formě minoritními píky, zatímco ve světlé formě představují majoritní píky. Jeden z těchto majoritních píků by mohl být melanin. Tento pigment je zodpovědný za černé až hnědé zabarvení různých druhů hmyzu⁶⁹. Identifikace těchto píků bude předmětem dalšího studia.

6 Závěr

Byla vypracována metoda kapilární elektroforézy pro separaci šesti derivátů pterinu, konkrétně biopterinu, neopterinu, isoxanthopterinu, leukopterinu, xanthopterinu a erythropterinu. Jako základní elektrolyt byla použita tříložková směs vodného roztoku kyseliny borité, chelatonu 3 a TRISu.

V rámci optimalizačního procesu byl sledován vliv změny pH základního elektrolytu, změny koncentrace jeho jednotlivých složek a separačního napětí na elektromigrační chování a rozlišení studovaných analytů. V optimalizovaných separačních podmínkách (separační elektrolyt skládající se ze 100 mmol.dm⁻³ kyseliny borité, 2 mmol.dm⁻³ chelatonu 3 a 100 mmol.dm⁻³ TRISu o pH 9,0, elektrokinetické dávkování po dobu 10 s při 20 kV, separace při 20 kV a 30 kV, UV detekce při 250 nm) byla analyzována modelová směs všech šesti derivátů pterinu a byla určena opakovatelnost elektromigračních časů jednotlivých derivátů vyjádřená hodnotou směrodatné odchylky. Ta se pohybovala v desetinách procent, což je pro elektroforetická měření velmi dobrá hodnota. Nově vyvinutá metoda byla aplikována na analýzu extraktů ze štítků tří forem ploštic *Graphosoma semipunctatum*, a to světlé, oranžové a červené formy.

Identifikace jednotlivých derivátů pterinu v reálném vzorku byla provedena na základě shodnosti migračních časů získaných píků s migračními časy příslušných standardů a metodou standardního přídatku. Bylo zjištěno, že ve všech studovaných formách se vyskytuje biopterin, isoxanthopterin, leukopterin a erythropterin, avšak v různých vzájemných poměrech. Přesnější určení poměru a obsahu jednotlivých derivátů pterinu bude předmětem dalšího studia.

7 Seznam literatury

- [1] Schüttelkopf, A. W.; Hardy, L. W.; Beverly, L. W.; Hunter, W. N.: Structures of *Leishmania major* pteridine reductase complexes reveal the active site features important for ligand binding and to guide inhibitor design. *Journal of Molecular Biology* **352**, 105–116 (2005).
- [2] Ito, K.; Kawanishi, S.: Photoinduced hydroxylation of deoxyguanosine in DNA by pterins: Sequence specificity and mechanism. *Biochemistry* **36**, 1774–1781 (1997).
- [3] Petroselli, G.; Erra-Balsells, R.; Gabrerizo, F. M.: Photosensitization of 2'-deoxyadenosine-5'-monophosphate by pterin. *Organic & Biomolecular Chemistry* **5**, 2792–2799 (2007).
- [4] Johnson, J. L.; Hamm-Alvarez, S.; Payne, G.; Sancar, G. B.; Rajagopalan, K. V.; Sancar, A.: Identification of the second chromophore of *Escherichia coli* and yeast DNA photolyases as 5,10-methenyltetrahydrofolate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **85**, 2046–2050 (1988).
- [5] Hevel, J. M.; Marletta, M. A.: Macrophage nitric oxide synthase: Relationship between enzyme-bound tetrahydrobiopterin and synthase activity. *Biochemistry* **31**, 7160–7165 (1992).
- [6] Smutna, M.; Svoboda, M.; Breinekova, K.: Pterins as sensors of response of the application of Fe³⁺-dextran in piglets. *Sensors* **10**, 890–900 (2010).
- [7] Suga, T.; Munesada, K.: The pigments in the dorsal skin of frogs. *Journal of Natural Products* **51**:4, 713–718 (1988).
- [8] Bel, Y.; Porcar, M.; Socha, R.; Němec, V.; Ferré, J.: Analysis of pteridines in *Pyrrhocoris apterus* (L.) (Heteroptera, Pyrrhocoridae) during development and in body-color mutants. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **34**, 83–98 (1997).

- [9] Porcar, M.; Bel, Y.; Socha, R.; Němec, V.; Ferré, J.: Identification of pteridines in the firebug, *Pyrrhocoris apterus* (L.) (Heteroptera, Pyrrhocoridae) by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **724**, 193–197 (1996).
- [10] Cinta, C. N.; Makio, T.: Color changes in *Halyomorpha brevis* (Heteroptera: Pentatomidae) correlated with distribution of pteridines: regulation by environmental and physiological factors. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* **132**, 653–660 (2002).
- [11] Rutowski, R. L.; Macedonia, J. M.; Morehouse, N.; Taylor-Taft, L.: Pterin pigments amplify iridescent ultraviolet signal in males of the orange sulphur butterfly *Colias eurytheme*. *Proceedings of the Royal Society B* **272**, 2329–2335 (2005).
- [12] Basu, P.; Burgmayer, S. J. N.: Pterin chemistry and its relationship to the molybdenum cofactor. *Coordination Chemistry Reviews* **255**, 1016–1038 (2011).
- [13] Čopíková, J.; Uher, M.; Lapčík, O.; Moravcová, J.; Drašar, P.: Přírodní barevné látky. *Chemické listy* **99**, 802–816 (2005).
- [14] Cabrerizo, F. M.; Dántola, M. L.; Thomas, A. H.; Lorente, C.; Braun, A. M.; Oliveros, E.; Capparelli, A. L.: Photooxidation of pterin in aqueous solutions: Biological and biomedical implications. *Chemistry & Biodiversity* **1**, 1800–1811 (2004).
- [15] Martínez, A.; Barbosa, A.: Are pterins able to modulate oxidative stress?. *Theoretical Chemistry Accounts* **127**, 485–492 (2010).
- [16] McGraw, K. J.: The antioxidant function of many animal pigments: are there consistent health benefits of sexually selected colourants?. *Animal Behaviour* **69**, 757–764 (2005).

- [17] Mori, H.; Nishinaka, Y.; Nonogawa, M.; Sommani, P.; Makino, K.; Yamashita, K.; Arai, T.: Substituent effects of pterin derivatives on singlet oxygen scavenging activity. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* **33**:5, 905–908 (2010).
- [18] Gamagedara, S.; Gibbons, S.; Ma, Y.: Investigation of urinary pteridine levels as potential biomarkers for noninvasive diagnosis of cancer. *Clinica Chimica Acta* **412**, 120–128 (2011).
- [19] Ogiwara, S.; Hidaka, H.; Sugimoto, T.; Teradaira, R.; Fujita, K.; Nagatsu, T.: Elevated levels of oncopterin, N²-(3-aminopropyl)biopterin, a new pterin compound, in urine from patients with solid and blood cancers. *The Journal of Biochemistry* **113**, 1–3 (1993).
- [20] Mansilla, A. E.; Merás, I. D.; Salinas, F.: Analysis of pteridines and creatinine in urine by HPLC with serial fluorimetric and photometric detectors. *Chromatographia* **53**, 510–514 (2001).
- [21] Llanos, A. M.; Zan, M. M.; Culzoni, M.J.; Espinosa-Mansilla, A.; Cañada-Cañada, F.; Peña, A. M.; Goicoechea, H. C.: Determination of marker pteridines in urine by HPLC with fluorimetric detection and second-order multivariate calibration using MCR-ALS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **399**, 2123–2135 (2011).
- [22] Han, F.; Huynh, B. H.; Shi, H.; Lin, B.; Ma, Y.: Pteridine analysis in urine by capillary electrophoresis using laser-induced fluorescence detection. *Analytical Chemistry* **71**, 1265–1269 (1999).
- [23] Yuksel, O.; Sahin, T. T.; Girgin, G.; Sipahi, H.; Dikmen, K.; Samur, O.; Barak, A.; Tekin, E.; Baydar, T.: Neopterin, catalase and superoxide dismutase in females with benign and malignant breast tumors. *Pteridines* **18**, 132–138 (2007).

- [24] Messahel, S.; Pheasant, A. E.; Pall, H.; Ahmed-Choudhury, J.; Sungun-Paliwal, R. S.; Vostanis, P.: Urinary levels of neopterin and biopterin in autism. *Neuroscience Letters* **241**, 17–20 (1998).
- [25] Blasko, I.; Knaus, G.; Weiss, E.; Kemmler, G.; Winkler, C.; Falkensammer, G.; Griesmacher, A.; Würzner, R.; Marksteiner, J.; Fuchs, D.: Cognitive deterioration in Alzheimer's disease is accompanied by increase of plasma neopterin. *Journal of Psychiatric Research* **41**, 694–701 (2007).
- [26] Wijnen, B.; Leertouwer, H. L.; Stavenga, D. G.: Colors and pterin pigmentation of pierid butterfly wings. *Journal of Insect Physiology* **53**, 1206–1217 (2007).
- [27] Svádová, K.; Exnerová, A.; Štys, P.; Landová, E.; Valenta, J.; Fučíková, A.; Socha, R.: Role of different colours of aposematic insects in learning, memory and generalization of naïve bird predators. *Animal Behaviour* **77**, 327–336 (2009).
- [28] Krajíček, J.: Analýza pigmentů z integumentu *Graphosoma semipunctatum*. Bakalářská práce. PŘF UK v Praze, Katedra analytické chemie, 2010.
- [29] Hopkins, F. G.: A contribution to the chemistry of pterins. *Biological Sciences* **130**:861, 359–379 (1942).
- [30] Tomandl, J.: Pteriny. *Chemické listy* **92**, 689–697 (1998).
- [31] Forrest, H. S.; Mitchell, H. K.: Pteridines from *Drosophila*. III. Isolation and identification of three more pteridines. *Journal of the American Chemical Society* **77**, 4865–4869 (1955).
- [32] Oliveros, E.; Dántola, M. L.; Vignoni, M.; Thomas, A. H.; Lorente, C.: Production and quenching of reactive oxygen species by pterin derivatives, an intriguing class of biomolecules. *Pure and Applied Chemistry* **83**:4, 801–811 (2011).

- [33] Marshall, G.: The chemistry of the pteridines. Pennsylvania, Bryn Mawr College, Department of chemistry, 1947, p.67.
- [34] Martínez, A.; Vargas, R.: Electron donor-acceptor properties of metal atoms interacting with pterins. *New Journal of Chemistry* **34**, 2988–2995 (2010).
- [35] Yao, Q.; Pfleiderer, W.: Pteridines. Part CXIII. Protection of pteridines. *Helvetica Chimica Acta* **86**, 1–12 (2003).
- [36] Lorente, C.; Thomas, A. H.: Photophysics and photochemistry of pterins in aqueous solution. *Accounts of Chemical Research* **39**, 395–402 (2006).
- [37] Cabrerizo, F. M.; Petroselli, G.; Lorente, C.; Capparelli, A. L.; Thomas, A. H.; Braun, A. M.; Oliveros, E.: Substituent effects on the photophysical properties of pterin derivatives in acidic and alkaline aqueous solutions. *Photochemistry and Photobiology* **81**:5, 1234–1240 (2005).
- [38] Song, Q. H.; Hwang, K. C.: Direct observation for photophysical and photochemical processes of folic acid in DMSO solution. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **185**, 51–56 (2007).
- [39] Soniat, M.; Martin, C. B.: Theoretical study on the relative energies of neutral pterin tautomers. *Pteridines* **19**, 120–124 (2008).
- [40] Soniat, M.; Martin, C. B.: Theoretical study on the relative energies of anionic pterin tautomers. *Pteridines* **20**, 124–129 (2009).
- [41] Obrázek červené formy plošnice *Graphosoma semipunctatum*, dostupné z URL: <http://d3ds4oy7g1wrqq.cloudfront.net/josemanuelav/myfiles/selsancrist.jpg>
[cit. 23.12.2011]

- [42] Obrázek světlé a oranžové formy plošnice *Graphosoma semipunctatum*, dostupné z URL: <<http://images.imagehotel.net/61zud7f2rm.jpg>> [cit. 23.12.2011]
- [43] Li, Chun-Yang; Xu, Huai-Long; Liu, Bo; Bao, Jin-Ku: Concanavalin A, from an old protein to novel candidate anti-neoplastic drug. *Current Molecular Pharmacology* **3**:3, 123–128 (2010).
- [44] Qujeq, D.; Ahmadi, H.: Determination of xanthopterin in patients with renal insufficiency. *American Journal of Nephrology* **21**, 340–342 (2001).
- [45] Robinson, F. A.: *The vitamin B complex*. New York, Wiley 1951.
- [46] Moheno, P. B. B.: Calcium pterin as an antitumor agent. *International Journal of Pharmaceutics* **271**, 293–300 (2004).
- [47] Taylor, E. C.; Abdulla, R. F.; Tanaka, K.; Jacobi, P. A.: Pteridines. XXXVI. Syntheses of xanthopterin and isoxanthopterin. Application of N-Oxide chemistry to highly functionalized pyrazines and pteridines. *The Journal of Organic Chemistry* **40**:16, 2341–2347 (1975).
- [48] Hamerlinck, F. F. V.: Neopterin: a review. *Experimental Dermatology* **8**, 167–176 (1999).
- [49] Solichová, D.; Melichar, B.; Klejna, M.; Jurašková, B.; Bláha, V.; Žďánský, P.; Zadák, Z.: Stanovení neopterinu v moči u gerontologických pacientů. *Česká geriatrická revue* **3**, 32–38 (2003).
- [50] Davis, M. D.; Kaufman, S.; Milstien, S.: Conversion of 6-substituted tetrahydropterins to 7-isomers via phenylalanine hydroxylase-generated intermediates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**, 385–389 (1991).

- [51] Richardson, M. A.; Read, L. L.; Reilly, M. A.; Clelland, J. D.; Clelland, C. L. T.: Analysis of plasma biopterin levels in psychiatric disorders suggests a common BH₄ deficit in Schizophrenia and Schizoaffective disorder. *Neurochemical Research* **32**, 107–113 (2007).
- [52] Melber, C.; Schmidt, G. H.: Body colouration related to the deposition of pteridines in the epidermis and other organs of *Dysdercus* species (Insecta; *Heteroptera:Pyrrhocoridae*). *Comparative Biochemistry and Physiology, A: Physiology* **116A**:1, 17–28 (1997).
- [53] Masahiro, K.; Kazuhiro, T.; Kazuo, I.: Analysis of unconjugated pterins in food resources and human urine. *Agricultural and Biological Chemistry* **44**:9, 2089–2094 (1980).
- [54] Llanos, A. M.; Espinosa-Mansilla, A.; Cañada- Cañada, F.; Peña, A.M.: Separation and determination of 11 marker pteridines in human urine by liquid chromatography and fluorimetric detection. *Journal of Separation Science* **34**, 1283–1292 (2011).
- [55] Tani, Y.; Ohno, T.: Analysis of 6R- and 6S-tetrahydrobiopterin and other pterins by reversed-phase ion-pair liquid chromatography with fluorimetric detection by post-column sodium nitrite oxidation. *Journal of Chromatography* **617**, 249–255 (1993).
- [56] Zhi-Guo, S.; Yu-Bo, W.; Yan-Bo, L., Yu-Qi, F.: Analysis of Pterins in Urine by HILIC. *Chromatographia* **71**, 761–768 (2010).
- [57] Dhondt, J. L.; Largilliere, C.; Ardouin, P.; Farriaux, J. P.; Dautrevaux, M.: Diagnosis of variants of hyperphenylalaninemia by determination of pterins in urine. *Clinica Chimica Acta* **110**:2-3, 205–214 (1981).
- [58] Stea, B.; Halpern, R. M.; Smith, R. A.: Separation of unconjugated pteridines by high-pressure cation-exchange liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **168**:2, 385–393 (1979).

- [59] Klein, R.: Determination of the stereoconfiguration of natural pterins by chiral high-performance liquid chromatography. *Analytical Biochemistry* **203**:1, 134–140 (1992).
- [60] Lorente, C.; Capparelli, L.; Thomas, A. H.; Braun, A. M.; Oliveros, E.: Quenching of the fluorescence of pterin derivatives by anions. *Photochemical & Photobiological Science* **3**, 167–173 (2004).
- [61] Stevenson, R.; Stokes, R. J.; MacMillan, D.; Armstrong, D.; Faulds, K.; Wadsworth, R.; Kunuthur, S.; Suckling, C. J.; Graham, D.: *In situ* detection of pterins by SERS. *Analyst* **134**, 1561–1564 (2009).
- [62] Wan, Y. Q.; Tang, L. J.; Tan, T.: Simultaneous determination of xanthopterin and isoxanthopterin in human urine by synchronous fluorescence spectroscopy. *Journal of Fluorescence* **20**, 1191–1198 (2010).
- [63] Štulík, K.; Pacáková, V.; Bosáková, Z.; Ševčík, J.; Coufal, P.; Jelínek, I.: *Analytické separační metody*. Praha, Karolinum 2005.
- [64] Heiger, D. N.: High performance capillary electrophoresis – an introduction. France, Hewlett-Packard Company 1992.
- [65] Pragolab s.r.o.: *Seriál o kapilární elektroforéze*. Dostupné z URL: <<http://www.pragolab.cz/serial-o-ce>> [cit. 10.12.2011]
- [66] Kašička, V.: Teoretické základy a separační principy kapilárních elektromigračních metod. *Chemické listy* **91**, 320–329 (1997).
- [67] Kozlík, P.; Bosáková, Z.: Využití HILIC chromatografie k analýze štítků ploštic. *Journal of Chromatography A*, připraveno k publikaci.

[68] Vaníková, J.: Separace hydroxylovaných derivátů anthrachinonu a derivátů pterinu metodou HPLC. Diplomová práce. PřF UK v Praze, Katedra analytické chemie, 2009.

[69] Chapman R. F.: *The insects: Structure and function*. 4. přeprac. vydání. Cambridge, Cambridge University Press 1998.