

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
Katedra analytické chemie

**Studie retenčního chování neopterinu v HILIC  
chromatografickém systému s různými typy  
stacionárních fází**

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Lucie Nováková, Ph.D.

Vedoucí katedry: Prof. RNDr. Petr Solich, CSc.

# **NÁZEV: Studie retenčního chování neopterinu v HILIC chromatografickém systému s různými typy stacionárních fází**

## **ABSTRAKT:**

Předmětem této diplomové práce je vývoj analytické metody určené k identifikaci a stanovení biologicky aktivních látek biopterinu, neopterinu a 7,8-dihydroneopterinu za použití metody chromatografie hydrofilních interakcí (HILIC) ve spojení s fluorescenční detekcí.

Neopterin představuje důležitý a užitečný parametr monitorování aktivity imunitního systému, který doprovází řadu infekčních a autoimunitních onemocnění. Zvýšená hladina neopterinu se vyskytuje také u různých typů malignit. V poslední době je neopterin spolu s 7,8-dihydroneopterinem spojován s intracelulárním oxidativním stresem a apoptózou buněk. Plně redukovaná forma biopterinu se v lidském organismu uplatňuje jako kofaktor některých enzymů.

HILIC je varianta vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Testovány byly tři chromatografické kolony (LUNA HILIC, OBELISK R, OBELISK N) za různých chromatografických podmínek. Mobilní fázi tvořila směs vodné (octanový pufr, kyselina octová, voda) a s vodou mísitelné organické složky (acetonitril).

Chromatografická kolona OBELISK N poskytla při užití směsi acetonitrilu a 100mM octanového pufru o pH=4,8 chromatogram se zcela separovanými píky biopterinu a neopterinu, pík 7,8-dihydroneopterinu nespĺňoval patřičná kritéria. Kvantitativní limity pro biopterin a neopterin byly 1 nmol/l, detekční limity byly 0,3 nmol/l. Nejlepších výsledků při stanovení pteridinových derivátů bylo dosaženo s chromatografickou kolonou LUNA HILIC, která poskytla při použití mobilní fáze složené ze směsi acetonitrilu a 100mM octanového pufru o pH=6,8 chromatogram se zcela separovanými píky testovaných látek. Kvantitativní limity pro biopterin a neopterin byly 1 nmol/l, detekční limity pak 0,3 nmol/l. Kvantitativní limit pro 7,8-dihydroneopterin byl 25 nmol/l. Detekční limit 7,8-dihydroneopterinu byl 7,6 nmol/l.

## **KLÍČOVÁ SLOVA:**

Biopterin, neopterin, 7,8-dihydroneopterinu, HPLC, HILIC

# **TITLE: The study of neopterin retention characteristics in HILIC chromatography system with different types of stationary phases**

## **SUMMARY:**

This graduation thesis was dealing with the development of an analytical method for the identification and quantification of biologically active substances biopterin, neopterin and 7,8-dihydroneopterin by hydrophilic liquid interaction chromatography (HILIC) connected to fluorescence detection.

Neopterin represents an important and useful parameter for monitoring of the immune system activation, that accompanies different infectious and autoimmune diseases. Increased level of neopterin concentration can be observed in several types of malignant tumors. Recently the coherency between neopterin, 7,8-dihydroneopterin and intracellular oxidative stress and apoptosis of the cells has been demonstrated. Totally reduced form of biopterin serves as a cofactor of some enzymes in human organism.

HILIC is an option of high performance liquid chromatography (HPLC). Three chromatographic columns (LUNA HILIC, OBELISK R, OBELISK N) were tested at different chromatographic conditions. Mobile phase consisted of mixture of aqueous component (ammonium acetate buffer, acetic acid, water) and water miscible organic component (acetonitrile).

The mixture of acetonitrile and 100mM ammonium acetate buffer (pH=4,8) offers a chromatogram with baseline separated peaks of biopterin and neopterin, the peak of 7,8 dihydroneopterin doesn't match standard requirements (on chromatographic column OBELISK N). Quantitation limits of biopterin and neopterin were 1 nmol/l. Detection limits were 0,3 nmol/l. The best results were achieved with chromatographic column LUNA HILIC. The mixture of acetonitrile and 100mM ammonium acetate buffer (pH=6,8) offers a chromatogram with baseline separated peaks of tested substances. Quantitation limits of biopterin and neopterin were 1 nmol/l. Detection limits were 0,3 nmol/l. Quantitation limit of 7,8-dihydroneopterin was 25 nmol/l. Detection limit was 7,6 nmol/l.

## **KEYWORDS:**

Biopterin, neopterin, 7,8-dihydroneopterin, HPLC, HILIC

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

V Hradci Králové 13. 4. 2010

.....

Aleš Matula

Zvláštní poděkování patří mé školitelce PharmDr. Lucii Novákové, PhD. za odborné vedení a vstřícné jednání, cenné rady, připomínky a pomoc během plnění úkolů spojených s mojí diplomovou prací. Velký dík náleží mé přítelkyni, která mě trpělivě podporovala a věrně při mně stála i v čase utváření mé diplomové práce. Děkuji také mým rodičům za vše, co pro mě za celý můj život vykonali. V neposlední řadě bych rád poděkoval všem pracovníkům Katedry analytické chemie za poskytnutí laboratoře, vřelé přijetí a vytvoření příjemného pracovního prostředí.

# **OBSAH**

SEZNAM ZKRATEK .....	8
1. ÚVOD .....	10
2. CÍL PRÁCE .....	12
3. TEORETICKÁ ČÁST .....	14
3.1. Pteriny .....	15
3.1.1. Chemická charakteristika .....	15
3.1.2. Biosyntéza pterinů .....	17
3.1.3. Funkce pterinů v metabolismu .....	18
3.1.4. Metody stanovení .....	19
3.2. Přehled publikovaných metod pro stanovení pterinů .....	20
3.3. Hydrophilic Interaction Chromatography (HILIC) .....	23
3.3.1. Historie .....	23
3.3.2. Mechanismus .....	23
3.3.3. Stacionární fáze pro HILIC .....	25
3.4. Validace analytické metody .....	31
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	35
4.1. Materiál a pomůcky .....	36
4.1.1. Chemikálie .....	36
4.1.2. Přístroje a pomůcky .....	36
4.2. Příprava zásobních roztoků a pracovních roztoků .....	37
4.2.1. Příprava zásobních roztoků .....	37
4.2.2. Příprava pracovních roztoků .....	38
4.3. Optimalizace podmínek měření .....	38
4.3.1. Chromatografické kolony .....	38
4.3.2. Mobilní fáze .....	39
4.3.3. Detekce .....	41
5. VÝSLEDKY A DISKUSE .....	42
5.1. Vývoj metody .....	43
5.1.1. Chromatografická kolona LUNA HILIC .....	43
5.1.2. Chromatografická kolona OBELISK R .....	49
5.1.3. Chromatografická kolona OBELISK N .....	54
5.2. Validace metody HILIC a test způsobilosti systému .....	59
5.2.1. Chromatografická kolona OBELISK N .....	60
5.2.2. Chromatografická kolona LUNA HILIC .....	63
5.3. Stanovení sledovaných látek v biologickém materiálu .....	65
5.4. Diskuse .....	68
6. ZÁVĚR .....	69
7. POUŽITÁ LITERATURA .....	72

# SEZNAM ZKRATEK

AcAc	Acetic acid, kyselina octová
ACN	Acetonitril
ALB	Albumin
AmAc	Octan amonný
BH2	7,8-dihydrobiopterin
BH4	5,6,7,8-tetrahydrobiopterin
BIO	Biopterin
CD	Cyklodextrin
CREA	Kreatinin
GTP	Guanosintrifosfát
HETP	Height Equivalent of Theoretical Plate, výškový ekvivalent teoretického patra
HILIC	Hydrophilic interaction chromatography, chromatografie hydrofilních interakcí
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high performance liquid chromatography)
ISO	Isoxanthopterin
MeOH	Methanol
NEO	Neopterin
NH2	7,8-dihydroneopterin
NO	Oxid dusnatý
NOS	NO-syntáza
NPC	Normal phase chromatography, chromatografie na normální fázi
PAH	Fenylalanin-4-hydroláza
PT	Pterin
RP	Reversed phase, reverzní fáze
RSD	Relativní směrodatná odchylka
SPE	Solid phase extraction, extrakce na tuhou fázi
TH	Tyrosin-3-hydroláza
TNF- $\alpha$	Tumor nekrotizující faktor- $\alpha$



TPH	Tryptofan-5-hydroláza
UV	Ultraviolet, ultrafialová oblast

# **1. ÚVOD**

Neopterin je produkován ve větší míře lidskými monocyty-makrofágy po stimulaci interferonem- $\gamma$ . Představuje důležitý a užitečný parametr monitorování aktivace imunitního systému, který doprovází řadu onemocnění. Mnoho prací prokazuje souvislost neopterinu a 7,8-dihydroneopterinu s intracelulárním oxidativním stresem a buněčnou apoptózou, která následuje. S ohledem na tato zjištění se výzkum pteridinů v současné době obrací také k neurodegenerativním onemocněním mozku. Patří k nim např. Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba a mnoho dalších nemocí, které provázejí ztráty a změny nervových buněk.

Neopterin a jeho deriváty jsou polární látky a jako takové jsou z hlediska analýzy poměrně problematické. HILIC je varianta vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Využívá mobilních fází složených z vodné a s vodou mísitelné organické části ve spojení s hydrofilní stacionární fází. Tato skutečnost dovoluje užít metodu HILIC pro analýzu velmi polárních a hydrofilních látek, které mají jinde značně nízkou retenci. V porovnání s RP jsou ceněnými vlastnostmi selektivita a vysoká retence pro polární a hydrofilní látky, stejně jako dobrá symetrie píků těchto analytů. Typickými aplikacemi jsou separace velmi polárních bazí a kyselin, peptidů a sacharidů.

## **2. CÍL PRÁCE**

Tato diplomová práce se zabývá analýzou biologicky aktivních látek biopterinu, neopterinu a 7,8-dihydroneopterinu pomocí HPLC s fluorescenční detekcí.

Cílem této práce je vývoj analytické HPLC metody vhodné pro separaci a stanovení zmiňovaných látek. Nově vyvinutá metoda by měla být prakticky použitelná pro analýzu biologických vzorků. V rámci optimalizace chromatografických podmínek bude hledáno vhodné složení mobilní fáze a testovány budou celkem tři chromatografické kolony. Sledováno bude retenční chování biopterinu a neopterinu jako reprezentativních zástupců zkoumaných látek-v systému HILIC. Po nalezení optimálních chromatografických podmínek pro analýzu směsi standardů bude následovat validace metody a stanovení zkoumaných látek ve vybraných biologických vzorcích.

## **3. TEORETICKÁ ČÁST**

### 3.1. Pteriny

Historicky první záznam o pterinech se datuje do roku 1889, kdy Hopkins izoloval žlutý pigment z křídel lepidoptera [1], podle kterého dostává později název celá skupina pigmentů (pteron = řecky křídlo) [2].

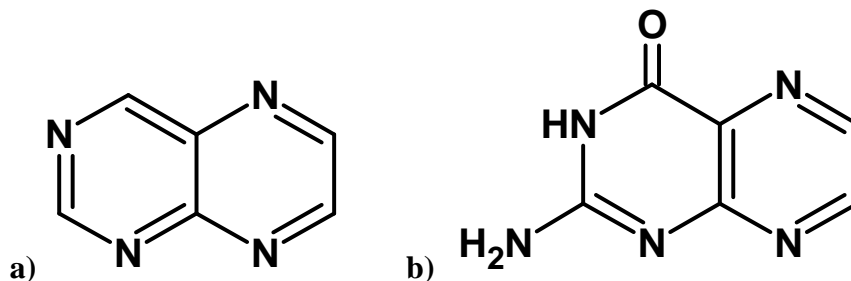
U člověka byly pteriny objeveny nejprve v moči. Jedná se především o xanthopterin (XAN) [3], biopterin (BIO) [4] a neopterin (NEO) [5].

Pterinů je mnoho, avšak biologická funkce byla popsána jen u některých zástupců. Například funkce neopterinu v lidském organismu není stále detailně objasněna. I přesto sledování jeho koncentrace v tělesných tekutinách napomáhá předvídat vývoj patologického stavu spojeného s aktivací buněčného imunitního systému [6].

#### 3.1.1. Chemická charakteristika

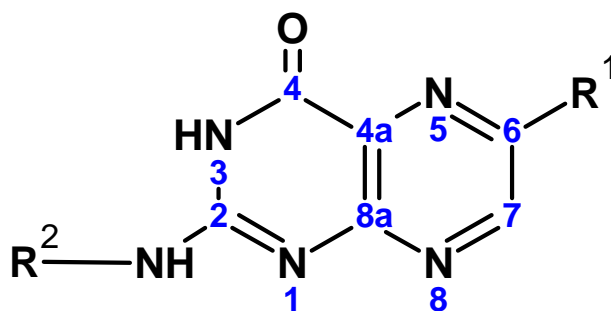
##### *Struktura a rozdělení*

Základní struktura pterinů je odvozena od pteridinu, což je pyrazino-[2,3-d]-pyrimidinový bicyklický systém. Deriváty pteridinu se podle substituce pyrimidinového cyklu dělí na pteriny (deriváty 2-amino-4-oxo-3,4-dihydropteridinu) (Obrázek 1) a lumaziny (deriváty 2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydropteridinu). Podle velikosti substituentů lze deriváty pteridinu rozdělit na nekonjugované (s relativně malými substituenty, např. neopterin, biopterin, molybdopterin, onkopterin) a konjugované, které obsahují větší substituenty vázané na pteridinový cyklus (např. kyselina listová, riboflavin, methanopterin) [7].



Obrázek 1: Strukturní vzorec pteridinu (a) a pterinu (b)

Pteriny lze odlišit jednak podle postranního řetězce v pozici 6, jednak podle oxidačního stavu pteridinového cyklu. Přehled hlavních pterinů zjištěných u člověka je uveden v Tab. 1. V přírodě se vyskytují rovněž isopteriny, které mají postranní řetězec přemístěn z polohy 6 do polohy 7. Vznikají pravděpodobně neenzymaticky, přesmykem z mateřských pterinů. U člověka byly zjištěny isosepiapterin [8], isoxanthopterin, isobiopterin [9][10].



Obrázek 2: Strukturální vzorec pterinů v oxidované formě

Sloučenina	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>
<b>Pterin</b>	H	H
<b>Xanthopterin</b>	OH	H
<b>6-Formylpterin</b>	CHO	H
<b>6-Karboxypterin</b>	COOH	H
<b>6-Hydroxymethylpterin</b>	CH <sub>2</sub> OH	H
<b>Sepiapterin</b>	(2' S)-CO-CHOH-CH <sub>3</sub>	H
<b>Biopterin</b>	(1' R, 2' S)-CHOH-CHOH-CH <sub>3</sub>	H
<b>Orinapterin</b>	(1' S, 2' S)-CHOH-CHOH-CH <sub>3</sub>	H
<b>Onkopterin</b>	(1' R, 2' S)-CHOH-CHOH-CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub>
<b>Neopterin</b>	(1' S, 2' R)-CHOH-CHOH-CH <sub>2</sub> OH	H
<b>Monapterin</b>	(1' S, 2' S)-CHOH-CHOH-CH <sub>2</sub> OH	H
<b>Umanopterin</b>	(1' R, 2' R)-CHOH-CHOH-CH <sub>2</sub> OH	H
<b>Molybdopterin</b>	CSH=CSH-CHOH-CH <sub>2</sub> O-PO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	H

Tab. 1: Přehled hlavních pterinů zjištěných v lidských buňkách a tělesných tekutinách [11]



## *Chemické vlastnosti*

Pteriny se vyskytují ve třech oxidačních formách: 5,6,7,8-tetrahydro-, 7,8-dihydro nebo v plně oxidované (aromatické) formě. Jsou to fotosenzitivní sloučeniny. Na světle se rozkládají za vzniku derivátů pteridinu. Dihydropteriny existují rovněž v méně stabilní chinoidní struktuře. Redukované formy pterinů snadno podléhají oxidaci vzdušným kyslíkem, zvláště v přítomnosti iontů kovů [12]. Touto oxidací nevznikají pouze plně oxidované formy mateřské sloučeniny, ale v důsledku různých přesmyků dochází během oxidace ke vzniku dalších derivátů pteridinu [13]. Redukované formy pterinů mají velmi silné antioxidační účinky a mohou *in vivo* působit jako lapače reaktivních forem kyslíku [14]. BIO a NEO lze získat z jejich redukovaných forem oxidací jodem [15][16]. Při oxidaci tetrahydropterinů dochází současně ke štěpení postranního řetězce. Pouze oxidované formy pterinů vykazují silnou modrou fluorescenci. BIO a NEO včetně svých různých oxidačních stavů mají podobná UV spektra [15].

### **3.1.2. Biosyntéza pterinů**

Biosyntéza všech pterinů a pteridinu začíná hydrolytickým štěpením guanosintrifosfátu (GTP) pomocí GTP cyklohydrolas. První reakční krok biosyntézy většiny známých pteridinů katalyzuje GTP cyklohydrolasa I (EC 3.5.4.16), výjimku tvoří biosyntéza riboflavinu u bakterií a rostlin, které obsahují GTP cyklohydrolasu 11 [17][18].

Biosyntéza tetrahydrobiopterinu (BH<sub>4</sub>) z GTP se uskutečňuje ve třech enzymatických krocích [19]. Probíhá především v hepatocytech, v lymfocytech a v dopaminergních a serotoninergních synaptosomech. V lidských hepatocytech je aktivita 6-pyruvoyltetrahydropterinsynthasy [20], enzymu katalyzujícího oxidační defosforylaci 7,8-dihydroneopterintrifosfát na 6-pyruvoyltetrahydropterin, asi o dva řády nižší než u ostatních savců a daný enzym chybí v lidských monocytech/makrofázích [21][22]. Následkem je akumulace 7,8-dihydroneopterintrifosfátu v buňkách. Ten je po hydrolyze uvolňován jako 7,8-dihydroneopterin (NH<sub>2</sub>) a NEO. Zvýšená biosyntéza NEO probíhá ve větším měřítku v monocytech/makrofázích aktivovaných cytokiny, především interferonem- $\gamma$  [23]. U aktivovaných makrofágů je poměr celkového NEO k celkovému BIO přibližně 50:1 [23][24].

### ***Regulace biosyntézy***

Biosyntéza BH<sub>4</sub> je regulována různými mechanismy [25], které většinou ovlivňují výhradně první a zároveň klíčový enzym, GTP cyklohydrolasu I. Stimulačně na enzym působí substrát GTP, zatímco konečné produkty di- a tetrahydropteriny působí inhibičně [26].

Prozánětlivé cytokiny stimulují biosyntézu pteridinů zvýšenou transkripcí a následnou *de novo* syntézou GTP cyklohydrolasy I [20][27][28][29]. Nejúčinnějším stimulatorem je interferon- $\gamma$ , velmi silným kostimulátorem je TNF- $\alpha$ , který však sám o sobě nevykazuje stimulační efekt [21]. Reserpin [30], či některé hormony (inzulín, glukokortikoidy) [31] stimulují biosyntézu BH<sub>4</sub> rovněž indukcí GTP cyklohydrolasy I. Inhibičně na indukcii působí protizánětlivé cytokiny jako např. transformující růstový faktor beta [32][33], interleukiny 4 a 10 [33].

### **3.1.3. Funkce pterinů v metabolismu**

BH<sub>4</sub> je nejvýznamnějším nekonjugovaným pteridinem vyskytujícím se v tělesných tekutinách. Je zapojený do hydroxylačních reakcí fenylalaninu, tyrosinu a tryptofanu. Hlavní funkce BH<sub>4</sub> spočívá v roli přirozeného kofaktoru hydroxylačních reakcí cyklických aminokyselin a kofaktoru enzymatických reakcí fenylalanin-4-hydroxylázy (PAH), tyrosin-3-hydroxylázy (TH) a tryptofan-5-hydroxylázy (TPH). Poslední dvě zmíněné látky jsou klíčové enzymy v biosyntéze biogenních aminů [34]. BH<sub>4</sub> se účastní i biosyntézy neurotransmiterů jako jsou např. dopamin, noradrenalin a serotonin a zastává úlohu kofaktoru NO-synthasy (NOS) [35].

Zatím byly popsány tři rozdílné izoenzymy NOS, mozkový, endoteliální a indukibilní [25]. Tyto izoenzymy katalyzují NADPH-dependentní oxidaci L-argininu za vzniku oxidu dusnatého (NO). Volný BH<sub>4</sub> inaktivuje NO za tvorby peroxynitrátu [36] a chrání tak enzym před inhibicí produktem reakce [37].

Bylo zjištěno, že BH<sub>4</sub>, který je ve zvýšené míře produkován aktivovanými T lymfocyty, zvyšuje jejich afinitu k interleukinu-2, což vede k jejich zvýšené proliferaci [38][39]. Další funkcí BH<sub>4</sub> je účast na řízení buněčného cyklu [40][41], nebo v regulaci melanogeneze [42].

Metabolismus BH<sub>4</sub> zahrnuje několik konjugovaných i nekonjugovaných pteridinů a enzymů. Hlavními metabolity BH<sub>4</sub> jsou nekonjugované pteridiny NEO a

BIO, což jsou oxidované formy BH<sub>4</sub>, isoxanthopterin (ISO) a pterin (PT). BH<sub>4</sub> je oxidován, mimo jiné i na 7,8-dihydrobiopterin (BH<sub>2</sub>). Biosyntéza mnohých neurotransmiterů je také ovlivněna změnami v metabolismu BH<sub>4</sub>. Tyto změny pak dávají vzniknout rozličným chorobám, např. fenylketonurie.

Neopterin je produkován ve větší míře lidskými monocyty/makrofágy po stimulaci interferonem- $\gamma$  [43][44]. Představuje důležitý a užitečný parametr monitorování aktivace imunitního systému, který doprovází řadu onemocnění. Objevila se řada prací prokazujících souvislost neopterinu a 7,8-dihydroneopterinu s intracelulárním oxidativním stresem a je popisována i možná role neopterinu v apoptóze vyvolané tímto oxidativním stresem [45]. V souvislosti s tímto pozorováním se výzkum pteridinů obrací v současné době k takovým onemocněním jako jsou neurodegenerativní onemocnění mozku - Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba a mnoho dalších nemocí, které provázejí ztráty a změny nervových buněk [46].

7,8-dihydroneopterin je schopen aktivovat transkripční faktory a indukovat expresi HIV-1 genu [47].

### **3.1.4. Metody stanovení**

Kromě výzkumu je stanovení některých pterinů vyžadováno v klinické praxi kvůli odhalení metabolické poruchy nebo předvídání a sledování vývoje patologického procesu resp. jeho léčby. Nejčastěji se pteriny stanovují v moči, plazmě, séru a mozkomíšním moku, kde je jejich koncentrace řádově  $10^{-9}$ - $10^{-6}$  mol/l. Není však doposud řádně prozkoumáno, jaká je stabilita pterinů v těchto vzorcích, protože řada studií týkající se stability byla prováděna pouze v modelových vzorcích. Kritickým místem je zpracování vzorků před vlastní analýzou [48].

#### ***HPLC metody***

Pteriny lze stanovit přímo pomocí reverzně-fázové [11], iontově-párové [49][50], iontově-výměnné [51][52][53] a chirální [54][55] vysokoúčinné kapalinové chromatografie s následnou fluorescenční a/nebo elektrochemickou detekcí. Chromatografie na reverzní fázi je vhodná pro stanovení oxidovaných forem pterinů. Pro separaci pterinů v různém oxidačním stavu, nebo různých tetrahydropterinů, nebo na separaci mono-, di- a trifosfátů pterinů je výhodné použít iontově-párovou nebo iontově-výměnnou chromatografii. Biologický vzorek se většinou aplikuje přímo, pouze

při obsahu proteinů je nutné provést deproteinaci [49][56][57]. Předseparací vzorku [15][58][59][60] nebo gradientovou elucí s přepínáním kolon [56] lze zabránit kontaminaci analytické kolony a ztrátě citlivosti.

Díky silné fluorescenci oxidovaných forem pterinů je možná jejich poměrně specifická a citlivá detekce bez předchozího zakoncentrování [61][62]. Redukované formy je nutno před vlastní analýzou oxidovat chemicky [15][62][63][64][65][66], nebo elektrochemicky [62][67]. Všechny oxidační formy biopterinu lze stanovit fluorimetricky, pokud se oxidace provádí jodem v prostředí o různém pH [15].

Endogenní oxidované a redukované pteriny je možné v biologickém materiálu stanovit elektrochemickou detekcí přímo. Byly použity amperometrické elektrody [68][69] a coulometrické elektrody z porézního grafitu v sériovém zapojení před fluorescenčním detektorem [62][49][67]. Modifikovanou metodou lze detekovat rovněž chinoidní formu dihydrobiopterinu [70].

### ***Fluorimetrie***

Celkový obsah pterinů je možné stanovit fluorimetricky [71] po oxidaci redukovaných forem jodem.

### ***Další metody***

Redukované formy biopterinu lze stanovit za pomoci enzymů fenylalanin-4-monooxygenasy a/nebo dihydropterinreduktasy [72][73][74].

Detekce hmotnostní spektrometrií byla využita při stanovení pterinů plynovou [75] a kapalinovou chromatografií [10].

Ke stanovení neopterinu nebo biopterinu imunoanalýzou jsou již dostupné komerční sady. Původně vyvinutá radioimunoanalýza [76][77] je v dnešní době nahrazována metodou ELISA [78].

## **3.2. Přehled publikovaných metod pro stanovení pterinů**

Většina nedávno publikovaných prací (Tab. 2, Tab. 3) zaměřených na stanovení pterinů v biologických materiálech (moč, plazma) využívá metody reverzně-fázové vysokoúčinné kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí (355 nm/450 nm). Základem mobilní fáze bývá fosfátový pufr o koncentraci 5-150 mM a pH v rozmezí 2,3-6,7.

Látka	Zdroj	Stacionární fáze	Mobilní fáze	Detekce	Citace
NEO, CREA, ALB	Moč	RP	Fosfátový pufr (15 mmol/l, pH 6,4), Na <sub>2</sub> -EDTA (2g/l)	FD (353 nm/438 nm)	[79]
NEO	Plazma/ Moč	Diasfer C16 (100 x 4 mm, 5 μm)	ACN : VODA (1:99)	FD (350 nm/430 nm)	[80]
BH4, BH2, PT, BIO, NEO	Tkáň jater, ledvin a mozku	Cosmosil 5C18 (250 x 4,6mm, 5 μm)	Fosfátový pufr (pH 3,0), 5% methanol, 3 mM oktylsulfát sodný, 0,1 mM Na <sub>2</sub> -EDTA, 0,1 mM askorbová kys.	FD (350 nm/440 nm)	[81]
BIO, NEO, onkopterin	Moč	1) Develosil ODS K-5 (150 x 4,6 mm I.D., 5μm) 2) Develosil ODS HG-5 (150 x 4,6 mm, 5 μm) 3) Nucleosil 100-5SA (150 x 4,6 mm, 5 μm)	1) Fosfátový pufr (50mM, pH 3,0) 2) Fosfátový pufr (100mM, pH 3,0)	FD (355 nm/450 nm)	[82]
BIO, NEO, onkopterin	Moč	Purospher RP-18 (250 x 4 mm, 5μm)	Gradient: 1) Fosfátový pufr (50mM, pH 3,0) 2) Fosfátový pufr (50mM, pH 3,0) : acetonitril – 100:15	FD (355 nm/450 nm)	[83]
CREA, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosin, NEO	Moč	C18 (250 x 4,6 mm, 5 μm)	1) 2% ACN v 0,3mM sírové kys. 2) Fosfátový pufr (10mM, pH 6,7), 5% MeOH	FD (353 nm/438 nm)	[84]
NEO, BIO	Moč		1% MeOH, 1% ACN, 0,01% octová kyselina	FD	[85]
BH4, BIO	Moč	Develosil ODS K-5 (150 x 4,6mm)	Fosfátový pufr (50mM, pH 3,0)	FD (350 nm/450 nm)	[86]
NEO	Plazma	Develosil ODS MG-5 (250 x 4,2 mm)	5% MeOH ve fosfátovém pufru (20mM, pH 6,0)	FD (353 nm/438 nm)	[87]
BIO, BH2, BH4		Zorbax Eclipse XDB-C18 (150 x 4,6 mm, 5 μm)	Citrátový pufr (10mM, pH 5,5) : ACN (99:1, v/v)	FD (272 nm/435 nm a 444 nm)	[88]
NEO, BIO, isoxanthopterin, PT, rhamnopterin)		1) C8 Spherisorb, 5 μm 2) ODS-1 Spherisorb (250 x 4,6 mm, 5 μm)	Hydrogenfosfátový pufr (1,5 mmol/l, pH 4,6) s 8% MeOH (v/v)	FD (350 nm/450 nm)	[89]

**Tab. 2: Přehled publikovaných metod pro stanovení pterinů**

Látka	Zdroj	Stacionární fáze	Mobilní fáze	Detekce	Citace
BIO, BH4	Plazma	Hypersil C18 column (200 x 2.1 mm, 5 µm)	Fosfátový pufr (15mM, pH 6,45)	FD (360/440 nm)	[90]
BH4		Luna C-18 (250 x 4.6 mm, Phenomenex)	Fosfátový pufr (25mM, pH 6,4)	FD	[91]
NEO	Moč	Asahipak ODP-50 4D (150 x 4,6 mm)		FD (353nm/438nm)	[92]
BIO, NEO	Cerebrospinální tekutina	Hypersil ODS(2)	19,5 mM AmAc, 0,23 mM Na-EDTA, 5,4 mM NaCl a 14.8% methanol (pH 2.3).	280 nm/360 nm	[93]
NEO	Moč	Aquapore OD 300 (250 x 4.6 mm, 5 µm) RP18 Licrospher 100 (4 x 4 mm, 5 µm)	Fosfátový pufr (150 mM, pH 4,0)	UV (353 nm)	[94]
NEO, BIO, BH2, BH4, PT	Moč	Zorbax Detekt XDB-C18 (150x4.6mm,5 µm) a (250 x 4.6mm)	Citrátový pufr (10mM, pH 5,5) : ACN (99:1)	UV-VIS diode array detektor (DAD), UV (256 nm) FD (272 nm/445 nm)	[95]
NEO	Hnis	Phenomenex Develosil ODS- MG-5 (250 x 4,2 mm)	5% methanol v 20 mM Fosforečnanu amonném (pH 6,0)	FD (353nm/438nm)	[96]
NEO, BIO	Plazma	Hypersil C18 (200 x 2,1 mm, 5 µm)	Fosfátový pufr (15 mmol/l, pH 6,45)	FD (360nm/440 nm)	[97]
5-methyltetrahydrofolát	Cerebrospinální tekutina	Nucleosil C-18 column (150 mm x 0.4 mm, 5 µm)	Fosfátový pufr (5 mmol/l, pH 2,3)	FD (295nm/355 nm)	[98]

**Tab. 3: Přehled publikovaných metod pro stanovení pterinů**

### **3.3. Hydrophilic Interaction Chromatography (HILIC)**

#### **3.3.1. Historie**

Zkratku HILIC navrhl v roce 1990 Alpert k charakterizaci chromatografické techniky, kde analyty interagují s hydrofilní stacionární fází a jsou vymývány relativně hydrofobní binární mobilní fází, ve které voda představuje silnější eluent [99]. V roce 1952 Samuelson a Sjöström [100] popisují separaci monosacharidů na iontově-výměnné koloně Amberlite IRA-400 pomocí stupňovité gradientové eluce začínající na 99,5% ethanolu a směřující k čisté vodě. Skutečnost, že hydrofilní stacionární fáze jako iontově-výměnné pryskyřice obsahují na svém povrchu vodnou vrstvu byla popsána skupinou vedenou Gregorem [101]. Rückert a Samuelson již v roce 1954 zjistili, že tato nepohyblivá vodná vrstva může souviset s adsorpcí neelektrolytů na iontově-výměnných pryskyřicích [102].

Metoda HILIC nabývá stále většího významu a v posledních několika letech se ukazuje jako vhodná volba pro mnoho aplikací týkajících se polárních a hydrofilních analytů.

#### **3.3.2. Mechanismus**

Odlišení HILIC od NPC (normal phase chromatography) je poněkud diskutabilní, ovšem definice navržená Alpertem [99] se jeví jako reálná. Zatímco retence u konvenční NPC je obvykle založena na povrchově adsorpčním jevu, termín HILIC by měl být užíván v případech, kdy rozpouštědlem o vysoké eluční síle je voda a retenční mechanismus je rozdělovací. Alpert proklamoval existenci vodou obohacené tenké vrstvy v bezprostředním okolí polární stacionární fáze. Tato vrstva je zadržována pomocí funkčních skupin (např. amino-skupin) navázaných na nosiči (silikagel) a je v kontaktu se směsí vodných rozpouštědel. Retenční mechanismus je založen na rozdělení analyzované látky mezi objem mobilní fáze a tenkou vodnou vrstvu částečně ukotvenou v bezprostřední blízkosti polární stacionární fáze. Mobilní fázi zde nejčastěji představuje směs rozpouštědel mísitelných s vodou. Avšak je na místě podotknout, že detailní mechanismus i nadále zůstává neobjasněn. Z mnohých studií vyplývají různé závěry, které se liší případ od případu v závislosti na analyzovaných látkách, použitých separačních kolonách, či složení mobilních fází. Retenci mohou ovlivnit elektrostatické interakce mezi analyzovanou látkou a stacionární fází, v úvahu pak připadá i vliv

vodíkových vazeb vytvářených mezi analytem a nepohyblivou tenkou vrstvou vody ukotvenou na stacionární fázi [103]. Při použití iontově-výměnných sorbetů se uplatňují i adsorpční interakce [104].

Užití vody, rozpouštědla s vysokou eluční silou, přináší do HILIC množství výhod oproti tradiční NPC. Mobilní fáze u NPC jsou obvykle tvořeny nepolárními látkami (např. hexan) a polární analyty v nich mají nízkou rozpustnost. Pořadí vymývaných látek je u HILIC více méně opačné vzhledem k RP separacím [99]. To znamená, že HILIC nejlépe pracuje s látkami, které se v RP jeví jako problematické. Jednou ze základních výhod HILIC je možnost vytváření vícedimenzionálních separací. Při spojení HILIC s RP SPE se rozpouštědlo s původně vysokou eluční silou použité k desorpci analytů z SPE zařízení stává u HILIC rozpouštědlem s nízkou eluční silou. Přímý vstřík SPE eluátu na separační kolonu opačné polarity je tedy často možný, což šetří čas i zabraňuje ztrátám vzorku. Tento přístup však může být užit pouze u látek, které jsou zadržovány na obou typech stacionárních fází (RP a HILIC) a schéma RP-SPE/HILIC je jasně preferovanou kombinací v případech, kde je cílem zachytit a separovat polární sloučeniny [105].



### 3.3.3. Stacionární fáze pro HILIC

Přestože počet komerčně dostupných kolon tvořených speciálně pro HILIC vzrůstá, nemůžeme říci totéž o pestrosti materiálů užitých k jejich výrobě. Výčet vybraných stacionárních fází užívaných v HILIC separacích ukazuje Tab. 4 [105].

Název produktu	Výrobce	Nosič	Funkční skupina
Atlantis <sup>®</sup>	Waters	Silikagel, 100Å	Nemodifikovaný
Betasil <sup>®</sup>	Thermo Hypersil	Silikagel, 100Å	Nemodifikovaný
ChromoLith <sup>®</sup>	Merck	Silikagel (monolit)	Nemodifikovaný
Hypersil <sup>®</sup>	Thermo Hypersil	Silikagel, 120Å	Nemodifikovaný
Kromasil <sup>®</sup>	EKA Chemicals	Silikagel, 100Å	Nemodifikovaný
Cogent Type C Silica <sup>™</sup>	Microsolv	Silikagel, 100Å	Hybridní stacionární fáze
Alltima <sup>™</sup> Cyano	Grace Alltech	Silikagel	3-kyanopropyl
Inertsil <sup>®</sup> Diol	GL Sciences	Silikagel	2,3-dihydroxypropyl
Lichrospher <sup>®</sup> Diol 100	Merck	Silikagel	2,3-dihydroxypropyl
Silasorb Diol	Chemapol	Silikagel	2,3-dihydroxypropyl
YMC-pack <sup>®</sup> Diol-120-NP	YMC	Silikagel	2,3-dihydroxypropyl
Amide Silica	(Unspecified)	Silikagel	Amid
TSKgel Amide-80	Tosoh Bioscience	Silikagel	Amid
GlycoSep N	ProZyme	Silikagel	Amid
Nucleodex <sup>®</sup> β-OH	Macherey-Nagel	Silikagel	β-CD
Cyclobond <sup>™</sup> I 2000	ASTEC	Silikagel	β-CD
PolyHydroxyethyl A	PolyLC	Silikagel	Poly(2-hydroxyethylaspartamid)
PolyGlycoplex	PolyLC	Silikagel	Poly(sukcimid)
Luna <sup>®</sup> Amino	Phenomenex	Silikagel, 100Å	3-aminopropyl[WAX]
Hypersil <sup>®</sup> APS2	Thermo Hypersil	Silikagel, 120Å	3-aminopropyl[WAX]
Spherisorb <sup>®</sup> NH <sub>2</sub>	Waters	Silikagel, 80Å	3-aminopropyl[WAX]
Zorbax <sup>®</sup> NH <sub>2</sub>	Agilent	Silikagel, 70Å	3-aminopropyl[WAX]
YMC-Pack <sup>®</sup> Polyamide II	YMC	Silikagel	Polyamin[WAX]
SynChropak CM300	Eichrom (Eprogen)	Silikagel, 300Å	Karboxymethyl[WCX]
PolyCAT A	PolyLC	Silikagel	Poly(aspartová kyselina) [WCX]
PolySulfoethyl A	PolyLC	Silikagel	Poly(2-sulfoethylaspartamid) [SCX]
Hydrolyzed GMA-co-EDMA	Cystom synthesis	Metakrylátový kopolymer	2,3-dihydroxypropyl
Astec apHera <sup>™</sup>	ASTEC	PVA kopolymer	Polyamin [WAX]

Tab. 4: Výčet vybraných stacionárních fází užívaných v HILIC separacích [105]

### ***Nemodifikovaný silikagel***

Většina nedávno publikovaných prací stále využívá tradiční nemodifikovaný silikagel, např. Betasil [106], Hypersil [107] a Kromasil [108]. Atlantis HILIC je silikagel vyrobený speciálně pro HILIC.

Nemodifikovaný silikagel byl v HILIC používán za účelem až 120-tinásobného zvýšení citlivosti oproti RP. Převládal názor, že je nemožné užít nemodifikovaný silikagel v bioanalytických separacích a dalších aplikacích, kde jsou separovány polární látky přítomné v složité matici. Tato skepse má své kořeny v tradiční NPC, kde byly užívány čistě organické mobilní fáze a vliv interakcí s povrchem nebyl dostatečně zastíněn vysokou koncentrací polárních příměsí. Voda náleží k nejsilnějším deaktivujícím činidlům a pokud je významný podíl vody (10% vody odpovídá 5,5 mol/l) přidán k mobilní fázi, je samotný silikagel pravděpodobně dostatečně deaktivován, aby poskytl reprodukovatelné výsledky i přes rozsáhlé množství nástřiků.

Přetížení je více patrné u materiálů, jejichž mechanismus separace závisí spíše na povrchové adsorpci, než na rozdělovacím mechanismu. Problém přetížení také může vyvstat v případech, kdy jsou složité vzorky nanášeny v koncentracích převyšujících normální analytické koncentrace [105].

Ačkoliv voda zakrývá povrch, nedostačuje její vliv k zamezení disociace silanolových skupin a kationtové výměně, která tuto disociaci doprovází. Ve skutečnosti přítomnost vody naopak podporuje vytváření volných silanolových skupin a tím zmíněnou disociaci zjednodušuje. Negativně nabitý povrch přitahuje kladně nabitě sloučeniny, ale také způsobuje sníženou retenci negativně nabitých polárních sloučenin, které jsou od povrchu odpuzovány [105].

### ***Silikagel modifikovaný aminopropylovými skupinami***

Tato stacionární fáze se používala v HILIC hlavně k separaci sacharidů. Výhodu oproti nemodifikovanému silikagelu představuje zábrana vytváření dvojitých píků v důsledku rozlišení anomerů. Stacionární fáze založené na nemodifikovaném silikagelu a na silikagelu s navázanými aminopropylovými skupinami jsou více reaktivní než alkylové stacionární fáze. Ireverzibilní adsorpce zde proto představuje větší problém v porovnání s RP-HPLC kolonami [109].

Ve srovnání s materiály odvozenými od polymerní matrice je při použití této stacionární fáze v kombinaci s určitými typy pufrů zapotřebí delšího času ekvilibrace [110].

Důvodem k znepokojení u těchto stacionárních fází je omezená stabilita ve vodných elučnicích činidlech [111], následovaná rychlým uvolňováním ligandů. To je doprovázeno zhoršeným tvarem píků v závislosti na podmínkách HILIC [112]. Zdá se, že příčinou této nestability je na ligandech katalyzovaná autodestruktivní reakce primárních aminoskupin [105].

### ***Ne-silikagelové stacionární fáze modifikované aminoskupinami***

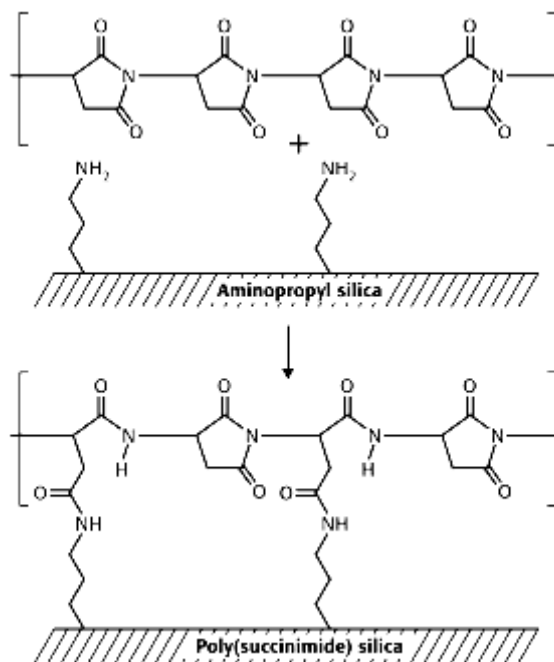
Nosiče odvozené od organických polymerů modifikované amino-skupinami mají mnohem vyšší stabilitu ve srovnání se silikagelem s navázanými aminopropylými skupinami. Mohou být užity za kyselých i bazických podmínek a jsou upotřebitelné i v HILIC separacích například pro strukturální analýzy oligosacharidů [113].

### ***Silikagel modifikovaný amido-skupinami***

Amidové skupiny jsou méně reaktivní než skupiny aminové a postrádají také jejich bazicitu. Retence na těchto kolonách je méně citlivá k pH mobilních fází a zároveň i méně náchylná k chemické sorpci analyzovaných sloučenin. Absence primárních amino-skupin pak předchází vzniku Schiffových bazí redukcí cukrů a jiných karbonylových sloučenin [105].

### ***Silikagel modifikovaný polysukcimidem a jeho deriváty***

Několik polárních stacionárních fází odvozených od silikagelu je založeno na kovalentní reakci polysukcimidu s aminopropylými skupinami navázanými na silikagel (Obrázek 3). Primární reakce utváří polyamidovou/amidovou povrchovou vrstvu ukotvenou na několika místech, kde se části polysukcimidových kruhů otevírají, aby vytvořily vazbu s aminopropylou částí. Pouze určitá frakce sukcimidových jednotek je zapojena do vytváření těchto vazeb a zbývající část je volná k reakci s nukleofily, které mohou být využity pro produkci mnoha funkčních silikagelů. Patří sem např. silikagel modifikovaný polyaspartovou kyselinou, poly-2-sulfoethylaspartamidem, nebo poly-2-hydroxyethylaspartamidem [105].



**Obrázek 3: Silikagel modifikovaný polysukcimidem**

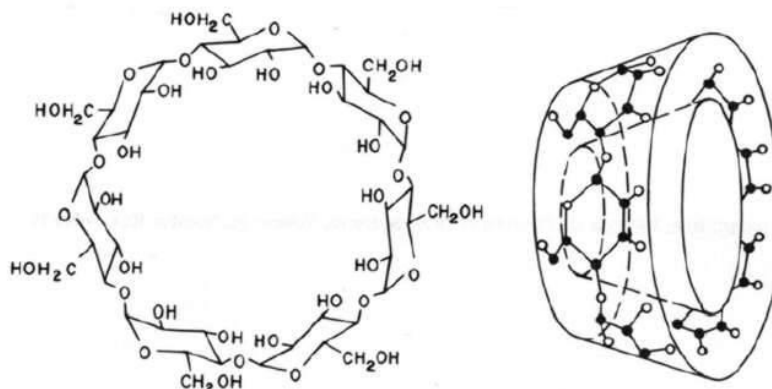
### ***Silikagel modifikovaný diolovou skupinou***

Silikagel modifikovaný diolovou skupinou je stacionární fáze, která je nejvíce podobná nemodifikovanému silikagelu vzhledem k výsledné polaritě [114][115]. Je připravována reakcí silikagelu s aktivovaným alkoxyglycidoxypropylsilanem, která je následována kyselou hydrolyzou. Dochází tak k otevření oxiranového kruhu za vzniku silikagelu s navázanou 2,3-dihydroxypropylovou skupinou. Silikagely s navázanými diolovými funkčními skupinami patří k prvním modifikovaným fázím. Byly vytvářeny za účelem odstranění nedokonalých adsorpčních vlastností nemodifikovaného silikagelu. Vysoká polarita a schopnost těchto kolon vázat vodík za relativně bezvýznamné disociace funkčních skupin z nich činilo ideální volbu pro HILIC aplikace, kde nebyla žádoucí iontová interakce se silanolovými skupinami.

### ***Kolony s cyklodextrinem (CD)***

Cyklodextrinové stacionární fáze jsou od silikagelu odvozené sorbenty, které nesou cyklické oligosacharidy složené z pěti, či více (1→4)  $\alpha$ -D-glukopyranosidových jednotek. Konfigurace těchto sloučenin připomíná prstenec s širokou a úzkou částí (Obrázek 4) vystavující primární a sekundární hydroxylové skupiny směrem k rozpouštědлу. Vnitřek prstence je podstatně méně hydrofilní než vnější část, a tak je

schopen pojmout hydrofobní molekuly. Protože jsou tyto dutiny utvářeny z opticky aktivních cukrů, jsou kolony s CD užívány jako chirální selektory v mnoha oblastech separace [116]. Vysoká hustota vystavených hydroxylových skupin činí kolony s CD atraktivní pro HILIC [105].



**Obrázek 4: Struktura cyklodextrinu**

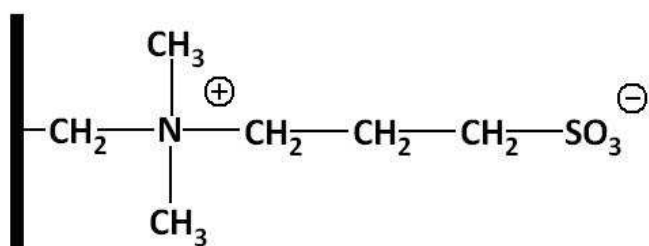
#### ***Silikagel modifikovaný kyanopropylovými skupinami***

Ačkoli je tento typ stacionární fáze běžně uváděný jako polární fáze, neschopnost utvářet vodíkové vazby způsobuje nízkou NP retenci [115], čímž nalézá využití v RP. Při srovnání několika materiálů pro separaci peptidů, selhala tato stacionární fáze, když nevykázala žádnou retenci [117]. Dalším praktickým aspektem, který brání použití takto modifikovaného silikagelu v HILIC, je mechanická nestabilita, která provází tyto stacionární fáze při užití mobilních fází střední polariry. Tato nestabilita je zapříčiněna snížením mezičásticových sil, které udržují integritu chromatografického lože v nepolárních, či vysoce polárních mobilních fázích [114].

#### ***Silikagel modifikovaný sulfoalkylbetainem***

Nový přírůstek stávajícího výčtu HILIC stacionárních fází je odvozen od porézního silikagelu, na který je jako funkční skupina grafitován zwitterion tvořený 3-sulfopropylodimethylalkylamonnou vnitřní solí (Obrázek 5). Současný výskyt kvarterní amoniové a sulfonylové skupiny v poměru 1:1 udílí celku téměř neutrální náboj. Sulfoalkylbetainový zwitterion je však stále silným osmolytem s výraznou schopností vázat na svém povrchu vodu [118]. Tyto materiály byly zpočátku vyvinuty pro separaci anorganických solí, malých iontových sloučenin a proteinů ve vodných mobilních fázích [119][120][121][122][123]. Selektivita sleduje hlavní model HILIC se zvýšenou

retencí jako funkcí polaroty roztoku, ale je zbavena výrazných iontových retenčních vlastností nemodifikovaného silikagelu a sorbentů obsahujících aminoskupiny. Avšak mírný elektrostatický náboj se zde vyskytuje. Přispívá jím pravděpodobně sulfonová skupina jako distálně umístěná nabitá část funkční skupiny. Tento nízký přebytek negativního náboje je odvislý od pH a může být ovlivněn přidavkem dvojmocných kationů v milimolárních koncentracích [120][121][122][123].



Obrázek 5: Strukturně znázorněný sulfoalkylbetainový zwitterion

### 3.4. Validace analytické metody

Smyslem validačního procesu je ověřit, zda je vypracovaná metoda vhodná pro daný účel použití. Cílem validace je určit podmínky, za kterých je zkušební postup použitelný, a zajistit stejnou spolehlivost při opakovaném použití v jedné, nebo i v různých laboratořích [124].

#### *Test způsobilosti systému*

Test způsobilosti analytického systému je nedílnou součástí validace analytické metody. Při každém novém použití metody se neopakuje celá validace, ale jsou definována určitá kritéria, která musí být splněna a která se obecně nazývají test způsobilosti analytického systému. Při splnění požadavků testu způsobilosti se předpokládá, že dříve provedená validace platí [124].

#### *Účinnost kolony a zdánlivý počet teoretických pater*

Účinnost kolony (zdánlivá) se může vypočítat jako zdánlivý počet teoretických pater (N) z dat získaných v závislosti na metodě za podmínek izotermických, izokratických nebo izopyknických. Použije se následující vzorec, hodnoty  $t_R$  a  $w_h$  se musí vyjádřit ve stejných jednotkách (času, objemu, nebo vzdálenosti):

$$N = 5,54 \cdot (t_R / w_h)^2$$

$t_R$  = retenční čas (nebo objem) nebo vzdálenost podél základní linie od bodu nástřiku ke kolmici spuštěné z vrcholu píku odpovídajícího dané složce

$w_h$  = šířka píku v polovině jeho výšky [125]

Z počtu teoretických pater (N) lze vypočíst výškový ekvivalent teoretického patra HETP (Height Equivalent of Theoretical Plate), jestliže je známa celková délka kolony L :

$$HETP = L / N$$

Na základě tohoto parametru lze porovnávat účinnost chromatografických kolon o různých délkách [126].

### ***Faktor symetrie***

Faktor symetrie píku ( $A_S$ ) (nebo faktor chvostování píku) se vypočítá podle vzorce:

$$A_S = w_{0,05} / 2d$$

$w_{0,05}$  = šířka píku v jedné dvacetině jeho výšky

$d$  = vzdálenost mezi kolmicí spuštěnou z vrcholu píku a vzestupnou částí píku v jedné dvacetině jeho výšky

Hodnota faktoru symetrie 1,0 značí úplnou (ideální) symetrii píku [125].

### ***Rozlišení***

Rozlišení ( $R_S$ ) mezi píky dvou složek se může vypočítat podle vzorce:

$$R_S = 1,18 \cdot (t_{R2} - t_{R1}) / (w_{h1} + w_{h2}),$$

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

$t_{R1}$  a  $t_{R2}$  = retenční časy píků

$w_{h1}$  a  $w_{h2}$  = šířky píků v poloviční výšce

Rozlišení větší než 1,5 odpovídá rozdělení píků na základní linii [125].

### ***Správnost***

Správnost vyjadřuje shodu mezi získaným výsledkem a správnou hodnotou. Správnou hodnotu lze zjistit buď jinou nezávislou metodou s ověřenou správností, nebo se připraví modelový vzorek ze všech složek přípravku a přesně přidaného standardu. Správnost se obvykle vyjadřuje jako rozdíl správné a získané hodnoty, nebo jako výtěžnost  $R$ , která se vypočítá podle vzorce:

$$R (\%) = 100 \cdot c_i / c_o$$

$c_i$  = koncentrace stanovená u testovaného vzorku

$c_o$  = správná známá koncentrace [124]



### ***Přesnost***

Přesnost je míra shody mezi jednotlivými výsledky metody, opakovaně získanými s jedním homogenním vzorkem. Podle podmínek opakování se rozlišují tři úrovně přesnosti – opakovatelnost, mezilehlá přesnost a reprodukovatelnost [124]. Opakovatelnost odezvy se vyjadřuje jako odhad relativní směrodatné odchylky (RSD%) v procentech pro řadu následných měření porovnávacího roztoku a vypočítá se podle vzorce:

$$\text{RSD}\% = \frac{100}{\bar{y}} \sqrt{\frac{\sum (y_i - \bar{y})^2}{n - 1}} = \frac{100}{\bar{y}} s$$

$y_i$  = jednotlivé hodnoty vyjádřené jako plocha píku, výška píku nebo poměr ploch u metody vnitřního standardu

$\bar{y}$  = průměr jednotlivých hodnot

$n$  = počet jednotlivých hodnot

$s$  = směrodatná odchylka [125]

### ***Selektivita***

Selektivita analytické metody je schopnost změřit správně a specificky danou látku v přítomnosti jiných látek, jež lze očekávat (např. nečistoty, rozkladné produkty). Tento parametr se doloží výsledky analýzy standardu, a dále např. vzorků bez analyzované látky obsahujících všechny složky přípravku, rozkladné produkty, nečistoty [124].

### ***Detekční limit***

Detekční limit vyjadřuje citlivost metody. Je to nejnižší detekovatelná koncentrace látky, nestanovované kvantitativně. U instrumentálních metod se může určit jako koncentrace analyzované látky s poměrem signálu k šumu s hodnotou 3. Nalezený detekční limit se ověřuje analýzou příslušné koncentrace vzorku [124].

### ***Kvantitativní limit***

Kvantitativní limit je také parametrem citlivosti metody. Je to nejnižší koncentrace látky stanovitelná s přijatelnou přesností a správností. Kvantitativní limit se

často vyjadřuje jako koncentrace stanovované látky s poměrem signálu k šumu s hodnotou 10 [124].

### ***Linearita***

Linearita je schopnost metody poskytovat výsledky přímo úměrné koncentraci stanovované látky. Obvykle se stanovuje minimálně pět různých koncentrací v rozmezí 50 – 150% deklarovaneho obsahu. Je možné pracovat s roztoky standardů, protože rušivé vlivy u reálných vzorků jsou hodnoceny jinými parametry validace [124].

### ***Rozsah***

Tento parametr se obvykle odvozuje z linearity metody a rozumí se jím koncentrační rozmezí, ve kterém může být metoda používána. Dolním limitem může být například detekční limit a horní může být určen maximální odezvou, při jejímž překročení už přístroj nepracuje přesně [124].

### ***Robustnost***

Robustnost vyjadřuje míru vlivu proměnných podmínek na výsledky analýzy. Sbírají se poznatky z vývoje metody a cílem je upozornit na podmínky, které mohou ovlivnit výsledky. U metody využívající vysokoučinnou kapalinovou chromatografii se sledují například vlivy: složení mobilní fáze, pH vodné složky mobilní fáze, teplota na koloně, rychlost průtoku, stabilita analyzovaných vzorků, rozdíl mezi kolonami různých šarží, případně i výrobců [124].

## **4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

## 4.1. Materiál a pomůcky

### 4.1.1. Chemikálie

- **Biopterin, 98%**, SIGMA-ALDRICH, Praha, Česká republika
- **5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin**, SIGMA-ALDRICH, Praha, Česká republika
- **Neopterin, 97,5%**, SIGMA-ALDRICH, Praha, Česká republika
- **7,8-Dihydroneopterin, 97%**, SIGMA-ALDRICH, Praha, Česká republika
- **Methanol CHROMASOLV for HPLC**, SIGMA-ALDRICH, Praha, Česká republika
- **Acetonitril CHROMASOLV for HPLC, gradient grade**, SIGMA-ALDRICH, Praha, Česká republika
- **Kyselina octová koncentrovaná, 99%**, FLUKA, SIGMA-ALDRICH, Praha, Česká republika
- **Octan amonný, 99%**, SIGMA-ALDRICH, Praha, Česká republika
- **Hydroxid amonný, 25%**, SIGMA-ALDRICH, Praha, Česká republika
- **Ultračistá voda pro HPLC**

### 4.1.2. Přístroje a pomůcky

- **Analytické váhy:** Sartorius 2004 MP, SARTORIUS, Německo
- **Chromatografické kolony:**
  - LUNA 3u HILIC (3 x 100 mm, 3 µm)
  - OBELISK N (3,2 x 100 mm, 5 µm)
  - OBELISK R (3,2 x 100 mm, 5 µm)
- **HPLC systém:**
  - Pumpa: LC-10 ADvp SHIMADZU (Kyoto, Japonsko)
  - Odplyňovač: DGU-10A SHIMADZU (Kyoto, Japonsko)
  - Dávkovací jednotka: SIL-Hta, autosampler SHIMADZU (Kyoto, Japonsko)
  - Termostat: CTO-10ACvp column oven, SHIMADZU (Kyoto, Japonsko)
  - Detektory: SPD-M10Avp diode array detektor, SHIMADZU (Kyoto, Japonsko), RF10Ax1 fluorescence detector, SHIMADZU (Kyoto, Japonsko)
  - Program: LC solution for windows v.1.1

- **Vakuová pumpa a filtrační zařízení:** MILIPORE
- **Ultrazvuková vodní lázeň:** SONOREX DIGITEC
- **Automatické pipety se špičkami:** Biohit, FISHER SCIENTIFIC, Česká republika
- **Laboratorní pH metr:** Hanna, FISCHER SCIENTIFIC, Česká republika

## 4.2. Příprava zásobních roztoků a pracovních roztoků

### 4.2.1. Příprava zásobních roztoků

Zkoušené látky jsou poměrně polární, a tak byla pro ověření jejich rozpustnosti zvolena nejprve ultračistá voda. Rozpuštění 1 mg neopterinu v 1 ml vody se však ukázalo jako problematické. Shodně tomu bylo i při užití směsi rozpouštědel - methanol : voda (50 : 50). Rozpuštění 1 mg neopterinu bylo dosaženo až při užití 100 ml směsi acetonitrilu s vodou (50 : 50). Obdobně se chovaly i další zkoušené látky. Zásobní roztoky zkoušených látek byly připravovány v koncentracích  $10^{-4}$  mol/l. Roztoky neoterinu a biopterinu jsou při vhodném skladování relativně stabilní. Opakem jsou roztoky dihydroneopterinu a tetrahydrobiopterinu, které jsou velmi nestabilní a rychle podléhají oxidaci. Proto byly všechny zásobní roztoky ihned po přípravě umístěny do lednice a uchovávány při teplotě 4°C v odměrných baňkách obalených aluminiovou folií.

#### *Výpočty pro přípravu zásobních roztoků*

Zásobní roztoky zkoušených látek byly připravovány do 100 ml odměrných baněk v koncentracích  $10^{-4}$  mol/l. Výpočet teoretických navážek zkoušených látek pro přípravu zásobních roztoků (Tab. 5) se řídí vztahem:

$$m = c \cdot V \cdot M ,$$

kde : m ..... navážka látky

M..... molární hmotnost navažované látky

c..... koncentrace zásobního roztoku

V.....objem zásobního roztoku

Látka	Sumární vzorec	Molekulová hmotnost	Koncentrace zásobního roztoku [mol/l]	Objem zásobního roztoku [l]	Navážka [mg]
NEO	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	253,08	10 <sup>-4</sup>	0,1	2,53
BIO	C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	237,09	10 <sup>-4</sup>	0,1	2,37
NH2	C <sub>9</sub> H <sub>13</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	255,10	10 <sup>-4</sup>	0,1	2,55
BH4	C <sub>9</sub> H <sub>15</sub> N <sub>5</sub> O <sub>3</sub>	241,25	10 <sup>-4</sup>	0,1	2,41

Tab. 5: Výpočet teoretických navážek zkoušených látek pro přípravu zásobních roztoků o koncentraci 10<sup>-4</sup> mol/l.

#### 4.2.2. Příprava pracovních roztoků

Pracovní roztoky látek použitých v průběhu pokusu byly připravovány smísením 100 µl zásobního roztoku a 900 µl rozpouštědla tvořeného směsí acetonitrilu a vody (50 : 50). Koncentrace analyzovaných látek v pracovních roztocích byla o jeden řád nižší než v roztocích zásobních, tedy 10<sup>-5</sup> mol/l. Pracovní roztoky byly připravovány vždy nové, ráno před jednotlivými měřeními, případně dle potřeby.

### 4.3. Optimalizace podmínek měření

Cílem práce bylo nalézt vhodné chromatografické podmínky pro kvalitativní i kvantitativní hodnocení jednotlivých pterinových derivátů - biopterinu, neopterinu a 7,8-dihydroneopterinu a případnou separaci jejich směsi. S ohledem na strukturu, fyzikálně-chemické vlastnosti a retenční chování zkoumaných látek byly zkoušeny různé chromatografické kolony a mobilní fáze.

#### 4.3.1. Chromatografické kolony

Byly použity tři chromatografické kolony :

- LUNA 3u HILIC (3 x 100 mm, 3 µm)
- OBELISK N (3,2 x 100 mm, 5 µm)
- OBELISK R (3,2 x 100 mm, 5 µm)

### 4.3.2. Mobilní fáze

Složení mobilní fáze bylo vybíráno s ohledem na fyzikálně – chemické vlastnosti a optimální separaci testovaných sloučenin.

#### *Příprava vodných složek mobilních fází*

- 0,1% roztok kyseliny octové byl připraven napipetováním 250  $\mu$ l koncentrované kyseliny octové do vody v 250 ml odměrné baňce a následným doplněním vodou po rysku.
- 0,5% roztok kyseliny octové byl připraven napipetováním 1,25 ml koncentrované kyseliny octové do vody v 250 ml odměrné baňce a následným doplněním vodou po rysku.
- 50mM roztok octanu amonného o pH = 3,8 byl připraven napipetováním 713  $\mu$ l koncentrované kyseliny octové do kádinky obsahující 200 ml vody. Za stálého míchání byl po kapkách přidáván vodný roztok amoniaku, dokud nebylo dosaženo pH = 3,8. Poté byl roztok kvantitativně převeden do 250 ml odměrné baňky, kde byl objem vodou doplněn po rysku.
- 10mM roztok octanu amonného o pH = 4,8 byl připraven napipetováním 143  $\mu$ l koncentrované kyseliny octové do kádinky obsahující 200 ml vody. Za stálého míchání byl po kapkách přidáván vodný roztok amoniaku, dokud nebylo dosaženo pH = 4,8. Poté byl roztok kvantitativně převeden do 250 ml odměrné baňky, kde byl objem vodou doplněn po rysku.
- 50mM roztok octanu amonného o pH = 4,8 byl připraven napipetováním 713  $\mu$ l koncentrované kyseliny octové do kádinky obsahující 200 ml vody. Za stálého míchání byl po kapkách přidáván vodný roztok amoniaku, dokud nebylo dosaženo pH = 4,8. Poté byl roztok kvantitativně převeden do 250 ml odměrné baňky, kde byl objem vodou doplněn po rysku.
- 100mM roztok octanu amonného o pH = 4,8 byl připraven napipetováním 1,426 ml koncentrované kyseliny octové do kádinky obsahující 200 ml vody. Za stálého míchání byl po kapkách přidáván vodný roztok amoniaku, dokud nebylo dosaženo pH = 4,8. Poté byl roztok kvantitativně převeden do 250 ml odměrné baňky, kde byl objem vodou doplněn po rysku.
- 50mM roztok octanu amonného o pH = 5,8 byl připraven napipetováním 713  $\mu$ l koncentrované kyseliny octové do kádinky obsahující 200 ml vody. Za stálého

míchání byl po kapkách přidáván vodný roztok amoniaku, dokud nebylo dosaženo pH = 5,8. Poté byl roztok kvantitativně převeden do 250 ml odměrné baňky, kde byl objem vodou doplněn po rysku.

- 50mM roztok octanu amonného o pH = 6,8 byl připravován rozpuštěním 0,9635 g čisté substance octanu amonného v 250 ml vody. Hodnota pH byla ověřena pH metrem.
- 10mM roztok octanu amonného o pH = 6,8 byl připravován rozpuštěním 0,1927 g čisté substance octanu amonného v 250 ml vody. Hodnota pH byla ověřena pH metrem.
- 100mM roztok octanu amonného o pH = 6,8 byl připravován rozpuštěním 1,9270 g čisté substance octanu amonného v 250 ml vody. Hodnota pH byla ověřena pH metrem.

Vzorec pro výpočet teoretických navážek octanu amonného užitých k přípravě roztoků o pH = 6,8:

$$m = c \cdot V \cdot M ,$$

kde : m ..... navážka octanu amonného  
M..... molární hmotnost octanu amonného  
c..... koncentrace roztoku  
V.....objem roztoku

Přehled užitých mobilních fází uvádí Tab. 6:

Číslo mobilní fáze	Složení mobilní fáze
1	Acetonitril : voda
2	Acetonitril : kyselina octová 0,1%
3	Acetonitril : kyselina octová 0,5%
4	Acetonitril : 50mM octan amonný pH=3,8
5	Acetonitril : 50mM octan amonný pH=4,8
6	Acetonitril : 50mM octan amonný pH=5,8
7	Acetonitril : 50mM octan amonný pH=6,8
8	Acetonitril : 10mM octan amonný pH=6,8
9	Acetonitril : 100mM octan amonný pH=6,8

Tab. 6: Složení použitých mobilních fází



Mobilní fáze byly připravovány vždy čerstvé, ráno v den měření. Voda použitá pro přípravu mobilní fáze byla vždy přefiltrována nedlouho před započatou prací.

Mobilní fáze byla do separační kolony vháněna pomocí binárního čerpadla, které míсило organickou a vodnou složku mobilní fáze v procentuálních poměrech 40:60, 50:50, 60:40, 70:30, 80:20, 85:15, 90:10 a 95:5.

Průtoková rychlost byla zvolena 1 ml/min a objem nástřiku 10  $\mu$ l.

### **4.3.3. Detekce**

Na základě literární rešerše byl zvolen fluorescenční způsob detekce s excitační vlnovou délkou 353 nm a emisní vlnovou délkou 438 nm.

## **5. VÝSLEDKY A DISKUSE**

## 5.1. Vývoj metody

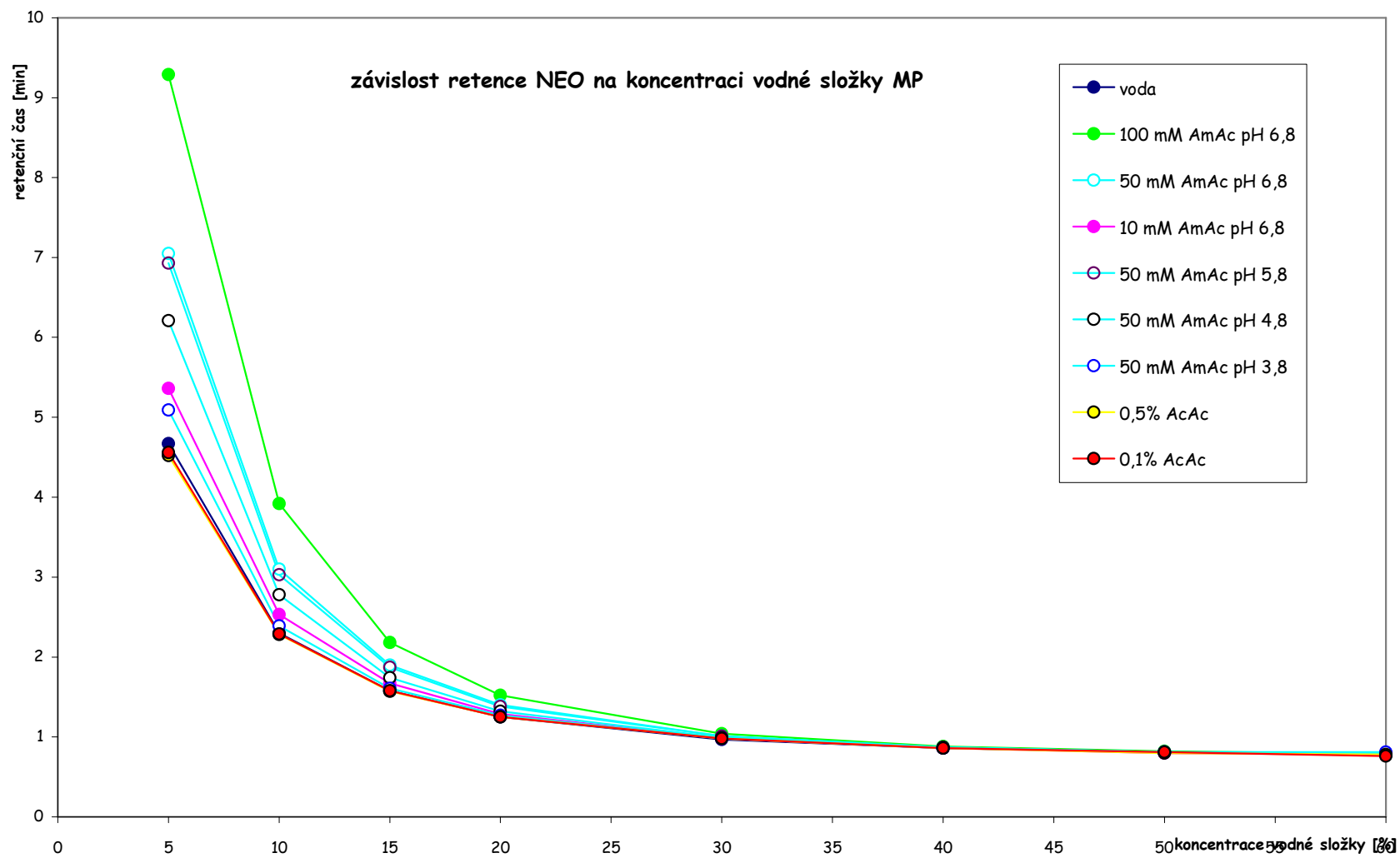
Základním cílem této práce bylo pomocí metody HILIC ověřit retenční chování pteridinových derivátů na zvolených chromatografických kolonách a optimalizovat chromatografické podmínky, za kterých by docházelo k uspokojivé retenci a separaci jednotlivých derivátů.

### 5.1.1. Chromatografická kolona LUNA HILIC

První testovanou chromatografickou kolonou byla LUNA HILIC (3 x 100 mm, 3  $\mu$ m). Ze zkoumaných látek byly jako reprezentativní vybrány biopterin a neopterin. Nastříkovány byly roztoky o koncentraci  $10^{-5}$  mol/l. Objem nástřiku činil 10  $\mu$ l. Cílem bylo orientačně zjistit retenční časy těchto látek a vyhodnotit, která z použitých mobilních fází se nejlépe hodí pro jejich separaci. Sledován byl vliv poměrného složení mobilní fáze, stejně jako vliv pH a koncentrace pufru, který tvořil vodnou složku mobilní fáze. (Tab. 7, Tab. 8, Obrázek 6, Obrázek 7)

Koncentrace	Voda	0,1% AcAc	0,5% AcAc	50 mM AmAc pH=3,8	50 mM AmAc pH=4,8	50 mM AmAc pH=5,8	10 mM AmAc pH=6,8	50 mM AmAc pH=6,8	100 mM AmAc pH=6,8
5%	4,67	4,56	4,52	5,09	6,21	6,93	5,36	7,05	9,29
10%	2,3	2,29	2,28	2,39	2,78	3,03	2,53	3,1	3,92
15%	1,58	1,58	1,57	1,61	1,74	1,87	1,67	1,9	2,18
20%	1,25	1,25	1,25	1,27	1,32	1,38	1,29	1,4	1,52
30%	0,97	0,98	0,98	0,98	0,99	1,01	0,98	1,01	1,04
40%	0,86	0,86	0,86	0,86	0,87	0,87	0,86	0,87	0,88
50%	0,81	0,81	0,8	0,81	0,81	0,81	0,8	0,81	0,82
60%	0,79	0,76	0,78	0,81	0,78	0,79	0,78	0,78	0,79

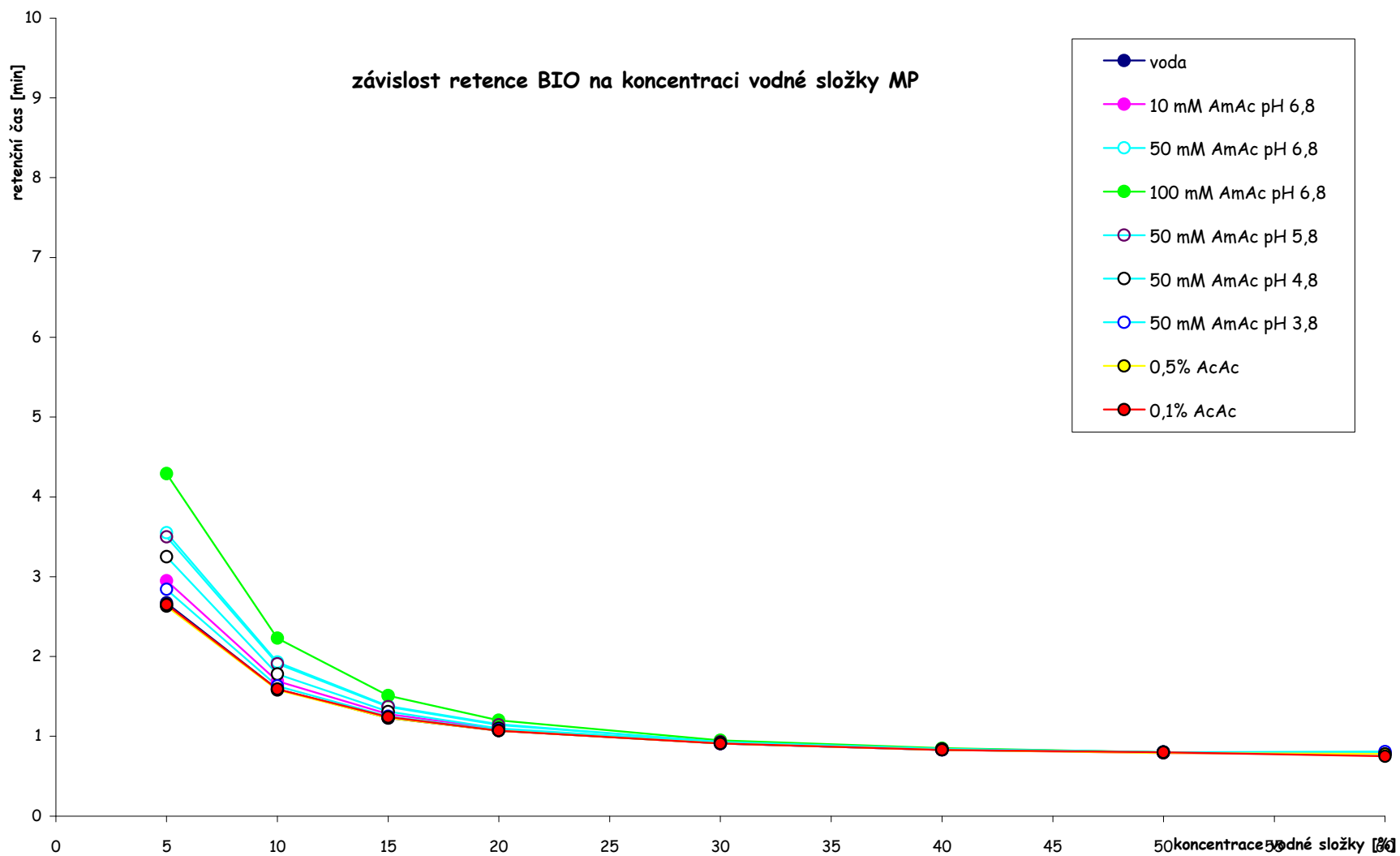
Tab. 7: Retenční časy (min.) neopterinu v závislosti na složení mobilní fáze



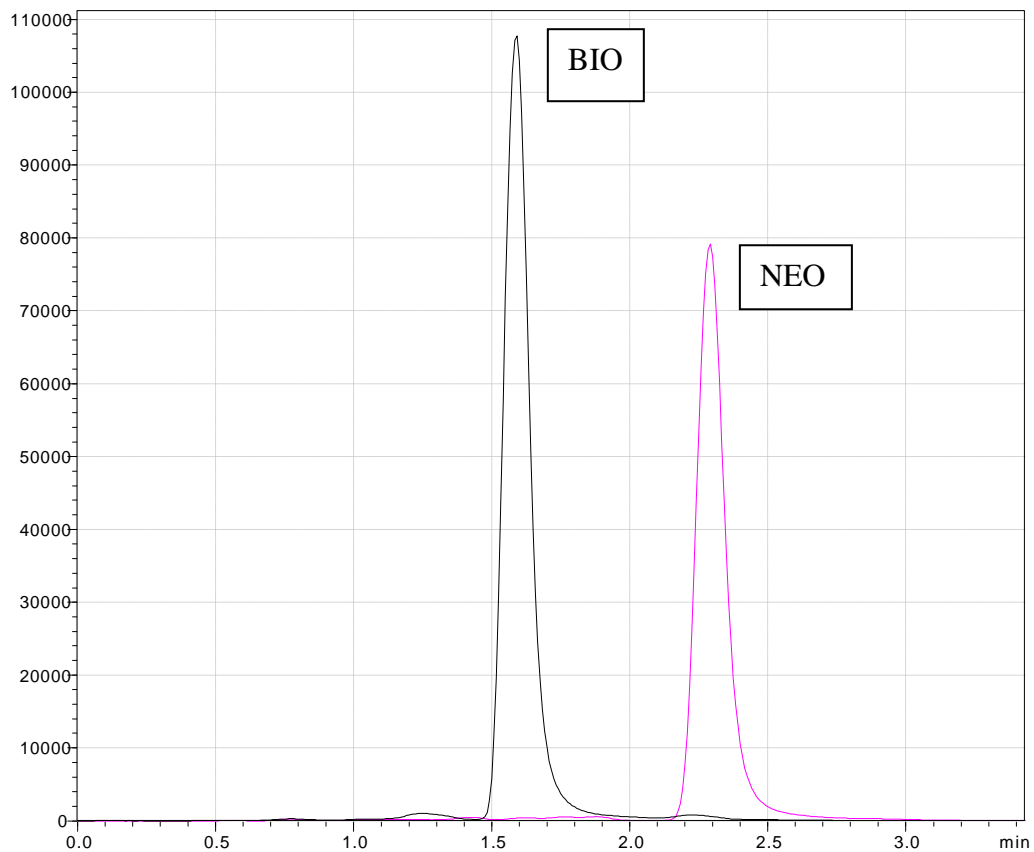
**Obrázek 6: Závislost retence neopterinu na koncentraci vodné složky mobilní fáze, vlivu pH a koncentraci pufru**

Koncentrace	Voda	0,1% AcAc	0.5% AcAc	50 mM AmAc pH=3,8	50 mM AmAc pH=4,8	50 mM AmAc pH=5,8	10 mM AmAc pH=6,8	50 mM AmAc pH=6,8	100 mM AmAc pH=6,8
5%	2,67	2,65	2,63	2,84	3,25	3,5	2,95	3,55	4,29
10%	1,59	1,59	1,58	1,63	1,78	1,91	1,69	1,93	2,23
15%	1,23	1,24	1,23	1,25	1,31	1,37	1,28	1,38	1,51
20%	1,07	1,07	1,07	1,08	1,1	1,14	1,09	1,15	1,2
30%	0,91	0,91	0,91	0,91	0,92	0,93	0,91	0,93	0,95
40%	0,83	0,83	0,83	0,83	0,84	0,84	0,83	0,84	0,85
50%	0,8	0,8	0,79	0,8	0,8	0,8	0,79	0,8	0,8
60%	0,79	0,75	0,78	0,81	0,78	0,79	0,78	0,78	0,79

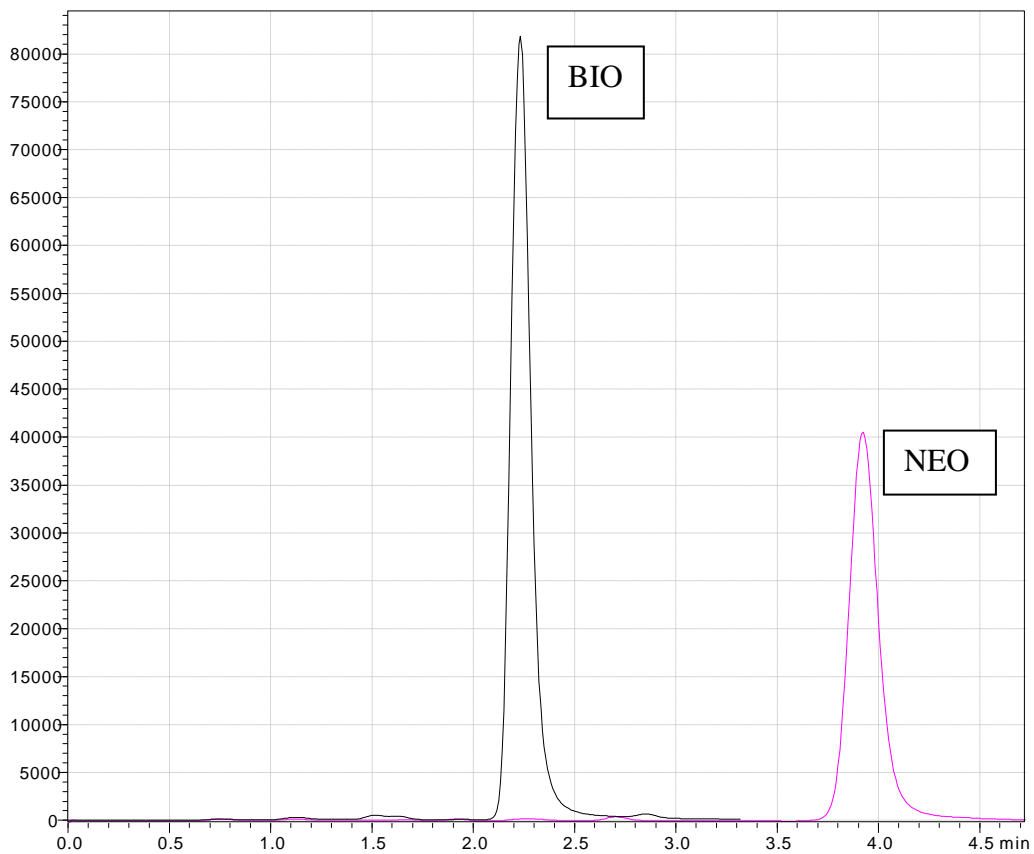
**Tab. 8: Retenční časy (min.) biopterinu v závislosti na složení mobilní fáze**



**Obrázek 7: Závislost retence biopterinu na koncentraci vodné složky mobilní fáze, vlivu pH a koncentraci pufru**



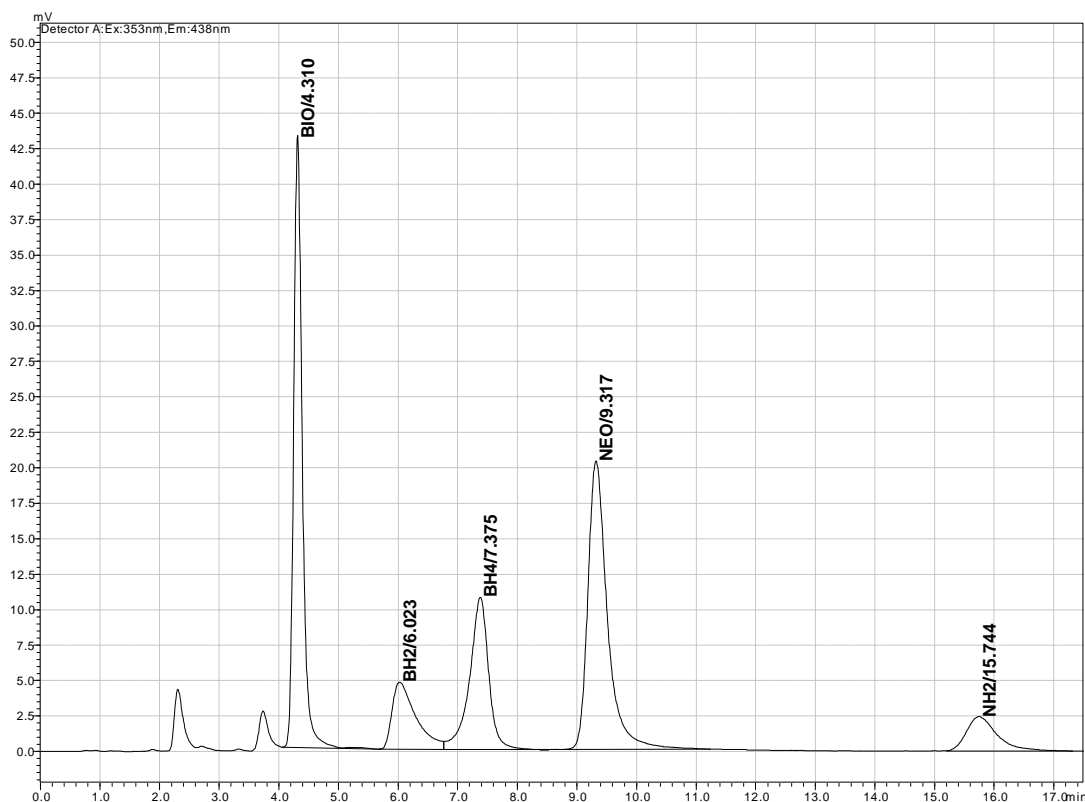
Obrázek 8: 0,1% kys. octová : ACN (10 : 90)



Obrázek 9: 100mM AmAc pH=6,8 : ACN (10 : 90)

Z výše uvedených údajů vyplývá, že NEO je na chromatografické koloně LUNA zadržován více než BIO. V intervalu koncentrací od 60% do 20% vodné složky mobilní fáze (voda, kyselina octová, pufr) se vliv složení, pH a koncentrace mobilní fáze na retenci NEO a BIO jeví jako prakticky bezvýznamný. S dalším snižováním koncentrace vodné složky mobilní fáze však dochází k rapidnímu nárůstu retence NEO. Tendenci ke zvyšování retenčního času pozorujeme i v souvislosti se vzrůstajícím pH a koncentrací octanových pufrů. Nejnižší retenci NEO vykazovala testovaná kolona při užití kyseliny octové jako vodné složky mobilní fáze (Obrázek 8). Naopak nejvyšší retence bylo dosaženo při užití octanového pufru o pH=6,8 jako vodné složky mobilní fáze (Obrázek 9). Retenční chování BIO bylo obdobné, vzestup retenčních časů v intervalu koncentrací od 20% k 5% vodné složky mobilní fáze však nebyl tak strmý. Píky na koloně LUNA HILIC byly za testovaných podmínek symetrické.

S ohledem na data popisující retenční chování BIO a NEO byla k testování separačních schopností chromatografické kolony LUNA pro látky BIO, NEO, BH4 a NH2 zvolena mobilní fáze obsahující ACN : 100 mM octanový pufr o pH=6,8 (95 : 5) (Obrázek 10). Příprava pracovních roztoků NH2 a BH4 se řídila stejnými pravidly jako příprava pracovních roztoků popsaná v kapitole 4.2.



**Obrázek 10: Chromatogram separace BIO, NEO, NH2, BH2 a BH4 - Acetonitril : AmAc 100 mM pH 6,8 (95 : 5). Standard BH2 nastříkován nebyl. Přítomnost jeho píku lze vysvětlit nestabilitou a oxidací BH4 během procesu separace.**



### 5.1.2. Chromatografická kolona OBELISK R

Další testovanou chromatografickou kolonou byla kolona OBELISK R (3,2 x 100 mm, 5  $\mu$ m). Jako v předešlém případě byly nastříkovány roztoky neopterinu a biopterinu o koncentraci  $10^{-5}$  mol/l. Objem nástřiku činil 10  $\mu$ l. Použity byly i stejné mobilní fáze.

Křivky grafu (Obrázek 11, Obrázek 12) popisujícího retenční chování BIO a NEO na chromatografické koloně OBELISK R jsou podobného charakteru jako v předešlém případě. Byly získány s využitím dat uvedených v Tab. 9 a Tab. 10. Markantní je však nárůst retenčního času NEO zejména v rozmezí koncentrací vodné složky mobilní fáze od 10% k 5%, kde např. u mobilní fáze obsahující 5% 10mM octanového pufru o pH=6,8 dosahoval retenční čas NEO 45 minut. S ohledem na trend v analytické chemii, který směřuje k stále rychlejší analýzám, je tento jev nežádoucí. Tendence ke zvyšování retenčního času byla pozorována i v souvislosti se vzrůstajícím pH. Při porovnání mobilních fází, kde vodné složky představovaly octanové pufrů o pH=6,8 a koncentracích 10 mM, 50 mM a 100 mM je patrné, že se retence zvyšuje s klesající koncentrací těchto pufrů.

Retenční chování BIO bylo obdobné, vzestup retenčních časů v intervalu koncentrací od 20% k 5% vodné složky mobilní fáze však nebyl tak strmý. Symetrie píků byla narušena zřetelným chvostováním.

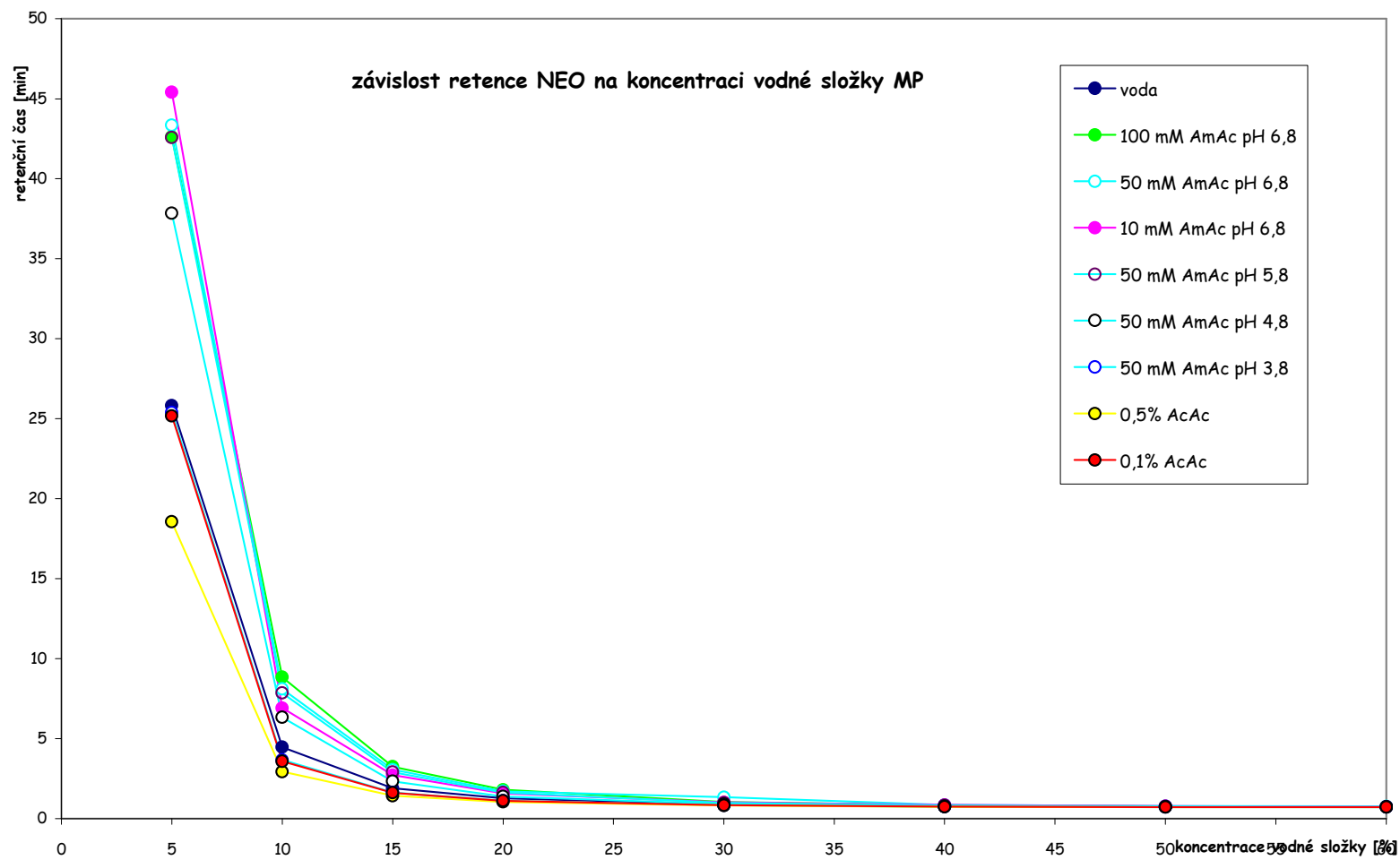
Nejnižší retence bylo dosaženo při užití 0,5% kyseliny octové (Obrázek 13) a naopak nejvyšší retence bylo dosaženo při užití octanového pufru o koncentraci 10 mM a pH=6,8 jako vodné složky mobilní fáze. Příklad retenčního chování BIO a NEO při použití octanového pufru znázorňuje Obrázek 14. Hodnoty retenčních časů napovídaly, že by u testovaných látek nedocházelo k případné celkové separaci všech studovaných derivátů. Z této skutečnosti vyplývá, že kolona OBELISK R není vhodná pro analýzu pteridinů.

Koncentrace	Voda	0,1% AcAc	0.5% AcAc	50 mM AmAc pH=3,8	50 mM AmAc pH=4,8	50 mM AmAc pH=5,8	10 mM AmAc pH=6,8	50 mM AmAc pH=6,8	100 mM AmAc pH=6,8
5%	25,82	25,18	18,56	25,38	37,85	42,59	45,41	43,35	42,61
10%	4,46	3,58	2,94	3,67	6,32	7,85	6,91	8,1	8,84
15%	1,9	1,61	1,43	1,63	2,34	2,91	2,71	3,06	3,25
20%	1,26	1,11	1,04	1,12	1,38	1,63	1,57	1,71	1,81
30%	0,9	0,84	0,82	0,83	0,91	0,99	1,02	1,34	1,03
40%	0,78	0,75	0,74	0,74	0,78	0,82	0,85	0,85	0,84
50%	0,75	0,72	0,72	0,72	0,73	0,76	0,78	0,78	0,77
60%	0,74	0,72	0,72	0,72	0,72	0,74	0,74	0,76	0,75

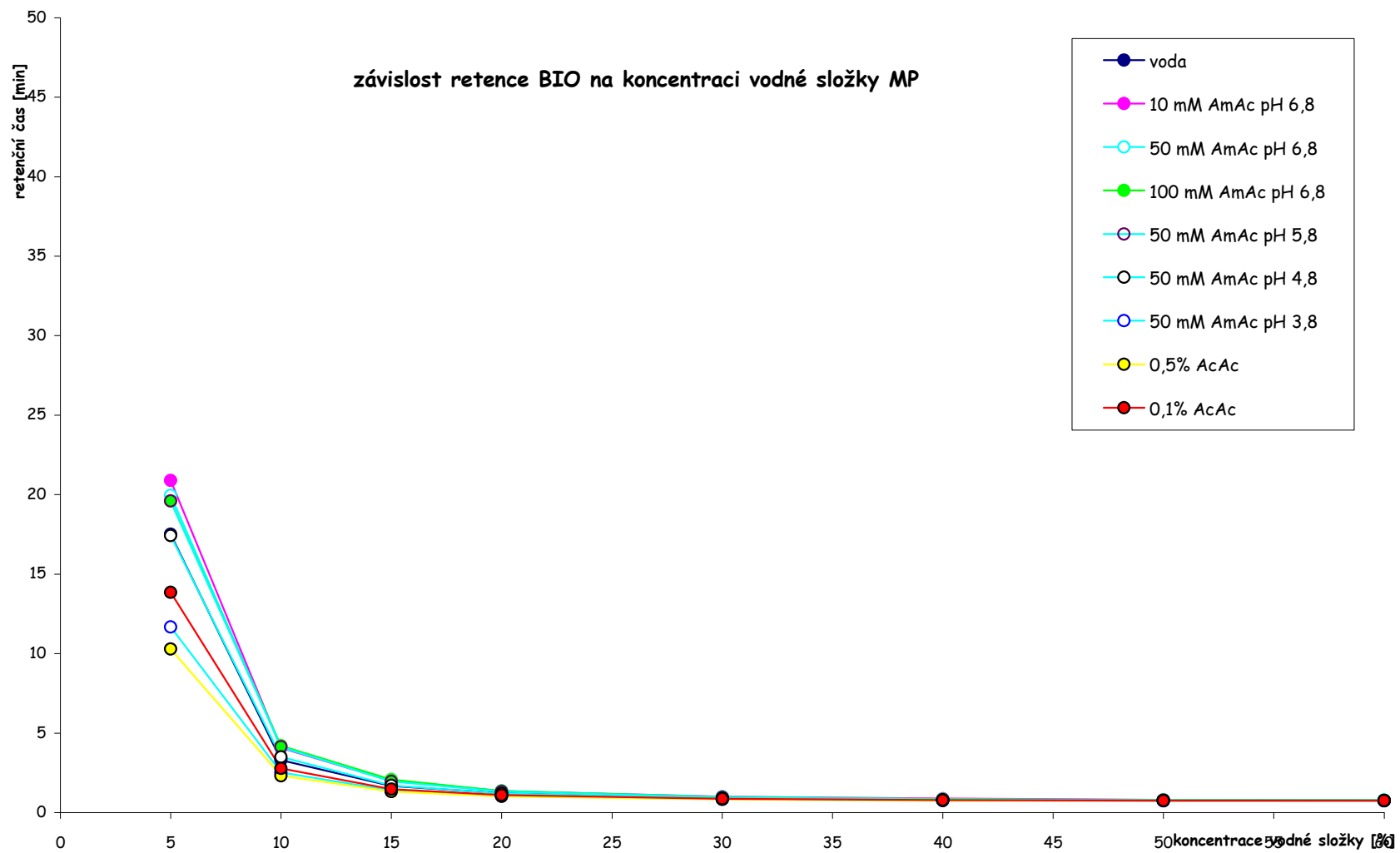
Tab. 9: Retenční časy (min.) neopterinu v závislosti na složení mobilní fáze

Koncentrace	Voda	0,1% AcAc	0.5% AcAc	50 mM AmAc pH=3,8	50 mM AmAc pH=4,8	50 mM AmAc pH=5,8	10 mM AmAc pH=6,8	50 mM AmAc pH=6,8	100 mM AmAc pH=6,8
5%	17,52	13,86	10,29	11,68	17,42	19,6	20,9	19,95	19,61
10%	3,31	2,78	2,32	2,53	3,5	4,14	4,08	4,1	4,21
15%	1,68	1,48	1,33	1,4	1,71	1,96	2	2,04	2,07
20%	1,22	1,1	1,03	1,05	1,2	1,32	1,36	1,37	1,37
30%	0,93	0,87	0,84	0,84	0,89	0,95	1	0,99	0,97
40%	0,83	0,79	0,77	0,77	0,79	0,83	0,88	0,85	0,84
50%	0,79	0,76	0,75	0,74	0,76	0,78	0,81	0,8	0,79
60%	0,78	0,76	0,75	0,74	0,75	0,77	0,77	0,79	0,78

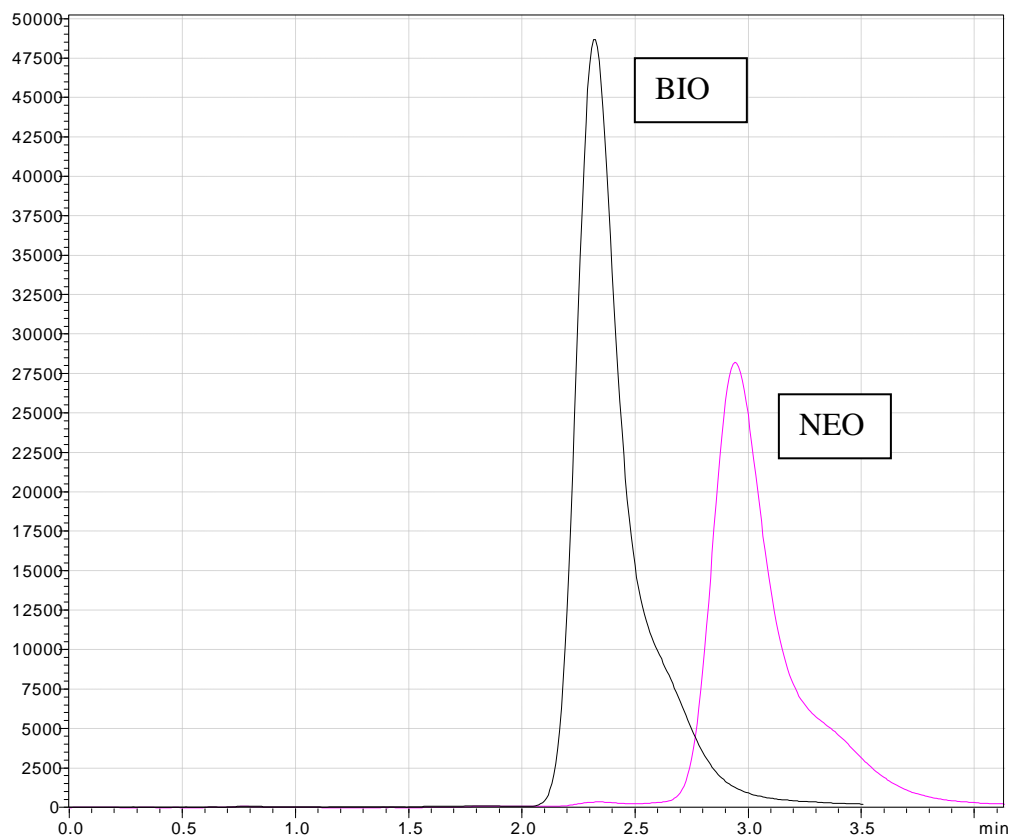
Tab. 10: Retenční časy (min.) biopterinu v závislosti na složení mobilní fáze



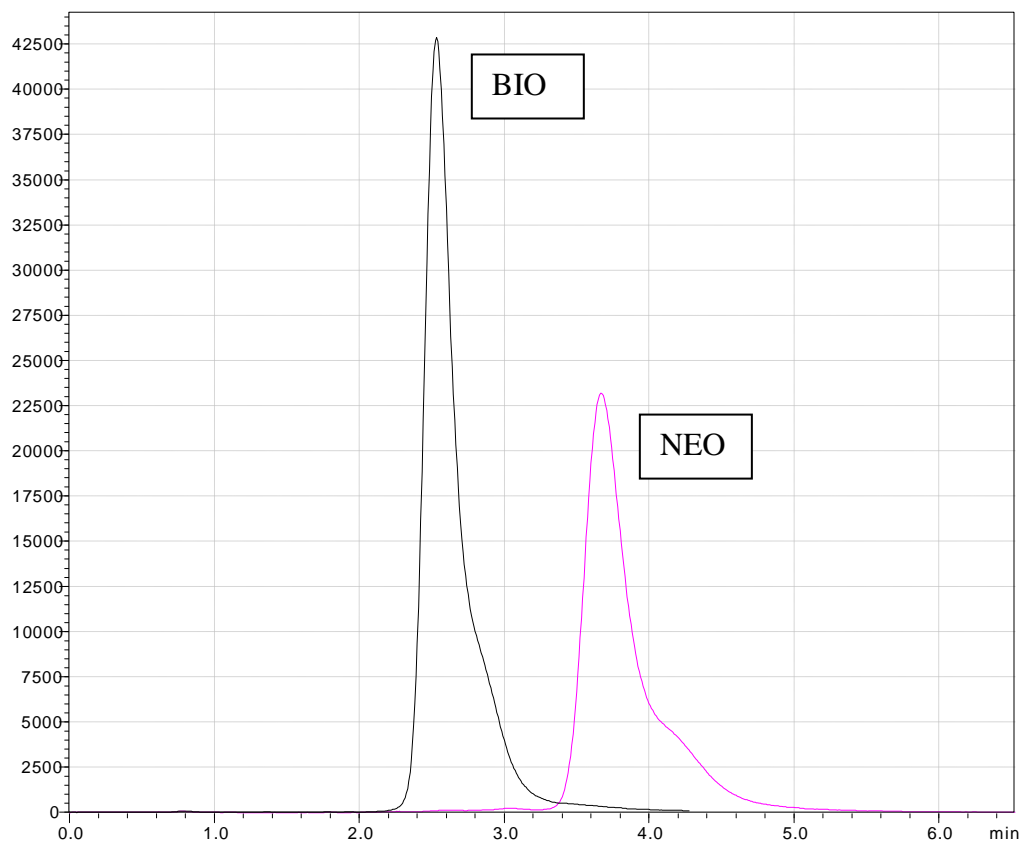
Obrázek 11: Závislost retence neopterinu na koncentraci vodné složky mobilní fáze, vlivu pH a koncentraci pufru



**Obrázek 12: Závislost retence biopterinu na koncentraci vodné složky mobilní fáze, vlivu pH a koncentraci pufru**



Obrázek 13: 0,5% kys. octová : ACN (10 : 90)



Obrázek 14: 50mM AmAc pH=3,8 : ACN (10 : 90)

### 5.1.3. Chromatografická kolona OBELISK N

Poslední testovanou chromatografickou kolonou byla kolona OBELISK N (3,2 x 100 mm, 5  $\mu$ m). Roztoky NEO a BIO o koncentraci  $10^{-5}$  mol/l byly znovu nastříkovány v objemu 10  $\mu$ l. S ohledem na výrobcem udávané rozmezí pH (do pH=5,0), při kterém je možno tuto kolonu užít, aniž by se riskovalo její poškození, byl výčet mobilních fází obměněn a zúžen. Byly použity mobilní fáze, které jako vodnou složku obsahovaly vodu, 0,1% kyselinu octovou, 0,5% kyselinu octovou, 50mM octanový pufr pH=3,8, 10mM octanový pufr pH=4,8, 50mM octanový pufr pH=4,8 a 100mM octanový pufr pH=4,8. Poměry organických a vodných složek mobilních fází byly zachovány stejné jako v předcházejících měřeních.

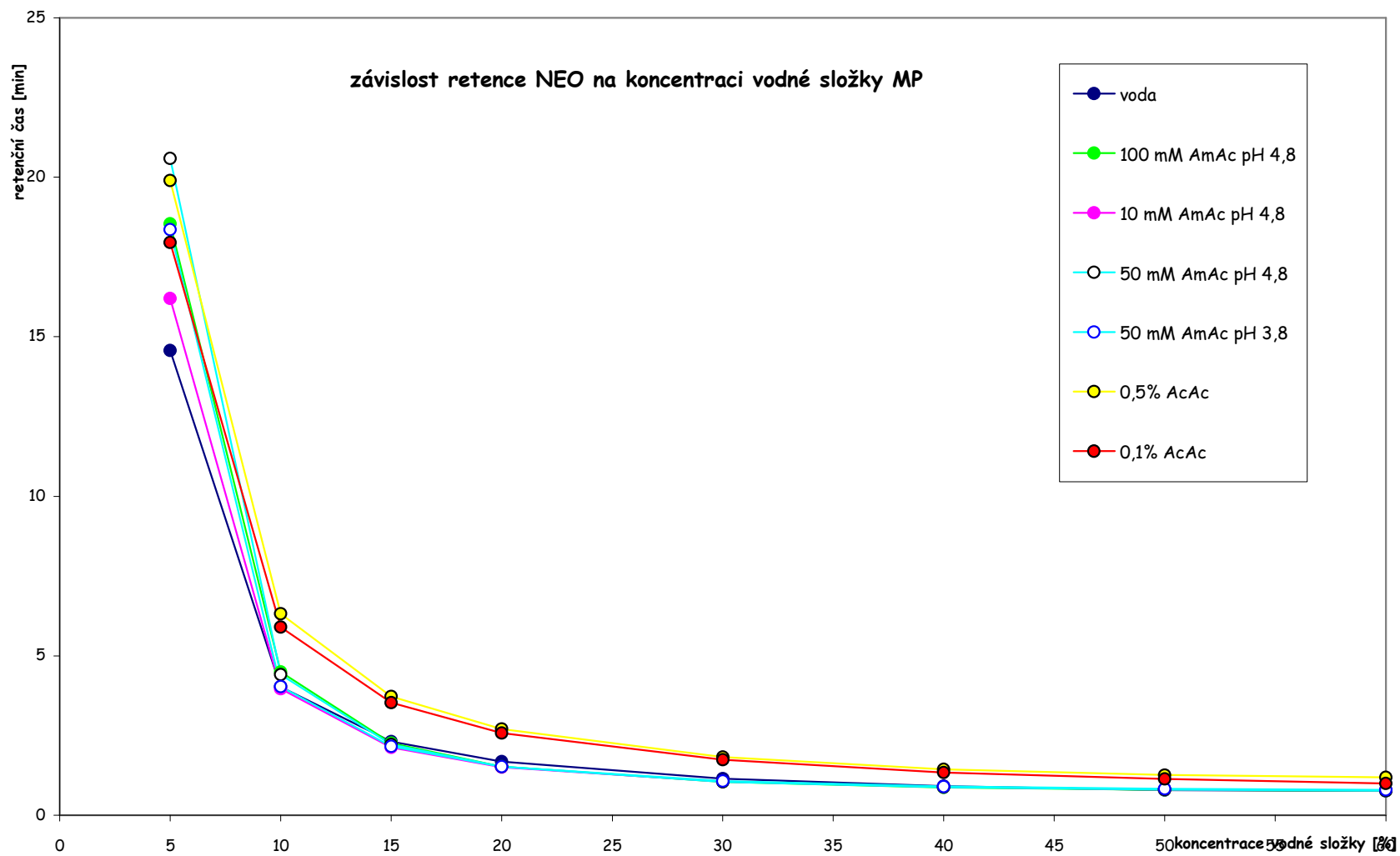
Křivky grafu (Obrázek 15, Obrázek 16) popisujícího retenční chování BIO a NEO na chromatografické koloně OBELISK N mají obdobný tvar jako u předchozích kolon. Naměřená data uvádějí Tab. 11 a Tab. 12. U obou testovaných látek bylo nejvyšší retence dosaženo při použití mobilní fáze, která obsahovala jako vodnou složku 0,5% kyselinu octovou. Ostatní zkoušené kolony naopak vykazovaly při použití mobilní fáze s kyselinou octovou nízkou retenci BIO a NEO. Píky byly symetrické. Ukázky retenčního chování znázorňují Obrázek 17 a Obrázek 18.

Koncentrace	Voda	0,1% AcAc	0,5% AcAc	50 mM AmAc pH=3,8	10 mM AmAc pH=4,8	50 mM AmAc pH=4,8	100 mM AmAc pH=4,8
5%	14,57	17,95	19,9	18,36	16,2	20,59	18,54
10%	4,03	5,9	6,32	4,04	3,96	4,41	4,49
15%	2,31	3,53	3,73	2,16	2,13	2,22	2,26
20%	1,68	2,58	2,71	1,53	1,51	1,53	1,53
30%	1,15	1,74	1,83	1,07	1,06	1,05	1,05
40%	0,92	1,34	1,44	0,9	0,89	0,88	0,87
50%	0,79	1,14	1,26	0,83	0,81	0,81	0,8
60%	0,76	1	1,19	0,8	0,78	0,77	0,77

Tab. 11: Retenční časy (min.) neopterinu závislé na složení mobilní fáze

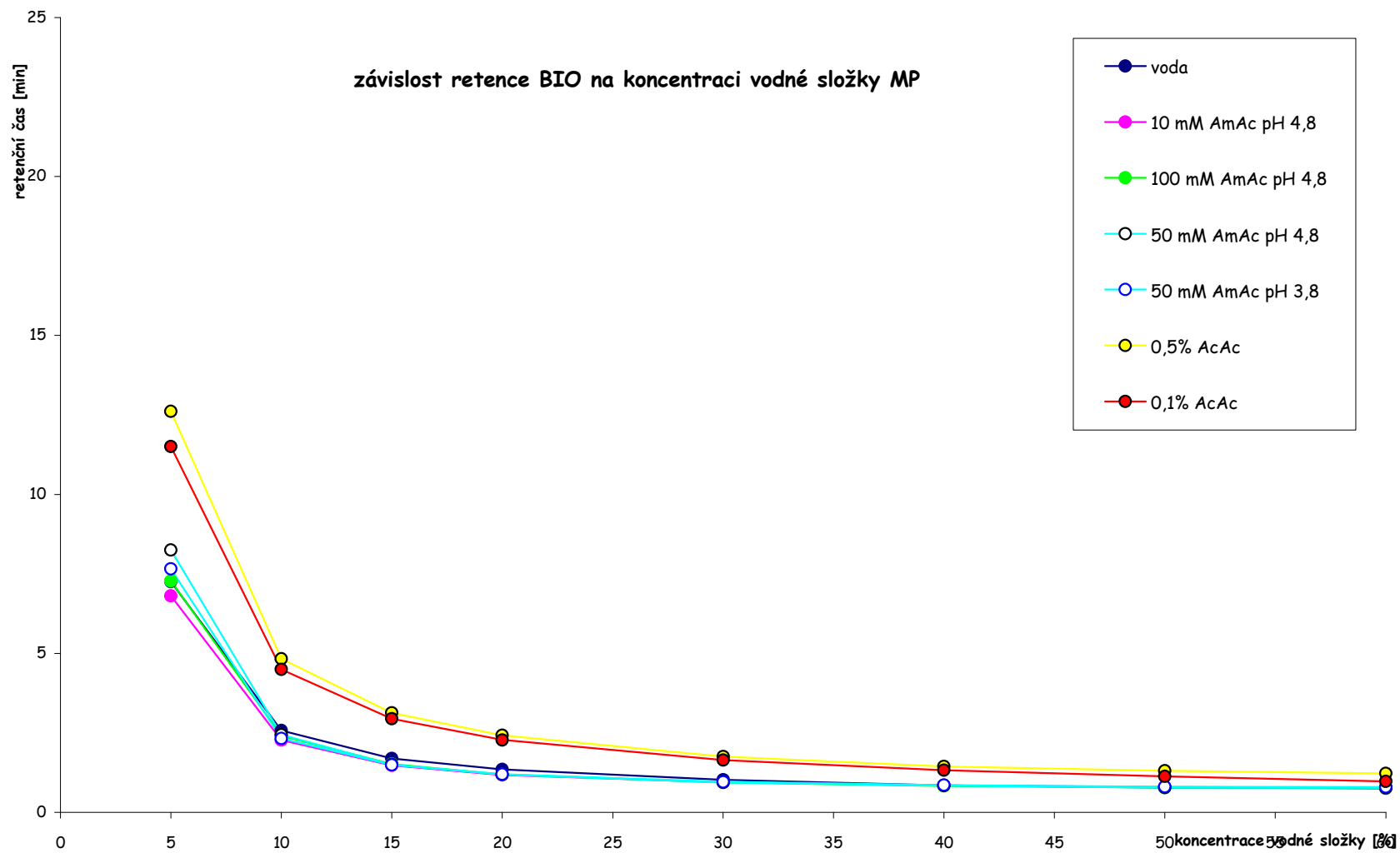
Koncentrace	Voda	0,1% AcAc	0,5% AcAc	50 mM AmAc pH=3,8	10 mM AmAc pH=4,8	50 mM AmAc pH=4,8	100 mM AmAc pH=4,8
5%	7,26	11,51	12,61	7,66	6,81	8,25	7,28
10%	2,57	4,5	4,83	2,32	2,27	2,44	2,41
15%	1,7	2,95	3,13	1,49	1,48	1,51	1,52
20%	1,35	2,28	2,43	1,2	1,18	1,19	1,19
30%	1,03	1,65	1,76	0,96	0,95	0,94	0,94
40%	0,85	1,33	1,45	0,86	0,85	0,84	0,83
50%	0,78	1,13	1,31	0,81	0,8	0,79	0,79
60%	0,76	0,98	1,23	0,8	0,77	0,77	0,77

Tab. 12: Retenční časy (min.) biopterinu závislé na složení mobilní fáze

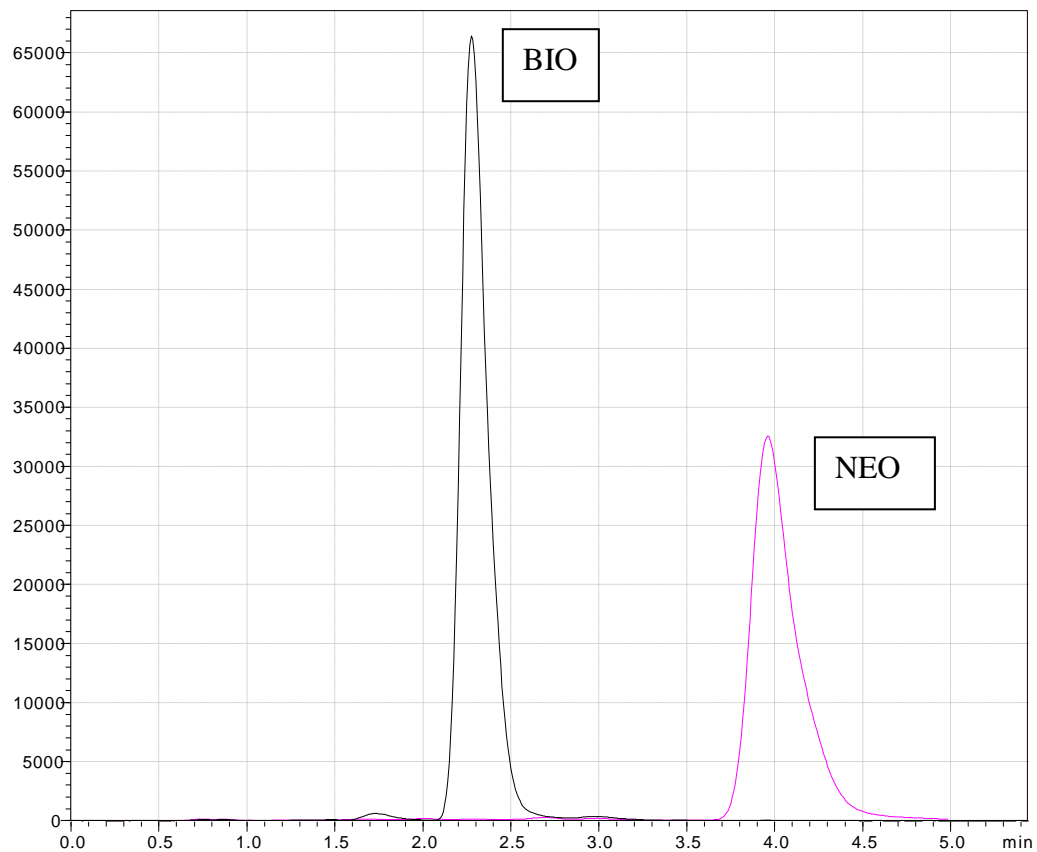


Obrázek 15: Závislost retence neopterinu na koncentraci vodné složky mobilní fáze, pH a koncentraci pufru

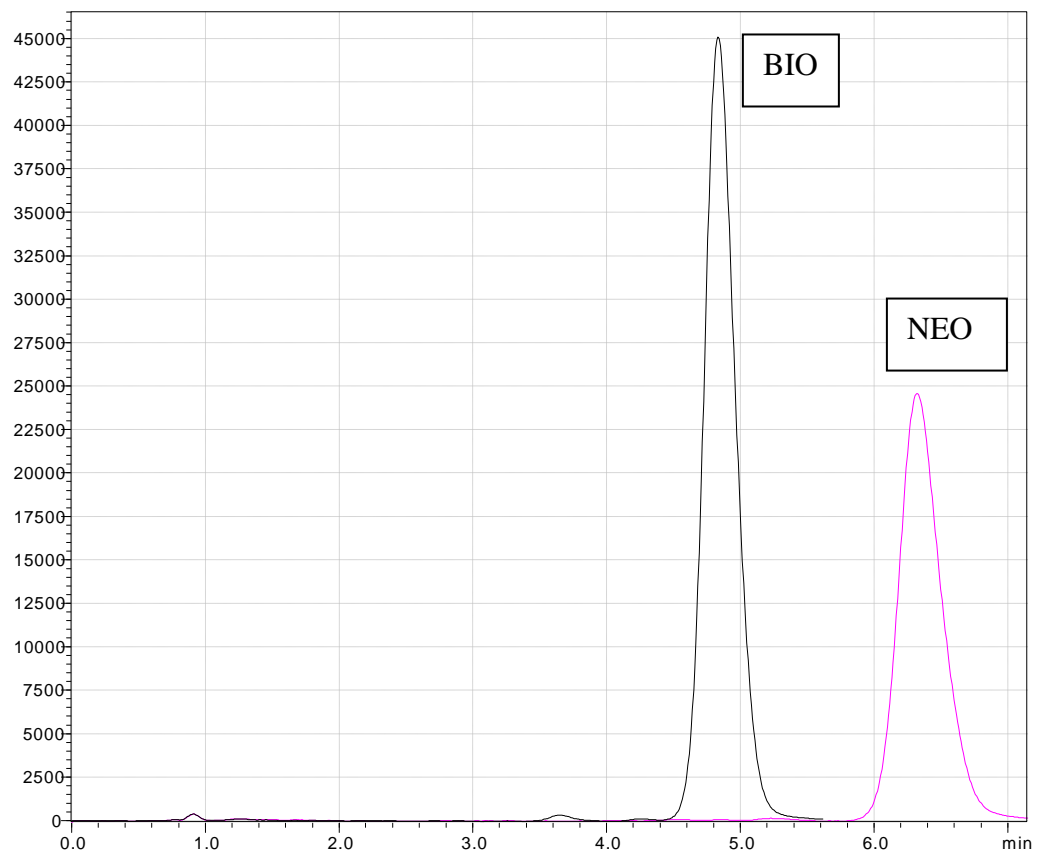




**Obrázek 16: Závislost retence biopterinu na koncentraci vodné složky mobilní fáze, pH a koncentraci pufru**



Obrázek 17: 10 mM AmAc pH=4,8 : ACN (10 : 90)



Obrázek 18: 0,5% kys. octová : ACN (10 : 90)

## 5.2. Validace metody HILIC a test způsobilosti systému

### *Testované parametry*

- Účinnost chromatografické kolony
- Faktor symetrie píků
- Rozlišení píků
- Opakovatelnost nástřiku
- Linearita a kalibrační rozmezí
- Limit detekce a kvantifikace

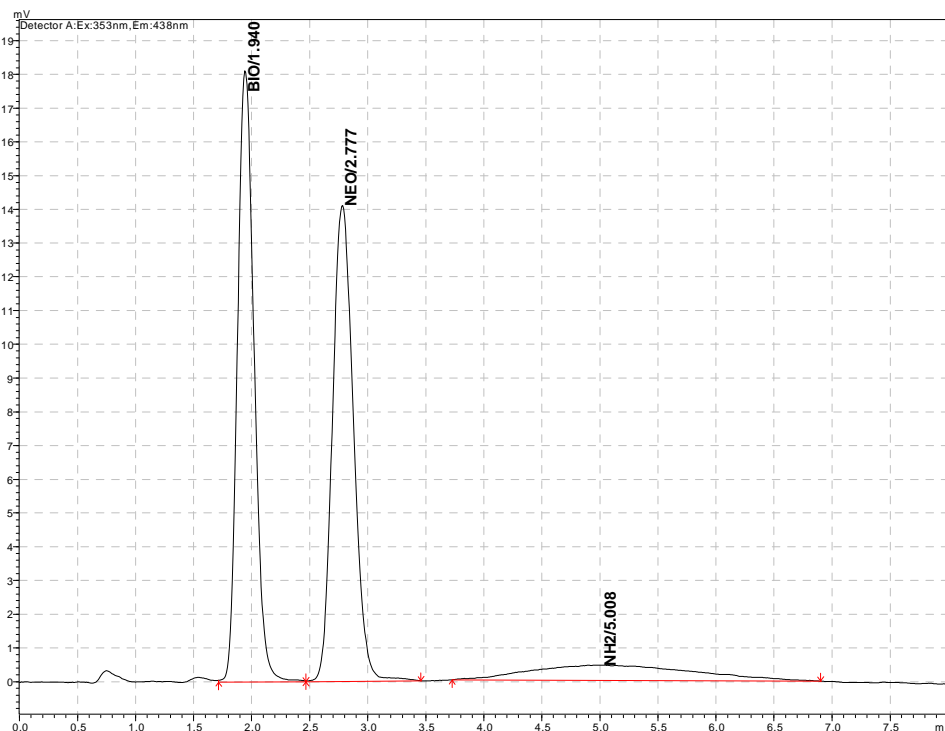
Zmíněné parametry byly zkoumány na dvou chromatografických kolonách za podmínek, které byly po předešlých testech vyhodnoceny jako optimální pro analýzu směsi standardů a uvádí je Tab. 13.

Analytická kolona	Mobilní fáze	Průtoková rychlost (ml/min)	Dávkovaný objem (μl)	Teplota (°C)	Detekce (nm)
LUNA	100mM AmAc pH=6,8 : ACN (13 : 87)	1	1	25	Fluorescenční 353/438
OBELISK N	100mM AmAc pH=4,8 : ACN (13 : 87)	1	1	25	Fluorescenční 353/438

**Tab. 13: Podmínky užití pro testování uvedených parametrů**

## 5.2.1. Chromatografická kolona OBELISK N

Byl proveden test separačních schopností s látkami BIO, NEO a NH2. U píku NH2 docházelo k nežádoucímu rozmytí (Obrázek 19).



Obrázek 19: 100mM AmAc pH=4,8 : ACN (13 : 87)

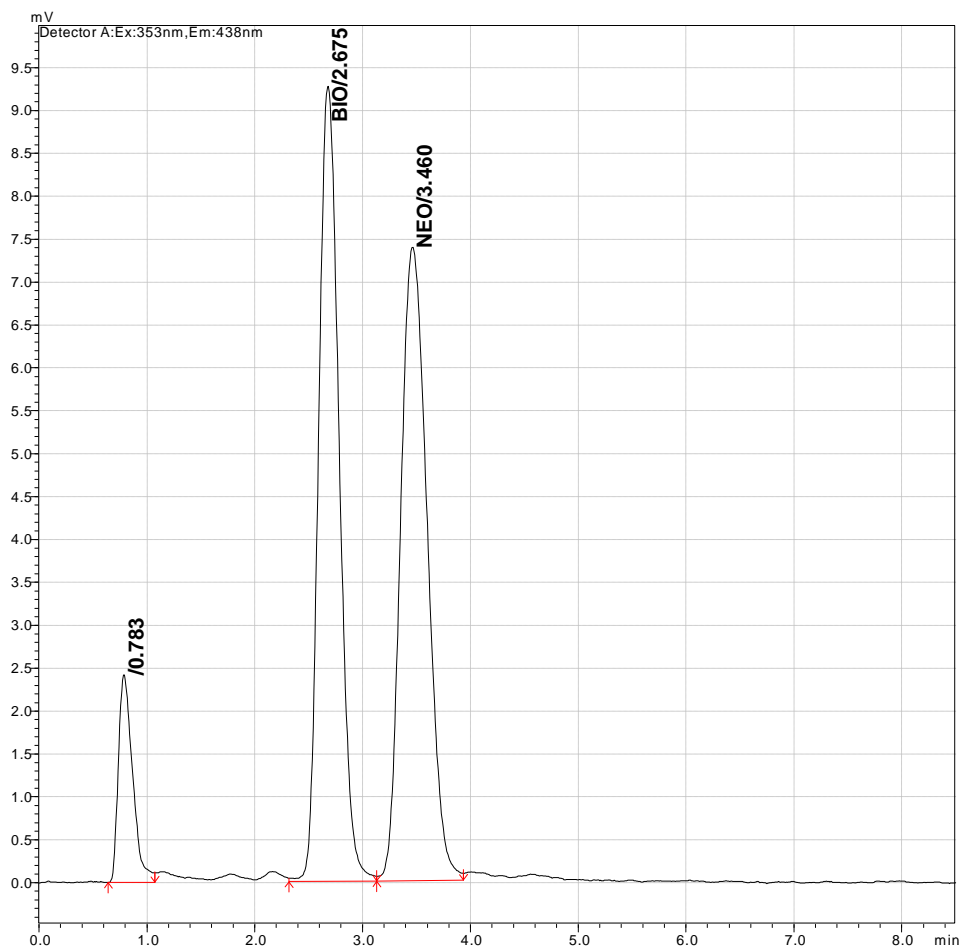
### Test způsobilosti systému

S ohledem na provedený test separačních schopností a nevhodný tvar píku NH2 byl pro test způsobilosti systému použit roztok směsi standardů BIO a NEO (Obrázek 20). Průměrné hodnoty testovaných parametrů uvádí Tab. 14.

Látka	Účinnost (N)	HETP	Faktor asymetrie ( $A_S$ )	Rozlišení ( $R_S$ )
BIO	908	165	1,18	6,17
NEO	913	164	1,20	1,95

Tab. 14: Průměrné hodnoty testovaných parametrů: účinnost chromatografické kolony(N), výškový ekvivalent teoretického patra(HETP), faktor symetrie píku( $A_S$ ), rozlišení( $R_S$ )

Požadavek na počet teoretických pater  $N > 900$  byl splněn u obou testovaných látek. Požadavek na faktor symetrie píku  $0,9 < A_S < 1,5$  byl splněn u obou testovaných látek. Požadavek na rozlišení  $R_S > 1,5$  byl splněn u obou testovaných látek.



Obrázek 20: 100mM AmAc pH=4,8 : ACN (13 : 87)

### Opakovatelnost plochy píku a opakovatelnost pro retenční čas

Průměrné hodnoty pro opakovatelnost plochy píku a opakovatelnost retenčního času uvádí Tab. 15.

Látka	AØ	SD <sub>(A)</sub>	RSD <sub>(A)</sub> (%)	R <sub>t</sub> (min.)	SD <sub>(Rt)</sub>	RSD <sub>(Rt)</sub> (%)
BIO	122833	497,9	<b>0,41</b>	2,64	0,03	<b>0,99</b>
NEO	124480	938,2	<b>0,75</b>	3,43	0,03	<b>0,77</b>

Tab. 15: Průměrná plocha píku (AØ), směrodatní odchylka (SD), relativní směrodatná odchylka (RSD) a průměrný retenční čas (R<sub>t</sub>) pro BIO a NEO

Požadavek na RSD<1% pro opakovatelnost plochy píku byl splněn u obou testovaných látek.

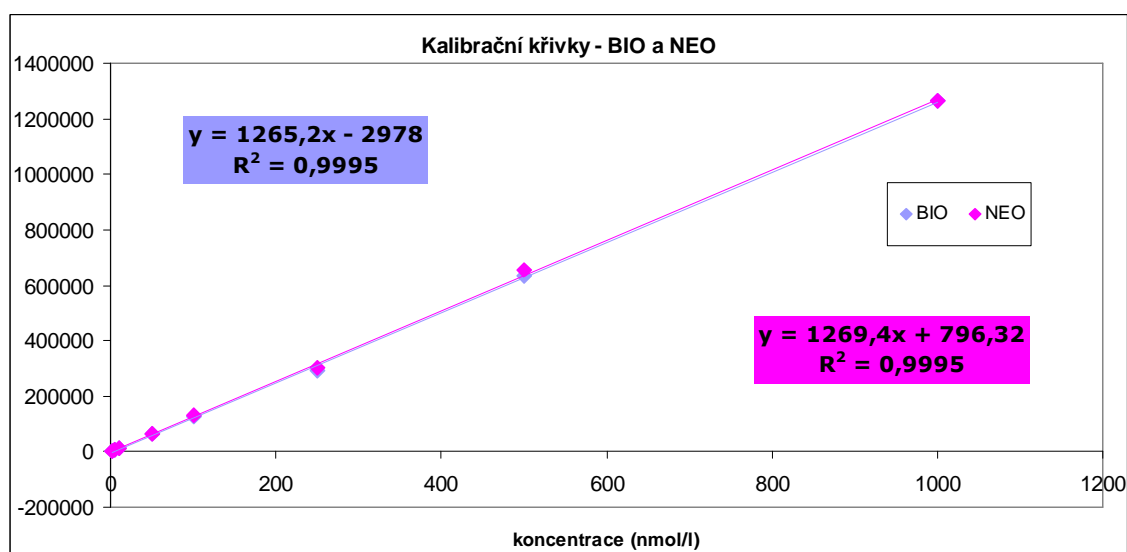
Požadavek na RSD<1% pro opakovatelnost retenčního času byl splněn u obou testovaných látek.

### Linearita a kalibrační rozmezí

Pro sestavení kalibračních křivek BIO a NEO (Obrázek 21) byly užity roztoky o koncentracích, které uvádí Tab. 16. Změřeny byly třikrát. Kalibrační křivky BIO a NEO byly v daném rozmezí koncentrací (1-1000 nmol/l) lineární. Kvantitativní limit pro obě testované látky představovala hodnota 1 nmol/l, detekční limit pak 0,3 nmol/l.

Koncentrace (nmol/l)	$A_{\emptyset}$ (BIO)	$A_{\emptyset}$ (NEO)
1	1760	2068
5	6763	7004
10	13314	14167
50	62962	66256
100	125883	130179
250	289503	300239
500	635091	653141
1000	1265004	1265535

Tab. 16: Kalibrační závislost BIO a NEO-koncentrace jednotlivých roztoků, průměrná plocha píku ( $A_{\emptyset}$ )



Obrázek 21: Kalibrační křivky BIO a NEO

## 5.2.2. Chromatografická kolona LUNA HILIC

### Test způsobilosti systému

Byl použit roztok směsi standardů BIO, NEO a NH2 o koncentraci  $10^{-5}$  mol/l (Obrázek 22). BH4 byl rovněž separován, avšak s ohledem na vysokou nestabilitu a degradaci nebyl pro kvantifikační analýzu použit. BH4 velmi rychle vlivem oxidace a teploty (HPLC systém bez možnosti chlazení) přechází na BH2 a BIO. Docházelo by ke zkreslování výsledků měření. Průměrné hodnoty testovaných parametrů uvádí Tab. 17.

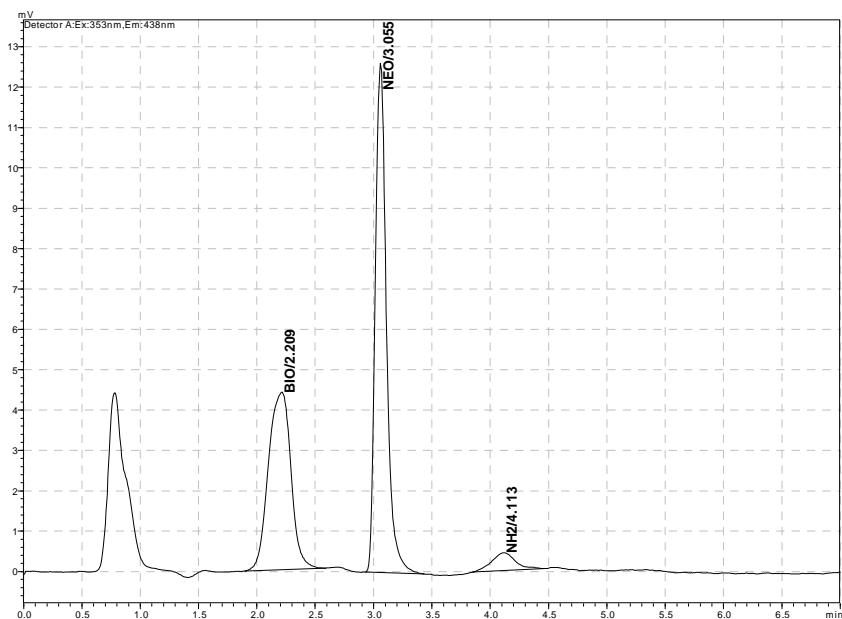
Látka	Účinnost (N)	HETP	Faktor symetrie ( $A_S$ )	Rozlišení ( $R_S$ )
BIO	646	232	0,95	3,70
NEO	4609	33	1,25	3,26
NH2	1905	79	1,08	3,79

Tab. 17: Průměrné hodnoty testovaných parametrů: účinnost chromatografické kolony(N), výškový ekvivalent teoretického patra(HETP), faktor symetrie píku( $A_S$ ), rozlišení( $R_S$ )

Požadavek na počet teoretických pater  $N > 900$  byl splněn pouze u NEO a NH2.

Požadavek na faktor symetrie píku  $0,9 < A_S < 1,5$  byl splněn pro všechny analyzované látky.

Požadavek na rozlišení  $R_S > 1,5$  byl splněn pro všechny analyzované látky.



Obrázek 22: 100 mM AmAc pH=6,8 : ACN (13 : 87)

### Opakovatelnost plochy píku a pro retenční čas

Získaná data uvádí Tab. 18.

Látka	AØ	SD <sub>(A)</sub>	RSD <sub>(A)</sub> (%)	R <sub>t</sub> (min.)	SD <sub>(Rt)</sub>	RSD <sub>(Rt)</sub> (%)
BIO	57806	610	<b>1,05</b>	2,21	0,003	<b>0,16</b>
NEO	82268	999	<b>1,21</b>	3,05	0,006	<b>0,19</b>
NH2	6291	114.46	<b>1,82</b>	4,10	0,010	<b>0,29</b>

Tab. 18: Průměrná plocha píku (AØ), směrodatná odchylka (SD), relativní směrodatná odchylka (RSD) a průměrný retenční čas (R<sub>t</sub>), pro BIO, NEO a NH2

Požadavek na RSD<1% pro opakovatelnost plochy píku nebyl splněn u žádné analyzované látky. U BIO a NEO však bylo překročení limitu pouze nevýrazné.

Požadavek na RSD<1% pro opakovatelnost retenčního času byl splněn u všech testovaných látek.

### Linearita a kalibrační rozmezí

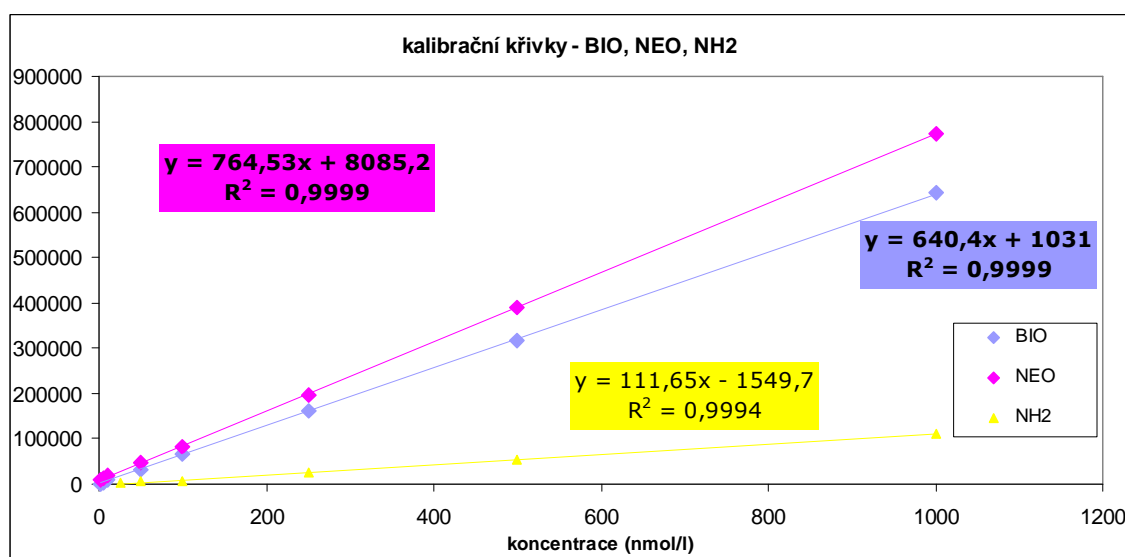
Kalibrační křivky BIO, NEO a NH2 (Obrázek 23) byly sestaveny z deseti kalibračních bodů o koncentracích, které uvádí Tab.19. Kalibrační body byly měřeny třikrát.

Koncentrace (nmol/l)	AØ (BIO)	AØ (NEO)	AØ (NH2)
1	1142	10569	-
2,5	1409	10826	-
5	3956	13316	-
10	9821	18042	-
25	16386	27995	2289
50	31706	46045	4841
100	66637	81037	7891
250	161854	197549	26429
500	316763	388843	53704
1000	643368	774111	110478

Tab. 19: Kalibrační závislost BIO, NEO a NH2 - koncentrace jednotlivých roztoků, průměrná plocha píku(AØ)



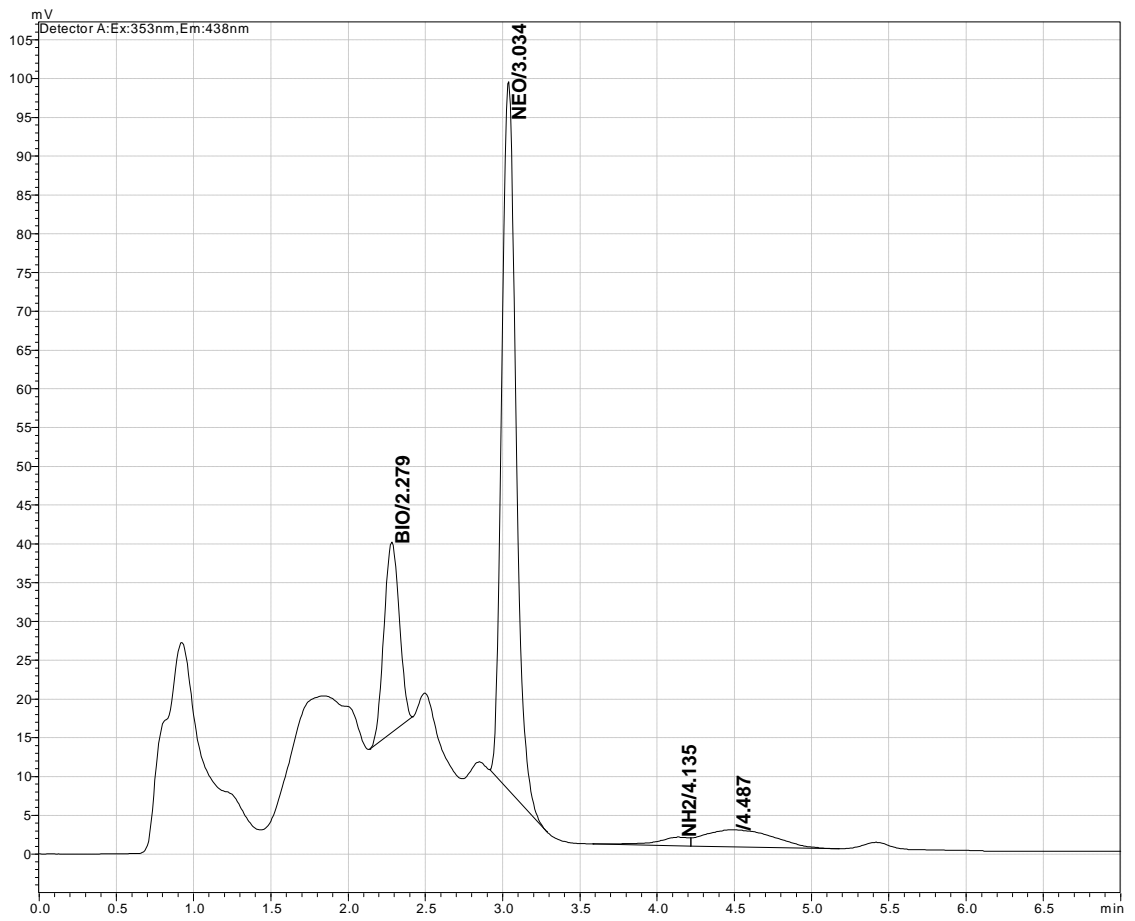
Ze získaných dat je patrné, že BIO a NEO poskytovaly dobrou odezvu při všech zvolených koncentracích. Kvantitativní limit pro obě testované látky představovala hodnota 1 nmol/l, detekční limit pak 0,3 nmol/l. Kvantitativním limitem pro NH<sub>2</sub> byla hodnota koncentrace 25 nmol/l, detekčním limitem pak hodnota 7,6 nmol/l. Kalibrační křivky BIO a NEO byly v daném rozmezí koncentrací (1-1000 nmol/l) lineární. Kalibrační křivka NH<sub>2</sub> byla s ohledem na kvantitativní limit lineární v rozmezí koncentrací 25-1000 nmol/l.



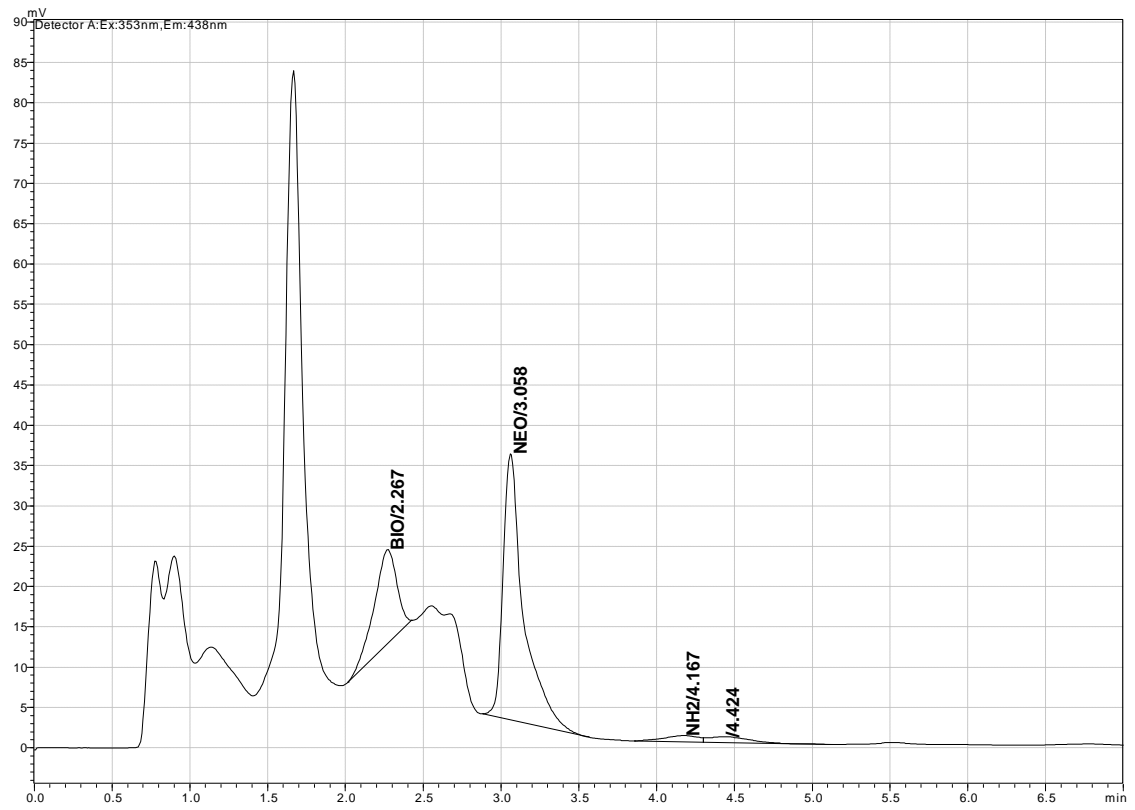
Obrázek 23: Kalibrační křivky BIO, NEO a NH<sub>2</sub>

### 5.3. Stanovení sledovaných látek v biologickém materiálu

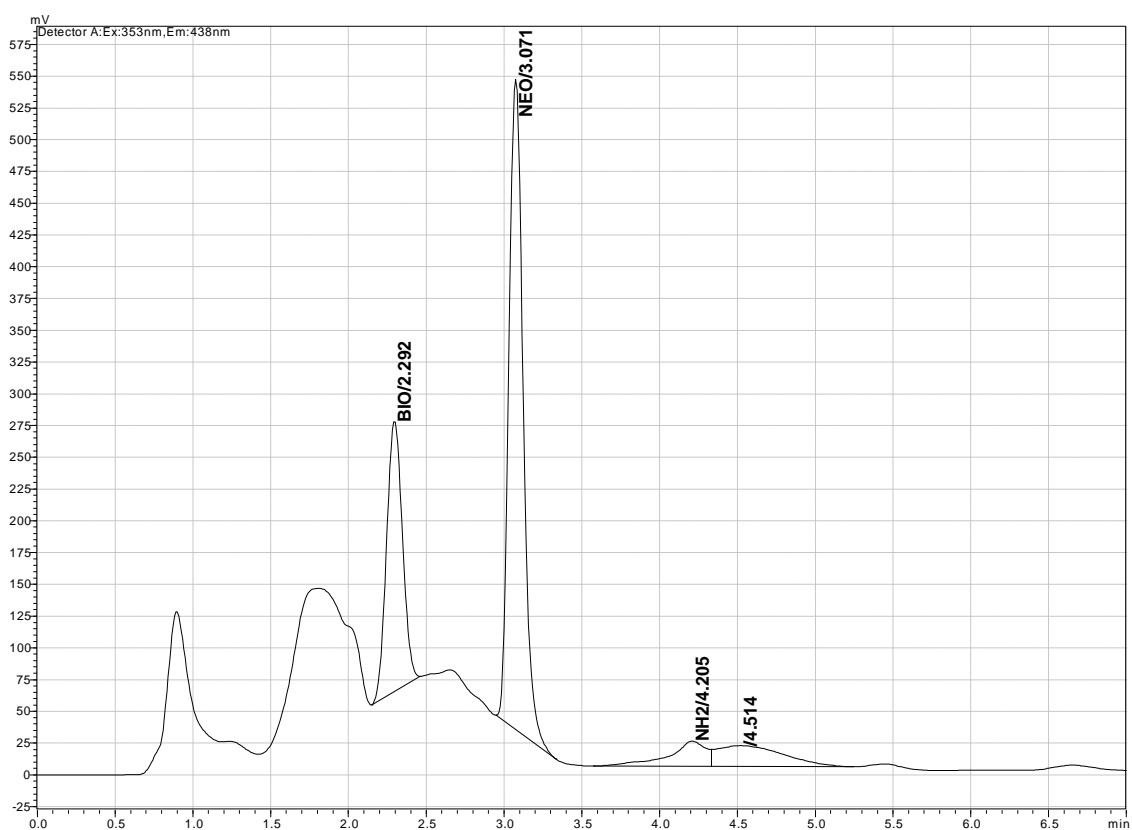
Byly analyzovány vzorky moči čtyř pacientů (Obrázek 24, Obrázek 25, Obrázek 26, Obrázek 27). Vzorky byly nařaděny mobilní fází přímo před analýzou. Analýza probíhala za shodných podmínek jako při validaci metody. Každý vzorek byl analyzován dvakrát a z průměrné hodnoty plochy píku byla vypočtena koncentrace. Pro kvantifikaci látek v moči pacientů byly využity rovnice kalibračních křivek. V moči byly hodnoceny koncentrace biopterinu, neopterinu a 7,8-dihydroneopterinu (Tab. 20).



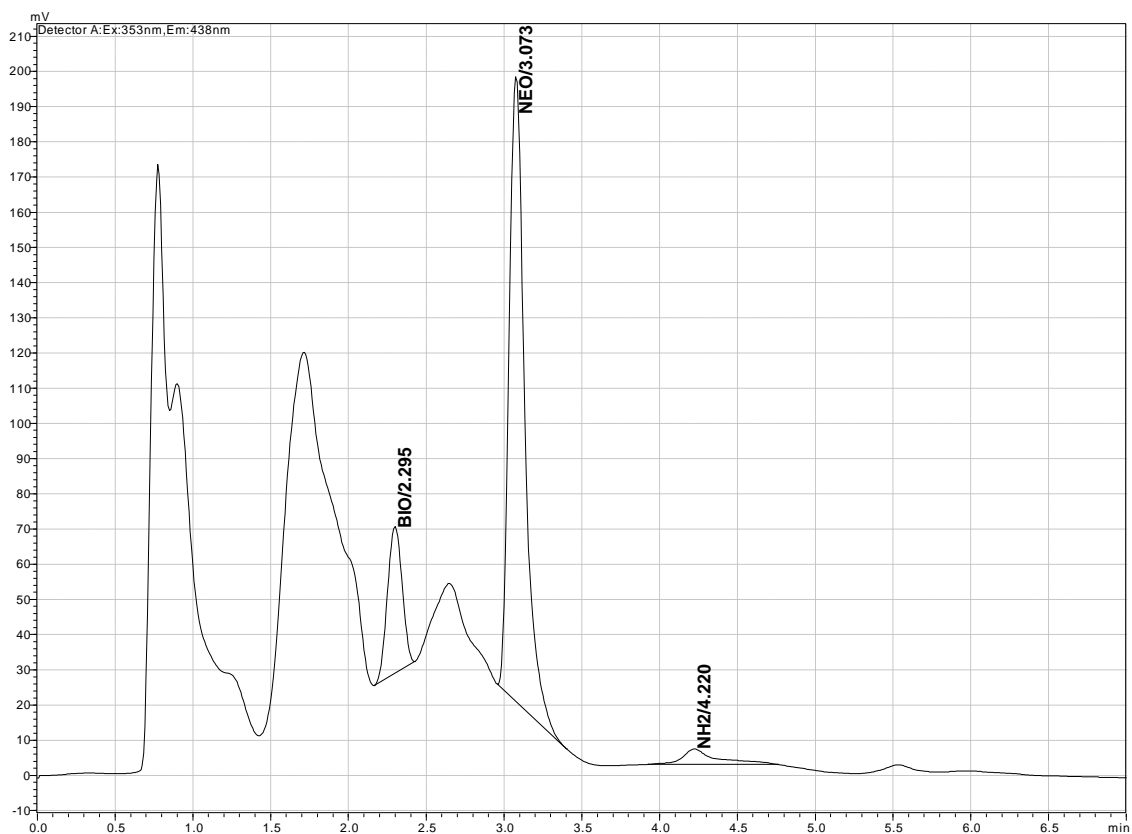
**Obrázek 24: Analyzovaný vzorek moči pacienta č.1**



**Obrázek 25: Analyzovaný vzorek moči pacienta č.2**



**Obrázek 26: Analyzovaný vzorek moči pacienta č. 3**



**Obrázek 27: Analyzovaný vzorek moči pacienta č. 4**

<b>Pacient</b>	<b>Konc.NEO (nmol/l)</b>	<b>Konc.BIO (nmol/l)</b>	<b>Konc.NH2 (nmol/l)</b>
1	674	1074	310
2	677	547	275
3	4264	5223	4833
4	1142	2333	3259

**Tab. 20: Změřené koncentrace BIO, NEO a NH2**

## 5.4. Diskuse

Při optimalizaci chromatografických podmínek, za kterých by docházelo k uspokojivé retenci a separaci pteridinových derivátů (BIO, NEO, NH2) byly testovány tři chromatografické kolony (OBELISK R, OBELISK N, LUNA HILIC).

Z retenčního chování BIO a NEO jako reprezentativních zástupců pteridinových derivátů na jednotlivých kolonách vyplynulo, že kolona OBELISK R není vhodná pro analýzu těchto derivátů, neboť by nedocházelo k jejich případné celkové separaci.

Pro test způsobilosti systému, ověření linearity a citlivosti metody byly vybrány kolony OBELISK N a LUNA HILIC. Mobilní fázi tvořila směs 100mM AmAc o pH=4,8 a ACN v poměru 13 : 87 (OBELISK N) a směs 100mM AmAc o pH=6,8 a ACN v poměru 13 : 87 (LUNA HILIC). Průtoková rychlost byla 1 ml/min, dávkovaný objem 1  $\mu$ l, teplota 25°C a fluorescenční (353 nm/438 nm) typ detekce, který je při těchto stanoveních velmi častý.

Chromatografická kolona OBELISK N při testu separačních schopností poskytovala chromatogram se separovanými píky BIO a NEO, pík NH2 však nedosahoval potřebné kvality.

Nejlépších výsledků bylo dosaženo s chromatografickou kolonou LUNA HILIC, která za výše popsaných podmínek poskytla symetrické píky separované na základní linii nejen BIO, NEO, NH2, ale i BH2 a BH4. Byla tedy vyvinuta metoda pro identifikaci a stanovení pteridinových derivátů, avšak je třeba dále řešit otázku nestability BH2 a BH4.

Stanovení v biologickém materiálu nebylo na koloně LUNA HILIC pro testované látky selektivní. Zejména s BIO interferovalo množství balastních látek. Velký význam má zpracování biologického vzorku. Důležité je zejména předčištění vzorku předcházející vlastní analýzu např. pomocí RP-SPE/HILIC [105].

## **6. ZÁVĚR**

1. Byla vyvinuta metoda pro současné stanovení neopterinu a biopterinu za použití metody HILIC s fluorescenční detekcí
2. Na základě literární rešerše byl zvolen fluorescenční způsob detekce s excitační vlnovou délkou 353 nm a emisní vlnovou délkou 438 nm.
3. Byly testovány celkem tři analytické HILIC kolony (OBELISK N, OBELISK R, LUNA HILIC) za různých chromatografických podmínek. Testované kolony měly pro sledované látky obdobnou selektivitu.
4. Byly vybrány dvě chromatografické kolony (OBELISK N, LUNA HILIC) a optimální složení mobilní fáze pro separaci zkoumaných látek. U obou kolon byl proveden test způsobilosti systému, ověření linearity a citlivosti metody. U kolony LUNA HILIC pak i stanovení v biologických vzorcích. Za zmíněných podmínek se na fluorescenčním detektoru podařilo na koloně OBELISK N získat separované píky odpovídající biopterinu, neopterinu a 7,8-dihydroneopterinu. Na koloně LUNA HILIC byly separovány píky odpovídající biopterinu, 7,8-dihydrobiopterinu, 5,6,7,8-tetrahydrobiopterinu, neopterinu a 7,8-dihydroneopterinu..
5. Z testu způsobilosti systému byla získána tato data:

#### Chromatografická kolona OBELISK N

- Požadavek na počet teoretických pater ( $N > 900$ ) byl splněn u biopterinu i neopterinu.
- Požadavek na faktor symetrie chromatografických píků ( $0,9 < A_s < 1,5$ ) byl splněn u biopterinu i neopterinu.
- Požadavek na rozlišení chromatografických píků ( $R_s > 1,5$ ) byl splněn u biopterinu i neopterinu.
- Požadavek na opakovatelnost plochy píku ( $RSD < 1\%$ ) byl splněn u biopterinu i neopterinu.
- Požadavek na opakovatelnost pro retenční čas ( $RSD < 1\%$ ) byl splněn u biopterinu i neopterinu.

#### Chromatografická kolona LUNA HILIC:

- Požadavek na počet teoretických pater ( $N > 900$ ) byl splněn pouze u neopterinu a 7,8-dihydroneopterinu.
- Požadavek na faktor symetrie chromatografických píků ( $0,9 < A_s < 1,5$ ) byl splněn u všech testovaných látek.
- Požadavek na rozlišení chromatografických píků ( $R_s > 1,5$ ) byl splněn u všech testovaných látek.
- Požadavek na opakovatelnost plochy píku ( $RSD < 1\%$ ) nebyl splněn u žádné z testovaných látek.
- Požadavek na opakovatelnost pro retenční čas ( $RSD < 1\%$ ) byl splněn u všech testovaných látek.

6. Linearita byla na obou chromatografických kolonách testována v rozmezí koncentrací od 1-1000 nmol/l. Kalibrační křivky biopterinu, neopterinu a 7,8-dihydroneopterinu byly ve všech případech v daném rozmezí lineární.

#### Chromatografická kolona OBELISK N

- Korelační koeficienty u obou kalibračních křivek byly 0,9995.
- Citlivost metody: BIO a NEO poskytovaly dobrou odezvu při všech zvolených koncentracích. Kvantitativní limit pro obě testované látky představovala hodnota 1 nmol/l, detekční limit pak 0,3 nmol/l.

#### Chromatografická kolona LUNA HILIC

- Korelační koeficienty u kalibračních křivek pro biopterin a neopterin byly 0,9999. Pro 7,8-dihydroneopterin 0,9994.
- Citlivost metody: BIO a NEO poskytovaly dobrou odezvu při všech zvolených koncentracích. Kvantitativní limit pro tyto testované látky představovala hodnota 1 nmol/l, detekční limit pak 0,3 nmol/l. Kvantitativním limitem pro NH<sub>2</sub> byla hodnota koncentrace 25 nmol/l, detekčním limitem pak hodnota 7,6 nmol/l. Citlivost metody je srovnatelná s jinými publikovanými metodami [95].

## **7.POUŽITÁ LITERATURA**



- [1] Hopkána F. G.: *Naturel*, 335 (1889).
- [2] Schopf C., Becker E.: *Justus Liebigs Ann. Chem.* 49 (1936) 524.
- [3] Koschara W.: *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 127 (1936) 240.
- [4] Paterson E. L. et al.: *J. Am. Chem. Soc.* 78 (1956) 5871.
- [5] Sakurai A., Goto M.: *J. Biochem.* 61 (1967) 142.
- [6] Miller M. M. et al.: *Clin. Chim. Acta* 207 (1996) 1.
- [7] White R. H.: *Biochemistry* 35 (1996) 3447.
- [8] Fukushima T. et al.: *J. Biol. Chem.* 247 (1972) 4549.
- [9] Katoh S. et al.: *Life Sci.* 45 (1989) 2561.
- [10] Davis M. D. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88 (1991) 385.
- [11] Tomand J. et al.: *Chem. Listy* 90 (1996) 731.
- [12] Armarego W. L. F. et al.: *Chemistry and Biology of Pteridines* (1983) 423.
- [13] Howells D. W. et al.: *Clin. Chim. Acta* 167 (1987) 23.
- [14] Shen R.: *Aech. Biochem. Biophys.* 310 (1994) 60.
- [15] Fukushima T. et al.: *Anal. Biochem.* 89 (1978) 71.
- [16] Fukushima T. et al.: *Anal. Biochem.* 102 (1980) 176.
- [17] Brown G. M. et al.: *Adv. Enzymol.* 53 (1982) 345.
- [18] Richter G. Et al.: *J. Bacteriol.* 175 (1993) 4045.
- [19] Nichol C. A. et al.: *Rev. Biochem.* 54 (1985) 729.
- [20] Werner E. R. et al.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 203 (1991) 1.
- [21] Schoedon G. Et al.: *Eur. J. Biochem.* 166 (1987) 303.
- [22] Werner E. R. et al.: *J. Biol. Chem.* 265 (1990) 3189.
- [23] Andert S. E. et al.: *Clin. Exp. Immunol.* 88 (1992) 555.
- [24] Werner-Felmayer G. Et al.: *Cancer Res.* 50 (1990) 2863.
- [25] Werner E. R. et al.: *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 127 (1995) 97.
- [26] Shen R.S. et al.: *Biochem. Biophys. Acta* 965 (1988) 9.
- [27] Blau N. et al.: *Clin. Chim. Acta* 148 (1985) 47.

- [28] Schoedon G. Et al.: J. Interferon Res. 6 (1986) 697.
- [29] Werner E. R. et al.: Biochem. J. 262 (1989) 861.
- [30] Viveros O. H. et al.: Science 213 (1981) 349.
- [31] Parniak M. A. et al.: Biochem. Cell. Biol. 67 (1989) 293.
- [32] Scott-Burden T. et al.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 196 (1993) 1261.
- [33] Schoedon G. Et al.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 196 (1993) 1343.
- [34] R.C. Scriver et al.: The Metabolit And Molecular Basis Of Inherited Disease (1995) 1015.
- [35] Marletta M. A.: J. Biol. Chem. 268 (1993) 12231.
- [36] Mayer B. et al.: J. Biol. Chem. 270 (1995) 655.
- [37] Stuehr D.J.: Annu. Rev, Pharmacol. Toxicol 37 (1997) 339.
- [38] Ziegler I. Et al.: J. Cell. Biochem. 41 (1989) 103.
- [39] Ziegler I. Et al.: Biochim Biophys. Acta 7735 (1992) 330.
- [40] Tanaka K. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86 (1989) 5864.
- [41] Rubenstein M. et al.: Int. J. Biochem. 25 (1993) 1873.
- [42] Wood J.M. et al.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 206 (1995) 480.
- [43] Huber C. et al.: J. Exp. Med 160 (1984) 310.
- [44] Bitterlich et al.: Immunobiology 176 (1988) 228.
- [45] Baier-Bitterlich G. Et al.: Biochem. Pharmacol. 53 (1997) 755.
- [46] D. Solichová et al.: Česká geriatrická revue (3/2003) 33.
- [47] Mori H. et al.: Biochem. Mol. Biol. Int. 40 (1996) 799.
- [48] Holand K. et al.: J. Chromatogr. 429 (1988) 95.
- [49] Blau N. et al.: Anal. Biochem. 128 (1983) 446.
- [50] Huber J.F.K. et al.: J. Chromatogr. B 666 (1995) 223.
- [51] Stea B. et al.: J. Chromatogr. 168 (1979) 385.
- [52] Dhondt J. L. et al.: Clin. Chim. Acta 770 (1981) 205.
- [53] Stea B. et al.: J. Chromatogr. 188 (1983) 363.

- [54] Ziegler T. R. et al.: *J. Parenteral and Enteral Nutrition* 74 (1990) 137.
- [55] Klein R.: *Anal. Biochem.* 203 (1992) 134.
- [56] Werner E. R. et al.: *Clin. Chem.* 33 (1987) 2028.
- [57] Candito M. et al.: *J. Chromatogr.* 614 (1993) 164.
- [58] Stea B. et al.: *Clin. Chim. Acta* 113 (1981) 231.
- [59] Ferre J. et al.: *J. Chromatogr.* 350 (1985) 389.
- [60] Slazyk W. E. et al.: *Clin. Chem.* 36 (1990) 1364.
- [61] Woolf F. H. et al.: *J. Chromatogr.* 274 (1983) 398.
- [62] Niederwieser A. et al.: *J. Chromatogr.* 290 (1984) 237.
- [63] Katoh S. et al.: *Life Sci.* 45 (1989) 2561.
- [64] Tani Y. et al.: *Life Sci.* 46 (1990) 373.
- [65] Niederwieser A. et al.: *Biochemical and Clinical Aspects of Pteridines 1* (1982) 81.
- [66] Haavik J. et al.: *J. Chromatogr.* 257 (1983) 361.
- [67] Hyland K.: *J. Chromatogr.* 343 (1985) 35.
- [68] Lunte C. L. et al.: *Anal. Biochem.* 129 (1983) 377.
- [69] Lunte C. L. et al.: *Methods Enzymol.* 122 (1986) 300.
- [70] Heales S. et al.: *J. Chromatogr.* 494 (1989) 77.
- [71] Trehan S. et al.: *J. Clin. Biochem. Nutr.* 14 (1992) 195.
- [72] Kaufman S.: *J. Biol. Chem.* 230 (1958) 931.
- [73] Guroff G.: *Methods Enzymol.* 18 (1971) 600.
- [74] Craine J. E. et al.: *J. Biol. Chem.* 247 (1972) 6082.
- [75] Curtius H. C. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153 (1988) 715.
- [76] Nagatsu T. et al.: *Anal. Biochem.* 141 (1984) 472.
- [77] Hey H. et al.: *Bio. Chem. Hoppe-Seyler* 370 (1989) 385.
- [78] Mayersbach P. et al.: *Clin Chem.* 40 (1994) 265.
- [79] Cermanová M. et al.: *Pteridines* 16 (2005) 174.

- [80] Dutov A. A. et al.: Russian Journal of Physical Chemistry 81 (2007) 421.
- [81] Yoshihiro T. et al.: Journal of Chromatography 617 (1993) 249.
- [82] Hibiya M. et al.: J. Chromatogr B 672 (1995) 143.
- [83] Tomandl J. et al.: J. Sep. Sci. 26 (2003) 674.
- [84] Svoboda P. et al.: Analytical Biochemistry 383 (2008) 236.
- [85] Messahel S. et al.: Neuroscience Letters 241 (1998) 17.
- [86] Kaneko Y. S. et al.: Brain Research Protocols 8 (2001) 25.
- [87] Flavall E. A. et al.: J. Chromatogr. B 863 (2008) 167.
- [88] Espinosa-Mansilla A.: Talanta 77 (2008) 844.
- [89] Fiege B. et al.: Molecular Genetics and Metabolism 81 (2004) 45.
- [90] Fekkes D.: Clinical Biochemistry 40 (2007) 411.
- [91] Vasquez-Vivar J. et al.: Free Radical Biology & Medicine 31 (2001) 975.
- [92] Hrciarikova D. et al.: Nutrition 25 (2009) 303.
- [93] Verbeek M. M. et al.: Molecular Genetics and Metabolism 95 (2008) 127.
- [94] de Castro M. R. et al.: J. Biochem. Biophys. Methods 59 (2004) 275.
- [95] Cañada-Cañada F. et al.: Analytica Chimica Acta 648 (2009) 113.
- [96] Firth C.A. et al.: Clinical Biochemistry 41 (2008) 1078.
- [97] Van Gool A.R. et al.: Psychiatry Research 119 (2003) 125.
- [98] Ormazabal A. et al.: Clinica Chimica Acta 371 (2006) 159.
- [99] Alpert A. J.: J.Chromatogr. 499 (1990) 177.
- [100] Samuelson O.,Sjöström E.: Sven. Kem. Tidskr. 64 (1952) 305.
- [101] Gregor H.P.: J. Colloid. Sci. 6 (1951) 304.
- [102] Rückert H.,Samuelson O.: Sven. Kem. Tidskr. 66 (1954) 337.
- [103] Scott R. P.W. et al.: J. Chromatogr. 196 (1980) 193.
- [104] Yoshiba T.: J.Chromatogr. A 811 (1998) 61.
- [105] Hemström P. et al.: J. Sep. Sci. 29 (2006) 1784.
- [106] Shou W. Z. et al.: J. Chromatogr. B 825 (2005) 186.

- [107] Li W. K. et al.: Biomed. Chromatogr. 19 (2005) 385.
- [108] Li R. P. et al.: J.Chromatogr. A 1041 (2004) 163.
- [109] Olsen B. A.: J. Chromatogr. A 913 (2001) 113.
- [110] Valette J. C. et al.: Chromatographia 59 (2004) 55.
- [111] Björklund M. et al.: J. Chromatogr. A 728 (1996) 149.
- [112] Lafosse M. et al.: J. Chromatogr. 472 (1989) 209.
- [113] Makino Y. et al.: Anal Biochem. 264 (1998) 172.
- [114] Neue U.: HPLC Columns-Theory,Technology and Practise 176-177 (1997) 217.
- [115] West C. et al.: J. Chromatogr. A 1110 (2006) 200.
- [116] Han S. M.: Biomed. Chromatogr. 11 (1997) 259.
- [117] Yoshida T. Okada T.: J. Chromatogr A 840 (1999) 1.
- [118] Kane R.S. et al.: Langmuir 19 (2003) 2388.
- [119] Juang W. et al.: Anal. Chem. 71 (1999) 333.
- [120] Viklund C. et al.: Macromolecules 33 (2000) 2539.
- [121] Juang W. et al.: Anal. Chem. 73 (2001) 1993.
- [122] Viklund C. et al.: Anal. Chem. 73 (2001) 444.
- [123] Jiang W. et al.: Anal. Chem. 74 (2002) 4682.
- [124] Klimeš J. a kol.: Kontrola chemických léčiv II (2004)
- [125] Český Lékopis 2009, GRADA Publishing a.s. (2009)
- [126] <http://www.chem.agilent.com/Library/Support/Documents/f39250232446.pdf>  
- 20. 1. 2010