

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Přírodovědecká fakulta
Katedra analytické chemie
2009

**SEPARACE HYDROXYLOVANÝCH DERIVÁTŮ
ANTHRACHINONU
A DERIVÁTŮ PTERINU METODOU HPLC**

**SEPARATION OF HYDROXYLATED DERIVATIVES OF
ANTHRAQUINONE AND PTERINE
BY HPLC**

Diplomová práce
studijního oboru Klinická a toxikologická analýza

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

Vypracovala: Jana Vaníková

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením školitele Doc. RNDr. Zuzany Bosákové, CSc. a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

Jsem si vědoma 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 *4.5.2009*.....

Činiková Jana
.....
podpis

Na tomto místě bych chtěla poděkovat své školitelce Doc. RNDr. Zuzaně Bosákové, CSc. za ochotu, cenné rady a odborné vedení. Dále bych chtěla poděkovat všem z katedry analytické chemie za vytvoření přátelského prostředí a pomoc. Svoji rodině děkuji za umožnění studia, psychickou a finanční podporu a značnou trpělivost, kterou se mnou mají. Tato práce byla finančně podporována výzkumným záměrem MŠMT ČR projekt MSM 0021620857 a Grantovou agenturou Univerzity Karlovy ČR, projekt GAUK 69807.

Předmětová hesla: analytická chemie, separace, vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Klíčová slova: reversní separační mód, identifikace, hydroxylované deriváty anthrachinonu, deriváty pterinu

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK	1
1 ÚVOD	3
1.1 CÍLE PRÁCE	5
2 TEORETICKÁ ČÁST	6
2.1 ANTHRACHINONY A JEJICH HYDROXYDERIVÁTY	6
2.1.1 Monohydroxyderiváty anthrachinonu	6
2.1.2 Dihydroxyderiváty anthrachinonu	6
2.1.3 Trihydroxyderiváty anthrachinonu	7
2.1.4 Tetrahydroxyderiváty anthrachinonu	7
2.2 PTERINY	8
2.2.1 Deriváty pterinu	9
2.3 STUDOVANÉ ANALYTY	10
2.3.1 ANTHRACHINONY	10
2.3.2 PTERINY	12
2.4 METODY POUŽÍVANÉ K ANALÝZÁM STUDOVANÝCH SLOUČENIN	14
2.4.1 ANTHRACHINONY	14
2.4.2 PTERINY	16
2.5 HPLC	18
2.5.1 Stacionární fáze	20
2.5.2 Mobilní fáze	20
2.5.3 Popis separačního děje	21
2.5.4 Instrumentace v HPLC	23
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	24
3.1 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE	24
3.2 POUŽITÉ PŘÍSTROJE	25

3.3 POSTUPY	26
3.3.1 Příprava pufru	26
3.3.2 Příprava zásobních roztoků analytů a jejich ředění	27
3.3.3 Příprava studovaných látek k proměření jejich UV-VIS a fluorescenčních spekter	28
4 VÝSLEDKY A DISKUZE	29
4.1 SEPARACE POLYHYDROXYANTHRACHINONOVÝCH DERIVÁTŮ IZOLOVANÝCH Z HOUBY RODU <i>GEOSMITHIA</i>	29
4.1.1 DETEKCE	29
4.1.2 SEPARACE STUDOVANÝCH ANALYTŮ	29
4.1.2.1 Methanol jako organický modifikátor mobilní fáze	30
4.1.2.2 Acetonitril jako organický modifikátor mobilní fáze	32
4.1.2.3 Ternární mobilní fáze methanol/acetonitril/octanový pufr	34
4.2 SEPARACE MONO-, DI- A TRIHYDROXYLOVANÝCH ANTHRACHINONŮ	39
4.2.1 DETEKCE	39
4.2.2 SEPARACE STUDOVANÝCH ANALYTŮ	39
4.2.2.1 Vliv obsahu acetonitrilu v mobilní fázi na retenci analytů	39
4.2.2.2 Gradientová eluce směsi anthrachinonů	43
4.3 SEPARACE PTERINŮ	48
4.3.1 DETEKCE	48
4.3.2 SEPARACE STUDOVANÝCH ANALYTŮ	49
4.3.2.1 Separace na koloně Purospher C18	49
4.3.2.2 Separace na koloně LiChrospher 100 RP-8	51
4.3.2.3 Separace na koloně Spherisorb ODS-2	53
5 ZÁVĚR	57
6 LITERATURA	60

SEZNAM ZKRATEK

1-HA ... 1-hydroxyanthrachinon

2-HA ... 2-hydroxyanthrachinon

1,2-DHA ... 1,2-dihydroxyanthrachinon

1,4-DHA ... 1,4-dihydroxyanthrachinon

1,2,4-THA ... 1,2,4-trihydroxyanthrachinon

1,3,6,8-THA ... 1,3,6,8-tetrahydroxyanthrachinon

1-Ac-2,4,5,7-THA ... 1-acetyl-2,4,5,7-tetrahydroxyanthrachinon

1-Ac-2,4,5,7,8-PHA ... 1-acetyl-2,4,5,7,8-pentahydroxyanthrachinon

A ... plocha píku

ACN ... acetonitril

AS ... faktor asymetrie píku

CZE ... kapilární zónová elektroforéza

DMSO ... dimethylsulfoxid

ELISA ... enzymově vázaná imunosorpční analýza

F_m ... objemový průtok mobilní fáze

h ... výška píku

H ... výškový ekvivalent teoretického patra

HCOOH ... mravenčí kyselina

H₂O ... voda

HPLC ... vysokoúčinná kapalinová chromatografie

IR ... infračervená oblast

k ... retenční faktor

K_D ... distribuční konstanta

L ... délka kolony

LC-MS ... kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií

MEKC ... micelární elektrokinetická kapilární chromatografie

MeOH ... methanol

MF ... mobilní fáze

M_r ... relativní molekulová hmotnost

MS ... hmotnostní detekce

n ... počet teoretických pater
NMR ... nukleární magnetická rezonance
NP-HPLC ... kapalinová chromatografie s normálními fázemi
 $R_{1,2}$... rozlišení
RIA ... radioimunoanalýza
RP-HPLC ... kapalinová chromatografie s obrácenými fázemi
 t_M ... mrtvý čas
 t_R ... retenční čas
 t'_R ... redukovaný retenční čas
 T ... teplota
TEA ... triethylamin
TLC ... tenkovrstvá chromatografie
UV ... ultrafialová oblast
 V_m ... objem mobilní fáze
 V_M ... mrtvý retenční objem
 V_R ... retenční objem
 V'_R ... redukovaný retenční objem
 V_s ... objem stacionární fáze
VIS ... viditelná oblast
 w_b, w_1, w_2 ... šířka píku při základně
 $w_{1/2}$... šířka píku v polovině jeho výšky
 $\alpha_{1/2}$... selektivita
 λ ... vlnová délka
 σ ... směrodatná odchylka

1 ÚVOD

Chinonová barviva jsou nejrozšířenější skupinou přírodních barviv. Najdeme je v kořenech a kůře rostlin a stromů, mohou se podílet na zbarvení některých druhů hub a barevných výměšků některých druhů brouků. Do skupiny chinonových barviv patří deriváty benzochinonu, naftochinonu, anthrachinonu a dalších. U těchto derivátů se velice často nachází jedna nebo více hydroxylových skupin, na které bývá často navázána cukerná složka, zejména glukosa nebo L-rhamnosa.¹ Chinonové skupiny se také podílí na fotosyntéze rostlin a bakterií, dále se také vyskytují v některých vitamínech důležitých pro život, např. ve vitamínu K.²

Hydroxylované deriváty anthrachinonu se používaly již od starověku k barvení textilií,³⁻⁷ a také při kreslení map.⁸ Největší význam mezi těmito barvivy má alizarin.¹ Od konce 19. století jsou pro barvení textilií využívána syntetická, podstatně levnější a dostupnější barviva. Hydroxyderiváty anthrachinonu mají v současnosti uplatnění v zemědělství a v potravinářském a farmaceutickém průmyslu.

Byla provedena řada analytických studií na rostlinách, které se používají například v tradiční čínské medicíně (např. *Rubia tinctorum*, *Aloe sp.*, *Cassia angustifolia* a mnoho dalších). Během nich bylo prokázáno, že tyto rostliny, jejichž nejrůznější části se používají k léčení řady zdravotních problémů a onemocnění (např. nechutenství, bolesti hlavy, cholera, průjem, horečka, hemeroidy) nebo mají protinádorové a protimutagenní účinky, obsahují celou řadu anthrachinonových derivátů.⁹⁻¹²

Hydroxylované deriváty anthrachinonu byly také nalezeny při studiu sekundárních metabolitů vřekovýtrusných hyfomycet rodu *Geosmithia*, konkrétně pak ve fialově sporulujícím druhu *Geosmithia lavendula*. Houby rodu *Geosmithia* žijí v symbióze s kůrovcovitými (*Scolytinae*). Kůrovce můžeme najít v lýku a dřevě téměř všech stromů, dále se pak nacházejí v ovoci, semenech, v řapících listů, v dužnině větvíček, ve stoncích bylin nebo ve vzdušných kořenech mangrovů. Za pomoci dřevokazných hub ničí kůrovci miliony stromů ročně v celé holarktické oblasti, další druhy hub si pro změnu pěstují jako potravu pro své larvy.¹³⁻¹⁷

Deriváty objevené v sekundárních metabolitech druhu *Geosmithia lavendula* by se daly využít jako velmi stabilní barviva a mořidla textilií. Objev těchto přírodních barviv poukazuje na to, že lze v přírodě nalézt řadu zcela nových derivátů anthrachinonu, které

by mohly sloužit jako levná barviva, proto je velice důležité pokračovat ve studiu hydroxylovaných derivátů anthrachinonu.

Kromě barviv můžeme v přírodě najít i celou řadu přírodních pigmentů. K nejvýznamnější skupině pigmentů patří pteriny, které jsou zodpovědné za různobarevnost hmyzu. Tvoří především žluté a červené zbarvení hmyzu. Pteriny jsou součástí motýlích křídel, vosích a včelích těl nebo je můžeme najít v kůži a očích ryb.¹⁸

Dále se můžeme setkat s pteriny i v lidských tělních tekutinách. Do popředí zájmu se v poslední době dostal hlavně neopterin, který by mohl sloužit jako významný biomarker některých onemocnění, zejména pak rakovinných onemocnění.

U dvou druhů kněžic (*Graphosoma lineatum* a *Graphosoma semipunctatum*) můžeme najít pteriny v jejich červeném výstražném zbarvení štítu a štítků na hřbetní straně jejich těla. Na kněžicích rodu *Graphosoma* zatím nebyla provedena žádná studie. Avšak je známo, že podle ročního období mění svoji barvu od sytě červené na jaře až po růžovožlutou či světle hnědou na podzim. Změna zbarvení bude zřejmě způsobená změnami koncentrací leukopterinu a erythropterinu.

Změny zbarvení působí pro kněžice jako ochrana. Sytě červená barva působí jako výstraha pro případné predátory kněžic (hlavně ptáky) a světlé zbarvení na podzim je ochranné, neboť kněžice pak mají barvu podobnou okoličnatým rostlinám (např. máčka, srpek, krabilice, svinutec, fenykl, kerblík), na kterých žijí, tím jsou chráněny před ptáky, kteří se jimi živí.

Vzhledem k širokému použití a pokračujícímu výzkumu derivátů anthrachinonu a pterinu je důležité vypracovávat nové analytické metody, zaměřené na jejich využití pro konkrétní účel.

1.1 CÍLE PRÁCE:

- Vypracování analytické HPLC metody pro separaci dvou majoritních (1-acetyl-2,4,5,7-tetra- a 1-acetyl-2,4,5,7,8-pentahydroxyanthrachinon) a jednoho minoritního (1,3,6,8-tetrahydroxyanthrachinon) metabolitu, které jsou izolovány z houby rodu *Geosmithia lavendula*.
- Vypracování analytické HPLC metody pro separaci směsi monohydroxy-, dihydroxy- a trihydroxyderivátů anthrachinonu.
- Vypracování analytické metody pro separaci čtyř vybraných derivátů pterinů, která by následně umožnila analýzu pigmentu obsaženého v červeném výstražném zbarvení ploštic *Graphosoma lineatum* a *Graphosoma semipunctatum* metodou HPLC (zjistit, čím je způsobena barevná variabilita výstražného zbarvení v různých ročních dobách).

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 ANTHRACHINONY A JEJICH HYDROXYDERIVÁTY

Deriváty anthrachinonu lze rozdělit podle zdroje jejich výskytu v přírodě, podle strukturního uspořádání či počtu substituentů. V této práci je použito dělení podle počtu hydroxylových skupin.

2.1.1 Monohydroxyderiváty anthrachinonu

Do této skupiny patří 1-hydroxy-9,10-anthrachinon, u kterého byla studována schopnost tvořit vodíkové vazby¹⁹, a 2-hydroxy-9,10-anthrachinon. Oba tyto deriváty se používají jako přírodní barviva.

1-hydroxy-9,10-anthrachinon se dá mimo jiné použít jako reagenční činidlo ve spektrometrických a fotometrických analýzách kovů a společně se solemi kovů jako přísady do komplexů, které se pak dají použít pro určení struktury přírodních hydroxyanthrachinonů.²⁰

2.1.2 Dihydroxyderiváty anthrachinonu

Mezi tyto deriváty se řadí nejznámější a nejčastěji se vyskytující hydroxylovaný derivát anthrachinonu – alizarin (1,2-dihydroxyanthrachinon). Je to červené barvivo, které bylo společně s purpurinem (1,2,4-trihydroxyanthrachinon) a xanthopurpurinem (1,3-dihydroxyanthrachinon) izolováno z kořene mořeny barvířské (*Rubia tinctorum*). Alizarin bylo první synteticky vyrobené barvivo (v roce 1868 Graebem a spol.), v roce 1871 byla jeho syntéza vylepšena a průmyslově se vyráběl až do roku 1930, kdy byl v praxi vystřídán moderními syntetickými barvivy.²¹ Alizarin se používá k barvení textilií, tapet nebo jako malířská barva.²²

Quinizarin (1,4-dihydroxyanthrachinon) je hnědofialový prášek, který se získává z indické mořeny (*Rubia cordifolia*). Po rozpuštění v acetonitrilu je to oranžové barvivo, které se na Východě používá k barvení tkanin.

Aloe-emodin (2-hydroxymethyl-4,5-dihydroxyanthrachinon) byl nalezen v rostlině *Aloe vera* a také v listech a kořenech dalších rostlin. Velice často ho doprovází i jeho glykosidická forma. Svoji strukturou je velmi podobný emodinu a vykazuje cytostatické účinky.²³

Dále sem ještě patří danthron (1,8-dihydroxyanthrachinon) a anthrarufin (1,5-dihydroxyanthrachinon).

1,5-dihydroxyanthrachinon se používá při studiu tautomerního a konformačního isomerismu přírodních hydroxyanthrachinonů. Může se vyskytovat ve dvou konformerních formách – s jedním nebo dvěma intermolekulárními vodíkovými můstky.²⁴

1,8-dihydroxyanthrachinon se vyskytuje jako součást projímadel a v tradiční čínské medicíně (nachází se v rostlinách *Rumex japonicus*, *Cassia senna* a aloi). Bylo zjištěno, že snižuje neurotoxicitu vyvolanou β -amyloidy.²⁵

2.1.3 Trihydroxyderiváty anthrachinonu

Purpurin (1,2,4-trihydroxyanthrachinon) patří mezi barviva izolovaná z mořeny barvířské (*Rubia tinctorum*). Dříve byla tato barviva hojně používána k barvení textilií. Společně s alizarinem se používal k barvení až do doby, kdy byl alizarin připraven synteticky.

Emodin (6-methyl-1,3,8-trihydroxyanthrachinon) se nachází v podobě glykosidu – fragulinu v kořeni rebarbory a v bukové kůře. Lze ho také najít v některých houbách rodu *Penicillium* a v rostlinách běžně používaných v tradiční čínské medicíně, které vykazují protinádorovou aktivitu.²³

2.1.4 Tetrahydroxyderiváty anthrachinonu

Karmínová kyselina (7- β -D-glukopyranosyl-3,5,6,8-tetrahydroxy-1-methyl-9,10-dioxoanthracen-2-karboxylová kyselina) je červené barvivo. Používá se k barvení alkoholických nápojů nebo dražé, v cytologii a jako indikátor. Je izolována z těl samiček červce nopálového (*Coccus cacti* L.), který žije ve Střední a Jižní Americe.

Lakaová kyselina je souhrnný název pro pět velmi si podobných hydroxylovaných derivátů anthrachinonu, které se v přírodě vyskytují ve směsi. Získává se z pryskyřičných skořápek, které obsahují sekret hmyzu *Coccus lacca*, který žije na stromech rodu *Genus ficus* v Indii.

Quinalizarin (1,2,5,8-tetrahydroxyanthrachinon) byl použit pro vytvoření nové matrice, pomocí které se dá stanovit kobalt ve vitamínech, uran ve vodních pramenech a měď, kadmium, kobalt, olovo, zinek a mangan ve vzorcích říční vody.²⁶

2.2 PTERINY



Obr. 1: *Graphosoma lineatum*, převzato z²⁷

Historie pterinů se píše od roku 1889, kdy Hopkins izoloval žlutý pigment z křídel *lepidoptera* – běláška.^{18,28} Pteriny patří společně s lumaziny mezi deriváty pyrazino[2,3-d]pyrimidinového kruhu, tzv. pteridinu. Společně s melaniny a s karotenoidy jsou pteriny nejdůležitějšími pigmenty zajišťujícími různobarevnost hmyzu.²⁹ Na světle se rozkládají na různé deriváty pterinu; jsou to fotosenzitivní sloučeniny.¹⁸

Hydroxy- a aminoderiváty pterinu se nacházejí v křídlech motýlů a jiného hmyzu, v těle vos a včel, v kůži a v očích některých ryb, v játrech, v kvasnicích a také ve špenátu. Pteriny jsou bezbarvé nebo žluté a v roztoku fluoreskují. Leukopterin nalezneme v křídlech bělásků. Dalším derivátem pteridinu je kyselina listová, která je nezbytná pro růst některých mikroorganismů, nebo žlutě zbarvený riboflavin (vitamín B12).¹ U člověka byly pteriny nejprve nalezeny v moči, kde se nachází zejména xanthopterin, biopterin a neopterin.¹⁸

Většina žlutých a červených zbarvení u hmyzu je způsobená pteriny. Erythropterin, isoxanthopterin a leukopterin jsou označovány jako nejdůležitější složky. Žlutě zbarvené druhy hmyzu obsahují stejné množství pterinů jako červeně nebo oranžově zbarvené druhy. Rozdíly ve zbarvení jsou způsobeny především různým množstvím přítomného erythropterinu vzhledem k leukopterinu. U některých druhů hmyzu se podílí na zbarvení i kyselina močová. Pokles množství erythropterinu je často doprovázen zvýšeným množstvím leukopterinu. Největší obsah leukopterinu se nachází ve žlutém zbarvení, v červeném je ho nejméně.³⁰

Pteridiny plní také mnoho fyziologicky důležitých rolí. Slouží jako kofaktory mnoha enzymů, například v hydroxylačních reakcích nebo při konverzi tyrosinu na 3,4-dihydroxyfenylalanin (DOPA) – prekurzor melaninu. Účastní se na inaktivaci toxických metabolických zbytků dusíku a jsou nenahraditelné při přenosu elektronů do buněk a společně s puriny slouží jako depotní forma produktů vylučování. Hrají důležitou roli v humánní medicíně^{31–33} a pravděpodobně se účastní i fotosyntézy v rostlinách.³⁴

2.2.1 DERIVÁTY PTERINU

Deriváty pterinu se dělí podle velikosti substituentů na konjugované (na pteridinový kruh mají vázané malé substituenty – patří sem např. biopterin, neopterin, molybdopterin, onkopterin) a nekonjugované (mají na pteridinový kruh vázané větší substituenty – sem patří např. methanopterin).¹⁸

Biopterin je esenciální kofaktor v syntéze katecholaminů a serotoninových neurotransmiterů a oxidů dusíku. Biopterin také stimuluje mitózu u trypanosomy *Crithidia flagellata*. Redukovaná forma biopterinu – 5,6,7,8-tetrahydrobiopterin je kofaktorem mnoha monooxygenas aromatických aminokyselin a NO-synthasy.¹⁸ Pacienti se sníženým obsahem tetrahydrobiopterinu mají sníženou produkci NO, proto mohou být postiženi mentální retardací nebo trpět epilepsií či zmateností.³⁵

Neopterin je meziproduct v syntéze biopterinu, je vylučován ve velkém množství lidskými monocyty/makrofágy po stimulaci interferonu γ .

Molybdopterin je nutný jako kofaktor u mnoha redoxních enzymů, např. u xanthindehydrogenasy. Patří mezi základní struktury molybdenových kofaktorů oxidoreduktas jako je například nitrátoreduktasa, sulfitoxidasa, xanthinoxidasa.¹⁸

Onkopterin je silně bazický pteridin, vyskytující se v moči pacientů trpících rakovinou. Je složený ze dvou markerů rakoviny – pteridinu a polyaminu.

Methanopterin najdeme v methanogenních bakteriích, kde má podobnou funkci jako kyselina listová v metabolismu jednoduhlíkatých zbytků.¹⁸

Dalšími deriváty pterinu jsou drosopterin, leukopterin, xanthopterin a sepiapterin.

Drosopterin je červený pigment.

Leukopterin je společně s erythropterinem a isoxanthopterinem zodpovědný za tvorbu červeného a žlutého zbarvení u *Dysdercus* sp.³⁶

Xanthopterin je žlutý pigment, který je společně s leukopterinem součástí motýlích křídel.

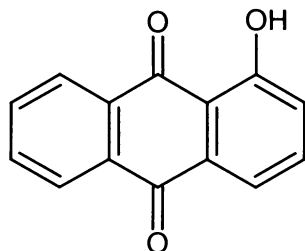
Sepiapterin je žlutý pigment, který byl izolován z hnědé mutované formy rodu *Drosophila*.³⁷

2.3 STUDOVANÉ ANALYTY

2.3.1 ANTHRACHINONY

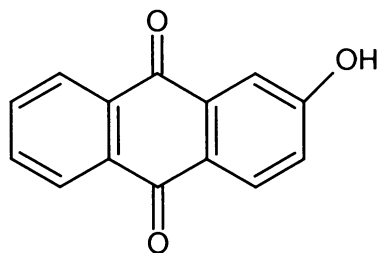
Monohydroxyderiváty anthrachinonu

1-hydroxyanthrachinon



$$M_r = 224,22$$

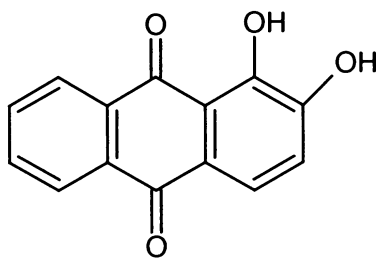
2-hydroxyanthrachinon



$$M_r = 224,22$$

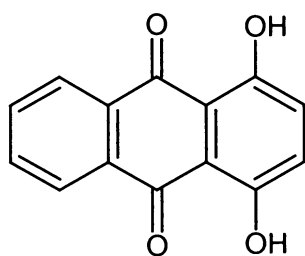
Dihydroxyderiváty anthrachinonu

1,2-dihydroxyanthrachinon = alizarin



$M_r = 240,22$

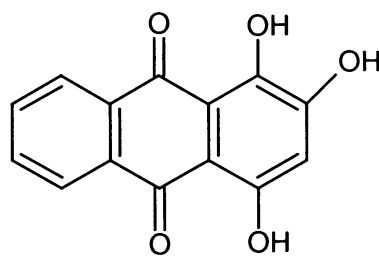
1,4-dihydroxyanthrachinon = quinizarin



$M_r = 240,22$

Trihydroxyderiváty anthrachinonu

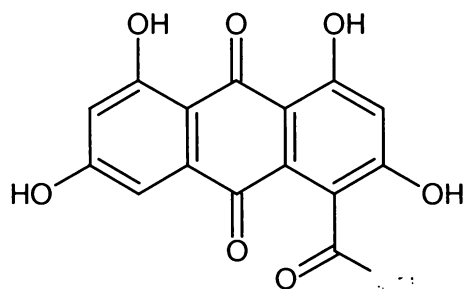
1,2,4-trihydroxyanthrachinon = purpurin



$M_r = 256,21$

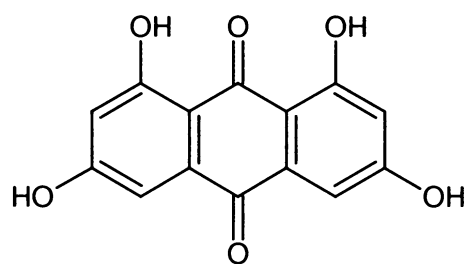
Tetrahydroxyderiváty anthrachinonu

1-acetyl-2,4,5,7-tetrahydroxyanthrachinon



$M_r = 316,22$

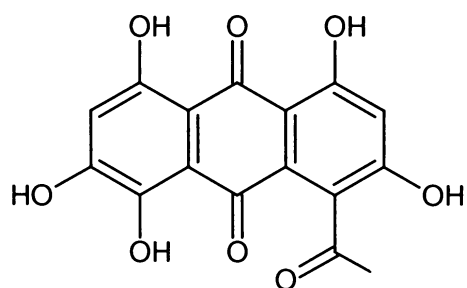
1,3,6,8-tetrahydroxyanthrachinon



$$M_r = 272,21$$

Pentahydroxyderiváty anthrachinonu

1-acetyl-2,4,5,7,8-pentahydroxyanthrachinon

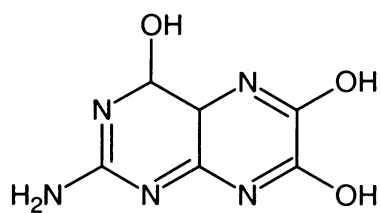


$$M_r = 332,22$$

2.3.2 PTERINY

Leukopterin

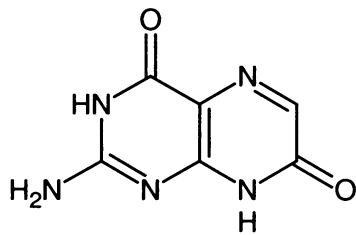
2-amino-4,6,7(3H,5H,8H)-pteridintriol



$$M_r = 195,14$$

Isoxanthopterin

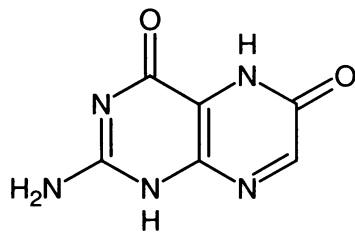
2-amino-4,7(3H,8H)-pteridindion



$M_r = 179,14$

Xanthopterin

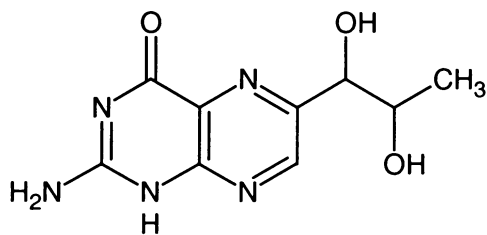
2-amino-4,6(3H,5H)-pteridindion



$M_r = 197,15$

Biopterin

2-amino-4-hydroxy-6-(L-erythro-1',2'-dihydroxypropyl)pteridin



$M_r = 237,22$

2.4 METODY POUŽÍVANÉ K ANALÝZÁM STUDOVANÝCH SLOUČENIN

2.4.1 ANTHRACHINONY

K analýze přírodních barviv se nejčastěji využívají následující metody:

- mikrochemické důkazy
- elektrochemické metody
- spektrální metody
- elektromigrační metody
- chromatografické metody

Mikrochemické důkazy ^{3,5}

Jsou to jednoduché, selektivní reakce barviv s činidly, které lze použít k identifikaci konkrétních přírodních barviv. Dnes jsou využívány především k orientačním důkazům přírodních barviv.

Elektrochemické metody ⁵

Při analýze některých anthrachinonových barviv se dá využít i elektrochemických metod. Využívají jevy spojené s přenosem elektrického náboje přes fázové rozhraní a s transportem nabitých částic v roztoku.

Voltametriky bylo zjištěno, že odezva detektoru pro polyhydroxyanthrachinony je lineárně závislá na počtu –OH skupin navázaných na jejich anthrachinonový řetězec. Tento fakt byl ověřen pro 1-hydroxy-, 2-hydroxy-, 1,2-dihydroxy-, 1,4-dihydroxy-, 1,8-dihydroxy- a 1,2,5,8-tetrahydroxy-9,10-anthrachinon. ³⁸

Spektrální metody ^{3,5}

Detekce a identifikace přírodních barviv se často provádí prostřednictvím spektrálních metod, které využívají absorpce či emise kvant energie molekulami analyzovaných látek. Patří sem infračervená spektrometrie (ve spojení s Fourierovou transformací), Ramanova spektrometrie, rentgenová fluorescenční spektrometrie, absorpční fluorescenční spektrometrie a molekulová absorpční spektrometrie v UV/VIS oblasti. Struktura neznámých látek se určuje pomocí nukleární magnetické rezonance (NMR). Pomocí NMR bylo z methanolického extraktu listů rostliny *Cassia angustifolia*

izolováno a strukturně určeno sedm známých a jeden nový glykosilovaný derivát anthrachinonu.³⁹

Spektrometrie v UV/VIS oblasti je nejpoužívanější ze všech spektrálních metod. Je to metoda citlivá, jednoduchá a hlavně levná.

Z kořene rostliny *Rubia yunnanensis* byly izolovány a pomocí IR spektrometrie popsány čtyři nové naftohydrochinony společně s dalšími jedenácti složkami; jednou z nich byl např. i xanthopurpurin.⁴⁰

Vodíkové vazby u 1-hydroxy-9,10-anthrachinonu byly studovány i s využitím Ramanovy spektrometrie.¹⁸

Elektromigrační metody⁵

Elektromigrační metody jsou založeny na pohybu nabitých molekul v elektrickém poli. Jsou to metody obecně poskytující vysokou účinnost a dostatečnou rychlost separace. Vyžadují malá množství vzorku a ostatních činidel.

Deriváty anthrachinonu (chrysofanol, emodin, cassiamin A a B izolované z rostliny *Cassia siamea*) byly separovány micelární elektrokinetickou kapilární chromatografií.⁴¹ Pro separaci a určení tří anthrachinonů z *Xanthophytum atpovensis pierre* byla použita kapilární elektroforéza v nevodném prostředí.⁴²

Chromatografické metody^{3, 5, 43, 44}

Společně s elektromigračními metodami patří chromatografické metody k nejvíce používaným metodám pro separaci přírodních látek. Pro identifikaci a stanovení anthrachinonových derivátů se velmi často využívá tenkovrstvá chromatografie (pro svoji jednoduchost a minimální nároky na laboratorní vybavení) a vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) ve spojení s UV-VIS nebo hmotnostní detekcí (pro vysokou separační účinnost, citlivost detekce a rychlou identifikaci sloučenin).⁴⁵ Jsou známa i stanovení směsi anthrachinonů pomocí plynové chromatografie (GC).⁴⁶

Pomocí TLC a HPLC byla identifikována přítomnost devíti různých derivátů anthrachinonu z čerstvých kořenů 172 druhů *Aloe*. Pro kapalinovou chromatografii byla použita gradientová eluce čerpající ze dvou systémů – ACN a 45/55 (v/v) ACN/voda. Byla použita kolona Phenomenex Spherisorb 3 ODS 2, 100 x 4,6 mm I.D.⁴⁷

Na silikagelové desce bylo ve vyvíjející soustavě hexan/aceton/terc-butanol (85/10/5 v/v/v) separováno pět nejvýznamnější anthrachinonů z rebarbory.³ Nejvíce používanou chromatografickou metodou pro jejich identifikaci je však vysokoúčinná kapalinová chromatografie na obrácených fázích.

Metodou RP-HPLC byly separovány hydroxylované deriváty anthrachinonu v mobilních fázích ACN/H₂O s 1% přídavkem HCOOH při různých poměrech vodné a organické složky a při pH vodné složky mobilní fáze v rozmezí 2,2 - 2,8, dále v mobilní fázi MeOH/0,2 M octanový pufr, rozmezí pH 3,5 - 5,5 a v mobilní fázi MeOH/0,1 M citrátový pufr pH 2,5 (izokraticky i za použití gradientové eluce).^{3,4}

Pomocí HPLC byly stanoveny hydroxyderiváty anthrachinonu v kořeni rostliny *Rheum emodi* za použití kolony Purospher-Star RP-18e, 250 x 4,6 mm I.D. s gradientovou elucí. Mobilní fáze se skládala ze dvou systémů – ACN/MeOH (95/5, v/v) a voda/octová kyselina (99,9/0,1, (v/v) pH 3,5).¹¹

Stanovení lucidinu v mořeně barvířské (*Rubia tinctorum*) bylo provedeno pomocí HPLC na koloně Purospher RP-18e, 125 x 4 mm I.D. v mobilní fázi 45/55 (v/v) ACN/200 mM octanový pufr při pH 4,2.⁴⁴

2.4.2 PTERINY

Nejčastěji byly pteriny stanovovány v lidské moči, v plazmě, v séru nebo v mozkomíšním moku. Nejkritičtější bodem stanovení pterinů je samotná úprava vzorku před vlastní analýzou.²⁸

Ke stanovení pterinů se používají následující metody:

- chromatografické metody
- imunometody
- mikroskopie
- elektronová spektrometrie

Chromatografické metody

Pro analýzu pterinů z některých druhů hmyzu byly použity chromatografické metody – nejčastěji papírová chromatografie a chromatografie na tenké vrstvě.^{27, 29, 31, 33, 35}

Dále pak byla prováděna separace pterinů pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie.^{32, 48-50} Analyty byly detekovány pomocí fluorescenčního detektoru kvůli svojí schopnosti fluoreskovat.

Pomocí HPLC byl nalezen isoxanthopterin, 7-methylxanthopterin a isoxantholumazin v extraktech z ruměnice pospolné (*Pyrrhocoris apterus*). K této separaci byla použita kolona C18 μ -Bondapak (30 x 0,9 cm I.D.), mobilní fáze 4/96 (v/v) MeOH/10 mM fosfátový pufr pH 3,2 a fluorescenční detektor.³²

V séru byl neopterin stanovován za použití dvoudimensionální HPLC s automatickým přepínáním mezi třemi různými kolonami (LiChrospher 100 RP-18, 35 x 4 mm I.D., LiChrospher 100 RP-18, 50 x 4 mm I.D. a LiChroCart ODS, 125 x 4 mm I.D.). K detekci byl použit fluorescenční detektor. Pro toto stanovení byla použita gradientová eluce. Mobilní fáze se skládala ze třech různých elučních soustav – vodný roztok 9 mM octanového pufru (pH 5,1), ethandiol – propan-2-ol (75/25 v/v) a acetonitril – propan-1-ol (65/35 v/v).⁴⁸

Neopterin obsažený v moči lidí vystavených působení křemičitého prachu byl stanovován pomocí HPLC za použití fluorescenčního i UV detektoru. Kolona byla použita C18 (130 x 8 mm I.D.), mobilní fáze 2,5/97,5 MeOH/15 mM fosfátový pufr, pH = 7,0.⁴⁹

Stanovení onkopterinu, neopterinu a biopterinu v lidské moči bylo prováděno za pomoci HPLC s gradientovou elucí a fluorescenčním detektorem. Byla použita kolona Purospher RP-18, 250 x 4 mm I.D., mobilní fáze obsahovala 50 mM fosfátový pufr (pH 3) a 100/15 (v/v) 50 mM fosfátový pufr (pH 3)/ACN.⁵⁰

Imunometody

Zjistilo se, že neopterin je ukazatelem buněčné imunitní odpovědi, proto se používá pro diagnostiku a léčbu v klinické praxi. Pomocí metody ELISA nebo RIA lze měřit množství neopterinu v moči, v séru, v cerebrospinální tekutině, v synoviální tekutině a ve slinách. Tyto metody jsou vhodné pro časté opakování a denní použití.⁴⁸

Metoda ELISA⁴⁹ byla použita k určení množství neopterinu v séru lidí, kteří byli vystaveni působení křemíku. U pacientů, kteří byly v kontaktu s křemíkem byly nalezeny zvýšené hodnoty neopterinu v séru a v moči. Na základě této studie by mohla být proto identifikována silikóza pomocí stanovení neopterinu v těchto tělních tekutinách.

Mikroskopie

Pomocí světelné a elektronové mikroskopie byla studována rozdílná množství erythropterinu a leukopterinu u hmyzu rodu *Dysdercus*. Fixace na podložní sklíčko se musela provádět nevodnými rozpouštědly, kvůli rozpustnosti pterinů ve vodě.³⁰

Elektronová spektrometrie

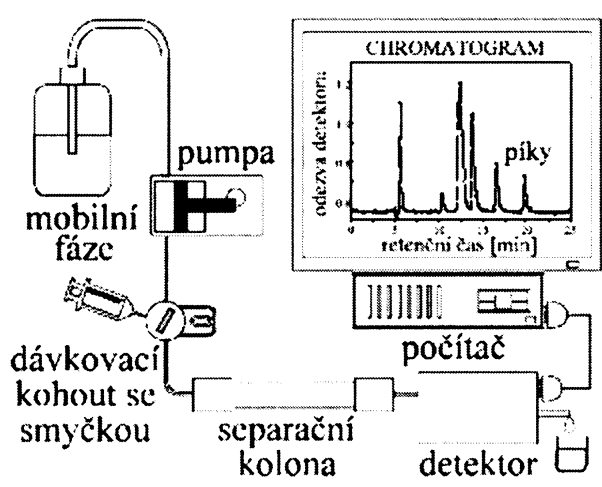
Určení a změření elektronových spekter pterinů a jejich derivátů je důležité pro určení jejich struktury. Zejména proto, že se hojně vyskytují v přírodě a databáze jejich spekter tak může být použita pro studium nových analogů rodiny pterinů. Jejich elektronová spektra jsou charakterizována silnou absorpcí v UV a modro/fialové oblasti. Mnoho z nich silně fluoreskuje.⁵¹

2.5 HPLC^{3, 41, 52}

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie se vyvinula z chromatografie plynové. Stacionární fáze se skládají z malých částic pravidelného tvaru a jednotné velikosti, které homogenně vyplňují celou kolonu. Tento jev společně s vysokým tlakem mobilní fáze zaručuje vysokou účinnost systému. Vzorku se dávkuje jen velmi malá množství (řádově desítky mikrolitrů). K detekci se používají vysoce citlivé detektory, jejichž signál je zaznamenán počítačem.

Prostřednictvím HPLC lze analyzovat širokou škálu analytů: ionty, polární a nepolární látky, málo těkavé, tepelně nestabilní i vysokomolekulární látky. Separace se dá poměrně dobře regulovat změnou stacionární nebo mobilní fáze.

Nejběžnější používanou technikou chromatografie je eluční technika. Látky, které mají být rozděleny jsou nadávkovány do kolony a poté unášeny kontinuálně protékající mobilní fází. Schéma kapalinového chromatografu je na obr. 2.



Obr. 2: Schéma kapalinového chromatografu (převzato z ⁵²).

Po rozdělení látek získáme v počítači záznam – chromatogram. Ten se skládá z elučních křivek, neboli píků separovaných látek.

Z chromatogramu se pak dá odečíst mrtvý čas kolony (t_M), to je čas, který stráví látka v mobilní fázi, a retenční časy (t_R) jednotlivých analytů, ty jsou pro různé látky odlišné a závisí na době, po kterou jsou jednotlivé analyty zadržovány stacionární fází. Z těchto veličin může být vypočítán mrtvý objem kolony (V_M) – vztah (1), retenční objemy jednotlivých analytů (V_R) – vztah (2), kde F_m je objemový průtok mobilní fáze, a také redukované hodnoty retenčních časů (t'_R) a objemů (V'_R) – vztah (3), respektive (4).

$$V_M = F_m \cdot t_M = V_m \quad (1)$$

$$V_R = F_m \cdot t_R \quad (2)$$

$$t'_R = t_R - t_M \quad (3)$$

$$V'_R = V_R - V_M \quad (4)$$

Redukované retenční hodnoty, na rozdíl od prostých hodnot objemů nebo časů, jsou nezávislé na délce kolony a dá se pomocí nich vyjádřit retenční faktor – vztah (5), kde K_D je distribuční konstanta, V_s je objem stacionární a V_m objem mobilní fáze.

$$k = \frac{t'_R}{t_M} = \frac{V'_R}{V_M} = K_D \cdot \frac{V_s}{V_m} \quad (5)$$

2.5.1 Stacionární fáze

U náplňových kolon je důležitá velikost a uspořádání částic. Čím menšími částicemi je kolona naplněna, tím je účinnost separace vyšší. Běžně používané kolony jsou naplněny částicemi o velikosti 5 nebo 10 μm , dostupné jsou ale i komerční náplně s částicemi o velikosti 2 μm i menšími.

Je možné použít i monolitické kolony, které jsou vyplněny polymerem o definované pórovitosti. Tyto kolony mají velkou mechanickou stabilitu a odolnost vůči změnám pH a zaručují vysokou účinnost separace i při vysokých průtocích mobilní fáze.

Nejběžněji používané náplňové kolony mají délku 5 - 25 cm, vnitřní průměr několik milimetrů (3, 4 až 4,6 mm), objem nadávkovaného vzorku bývá v rozsahu 1 - 20 μl a průtok mobilní fáze se pohybuje v rozmezí 0,5 až 1,5 ml/min.

2.5.2 Mobilní fáze

Mobilní fáze se v kapalinové chromatografii výrazně podílí na separačním procesu. Složení mobilní fáze se dá ovlivnit změnou složení rozpouštědel, pH, iontové síly, iontově-párovými činidly apod. Mobilní fáze je charakterizována zejména polaritou a selektivitou, v detektoru by měla dávat minimální signál, mít nízkou viskozitu, stlačitelnost a být málo toxická.

Polarita je schopnost rozpouštědla podílet se na polárních interakcích.

Selektivita – vztah (6) je definována jako relativní retence dvou sousedních analytů. Čím je hodnota $\alpha_{1,2}$ větší, tím je systém selektivnější.

$$\alpha_{1,2} = \frac{t'_{R2}}{t'_{R1}} = \frac{k_2}{k_1} = \frac{K_{D,2}}{K_{D,1}} \quad (6)$$

2.5.3 Popis separačního děje

Separace vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií probíhá v separační koloně naplněné stacionární fází (sorbentem), kterou protéká mobilní fáze (eluent). Dělení probíhá na základě rozdílných interakcí mezi mobilní fází a analytem, interakcí mezi mobilní a stacionární fází a rozdělování analytu mezi mobilní a stacionární fází (tzv. solvofobní teorie). Rozdílné analyty jsou tedy rozdílně zadržovány a zpoždovány kolonou a do detektoru doputují v různých retenčních časech.

Separací mechanismy v HPLC se dají rozdělit podle způsobu zadržování a dělení separovaných látek na několik skupin:

- rozdělovací chromatografie
- adsorpční chromatografie
- gelová permeační chromatografie
- iontově-výměnná chromatografie
- iontově párová chromatografie
- afinitní chromatografie

Podle povahy mobilní fáze rozlišujeme dva druhy HPLC:

- chromatografie s normálními fázemi (NP-HPLC) – stacionární fáze je polární a mobilní fáze je nepolární (nejčastěji pentan, heptan, chloroform a jejich směsi)
- chromatografie s obrácenými (=reversními) fázemi (RP-HPLC) – stacionární fáze je nepolární, mobilní fáze je polární (nejčastěji methanol, acetonitril, tetrahydrofuran, voda a jejich směsi)

Reversní chromatografií (reversní separační mód) se dá rozdělit široké spektrum látek. Stacionární fází je nejčastěji silikagel, který je modifikován nepolární složkou, nejčastěji oktylem nebo oktadecylem. Díky nepolárnímu charakteru lze tyto stacionární fáze velmi dobře kombinovat s polárními organickými rozpouštědly, které se dají smísit s pufrům, vodou, kyselinami, bázemi, iontově-párovými činidly nebo chirálními selektory, používanými jako složka mobilní fáze.

Reversní separační mód má řadu výhod, protože jej můžeme použít pro široké spektrum analytů, můžeme si vybrat ze široké škály stacionárních i mobilních fází, je to

jednoduchá, rychlá a dobře reprodukovatelná metoda a při použití vodných MF se dá aplikovat i na biologické materiály.

Pro přípravu reversních stacionárních fází se nejčastěji používá silikagelový nosič. Tyto stacionární fáze jsou stabilní jen v omezeném rozsahu hodnot pH (3 – 7).

Separace látek závisí na rozdílu jejich retenčních objemů (V_R) a na šířce jejich koncentračních profilů (w_b) – vztah (7), kde w_b je šířka píku při základně a σ je směrodatná odchylka.

$$w_b = 4\sigma \quad (7)$$

Ze vztahu (7) lze pak snadno vypočítat počet teoretických pater n v koloně, který určuje separační účinnost kolony – vztah (8). Čím vyšší je počet teoretických pater (n), tím vyšší je separační účinnost kolony a tím nižší je výškový ekvivalent teoretického patra (H) – vztah (9), kde L je délka kolony, t_R je retenční čas analytu a $w_{1/2}$ je šířka píku v polovině jeho výšky.

$$n = 5,545 \cdot \left(\frac{t_R}{w_{1/2}} \right)^2 \quad (8)$$

$$H = \frac{L}{n} = \frac{L}{5,545} \cdot \left(\frac{w_{1/2}}{t_R} \right)^2 \quad (9)$$

Kromě selektivity $\alpha_{1,2}$ charakterizuje míru separace dvou píků i rozlišení $R_{i,j}$, které je definováno vztahem (10), kde w_i a w_j je šířka píků při základně dříve, respektive později eluujících píků. Aby došlo k rozlišení dvou látek až na základní linii, musí být hodnota $R_{i,j} \geq 1,5$.

$$R_{i,j} = \frac{2 \cdot (t_{R,i} - t_{R,j})}{w_i + w_j} = \frac{2 \cdot \Delta t_R}{w_i + w_j} \quad (10)$$

Faktor asymetrie píku (AS) je veličina, která charakterizuje míru odlišnosti daného píku od jeho gaussovského tvaru. Optimální hodnota faktoru asymetrie se pohybuje v rozmezí 0,98 – 1,02 a v ideálním případě může nabývat hodnoty 1,00.

2.5.4 Instrumentace v HPLC

Schéma kapalinového chromatogramu je uvedeno na obr. 2. Na ultrazvuku nebo v odplyňovači mobilní fáze odplyněná mobilní fáze je přiváděna ze zásobní lahve do čerpadla. Čerpadlo musí být vysokotlaké a musí zajišťovat konstantní, reprodukovatelný a bezpuzlní průtok mobilní fáze. Nejčastěji se používají čerpadla dvoupístová. Z čerpadla je mobilní fáze vedena na dávkovací kohout se smyčkou. Vzorek se do dávkovací smyčky dávkuje injekční stříkačkou. Dávkování je reprodukovatelné a dá se snadno automatizovat. Po nadávkování je vzorek přiváděn na kolonu. Její plášť je nejčastěji vyroben z nerezové oceli. Odtud putuje analyt do detektoru a signál z detektoru je vyhodnocen pomocí počítače. Jednotlivé části kapalinového chromatogramu jsou propojeny spojovacími kapilárami.

Materiál, který se používá v HPLC, musí být mechanicky a chemicky odolný a povrchově neaktivní, aby nepřispíval k rozmývání elučních křivek analytů. Proto se nejčastěji používá nerezová ocel, sklo nebo některé plasty.

Na detektory jsou kladeny vysoké požadavky, zvláště pak signál detektoru by měl být stabilní a reprodukovatelný, dále by měl být detektor dostatečně citlivý.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE

- acetonitril R CHROMASOLV pro kapalinovou chromatografii (99,8%, Sigma-Aldrich, Německo)
- methanol CHROMASOLV pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (99,9%, Sigma-Aldrich, Německo)
- octová kyselina (99%, p.a., Lach Ner, ČR)
- amoniak – vodný roztok (min. 25%, p.a., Lachema, ČR)
- kyselina fosforečná (85%, p.a., Lach Ner, ČR)
- hydrogenfosforečnan sodný, dodekahydrát (p.a., Penta, ČR)
- dihydrogenfosforečnan sodný, dihydrát (p.a., Penta, ČR)
- kyselina boritá (p.a., Penta, ČR)
- tetraboritan sodný, dekahydrát (p.a., Lachema, ČR)
- triethylamin (99,5%, Sigma Aldrich, Belgie)
- hydroxid sodný (p.a., Lach Ner, ČR)
- deionizovaná voda

analyty:

1,3,6,8-tetrahydroxyanthrachinon, 1-acetyl-2,4,5,7-tetrahydroxyanthrachinon a 1-acetyl-2,4,5,7,8-pentahydroxyanthrachinon byly izolovány v Mikrobiologickém ústavu AV ČR skupinou Dr. Fliegera; jejich struktura byla určena pomocí NMR a hmotnostní spektrometrie.¹⁶

1-hydroxy-, 2-hydroxy- a 1,2-dihydroxy-9,10-anthrachinon byly izolovány v Mikrobiologickém ústavu AV ČR s čistotou vyšší než 98 %⁵

1,4-dihydroxy-9,10-anthrachinon ($\geq 95,0$ % (HPLC), Fluka, Německo)

1,2,4-trihydroxy-9,10-anthrachinon (standard, Fluka, Německo)

6-biopterin (97%, Sigma Aldrich, Německo)

leukopterin (95%, Sigma Aldrich, Německo)

isoxanthopterin (97,5%, Sigma Aldrich, Německo)

xanthopterin, monohydrát (97%, Sigma Aldrich, Německo)

3.2 POUŽITÉ PŘÍSTROJE

Pevné vzorky byly váženy na analytických vahách model APX-100 (Denver Instrument, Německo).

K proměření UV/VIS spekter studovaných látek byl použit UV/VIS spektrofotometr model PU 8800 (Pye Unicam, UK).

Fluorescenční spektra derivátů pterinu byla proměřena na spektrofluorimetru ABS2 (Amico, USA).

K separaci vzorků byl použit kapalinový chromatograf, který se skládal z vysokotlaké gradientové pumpy Beta 10 s degasserem DG 3014, UV/VIS detektoru Sapphire 800 (Ecom, ČR) a šesticestného ventilu Rheodyne 7725i (Cotati, California, USA) se smyčkou o objemu 5 μ l. Kolona byla po celou dobu analýzy termostatována v termostatu LCO 101 (Ecom, ČR). Vzorky byly dávkovány stříkačkou Hamilton o objemu 10 μ l (Reno, Nevada, USA).

Všechna měření prováděna při teplotě $T = 22 \pm 2$ °C.

Ke sběru a vyhodnocení naměřených dat byly použity programy CSW32 (DataApex, ČR) a Origin 7.0 (OriginLab Corporation, USA).

Pufř používaný v mobilních fázích byl upraven na požadované pH pomocí pH-metru model 3510 (Jenway, UK).

Separace byly prováděny na koloně LiChroCart 125-4 Cartridge Purospher RP-18e, 125 x 4,0 mm I.D., velikost zrnění 5 μ m (Merck, Německo) s předkolonkou LiChroCart 4-4 Purospher RP-18e, 10,0 x 4,0 mm I.D. (Merck, Německo), na koloně Zorbax Extend-C18, 150 x 4,6 mm I.D., velikost zrnění 5 μ m s předkolonkou 12,5 x 4,6 mm I.D., velikost zrnění 5 μ m (Agilent, USA), na koloně LiChrospher 100 RP-8, 125 x 4,0 mm I.D., velikost zrnění 5 μ m (Merck, Německo) s předkolonkou 4-4 LiChrospher 60 RP-select B, 10,0 x 4,0 mm I.D. (Merck, Německo) a na koloně 250-4 Spherisorb ODS-2, 250 x 4,6 mm I.D., velikost zrnění 5 μ m (Waters, USA) s předkolonkou 4-4 LiChrospher 60 RP-select B, 10,0 x 4,0 mm I.D. (Merck, Německo).

3.3 POSTUPY

3.3.1 Příprava pufrů

Pufr použitý pro přípravu mobilních fází pro separaci 1,3,6,8-THA, 1-Ac-2,4,5,7-THA a 1-Ac-2,4,5,7,8-PHA, byl 25 mM octan amonný. Do 450 ml deionizované vody bylo přidáno 0,725 ml octové kyseliny a pH tohoto roztoku bylo upraveno na požadovanou hodnotu (pH = 3,5; 4,0; 4,5; 5,0 nebo 5,5) přidávkem příslušného objemu vodného roztoku amoniaku. Poté byl objem pufru v odměrné baňce doplněn na celkový objem 500 ml.

Pufr o pH 4,0 byl použit pro mobilní fáze MeOH/25 mM octanový pufr a ACN/25 mM octanový pufr.

Pro mobilní fázi MeOH/ACN/25 mM octanový pufr byly použity všechny hodnoty pH pufru.

Pro separaci analytů 1-HA, 2-HA, 1,2-DHA, 1,4-DHA a 1,2,4-THA byl použit 10 mM tetraboritan sodný (pH = 8,5 a 9,5), 20 mM fosfát sodný (pH = 3,5; 4,5; 5,5; 6,5 a 7,5), 20 mM octan sodný (pH = 4,5), 200 mM octan sodný (pH = 4,5) a 0,1 % triethylaminoctanový pufr (pH = 4,5).

Tetraboritan sodný byl připraven rozpuštěním 1,905 g tetraboritanu sodného v necelých 500 ml deionizované vody a pH bylo poté upraveno za pomoci koncentrované kyseliny borité na požadovanou hodnotu pH a objem byl doplněn v odměrné baňce na celkový objem 500 ml.

Fosfátový pufr o pH 6,5 byl připraven smícháním 0,1264 g dihydrogenfosforečnanu sodného s 0,0941 g hydrogenfosforečnanem sodným a jejich rozpuštěním v 500 ml deionizované vody. Fosfátový pufr o pH 7,5 byl připraven smícháním 0,0245 g dihydrogenfosforečnanu sodného s 0,796 g hydrogenfosforečnanem sodným a jejich rozpuštěním v 500 ml deionizované vody. Další fosforečnanové pufry byly připraveny přidáním 0,678 ml kyseliny fosforečné do 450 ml deionizované vody a následnou úpravou pH roztoku pomocí pH-metru přidávkem vodného roztoku amoniaku až na požadovanou hodnotu pH. Objem pufru byl v odměrné baňce poté doplněn na celkový objem 500 ml.

Vodný roztok 0,1% triethylaminoctanového pufru o pH 4,5 byl připraven tak, že do necelých 500 ml bylo přidáno 0,5 ml TEA, pH bylo upraveno na pH-metru přidavkem octové kyseliny až na požadovanou hodnotu pH a poté byl objem pufru doplněn na celkový objem 500 ml v odměrné baňce.

Pro separaci pterinů byl použit 20 mM fosfát amonný (pH = 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5 a 7,0), který byl připraven stejným způsobem jako fosfátové pufrы pro separaci hydroxylovaných anthrachinonů. Příprava těchto pufrů je popsána výše.

3.3.2 Příprava zásobních roztoků analytů a jejich ředění

Zásobní roztoky 1-HA, 2-HA, 1,2-DHA, 1,4-DHA, 1,2,4-TAH, 1-Ac-2,4,5,7-THA a 1-Ac-2,4,5,7,8-PHA byly připraveny rozpuštěním 0,5 mg pevného vzorku v 1 ml MeOH.

Zásobní roztok směšného vzorku 1,3,6,8-THA a 1-Ac-2,4,5,7-THA byl připraven rozpuštěním 0,4 mg pevného vzorku v 0,8 ml MeOH.

Všechny připravené zásobní roztoky měly koncentraci $c = 0,5$ mg/ml a byly uchovány v chladu a v temnu.

Pro vlastní separaci byly tyto vzorky příliš koncentrované, a proto byly 10x zředěny (100 μ l vzorku v 900 μ l methanolu), jejich výsledná koncentrace pak byla $c = 0,05$ mg/ml.

Při přípravě směsi analytů 1,3,6,8-THA, 1-Ac-2,4,5,7-THA a 1-Ac-2,4,5,7,8-PHA byly použity ředěné vzorky zásobních roztoků a byly smíchány v poměru 1:1 (analyt 1,3,6,8-THA je dostupný pouze ve směšném vzorku s 1-Ac-2,4,5,7-THA).

Zásobní roztoky leukopterinu, isoxanthopterinu, xanthopterinu a 6-biopterinu byly připraveny rozpuštěním 0,25 mg pevného vzorku v 2 ml dimethylsulfoxidu (DMSO). Vzorky byly uchovávány v tmavých vialkách při laboratorní teplotě v uzavřené krabici, aby byly chráněny před světlem.

Pro zjištění látek obsažených ve štítku z kněžice pásované byly vystříhány ze štítku kněžice červně zabarvené pruhy, které byly následně rozdrceny a rozpuštěny v dimethylsulfoxidu. Vzniklý roztok byl přefiltrován, aby z něj byly odstraněny zbylé nerozdrcené štítky a byl uchováván taktéž v temnu za laboratorní teploty.

3.3.3 Příprava studovaných látek k proměření jejich UV-VIS a fluorescenčních spekter

K proměření UV-VIS spekter studovaných hydroxylovaných anthrachinonů byly použity 20x zředěné zásobní roztoky 1-Ac-2,4,5,7-THA a 1-Ac-2,4,5,7,8-PHA, jejich koncentrace tedy byla $c = 0,025$ mg/ml.

Byly proměřovány methanolicke roztoky obou analytů v kyvetě délky $l = 1$ cm oproti methanolu.

K proměření absorpčních spekter mono-, di- a trihydroxyderivátů anthrachinonu byly použity zásobní acetonitrilové roztoky analytů, které byly naředěny směsí 33/67 (v/v) ACN/20 mM borátový pufru (pH 9,5) na koncentrace řádově 10^{-5} - 10^{-4} M. Ředící roztok byl použit jako slepý vzorek pro určení absorpčního pozadí.⁵

K proměření UV-VIS spekter a fluorescenčních spekter zkoumaných pterinů byly použity jejich zásobní roztoky, které měly koncentraci 0,6 mg/ml.

Byly proměřeny roztoky všech analytů v DMSO v kyvetě délky $l = 1$ cm oproti DMSO.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 SEPARACE POLYHYDROXYANTHRACHINONOVÝCH DERIVÁTŮ IZOLOVANÝCH Z HOUBY RODU *GEOSMITHIA*

4.1.1 DETEKCE

K zajištění dostatečné citlivosti detekce byla proměřena UV-VIS spektra analyzovaných látek: 1-Ac-2,4,5,7-THA a 1-Ac-2,4,5,7,8-PHA. Spektra byla proměřena v rozpětí vlnových délek 200 – 800 nm. Naměřená lokální maxima jsou zaznamenána v tabulce 1.

Tabulka 1: Vlnové délky lokálních maxim analytů, tučně vyznačeny hodnoty lokálních maxim, při kterých měly analyty nejvyšší absorbanci.

analyt	λ (nm)				
1-Ac-2,4,5,7-THA	224	256	292	311	455
1-Ac-2,4,5,7,8-PHA	225	271	320	537	-

Standard 1,3,6,8-THA nebyl k dispozici, protože je minoritní složkou pigmentu získaného z houby *Geosmithia lavendula*, a proto nemohlo být jeho UV-VIS spektrum proměřeno. Předpokládalo se, že daný analyt bude mít obdobné absorpční vlastnosti jako majoritní analyt 1-Ac-2,4,5,7-THA.

Pro detekci samotného 1-Ac-2,4,5,7-THA a směsi 1-Ac-2,4,5,7-THA a 1,3,6,8-THA byla zvolena vlnová délka 290 nm. Pro detekci samotného 1-Ac-2,4,5,7,8-PHA, směsi 1-Ac-2,4,5,7,8-PHA a 1-Ac-2,4,5,7-THA a směsi 1-Ac-2,4,5,7,8-PHA, 1-Ac-2,4,5,7-THA a 1,3,6,8-THA byla zvolena vlnová délka 270 nm.

4.1.2 SEPARACE STUDOVANÝCH ANALYTŮ

K separaci analytů izolovaných z houby rodu *Geosmithia lavendula* byla použita oktadecylová stacionární fáze a byl použit reversní separační mód. V průběhu celého experimentu bylo pracováno izokraticky a byl sledován vliv složení mobilní fáze a průtokové rychlosti na retenci studovaných analytů. Jako organický modifikátor mobilní fáze byl použit methanol, acetonitril a na závěr i směs acetonitrilu s methanolem

ve směsi s vodným pufrům, 25 mM octanem amonným, jehož pH se pohybovalo v rozmezí 3,5 až 5,5.

4.1.2.1 Methanol jako organický modifikátor mobilní fáze

Organickým modifikátorem byl na začátku zvolen methanol (MeOH), protože studované látky se v něm dobře rozpouštěly. Druhou složkou mobilní fáze byl 25 mM octanový pufr o pH = 4,0. V mobilních fázích o různém objemovém poměru MeOH/25 mM octanový pufr byly proměřeny nejprve samostatné vzorky 1-Ac-2,4,5,7-THA a 1-Ac-2,4,5,7,8-PHA. Poté byla proměřena směs 1-Ac-2,4,5,7-THA a 1,3,6,8-THA. V tabulce 2 jsou sumarizovány výsledky získané proměřením vlivu obsahu MeOH na retenci 1-Ac-2,4,5,7-THA při dvou různých průtokových rychlostech mobilní fáze.

Tabulka 2: Vliv obsahu MeOH v mobilní fázi MeOH/25 mM octanový pufr pH 4,0 a průtokové rychlosti mobilní fáze na retenci 1-Ac-2,4,5,7-THA, UV detekce při $\lambda = 290$ nm, kde k je retenční faktor, AS je faktor asymetrie.

MeOH (%)	$F_m = 0,7$ ml/min		$F_m = 1,3$ ml/min	
	k	AS	k	AS
90	0,52	0,78	-	-
80	1,04	0,84	1,17	1,00
70	1,93	0,60	2,56	1,00
60	8,08	0,61	7,37	0,60

(- ... neměřeno)

Z tabulky 2 je vidět, že se snížením obsahu organické složky v mobilní fázi se zvyšuje retence analytu. Píky jsou symetričtější při vyšším obsahu organického modifikátoru v mobilní fázi.

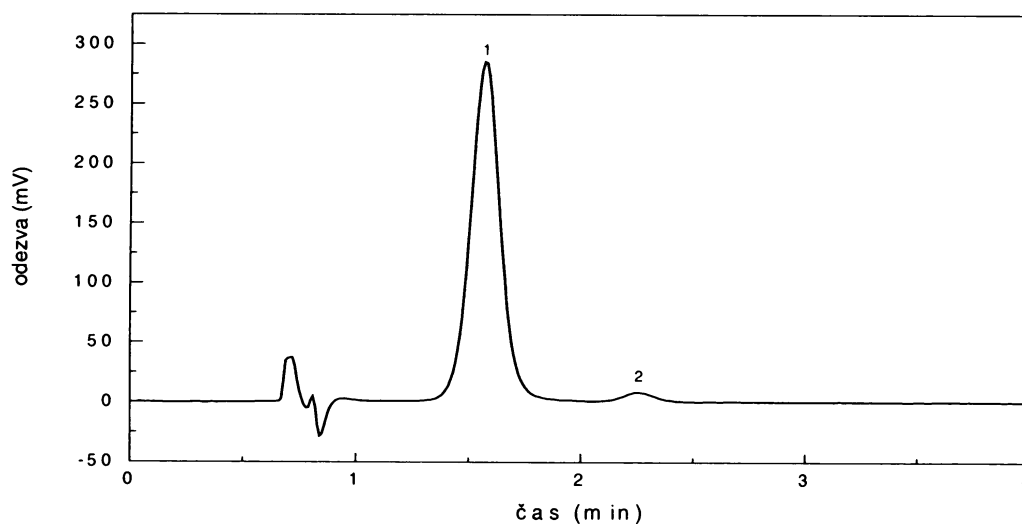
Za stejných experimentálních podmínek (složení mobilních fází) jako pro 1-Ac-2,4,5,7-THA, byla změřena i směs 1-Ac-2,4,5,7-THA a 1,3,6,8-THA. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 3.

Tabulka 3: Vliv obsahu MeOH v mobilní fázi MeOH/25 mM octanový pufr pH 4,0 a průtokové rychlosti mobilní fáze na retenci směsi 1-Ac-2,4,5,7-THA a 1,3,6,8-THA, UV detekce při $\lambda = 290$ nm, kde k_1 a k_2 je retenční faktor 1-Ac-2,4,5,7-THA, respektive 1,3,6,8-THA, $R_{1,2}$ je jejich vzájemné rozlišení a $\alpha_{1,2}$ je selektivita.

MeOH (%)	$F_m = 0,7$ ml/min				$F_m = 1,3$ ml/min			
	k_1	k_2	$R_{1,2}$	$\alpha_{1,2}$	k_1	k_2	$R_{1,2}$	$\alpha_{1,2}$
90	-	0,52	-	-	-	-	-	-
80	1,10	1,91	2,56	1,74	1,21	2,17	2,76	1,80
70	2,40	4,27	4,16	1,78	2,76	4,90	3,47	1,78
60	7,17	12,71	6,10	1,77	7,53	13,59	5,55	1,79

(- ... neměřeno)

Z tabulky 3 je patrné, že 1,3,6,8-THA byl na koloně ve všech proměřovaných mobilních fázích podstatně déle zadržován než jeho acetylovaný analog. Se snižujícím se obsahem MeOH v mobilní fázi docházelo v případě obou derivátů k prodlužování retence, selektivita i rozlišení mezi oběma deriváty stoupaly se snižujícím se obsahem MeOH v mobilní fázi. V žádné z výše proměřovaných mobilní fází bohužel nedošlo k eluci 1-Ac-2,4,5,7,8-PHA do 120 minut. Na obr. 3 je ukázka rozdělení směsi 1-Ac-2,4,5,7-THA a 1,3,6,8-THA změřené při složení mobilní fáze 80/20 (v/v) MeOH/25 mM octanový pufr pH 4,0 a průtoku mobilní fáze 1,3 ml/min.



Obr. 3: Separace 1-Ac-2,4,5,7-THA (pík 1) a 1,3,6,8-THA (pík 2) v mobilní fázi 80/20 ACN/25 mM octanový pufr pH 4,0 a průtoku $F_m = 1,3$ ml/min, UV detekce při $\lambda = 290$ nm.

Závěr:

Bylo zjištěno, že binární mobilní fáze MeOH/25 mM octanový pufr pH 4,0 je vhodná k rozdělení směsi 1-Ac-2,4,5,7-THA a 1,3,6,8-THA. K velmi dobrému rozdělení ($R_{1,2} = 2,8$) dochází již ve velmi krátkém elučním čase (do 3 minut). Snížením obsahu MeOH (průtokové rychlosti) lze snadno převést analytickou separaci do preparativního módu.

Bohužel je tato mobilní fáze nevhodná pro analýzu 1-Ac-2,4,5,7,8-PHA.

4.1.2.2 Acetonitril jako organický modifikátor mobilní fáze

Protože se 1-acetyl-2,4,5,7,8-pentahydroxyanthrachinon podařilo z kolony vymýt čistým acetonitrilem (ACN), byly vyzkoušeny mobilní fáze s ACN jako organickým modifikátorem. Jako druhá složka mobilní fáze byl opět použit 25 mM octanový pufr pH 4,0. Nejprve byly proměřeny samostatně vzorky 1-Ac-2,4,5,7,8-PHA a 1-Ac-2,4,5,7-THA.

V tabulce 4 jsou uvedeny výsledky, které byly získány proměřením vlivu obsahu ACN na retenci obou acetylovaných derivátů při průtokové rychlosti $F_m = 0,7$ ml/min. V reversním separačním módu má ACN jako organický modifikátor mobilní fáze vyšší eluční sílu než MeOH, proto byl nejvyšší proměřovaný obsah ACN v mobilní fázi nižší než v případě methanolických mobilních fází (viz kap. 4.1.2.1).

Tabulka 4: Vliv obsahu ACN v mobilní fázi ACN/25 mM octanový pufr pH 4,0 na retenci 1-Ac-2,4,5,7,8-PHA a 1-Ac-2,4,5,7-THA, při průtoku $F_m = 0,7$ ml/min, UV detekce při $\lambda = 270$ nm, kde k je retenční faktor, AS je faktor asymetrie.

ACN (%)	1-acetyl-2,4,5,7,8-penta-		1-acetyl-2,4,5,7-tetra-	
	k	AS	k	AS
50	0,48	0,72	1,56	1,06
30	7,90	0,61	10,91	0,56
27	15,62	1,46	18,69	0,93
26	14,98	0,47	17,90	0,60
25	17,26	0,53	19,58	0,61

Z tabulky 4 je vidět, že se snižujícím se obsahem ACN v mobilní fázi se zvyšuje retence obou studovaných analytů. Při nejvyšším proměřovaném obsahu ACN docházelo k velmi rychlé eluci 1-Ac-2,4,5,7,8-PHA, snížením obsahu ACN v mobilní

fázi na 30 obj. % a níže došlo k podstatnému prodloužení retence obou derivátů, které bylo doprovázeno zhoršením symetrie píků.

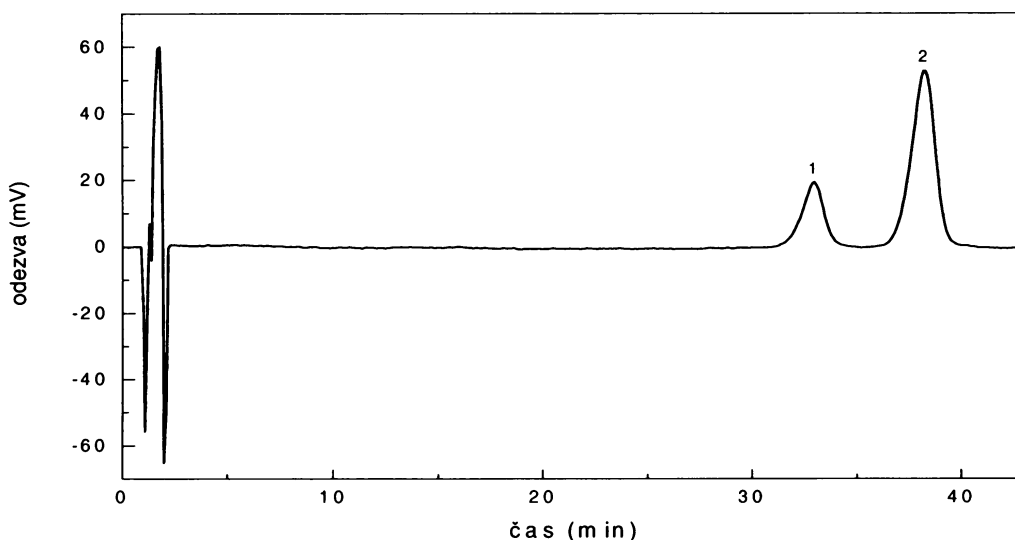
V tabulce 5 jsou zaznamenány hodnoty retence, rozlišení a selektivity získané při separaci směsi 1-Ac-2,4,5,7-THA a 1-Ac-2,4,5,7,8-PHA v závislosti na třech obsazích ACN v mobilní fázi. Z tabulky 4 vyplynulo, že při těchto obsazích ACN v mobilní fázi (27 - 25 obj. %) by mohlo dojít k dostatečnému rozdělení obou analytů i ve směsi a následně i v reálném vzorku.

Tabulka 5: Vliv obsahu ACN v mobilní fázi ACN/25 mM octanový pufr pH 4,0 a průtoku $F_m = 0,7$ ml/min. na retenci a rozlišení směsi 1-Ac-2,4,5,7,8-PHA a 1-Ac-2,4,5,7-THA, UV detekce při $\lambda = 270$ nm, kde k_1 a k_2 je retenční faktor 1-Ac-2,4,5,7,8-PHA, respektive 1-Ac-2,4,5,7-THA, $R_{1,2}$ je jejich vzájemné rozlišení a $\alpha_{1,2}$ je selektivita.

ACN (%)	k_1	k_2	$R_{1,2}$	$\alpha_{1,2}$
27	10,43	12,09	2,16	1,16
26	15,20	17,64	2,42	1,16
25	16,65	19,48	2,73	1,17

Z tabulky 5 je zřejmé, že i s velmi malým snížením obsahu ACN v mobilní fázi došlo ke zdatnému zvýšení rozlišení, zatímco selektivita zůstala prakticky nezměněna. Při porovnání hodnot retenčních faktorů naměřených v identických mobilních fázích (pro jednotlivé deriváty (tabulka 4) versus deriváty ve směsi (tabulka 5)) je patrné, že ve směsi došlo ke zkrácení jejich retenčních faktorů. Tento jev není neobvyklý a bývá způsoben vzájemným ovlivňováním analytů ve směsi. Na obr. 4 je ukázka separace směsi 1-Ac-2,4,5,7,8-PHA a 1-Ac-2,4,5,7-THA.

Bohužel v acetonitrilových mobilních fázích se nepodařilo detekovat 1,3,6,8-THA. Vzhledem k absenci jeho standardu a vzhledem k tomu, že ve směsném vzorku s jeho acetylovaným analogem je minoritní složkou, nelze rozhodnout, zda v acetonitrilových mobilních fázích docházelo ke koeluci 1,3,6,8-THA s 1-Ac-2,4,5,7-THA nebo retence 1,3,6,8-THA byla natolik vysoká, že jeho pík již nemohl být detekován.



Obr. 4: Separace směsi 1-Ac-2,4,5,7,8-PHA (pík 1) a 1-Ac-2,4,5,7-THA (pík 2) v mobilní fázi 25/75 (v/v) ACN/25 mM octanový pufr pH 4,0 a průtoku mobilní fáze $F_m = 0,7$ ml/min, UV detekce při $\lambda = 270$ nm.

Závěr:

V binární mobilní fázi ACN/25 mM octanový pufr pH 4,0 je možné rozdělit směs 1-Ac-2,4,5,7-THA a 1-Ac-2,4,5,7,8-PHA až na základní linii. Separace probíhá v časovém intervalu do 45 minut. Bohužel v acetonitrilové mobilní fázi nedošlo k detekci 1,3,6,8-THA.

4.1.2.3 Ternární mobilní fáze methanol/acetonitril/octanový pufr

Vzhledem k tomu, že 1,3,6,8-THA nebyl detekován v mobilní fázi s acetonitrilem jako organickým modifikátorem a 1-Ac-2,4,5,7,8-PHA neeluoval v mobilních fázích obsahujících methanol, byla vyzkoušena ternární mobilní fáze s proměnlivým obsahem MeOH a ACN. Vodnou složku mobilní fáze tvořil 25 mM octanový pufr o různých hodnotách pH (3,5 - 5,5).

Jako první byl hledán nejvhodnější objemový poměr všech tří složek mobilní fáze za přítomnosti 25 mM octanového pufru pH 4,0. Vliv složení mobilní fáze na retenci a separaci byl proměřen pro 1-Ac-2,4,5,7,8-PHA, směsný vzorek 1-Ac-2,4,5,7-THA a 1,3,6,8-THA a směs 1-Ac-2,4,5,7,8-PHA s 1-Ac-2,4,5,7-THA (v poměru 1:1).

Výsledky jsou uvedeny v tabulce 6, ze které je vidět, že pokud došlo v dané fázi k vysoké retenci jednoho z analytů, další analyty (jejich směsi) již v této fázi nebyly měřeny (např. mobilní fáze s 40% MeOH a 10% ACN). Stejný princip byl aplikován i pokud jeden z analytů měl velmi krátkou retenci nebo podobnou s dalšími proměřovanými analyty.

Z tabulky 6 vyplývá, že akceptovatelných retencí a dobrého rozlišení 1-Ac-2,4,5,7,8-PHA a 1-Ac-2,4,5,7-THA (kritický pár) je dosaženo při vysokém obsahu 25 mM octanového pufru v mobilní fázi. Při zvyšujícím se obsahu MeOH v mobilní fázi se retence a rozlišení jednotlivých analytů snižují. V tabulce je tučně vyznačena mobilní fáze, jejíž objemové poměry se jeví jako nejvhodnější. Mobilní fáze 15/35/50 (v/v/v) MeOH/ACN/25 mM octanový pufr pH 4,0 poskytovala dostatečně krátkou retenci 1,3,6,8-THA, důležitou pro jeho detekci, a rozlišení téměř na základní linii směsi 1-Ac-2,4,5,7,8-PHA a 1-Ac-2,4,5,7-THA ($R = 1,13$).

Při tomto složení (objemových poměrech) mobilní fáze byla proměřena závislost retence směsi všech tří studovaných látek na hodnotě pH 25 mM octanového pufru v rozmezí 3,5 - 5,5 a výsledky jsou shrnuty v tabulce 7. Z tabulky 7 je patrné, že se vzrůstajícím pH mobilní fáze klesají retenční faktory všech studovaných látek. Rozlišení 1-Ac-2,4,5,7,8-PHA a 1-Ac-2,4,5,7-THA se se vzrůstající hodnotou pH nejprve zvyšuje (maxima dosahuje při pH = 4,5) a pak začíná klesat. Rozlišení mezi 1-Ac-2,4,5,7-THA a 1,3,6,8-THA se se stoupající hodnotou pH pufru zvyšuje.

Tabulka 6: Vliv obsahu MeOH a ACN v mobilní fázi MeOH/ACN/25 mM octanový pufr o pH = 4,0 na retenci 1-Ac-2,4,5,7,8-PHA (k_1), směsi 1-Ac-2,4,5,7-THA a 1,3,6,8-THA (k_2 , respektive k_3) a směsi 1-Ac-2,4,5,7,8-PHA a 1-Ac-2,4,5,7-THA (k_1 , respektive k_2); průtok mobilní fáze $F_m = 0,7$ ml/min, UV detekce při $\lambda = 270$ nm, kde k jsou příslušné retenční faktory, R je rozlišení analytů a α je selektivita.

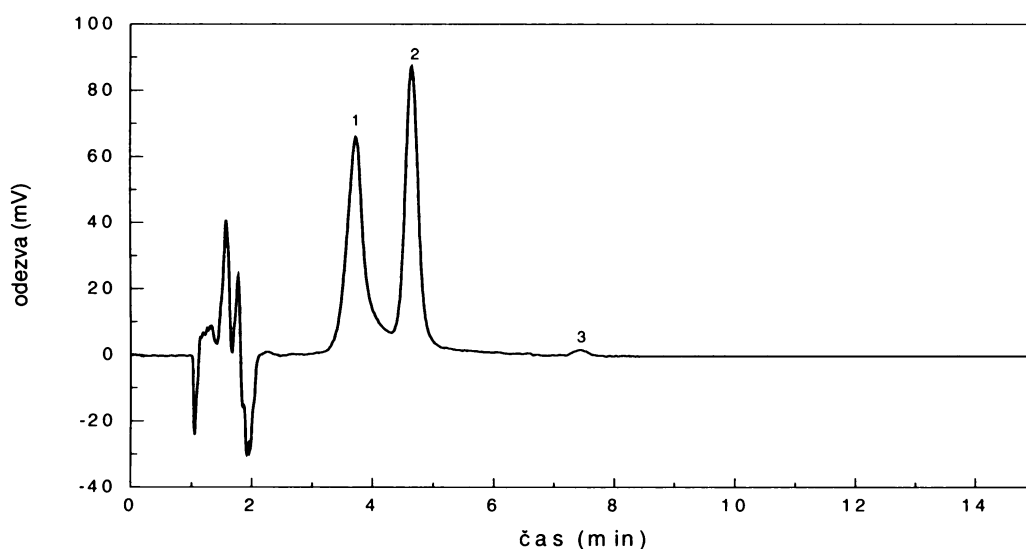
MeOH (%)	ACN (%)	1-Ac-2,4,5,7,8-PHA			směs 1-Ac-2,4,5,7-THA a 1,3,6,8-THA			směs 1-Ac-2,4,5,7,8-PHA a 1-Ac-2,4,5,7-THA		
		k_1	k_2	k_3	$R_{2,3}$	$\alpha_{2,3}$	k_1	k_2	$R_{1,2}$	$\alpha_{1,2}$
40	10	24,23	-	-	-	-	-	-	-	-
50	10	5,70	5,59	10,01	5,25	1,79	-	-	-	-
60	10	3,10	3,39	5,97	4,14	1,76	-	-	-	-
30	20	6,56	9,32	16,30	8,29	1,75	-	-	-	-
40	20	3,07	3,07	5,48	5,27	1,79	-	-	-	-
50	20	1,17	1,23	2,31	3,62	1,88	-	-	-	-
60	20	0,47	0,57	1,13	2,47	1,98	-	-	-	-
10	30	20,20	-	-	-	-	-	-	-	-
14	30	-	4,48	7,88	7,24	1,76	4,08	5,03	1,25	1,23
15	30	-	5,06	8,96	7,40	1,77	3,07	3,96	1,24	1,29
20	30	2,77	3,23	5,83	5,93	1,80	2,64	3,20	1,16	1,21
30	30	1,65	2,90	4,97	4,89	1,71	-	-	-	-
40	30	0,99	0,91	1,75	3,51	1,92	-	-	-	-
5	35	2,84	2,69	4,92	7,52	1,83	2,77	3,60	1,03	1,30
10	35	2,28	2,94	5,24	6,40	1,78	2,18	2,91	1,13	1,33
15	35	1,81	2,30	4,13	5,25	1,80	1,71	2,28	1,13	1,33

(- ... neměřeno)

Tabulka 7: Vliv pH 25 mM octanového pufru v mobilní fázi 15/35/50 (v/v/v) MeOH/ACN/25 mM octanový pufr na retenci a rozlišení směsi 1-Ac-2,4,5,7,8-PHA (k_1), 1-Ac-2,4,5,7-THA (k_2) a 1,3,6,8-THA (k_3); průtok mobilní fáze 0,7 ml/min, UV detekce při $\lambda = 270$ nm.

pH	k_1	k_2	k_3	$R_{1,2}$	$R_{2,3}$	$\alpha_{1,2}$	$\alpha_{2,3}$
3,5	3,07	3,33	5,75	0,56	6,12	1,08	1,73
4,0	1,93	2,42	4,32	0,96	5,89	1,25	1,79
4,5	1,56	2,01	3,94	1,21	6,70	1,29	1,96
5,0	1,35	1,72	3,80	0,63	7,00	1,27	2,21
5,5	0,80	1,20	3,44	0,89	7,04	1,50	2,87

Jako nejvýhodnější experimentální podmínky pro separaci všech tří studovaných derivátů se jeví mobilní fázi o složení 15/35/50 (v/v/v) MeOH/ACN/25 mM octanový pufr o pH = 4,5, průtoku mobilní fáze 0,7 ml/min. Na obr. 5 je uvedena separace směsi 1-Ac-2,4,5,7,8-PHA, 1-Ac-2,4,5,7-THA a 1,3,6,8-THA za těchto podmínek.



Obr. 5: Separace 1-Ac-2,4,5,7,8-PHA (pík 1), 1-Ac-2,4,5,7-THA (pík 2) a 1,3,6,8-THA (pík 3) v mobilní fázi 15/35/50 (v/v/v) MeOH/ACN/25 mM octanový pufr o pH = 4,5 a průtoku 0,7 ml/min, UV detekce při $\lambda = 270$ nm.

Závěr:

Vhodnou mobilní fází pro separaci směsi všech tří derivátů se ukázala být ternární mobilní fáze MeOH/ACN/25 mM octanový pufr s nízkými obsahy obou organických složek. V mobilní fázi 15/35/50 (v/v/v) MeOH/ACN/25 mM octanový pufr byl sledován i vliv pH pufru na retenci a separaci studovaných analytů. Jako nejvýhodnější se jevila hodnota pH = 4,5. Jako nejvhodnější experimentální podmínky byla vybrána mobilní fáze o složení 15/35/50 (v/v/v) MeOH/ACN/25 mM octanový pufr o pH = 4,5 při průtoku mobilní fáze 0,7 ml/min, při použití této mobilní fáze došlo v rámci směsi všech tří derivátů k nejlepšímu rozdělení 1-Ac-2,4,5,7,8-PHA a 1-Ac-2,4,5,7-THA a derivát 1,3,6,8-THA byl ještě dobře detekovatelný.

4.2 SEPARACE MONO-, DI- A TRIHYDROXYLOVANÝCH ANTHRACHINONŮ

4.2.1 DETEKCE

K zajištění dostatečné citlivosti detekce studovaných látek byla proměřena spektra jednotlivých látek v rozsahu vlnových délek 150 – 500 nm.⁵ V tabulce 8 jsou zaznamenána lokální maxima studovaných látek. Jako nejvhodnější vlnová délka byla vybrána $\lambda = 254$ nm

Tabulka 8: Vlnové délky lokálních maxim studovaných analytů ⁵

analyt		λ (nm)	
1-HA	198	248	400
2-HA	196	242	304
1,2-DHA	–	–	250
1,4-DHA	224	248	280
1,2,4-THA	–	200	254

4.2.2 SEPARACE STUDOVANÝCH ANALYTŮ

4.2.2.1 Vliv obsahu acetonitrilu v mobilní fázi na retenci analytů

Vzhledem k tomu, že je známo, že některé ze studovaných derivátů tvoří pevnou intramolekulární vodíkovou vazbu (zejména 1-HA a 1,4-DHA),¹⁷ byla pro separaci studovaných hydroxyderivátů anthrachinonu vybrána jako první kolona Zorbax Extended-C18. Tato kolona umožňuje práci i při vyšších hodnotách pH pufru. Nejprve byl sledován vliv obsahu organického modifikátoru – acetonitrilu – v mobilní fázi ACN/borátový pufr na retenci hydroxylovaných derivátů anthrachinonu. Byly testovány mobilní fáze 80/20, 60/40 a 40/60 (v/v) ACN/10 mM borátový pufr. Při obou proměřovaných hodnotách pH borátového pufru (9,5 a 8,5) eluovala většina analytů z kolony s mrtvým časem.

V tabulce 9 jsou uvedeny pouze ty výsledky, kdy derivát eluoval v čase delším než je mrtvý čas, tzn. výsledky pro deriváty 1-HA a 1,4-DHA. Z tabulky je zřejmé, že při vysokých hodnotách pH pufru v mobilních fázích jsou analyty 2-HA, 1,2-DHA a 1,2,4-THA kompletně disociovány, tudíž značně polární, a proto eluují prakticky

s mrtvým časem. U derivátů 1-HA a 1,4-DHA, které jsou podstatně méně polární díky intramolekulární vodíkové vazbě uskutečňované mezi chinoidním kyslíkem a hydroxylovou skupinou v poloze 1 (event. 4), je retence vysoká i při nejvyšší proměřované hodnotě pH pufru v mobilních fázích s nízkým obsahem organického modifikátoru (40 obj. %).

Tabulka 9: Hodnoty retenčních faktorů (k) derivátů 1-HA a 1,4-DHA v MF ACN/10 mM borátový pufr o různém poměru organického modifikátoru a pufru a různé hodnotě pH pufru, průtok $F_m = 0,7$ ml/min, UV detekce při $\lambda = 254$ nm.

pH	Složení MF (ACN/pufr)		1-HA	1,4-DHA
9,5	80/20	k	0,68	0,75
	60/40	k	1,67	3,09
	40/60	k	8,47	11,91
8,5	60/40	k	1,97	3,89
	40/60	k	8,82	14,19

Nižší hodnoty pH pufru byly realizovány pomocí fosfátového pufru. Byl použit 20 mM fosfátový pufr o pH = 7,5; 6,5; 5,5 a 4,5. Složení mobilní fáze bylo 80/20, 60/40 a 40/60 ACN/20 mM fosfátový pufr. Výsledky jsou zaznamenány v tabulce 10.

Tabulka 10: Vliv obsahu acetonitrilu a hodnoty pH fosfátového pufru na retenci 1-HA, 2-HA, 1,2-DHA, 1,4-DHA a 1,2,4-THA v MF ACN/20 mM fosfátový pufr, průtok $F_m = 0,7$ ml/min, UV detekce při $\lambda = 254$ nm, kde k je retenční faktor.

pH	Složení MF (ACN/pufr)		1-HA	2-HA	1,2-DHA	1,4-DHA	1,2,4-THA
7,5	80/20	k	0,93	0,18	0	2,02	0
	60/40	k	2,07	0,42	0	5,78	0
	40/60	k	9,51	1,52	0,56	15,88	0
6,5	80/20	k	0,72	0,40	0,20	2,24	0
	60/40	k	2,18	0,80	0,59	6,16	0
	40/60	k	9,88	3,31	2,18	16,23	0,23
5,5	80/20	k	0,84	0,46	0,51	2,17	0
	60/40	k	2,23	0,91	0,98	5,89	0,82
	40/60	k	9,95	3,83	3,85	16,50	2,26
4,5	80/20	k	0,82	0,50	0,57	2,26	0,66
	60/40	k	2,33	0,92	1,03	5,82	1,41
	40/60	k	10,05	4,09	4,38	16,56	6,68

Z tabulky 10 je patrné, že s klesající hodnotou pH pufru se zvyšují retenční faktory derivátů 2-HA, 1,2-DHA a výrazně 1,2,4-THA. Pro tyto deriváty v zásadě platí, že čím je nižší hodnota pH pufru, tím je menší stupeň jejich disociace a tím je vyšší jejich retence v RP separačním systému. Retence u derivátů 1-HA a 1,4-DHA je při daném obsahu acetonitrilu v MF v rozmezí pH pufru 4,5 - 7,5 prakticky neměnná a pokles jejich retence je patrný až při hodnotě pH vyšší než 7,5. Ze získaných výsledků je zřejmé, že alespoň pro částečnou disociaci derivátů 1-HA a 1,4-DHA je třeba pH pufru vyšší než 7,5.

V rámci všech proměřovaných hodnot pH pufru nejvyšších retencí bylo vždy dosahováno v mobilních fázích s nejnižším proměřovaným obsahem acetonitrilu. Ze studovaných derivátů nejpomaleji eluoval 1,4-DHA a nejrychleji 1,2,4-THA při vyšších hodnotách pufru a 1,2-DHA při nižších proměřovaných hodnotách pH fosfátového pufru. Lze tedy předpokládat, že při použití mobilní fáze s nižší hodnotou pH pufru a nízkým obsahem ACN bude možné vzájemné rozlišení analytů i ve směsi.

Při použití kolony Zorbax Extended C-18 však byla pozorována nízká symetrie píků a vzhledem k tomu, že se ukázalo jako výhodnější použití nižších hodnot pH pufru, byla tato kolona vyměněna za kolonu Purospher C18. Na této koloně byla vyzkoušena separace směsi studovaných analytů: 1-HA, 2-HA, 1,2-DHA, 1,4-DHA a 1,2,4-THA (v poměru 4:1:2:4:2).

V rámci optimalizace separačních podmínek byla pro separaci této směsi vyzkoušena řada mobilních fází o různém složení:

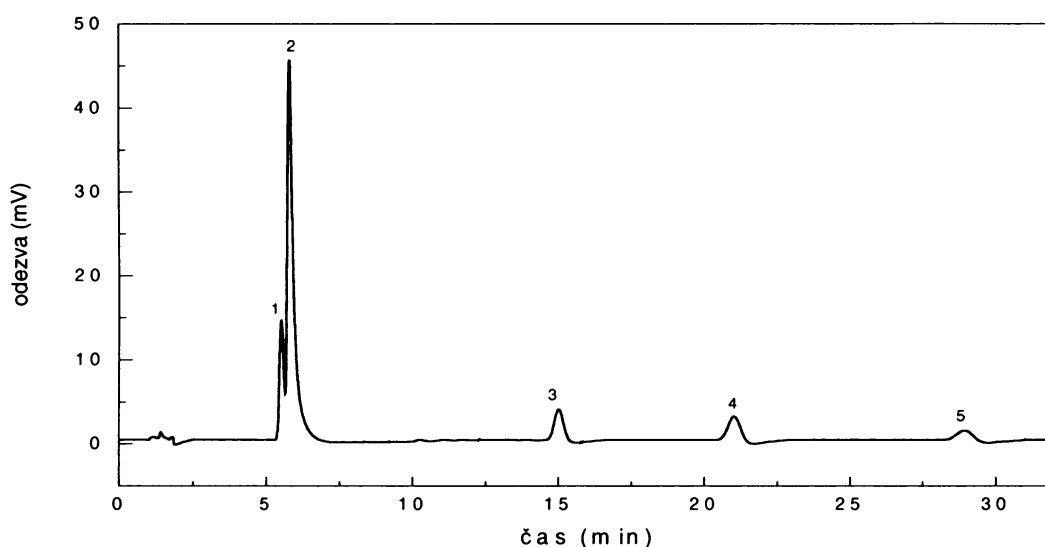
- 1) ACN/20 mM fosfátový pufr, pH = 4,5 (obsah ACN: 45 – 35 obj. %)
- 2) ACN/0.1 % triethylaminoctanový pufr, pH = 4,5 (obsah ACN: 50 – 30 obj. %)
- 3) ACN/25 mM octanový pufr, pH = 4,5 (obsah ACN: 45 – 35 obj. %)

Nejlépeších podmínek pro rozdělení výše uvedené směsi za podmínek izokratické eluce bylo dosaženo v mobilní fázi o složení 45/55 (v/v) ACN/25 mM octanový pufr o pH 4,5. Výsledky tohoto měření jsou zaznamenány v tabulce 11, kde jsou uvedeny hodnoty retenčních faktorů, rozlišení a faktorů asymetrie jednotlivých analytů ve směsi. Všechny analyty se od sebe oddělily. Pár analytů 2-HA a 1,2-DHA se bohužel nepodařilo rozdělit až na základní linii, jejich vzájemné rozlišení je 0,64. Toto rozlišení

je však nejlepší, jakého bylo v průběhu izokratických elucí dosaženo. Chromatografický záznam této separace je uveden na obrázku 6.

Tabulka 11: Separace směsi 2-HA, 1,2-DHA, 1,2,4-THA, 1-HA a 1,4-DHA v mobilní fázi 45/55 (v/v) ACN/25 mM octanový pufr o pH 4,5, průtok $F_m = 0,7$ ml/min, UV detekce při $\lambda = 254$ nm, $p = 60$ bar (k – retenční faktor, R – rozlišení, AS – faktor asymetrie).

	2-HA	1,2-DHA	1,2,4-THA	1-HA	1,4-DHA
k	2,90	3,10	8,37	12,12	16,81
R	-	0,64	19,03	8,08	7,69
AS	0,84	2,14	1,04	0,98	0,93



Obr. 6: Separace směsi 2-HA (pík 1), 1,2-DHA (pík 2), 1,2,4-THA (pík 3), 1-HA (pík 4) a 1,4-DHA (pík 5) v mobilní fázi 45/55 (v/v) ACN/25 mM octanový pufr o pH 4,5; průtoku $F_m = 0,7$ ml/min, UV detekce při $\lambda = 254$ nm.

Závěr:

Mobilní fáze s borátovým pufrém nejsou vhodné pro separaci směsi studovaných analytů, protože většina studovaných analytů eluuje v přítomnosti borátu o vysoké hodnotě pH s mrtvým časem. Mobilní fáze s fosfátovým pufrém je pro separaci směsi výše uvedených analytů lepší, zejména pak je vhodná MF s nižším obsahem organického modifikátoru a nízkou hodnotou pH pufru. Jako nejvhodnější se z hlediska separace analytů ve směsi jevila mobilní fáze o složení 45/55 (v/v) ACN/25 mM

octanový pufr o pH 4,5. V této mobilní fázi a za podmínek izokratické eluce eluovaly z kolony všechny analyty do 30 minut.

4.2.2.2 Gradientová eluce směsi anthrachinonů

Protože vzájemné rozlišení analytů 2-HA a 1,2-DHA nebylo při izokratické eluci dostatečně veliké a naopak retence později eluujících derivátů byla vysoká, byla vyzkoušena pro separaci směsi i gradientová eluce. Byl použit acetonitril jako organický modifikátor mobilní fáze ve směsi s 25 mM octanovým pufrem o pH 4,5.

V tabulce 12 jsou schematicky uvedeny všechny programy, které byly vyzkoušeny při hledání nejvhodnějšího gradientového programu pro rozdělení směsi studovaných analytů.

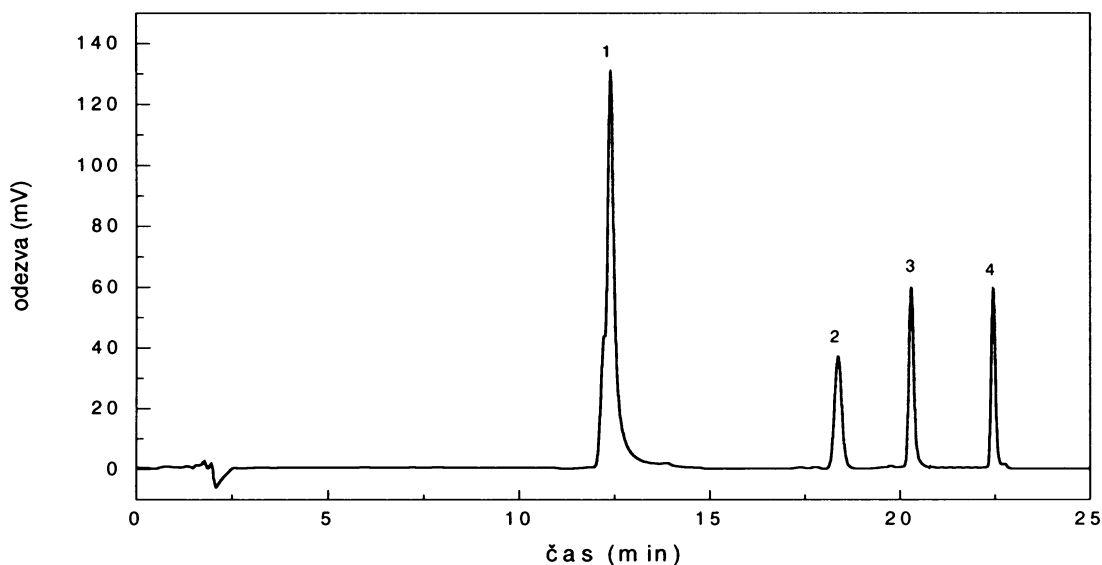
Jako první byl vyzkoušen gradientový program (program 1), který se skládal ze tří kroků. V prvním kroce probíhala izokratická eluce analytů při složení mobilní fáze 40/60 ACN/20 mM octanový pufr o pH 4,5, tento krok trval 15 minut. Ve druhém kroce byl gradientem navýšen obsah ACN v mobilní fázi na 60 obj. % během 5 minut. Třetím krokem byla opět izokratická eluce při složení mobilní fáze 60/40 ACN/20 mM octanový pufr o pH 4,5. Za těchto podmínek došlo k dobrému rozlišení analytů 2-HA a 1,2-DHA, avšak později eluující analyty měly zbytečně vysoké retence, proto byl vyzkoušen program 2.

Při použití programu 2 se zkrátila retence později eluujících analytů, avšak jejich symetrie a vzájemné rozlišení se zhoršilo.

Kvůli nepřilíživým výsledkům při použití programu 2, byl vyzkoušen program 3. Při této separaci došlo k lepšímu rozlišení později eluujících analytů a ke zlepšení symetrie pík, avšak analyty 2-HA a 1,2-DHA ztratily vzájemné rozlišení. Tato separace je pro ilustraci uvedena na obrázku 7.

Tabulka 12: Seznam všech použitých programů pro gradientovou eluci směsi studovaných analytů, mobilní fáze se skládala z ACN/25 mM octanového pufru o pH 4,5 v různých objemových poměrech, průtok byl konstantní $F_m = 0,7$ ml/min, UV detekce při $\lambda = 254$ nm. Tučně je zvýrazněn nejvhodnější gradientový program.

program 1	0 - 15 min 40/60	15 - 20 min 40/60 →60/40	20 - 35 min 60/40	-	-
program 2	0 - 13,5 min 40/60	13,5 - 20 min 40/60 →80/20	20 - 35 min 80/20	-	-
program 3	0 - 10 min 20/80 →50/50	10 - 15 min 50/50	15 - 20 min 50/50 →80/20	20 - 35 min 80/20	-
program 4	0 - 9 min 40/60	9 - 14 min 40/60 →80/20	14 - 25 min 80/20	-	-
program 5	0 - 8 min 40/60	8 - 13 min 40/60 →80/20	13 - 25 min 80/20	-	-
program 6	0 - 7,5 min 40/60	7,5 - 12,5 min 40/60 →80/20	12,5 - 25 min 80/20	-	-
program 7	0 - 7,5 min 40/60	7,5 - 10 min 40/60 →80/20	10 - 25 min 80/20	-	-
program 8	0 - 7 min 40/60	7 - 10 min 40/60 →80/20	10 - 25 min 80/20	-	-
program 9	0 - 5 min 40/60	5 - 7 min 40/60 →80/20	7 - 25 min 80/20	-	-
program 10	0 - 5 min 40/60	5 - 7 min 40/60 →60/40	7 - 9 min 60/40	9 - 10 min 60/40 →80/20	10 - 25 min 80/20



Obr. 7: Separace směsi: koeluce 2-HA a 1,2-DHA (pík 1), 1,2,4-THA (pík 2), 1-HA (pík 3) a 1,4-DHA (pík 4) při použití gradientového programu 3, průtok $F_m = 0,7$ ml/min, UV detekce při $\lambda = 254$ nm.

Kvůli koeluci analytů 2-HA a 1,2-DHA a také kvůli delší retenci všech analytů byl navržen program 4. Při jeho použití se zkrátila retence analytu 1,2,4-THA, avšak stále byla celá analýza příliš dlouhá (do 25 min).

Program 5 navrátil vzájemné rozlišení analytům 2-HA a 1,2-DHA, ale retence všech analytů byla stále příliš vysoká, program 6 přinesl další zlepšení rozlišení mezi analyty 2-HA a 1,2-DHA a program 7 umožnil další zkrácení retence všech analytů ve směsi.

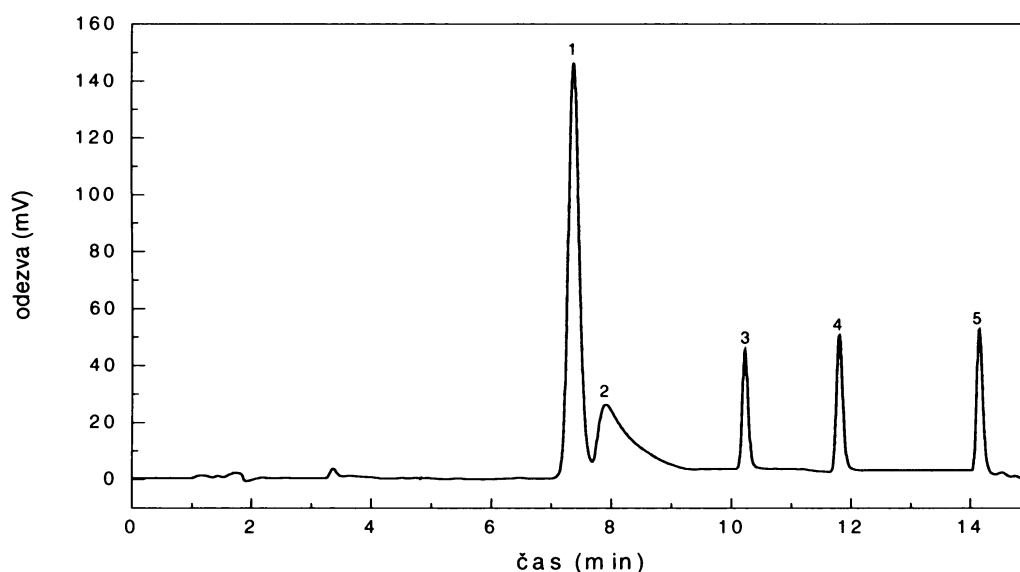
Při programu 8 došlo k dalšímu zkrácení retence všech analytů, avšak vzájemné rozlišení a symetrie píků nebyly dobré. Program 9 dále zkrátil retenci všech analytů ve směsi, avšak symetrie píků byla stále nedostatečná pro rozdělení analytů až na základní linii.

Nejlepší separace směsi proběhla při programu 10, hodnoty retenčních faktorů, asymetrie píků a hodnoty rozlišení jsou zaznamenány v tabulce 13. Prvním krokem gradientového programu byla izokratická eluce po dobu 5 minut při složení mobilní fáze 40/60 ACN/25 mM octanový pufr o pH 4,5. Druhý krok změnil během 2 minut složení mobilní fáze na 60/40 ACN/25 mM octanový pufr o pH 4,5. Mobilní fáze 60/40 ACN/25 mM octanový pufr o pH 4,5 byla poté využita k 2 minutové izokratické eluci.

Pak následovala změna mobilní fáze na 80/20 ACN/25 mM octanový pufr o pH 4,5, tento krok trval pouze 1 minutu. Do konce separace pak probíhala izokratická eluce při separačních podmínkách 80/20 ACN/25 mM octanový pufr o pH 4,5. Na obázku 8 je vidět samotná seprace celé směsi, při které bylo dosaženo nejvyššího rozlišení mezi analyty 2-HA (pík 1) a 1,2-DHA (pík 2), a to $R = 0,85$. Tvar píku, náležející derivátů 1,2-DHA však vykazoval značnou asymetrii. Doba analýzy nepřekročila 15 min.

Tabulka 13: Separace směsi 2-HA, 1,2-DHA, 1,2,4-THA, 1-HA a 1,4-DHA při použití gradientového programu 10, složení mobilní fáze ACN/25 mM octanový pufr o pH 4,5, průtok $F_m = 0,7$ ml/min, UV detekce při $\lambda = 254$ nm, $p = 60$ bar (k – retenční faktor, R – rozlišení, AS – faktor asymetrie).

	2-HA	1,2-DHA	1,2,4-THA	1-HA	1,4-DHA
k	3,27	3,58	4,91	5,83	6,85
R	-	0,85	4,15	8,23	8,84
AS	1,15	3,69	1,26	1,13	1,58



Obr. 8: Separace směsi 2-HA (pík 1), 1,2-DHA (pík 2), 1,2,4-THA (pík 3), 1-HA (pík 4) a 1,4-DHA (pík 5) při použití programu 10; průtok $F_m = 0,7$ ml/min, UV detekce při $\lambda = 254$ nm.

Závěr:

Byl hledán nejvhodnější gradientový program, který by zajistil retenci všech analytů ve zkoumané směsi tak, aby analýza byla dostatečně rychlá a rozlišení analytů 2-HA a 1,2-DHA bylo co největší. Jako nejvhodnější program pro gradientovou eluci směsi studovaných analytů byl nalezen program 10, při kterém nebyla retence žádného z analytů delší než 15 minut a 2-HA se téměř úplně oddělil od 1,2-DHA.

4.3 SEPARACE PTERINŮ

4.3.1 DETEKCE

Pro nalezení nejvhodnějších podmínek pro detekci studovaných pterinů byla proměřena jejich UV/VIS a fluorescenční spektra. V tabulce 14 jsou zaznamenána lokální maxima studovaných pterinů v UV/VIS oblasti, pro měření byla jako nejvhodnější vlnová délka zvolena $\lambda = 290$ nm.

Tabulka 14: Vlnové délky lokálních maxim analytů v UV/VIS oblasti.

analyt	λ (nm)	
biopterin	280	358
isoxanthopterin	290	348
leukopterin	304	340
xanthopterin	278	390

Tabulka 15: Vlnové délky lokálních maxim analytů ve fluorescenční oblasti.

analyt	λ (nm)	
	emisní	excitační
biopterin	429	342
isoxanthopterin	402	376
leukopterin	416	365
xanthopterin	465	363

V tabulce 15 jsou zaznamenána lokální maxima fluorescenčních spekter studovaných látek, spektra byla měřena z důvodu přirozené fluorescence studovaných pterinů.

Při měření fluorescenčního spektra biopterinu bylo zesílení fotonásobiče nastaveno na 900 V, emisní spektrum bylo měřeno při excitační vlnové délce 427 nm, excitační spektrum bylo měřeno při emisní vlnové délce 380 nm. U isoxanthopterinu bylo zesílení fotonásobiče nastaveno na 600 V, emisní spektrum bylo měřeno při excitační vlnové délce 376 nm, excitační spektrum bylo měřeno při emisní vlnové délce 355 nm. Při proměření daných spekter leukopterinu bylo zesílení fotonásobiče nastaveno na 1200 V, emisní spektrum bylo měřeno při excitační vlnové délce 416 nm, excitační spektrum bylo měřeno při emisní vlnové délce 365 nm. Na závěr pak zesílení fotonásobiče pro xanthopterin bylo 650 V, emisní spektrum měřeno při excitační vlnové délce 465 nm a excitační spektrum při vlnové délce 361 nm.

Pro použití fluorescenčního detektoru by byla vhodná excitační $\lambda = 372$ nm a emisní $\lambda = 428$ nm.

4.3.2 SEPARACE STUDOVANÝCH ANALYTŮ

Vzhledem k velice špatné rozpustnosti standardů látek v běžných organických rozpouštědlech bylo pro jejich převedení do roztoku vyzkoušeno několik rozpouštědel (methanol, acetonitril, voda a dimethylsulfoxid). Ačkoliv byly v literatuře^{30,32} nalezeny záznamy o velice dobré rozpustnosti těchto derivátů ve vodě a ostatních běžných organických rozpouštědlech, nemohu toto tvrzení potvrdit, neboť se rozpouštěla jen velice nepatrná množství analytů, která při analýze nebyla detekovatelná. Nejlépe se standardy rozpouštěly v dimethylsulfoxidu (DMSO), proto bylo toto rozpouštědlo použito pro přípravu zásobních roztoků všech čtyř standardů – xanthopterinu, isoxanthopterinu, leukopterinu a biopterinu.

Pro optimalizaci separace byly použity mobilní fáze s vysokým obsahem vodného roztoku 20 mM fosfátového pufru v kombinaci s methanolem jako organickým modifikátorem mobilní fáze. Tento postup byl zvolen na základě obdobné studie separace derivátů pterinu z ruměnice pospolné, kdy při nízkém obsahu methanolu (4 obj. %) v mobilní fázi byly studovány analyty xanthopterin a isoxanthopterin.³² V průběhu optimalizace byl kvůli rychlé retenci analytů i v mobilních fázích s velmi nízkým obsahem organického modifikátoru studován také vliv stacionární fáze na průběh separace.

4.3.2.1 Separace na koloně Purospher C18

Pro nalezení vhodných podmínek metody pro separaci pterinů byla nejprve použita kolona Purospher C18. Na základě dostupné literatury byly testovány mobilní fáze, ve kterých byl vysoký obsah 20 mM fosfátového pufru o hodnotě pH 3,0 s methanolem jako organickým modifikátorem mobilní fáze. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 16.

Tabulka 16: Vliv obsahu MeOH v mobilní fázi na eluci xanthopterinu, isoxanthopterinu, leukopterinu a biopterinu v mobilní fázi MeOH/20 mM fosfátový pufr pH 3,0, průtok $F_m = 0,7$ ml/min, UV detekce při $\lambda = 290$ nm, kde k je retenční faktor.

Složení MF		xanthopterin	isoxanthopterin	leukopterin	biopterinu
20/80	k	0,19	0,15	0	0
15/95	k	0,21	0,24	0,13	0,16
10/90	k	0,24	0,52	0,21	0,32
5/95	k	0,41	0,88	0,36	0,62

Z tabulky 16 je vidět, že i v mobilních fázích s nízkým obsahem methanolu byla retence všech derivátů krátká. Se snižujícím se obsahem methanolu v MF se retence velmi mírně prodlužovala a v mobilní fázi s nejnižším proměřovaným obsahem methanolu v mobilní fázi (5/95 MeOH/20 mM fosfátový pufr pH 3,0) všechny studované analyty eluovaly do 10 minut. Pro mobilní fázi o tomto složení byl sledovaný vliv pH 20 mM fosfátového pufru na retenci analytů a symetrii píků s ohledem najít takovou hodnotu pH pufru vedoucí k prodloužení retence derivátů pterinu. Byly připraveny pufrы o hodnotách pH 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5 a 7,0). Výsledky dosažené při různých hodnotách pH pufru jsou sumarizovány v tabulce 17.

Tabulka 17: Vliv změny pH fosfátového pufru na retenci analytů a symetrii píků v mobilní fázi 5/95 MeOH/20 mM fosfátový pufr, průtok $F_m = 0,7$ ml/min, UV detekce při $\lambda = 290$ nm (k – retenční faktor, AS – faktor asymetrie).

pH pufru		xanthopterin	isoxanthopterin	leukopterin	biopterin
2,5	k	0,35	0,85	0,30	0,45
	AS	0,50	0,35	0,38	0,29
3,0	k	0,41	0,88	0,36	0,62
	AS	0,73	0,46	0,75	0,96
3,5	k	0,52	0,94	0,43	0,71
	AS	0,70	0,33	0,45	0,41
4,0	k	0,60	0,98	0,49	0,75
	AS	0,69	0,25	0,30	0,29
4,5	k	0,48	0,89	0,48	0,55
	AS	1,26	0,38	0,37	0,40
7,0	k	0,29	0,67	0,23	0,25
	AS	1,46	0,27	0,80	0,38

Z tabulky 17 je patrné, že při zvyšujícím se pH fosfátového pufru retenční faktory rostou, nabývají maxima při hodnotě pH 4,0 a pak opět klesají. Mírně se zlepšuje i symetrie píků do hodnoty pH 3,0 a pak se opět zhoršuje. Nejvíce symetrické píky byly

pozorovány při použití 20 mM fosfátového pufru o pH 3,0, a proto bylo v další části práce pracováno s touto hodnotou pH fosfátového pufru.

Závěr:

Při použití kolony Purospher C18 bylo z hlediska retence a případné separace pterinů nalezeno jako nejlepší složení mobilní fáze 5/95 (v/v) MeOH/20 mM fosfátový pufr pH 3,0. Všechny analyty eluovaly z kolony při těchto podmínkách do 10 minut, avšak retence nebyla dostatečně veliká, aby se daly analyty od sebe oddělit ve směsi.

4.3.2.2 Separace na koloně LiChrospher 100 RP-8

Protože retence derivátů byla i při nejnižším proměřovaném obsahu MeOH v MF krátká a tudíž nebylo na koloně Purospher možné rozdělit analyty ve směsi, byla jako druhá vyzkoušena kolona LiChrospher 100 RP-8. Tato stacionární fáze obsahuje oktylový řetězec navázaný na silikagelový nosič a tudíž je tato stacionární fáze polárnější než kolona Purospher C18 s navázaným oktadecylovým řetězcem. Použitá mobilní fáze se skládala opět z 20 mM fosfátového pufru o hodnotě pH 3,0 s methanolem jako organickým modifikátorem mobilní fáze a byly proměřovány MF s nízkým obsahem methanolu. Výsledky jsou shrnuty do tabulky 18.

Tabulka 18: Vliv složení mobilní fáze MeOH/20 mM fosfátový pufr pH 3,0 na retenci studovaných analytů, průtok $F_m = 0,7$ ml/min, UV detekce při $\lambda = 290$ nm, kde k je retenční faktor.

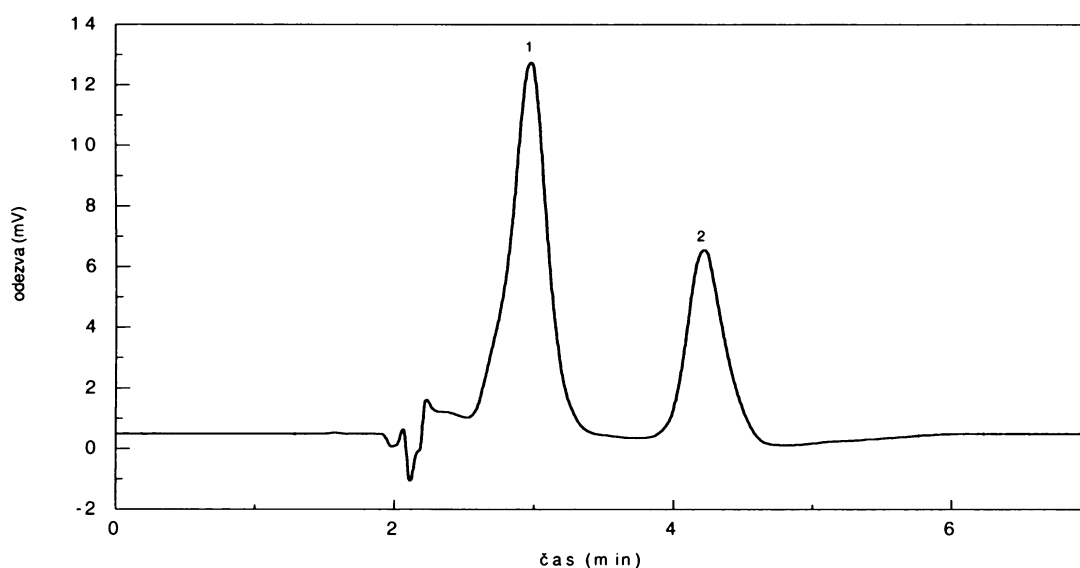
Složení MF		xanthopterin	isoxanthopterin	leukopterin	biopterin
20/80	k	0,10	0,15	0,10	0
10/90	k	0,38	0,59	0,23	0,36
5/95	k	0,47	0,81	0,32	0,65
3/97	k	0,50	0,91	0,31	0,76

Z tabulky 18 lze vidět, že se snižujícím se obsahem organického modifikátoru v mobilní fázi docházelo k nárůstu retenčních faktorů. Oproti předpokladu došlo v korespondujících MF k velmi mírnému zkrácení retence u leukopterinu a isoxanthopterinu, u xanthopterinu a biopterinu se retence lehce prodloužila na koloně LiChrospher 100 RP8 vzhledem ke koloně Purospher C18. Největších rozdílů

v retenčních faktorech bylo dosaženo v mobilní fázi o poměru acetonitril/pufr 3/97 (v/v) a při tomto složení MF byla vyzkoušena i separace směsí analytů, a proto byly připraveny 3 směsi. První směs se skládala z xanthopterinu a isoxanthopterinu (poměr 1:1), druhá směs byla připravena z leukopterinu a isoxanthopterinu (poměr 3:7) a poslední směs obsahovala xanthopterin, isoxanthopterin a leukopterin (poměr 2:2:1). Vzhledem k tomu, že biopterin eluoval v retenčních časech velice blízkých xanthopterinu, nebyl použit pro přípravu žádné směsi standardů, protože by se od něj ve směsi nedal oddělit.

Zatímco došlo k pěknému rozdělení obou binárních směsí, při separaci tříložkové směsi (leukopterin, xanthopterin a isoxanthopterin) docházelo ke koeluci analytů leukopterinu a xanthopterinu.

Na obrázku 9 je zaznamenán chromatogram analýzy směsi leukopterinu a isoxanthopterinu při separačních podmínkách 3/97 (v/v) MeOH/20 mM fosfátový pufr pH 3,0. Vzájemné rozlišení těchto dvou analytů bylo 2,57.



Obr. 9: Separace směsi leukopterinu (pík 1) a isoxanthopterinu (pík 2) v mobilní fázi 3/97 MeOH/20 mM fosfátový pufr pH 3,0 při průtoku $F_m = 0,7$ ml/min a UV detekci $\lambda = 290$ nm.

Na obrázku 9 je vidět, že leukopterin ještě nemá dostatečně vysokou retenci pro úplné oddělení se od mrtvého času. Všechny analyty eluovaly z kolony v čase kratším než 5 minut.

Závěr:

Použití kolony LiChrospher 100 RP-8 nepřineslo podstatnější prodloužení retence všech všech studovaných analytů. Nejvhodnější mobilní fází pro analýzu pterinů na této koloně se jevila mobilní fáze 3/97 (v/v) MeOH/20 mM fosfátový pufr pH 3,0 o průtoku mobilní fáze $F_m = 0,7$ ml/min a při UV detekci $\lambda = 290$ nm. V této mobilní fázi se podařilo i oddělit leukopterin od isoxanthopterinu a xanthopterin od isoxanthopterinu. Při separaci xanthopterinu ve směsi s leukopterinem docházelo k jejich vzájemné koeluci.

4.3.2.3 Separace na koloně Spherisorb ODS-2

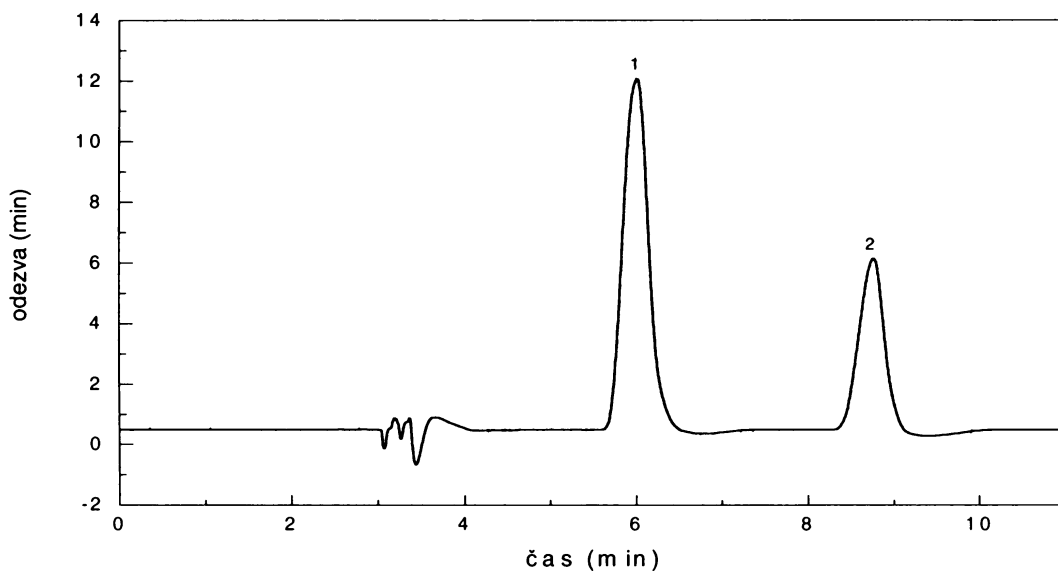
Protože výměna oktadecylové stacionární fáze za oktylovou stacionární fázi nepřinesla výrazněji delší eluci derivátů pterinu, byla jako třetí testována kolona Spherisorb ODS-2. Tato kolona obsahovala opět vázané oktadecylové řetězce na silikagelový nosič, avšak na rozdíl od dvou předchozích kolon byla dvakrát tak dlouhá. Pro retenční a separační chování sledovaných analytů byla použita opět mobilní fáze, která se skládala z methanolu a 20 mM fosfátového pufru o pH 3,0. Výsledky získané pro různý obsah methanolu v MF jsou shrnuty v tabulce 19.

Tabulka 19: Vliv složení mobilní fáze MeOH/20 mM fosfátový pufr pH 3,0 na retenci studovaných analytů, průtok $F_m = 0,7$ ml/min, UV detekce při $\lambda = 290$ nm, kde k je retenční faktor.

Složení MF		xanthopterin	isoxanthopterin	leukopterin	biopterin
20/80	k	0,15	0,20	0,12	0,20
10/90	k	0,41	0,76	0,37	0,50
5/95	k	0,72	1,44	0,67	0,98

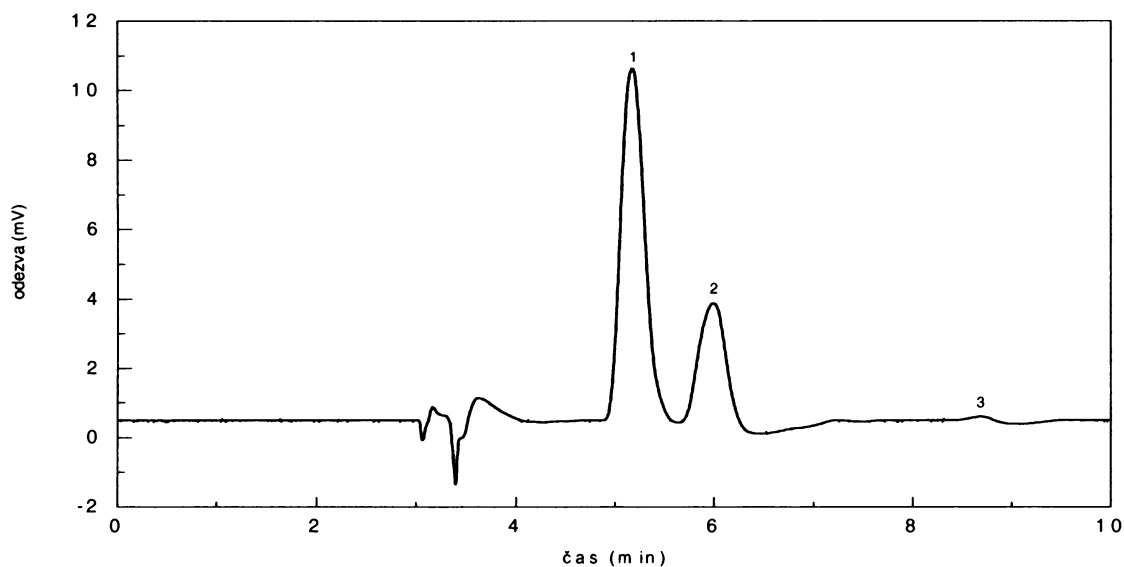
Z tabulky 19 je patrné, že závislost retenčních faktorů na obsahu methanolu v MF má obdobný trend jako v případě dvou již proměřených stacionárních fází, tedy se snižujícím se obsahem organického modifikátoru v mobilní fázi dochází k prodloužení retence všech studovaných analytů. Při porovnání retenčních faktorů jednotlivých analytů získaných v mobilní fázi 5/95 (v/v) MeOH/20 mM fosfátový pufr pH 3,0 na všech třech testovaných stacionárních fází (tab. 15 vs. 17 vs. 18) je zřejmé, že nejvyšší hodnoty byly získány na koloně Spherisorb ODS-2. Všechny analyty eluovaly z kolony

do 10 minut. Bohužel ani za těchto experimentálních podmínek nedošlo k oddělení leukopterinu od xanthopterinu. Separace směsí leukopterinu a isoxanthopterinu a xanthopterinu a isoxanthopterinu se však zlepšila. Na obr. 10 je vidět separace směsi leukopterinu a isoxanthopterinu.



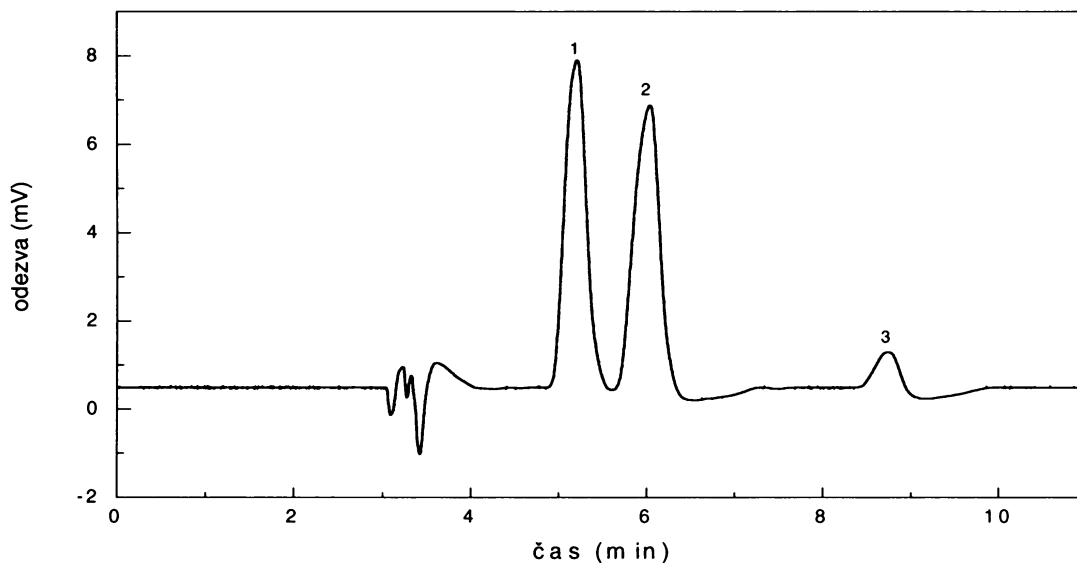
Obr. 10: Separace směsi leukopterinu (pík 1) a isoxanthopterinu (pík 2) při separačních podmínkách 5/95 MeOH/20 mM fosfátový pufr pH 3,0, průtok $F_m = 0,7$ ml/min, UV detekce při $\lambda = 290$ nm.

Za relativně optimalizovaných separačních podmínek byl analyzován reálný vzorek. Nejprve byl připraven vzorek ze štítků kněžic (viz kap. 3.3.2). Reálný vzorek byl nadávkován na kolonu a na obrázku 11 je vidět jeho seprace v MF 5/95 (v/v) MeOH/20 mM fosfátový pufr pH 3,0 při průtoku mobilní fáze $F_m = 0,7$ ml/min a UV detekci při $\lambda = 290$ nm.



Obr. 11: Separace reálného vzorku získaného ze štítků kněžice pásované při separačních podmínkách 5/95 MeOH/20 mM fosfátový pufr pH 3,0, průtok $F_m = 0,7$ ml/min, UV detekce při $\lambda = 290$ nm.

Na obrázku 11 je vidět, že se z rozdrcených štítků do roztoku dostaly 3 látky. Podle srovnání retenčních časů se standardy lze předpokládat, že pík 2 patří leukopterinu a pík 3 isoxanthopterinu (separace této směsi je na obrázku 10). Pík 1 neodpovídá retenci žádného z našich standardů. Pro potvrzení identifikace píků 2 a 3 byla použita metoda standardního přídatku. K reálnému vzorku (90 μ l) bylo přidáno 10 μ l zásobního roztoku standardu isoxanthopterinu a 10 μ l zásobního roztoku leukopterinu. Takto připravený vzorek byl opět analyzován za identických experimentálních podmínek. Výsledek této analýzy je zaznamenán na obrázku 12.



Obr. 12: Separace směsi reálného vzorku získaného ze štítků kněžice pásované s přidavkem leukopterinu (pík 2) a isoxanthopterinu (pík 3) při separačních podmínkách 5/95 MeOH/20 mM fosfátový pufr pH 3,0, průtok $F_m = 0,7$ ml/min, UV detekce při $\lambda = 290$ nm.

Z porovnání chromatogramů na obr. 11 a 12 je zřejmé, že pík 2 odpovídá standardu leukopterinu a pík 3 standardu isoxanthopterinu.

Závěr:

Bylo nalezeno vhodné složení mobilní fáze pro analýzu směsi standardů leukopterinu a isoxanthopterinu a xanthopterinu a isoxanthopterinu. Při použití kolony Spherisorb ODS-2 a mobilní fáze 5/95 (v/v) MeOH/20 mM fosfátový pufr pH 3,0 došlo také k separaci směsi látek izolovaných ze štítků kněžice pásované. Separace tohoto vzorku probíhala do 10 minut. Na základě srovnání jednotlivých píků s proměřenými standardními látkami a na základě přidavků standardů k reálnému vzorku byly v reálném vzorku identifikovány 2 analyty – leukopterinu a isoxanthopterin. Pík č. 1 na chromatogramu se nepodařilo identifikovat. Vzhledem k tomu, že nebyl dostupný erythropterin ve formě standardu, je možné, že tento pík náležel právě erythropterinu. Příprava erythropterinu a identifikace píku 1 bude předmětem dalšího studia.

5 ZÁVĚR

Byla vypracována analytická HPLC metoda pro separaci 1-acetyl-2,4,5,7-tetra-, 1,3,6,8-tetra- a 1-acetyl-2,4,5,7,8-pentahydroxyanthrachinonů – sekundárních metabolitů produkovaných houbou *Geosmithia lavendula*. Pro separaci byla použita kolona Purospher RP-18e.

Byly nalezeny vhodné vlnové délky pro UV detekci studovaných analytů.

Bylo zjištěno, že binární mobilní fáze MeOH/25 mM octanový pufr pH 4,0 je vhodná pro separaci směsi 1-acetyl-2,4,5,7-tetra- a 1,3,6,8-tetrahydroxyanthrachinonu, bohužel v těchto methanolických mobilních fázích nedochází k eluci 1-acetyl-2,4,5,7,8-pentahydroxyanthrachinonu.

Acetonitril jako organický modifikátor mobilní fáze byl z hlediska separace 1-acetyl-2,4,5,7,8-pentahydroxyanthrachinonu podstatně výhodnější. Separace 1-acetyl-2,4,5,7,8-penta- a 1-acetyl-2,4,5,7-tetrahydroxyanthrachinonu s dostatečným rozlišením proběhla až při nízkém obsahu acetonitrilu jako organického modifikátoru v mobilní fázi 25/75 (v/v) ACN/25 mM octanový pufr pH 4,0 při průtoku mobilní fáze 0,7 ml/min. Bohužel v acetonitrilových mobilních fázích nebylo možné detekovat 1,3,6,8-tetrahydroxyanthrachinon.

Vhodnou alternativou pro separaci směsi všech tří derivátů se ukázala být ternární mobilní fáze MeOH/ACN/25 mM octanový pufr s nízkými obsahy obou organických složek. V mobilní fázi 15/35/50 (v/v/v) MeOH/ACN/25 mM octanový pufr byl sledován i vliv pH pufru na retenci a separaci studovaných analytů. Jako nejvýhodnější se jevila hodnota pH = 4,5. Nejvhodnější experimentální podmínky se skládaly z mobilní fáze o složení 15/35/50 (v/v/v) MeOH/ACN/25 mM octanový pufr o pH = 4,5 při průtoku mobilní fáze 0,7 ml/min, při nichž došlo v rámci směsi všech tří derivátů k nejlepšímu rozdělení 1-acetyl-2,4,5,7,8-pentahydroxyanthrachinonu a 1-acetyl-2,4,5,7-tetrahydroxyanthrachinonu a 1,3,6,8-tetrahydroxyanthrachinon byl ještě dobře detekovatelný.

Dále byla vyvinuta analytická HPLC metoda pro separaci směsi 1-hydroxy-, 2-hydroxy-, 1,2-dihydroxy-, 1,4-dihydroxy- a 1,2,4-trihydroxyanthrachinonu. Pro vývoj metody byly vyzkoušeny dvě kolony - Zorbax Extend-C18 (umožňující pracovat i

v oblasti pH vyšší než 7) a PurospherRP-18e (vykazující dobrou symetrii píků díky sníženému obsahu kovů v silikagelové matici a účinné deaktivaci silanolových skupin).

Jako organický modifikátor mobilní fáze byl zvolen acetonitril, ve kterém se studované deriváty dobře rozpouštěly, vodná složka reversního separačního módu byla realizována různými typy pufrů (borátový, fosfátový, octanový). Byl sledován vliv obsahu acetonitrilu, typu pufru a jeho hodnota pH (v rozmezí 4,5 – 9,5) na retenční chování jednotlivých derivátů i jejich směsi. Bylo zjištěno, že vyšší obsah acetonitrilu a vyšší hodnoty pH pufru v mobilní fázi nejsou pro retenci většiny analytů vhodné, protože dochází k jejich velmi rychlé eluci. Za podmínek izokratické eluce se jako nejvhodnější podmínky pro separaci směsi 1-hydroxy-, 2-hydroxy-, 1,2-dihydroxy-, 1,4-dihydroxy- a 1,2,4-trihydroxyanthrachinonu jevila mobilní fáze 45/55 (v/v) ACN/25 mM octanový pufr o pH 4,5 při průtoku mobilní fáze 0,7 ml/min.

Kvůli nízkému rozlišení analytů 2-hydroxy- a 1,2-dihydroxyanthrachinonu byl hledán vhodný gradientový program pro separaci celé studované směsi tak, aby analýza směsi byla dostatečně rychlá a rozlišení 2-hydroxy- a 1,2-dihydroxyanthrachinonu bylo co největší. Z deseti testovaných programů se jako nejlepší ukázal program 10, složený z pěti kroků, kombinující lineární gradientovou i izokratickou eluci. Při použití tohoto programu eluovaly všechny analyty ve směsi v čase kratším než je 15 minut a bylo dosaženo nejvyššího rozlišení mezi analyty 2-hydroxy- a 1,2-dihydroxyanthrachinonu ($R = 0,85$).

Na závěr byla navržena analytická HPLC metoda pro separaci čtyř standardů derivátů pterinu (xanthopterin, isoxanthopterin, leukopterin a biopterin), které by mohly být obsažené v červeném zbarvení štítku kněžice pásované (*Graphosoma semipunctatum*).

Byly nalezeny vhodné vlnové délky pro UV a fluorescenční detekci studovaných analytů.

Separací systém byl v tomto případě realizován binární mobilní fází s methanolem jako organickým modifikátorem. Pro zajištění dostatečné retence jednotlivých derivátů pterinů byly studovány mobilní fáze s velmi nízkým obsahem methanolu (20 - 3 obj. %) v kombinaci s 20 mM fosfátovým pufrům o pH 2,5 - 7, nebo pouze 3,0. Postupně byly testovány tři kolony – Purospher C18, LiChrospher 100 RP-8 a Spherisorb ODS-2. První dvě se lišily délkou navázaného alkylového řetězce. Na obou kolonách docházelo

k velmi rychlé eluci studovaných analytů i v mobilních fázích s nejnižším proměřovaným obsahem methanolu. Na koloně LiChrospher 100 RP-8 v mobilní fázi 5/95 (v/v) MeOH/20 mM fosfátový pufr pH 3,0 došlo sice k rozdělení směsi leukopterinu a isoxanthopterinu a směsi xanthopterinu a isoxanthopterinu, avšak při separaci směsi leukopterinu a xanthopterinu docházelo k jejich vzájemné koleluci.

Jako třetí byla vyzkoušena opět oktadecylová stacionární fáze, avšak dvojnásobné délky. Za použití této kolony došlo k prodloužení retence všech derivátů v testovaných mobilních fázích. Nejvhodnější mobilní fází byla opět směs 5/95 (v/v) MeOH/20 mM fosfátový pufr pH 3,0. Za těchto podmínek došlo k eluci všech studovaných analytů, analýza nepřesáhla 10 minut a také došlo k separaci směsi leukopterinu a isoxanthopterinu a směsi xanthopterinu a isoxanthopterinu. Za těchto optimalizovaných podmínek byl analyzován reálný vzorek, izolovaný ze štítků kněžice pásované. Na základě srovnání jednotlivých píků získaných separací reálného vzorku s píky korespondujícími se standardy byly identifikovány 2 ze 3 píků reálného vzorku, a to jako leukopterin a isoxantopterin. Pro potvrzení identifikace byla použita metoda standardního přídatku. Třetí pík se nepodařilo identifikovat.

6 LITERATURA

[1] Moravcová, J.: *Biologicky aktivní přírodní látky*. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, Ústav chemie přírodních látek; V Praze 2006 (interní studijní pomůcka). Dostupné na URL: <<http://www.vscht.cz/lam/new/bapl2003-01.pdf>> [cit. 5.3.2009]

[2] Ahmed, S.; Fujii, S.; Kishikawa, N.; Ohba, Y.; Nakashima, K.; Kuroda, N.: Selective determination of quinones by high-performance liquid chromatography with on-line post column ultraviolet irradiation and peroxyoxalate chemiluminescence detection. *Journal of Chromatography A* **1133**, 76-82 (2006).

[3] Novotná, P.: *Stanovení barviv vyskytujících se v historických textiliích metodami HPLC a CE*. Diplomová práce. PřF UK v Praze, Katedra analytické chemie 1998.

[4] Novotná, P.; Pacáková, V.; Bosáková, Z.; Štulík, K.: High-performance liquid chromatographic determination of some anthraquinone and naphthoquinone dyes occurring in historical textiles. *Journal of Chromatography A* **863**, 235-241 (1999)

[5] Svobodová, E.: *Kapilární elektroforéza anthrachinonových barviv používaných v uměleckých dílech*. Diplomová práce. PřF UK v Praze, Katedra analytické chemie 2006.

[6] Orska-Gawrys, J.; Surowiec, I.; Kehl, J.; Rejniak, H.; Urbaniak-Walczak, K.; Trojanowicz, M.: Identification of natural dyes in archeological Coptic textiles by liquid chromatography with diode array detection. *Journal of Chromatography A* **989**, 239-248 (2003).

[7] Szostek, B.; Orska-Gawrys, J.; Surowiec, I.; Trojanowicz, M.: Investigation of natural dyes occurring in historical Coptic textiles by high-performance liquid chromatography with UV-VIS and mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A* **1012**, 179-192 (2003).

- [8] Blanc, R.; Espejo, T.; López-Montes, A.; Torres, D.; Crovetto, G.; Navalón, A.; Vílchez, J. L.: Sampling and identification of natural dyes in historical maps and drawings by liquid chromatography with diode-array detection. *Journal of Chromatography A* **1122**, 105-113 (2006).
- [9] Ismail, N. H.; Ali, A. M.; Aimi, N.; Kitajima, M.; Takayama, H.; Lajis, N. H.: Anthraquinones from *Morinda elliptica*. *Phytochemistry* **45**:8, 1723-1725 (1997).
- [10] Zhang, H.-X.; Liu, M.-C.: Separation procedures for the pharmacologically active components of rhubarb. *Journal of Chromatography B* **812**, 175-181 (2004).
- [11] Verma, S. C.; Singh, N. P.; Sinha, A. K.: Determination and locational variations in the quantity of hydroxyanthraquinones and their glycosides in rhizomes of *Rheum emodi* using high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **1097**, 59-65 (2005).
- [12] Liu, C.-L.; Zhu, P.-L.; Liu, M.-C.: Computer-aided development of a high-performance liquid chromatographic method for the determination of hydroxyanthraquinone derivatives in Chinese herb medicine rhubarb. *Journal of Chromatography A* **857**, 167-174 (1999).
- [13] Kolařík, M.: Fascinující svět podkorního hmyzu: houbové symbiózy. *Živa* **2**, 73-75 (2004).
- [14] Kubátová, A.; Kolařík, M.; Prášil, K.; Novotný, D.: Bark beetles and their galleries: well-known for little known fungi, case of *Geosmithia*. *Czech Mycology* **55**, 1-18 (2004).
- [15] Kolařík, M.: *Host preference, taxonomy, diversity and host range of fungi associated with bark beetles with an emphasis on the genus Geosmithia in temperate Europe*. Disertační práce. PřF UK v Praze, Katedra botaniky 2006.

- [16] Křesinová, Z.: *Studium sekundárních metabolitů houby Geosmithia Lavendula*. Diplomová práce. PřF UK v Praze, Katedra analytické chemie 2007.
- [17] Vaníková, J.: *Separace polyhydroxyanthrachinonových derivátů metodou HPLC*. Bakalářská práce. PřF UK v Praze, Katedra analytické chemie 2007.
- [18] Tomandl, J.: Pteriny. *Chemické listy* **92**, 689-697 (1998).
- [19] Cho, D. W.; Kim, S. H.; Yoon, M.; Jeoung, S. Ch.: Transient Raman spectroscopic studies on the excited-state intramolecular reverse proton transfer in 1-hydroxyanthraquinone. *Chemical Physics Letters* **391**, 314-320 (2004).
- [20] Fain, V. Y.; Zaitsev, B. E.; Ryabov, M. A.: Metal complexes with 1-hydroxyanthraquinone and its derivatives: Electronic absorption spectra and ligand structures. *Russian Journal of Coordination Chemistry* **32**, 610-613 (2006).
- [21] Sousa, A. T. de; Bessler, K. E.; Lemos, S. S.; Ellena, J.; Gatto, C. C.: Organotin complexes of Alizarin and Purpurin. *Zeitschrift für anorganische und allgemeine Chemie* **635**, 106-111 (2009).
- [22] Čopíková, J.; Uher, M.; Lapčík, O.; Moravcová, J.; Drašar, P: Přírodní barevné látky. *Chemické listy* **99**, 802-816 (2005).
- [23] Cárdenas, C.; Quesada, A. R.; Medina, M. A.: Evaluation of the anti-angiogenic effect of aloe-emodin. *Cellular and Molecular Life Sciences* **63**, 3083-3089 (2006).
- [24] Fain, V. Y.; Zaitsev, B. E.; Ryabov, M. A.: Tautomeric and conformational isomerism of natural hydroxyanthraquinones. *Chemistry of Natural Compounds* **42**:3, 269-276 (2006).
- [25] Kwon, Y.-S.; Koh, J.-Y.; Song, D.-K.; Kim, H.-Ch.; Kwon, M.-S.; Choi, Y.-S.; Wie, M.-B.: Danthron inhibits the neurotoxicity induced by various compounds causing

oxidative damages including β -amyloid (25-35) in primary cortical cultures. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **27**:5, 723-726 (2004).

[26] Kumar, M.; Rathore, D. P. S.; Singh, A. K.: Quinalizarin anchored on Amberlite XAD-2. A new matrix for solid-phase extraction of metal ions for flame atomic absorption spectrometric determination. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* **370**, 377-382 (2001).

[27] obrázek plošnice, převzato z internetu, dostupné na URL: <http://farm1.static.flickr.com/71/173893285_a7b1a45437.jpg?v=0> [cit. 24.9.2008]

[28] Watt, W. B.: Pteridine biosynthesis in the butterfly *Colias eurytheme*. *Journal of Biological Chemistry* **242**:4, 565-572 (1967).

[29] Niva, C. C.; Takeda, M.: Color changes in *Halyomorpha brevis* (Heteroptera: Pentatomidae) correlated with distribution of pteridines: regulation by environmental and physiological factors. *Comparative Biochemistry and Physiology B* **132**, 653-660 (2002).

[30] 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* **116**:1, 17-28 (1997).

[31] Socha, R.; Němec, V.: Coloration and pteridine pattern in a new, yolk body mutant of *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera: Pyrrhocoridae). *European Journal of Entomology* **93**, 525-534 (1996).

[32] 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).

- [33] Socha, R.; Němec, V.: Pteridine analysis in five body-color mutations of *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera, Pyrrhocoridae). *Acta Entomologica Bohemoslovaca* **89**, 195-203 (1992).
- [34] Cabrerizo, F. M.; Thomas, A. H.; Lorente, C.; Dántola, M. L.; Petroselli, G.; Erra-Balsells, R.; Capparelli, A. L.: Generation of reactive oxygen species during the photolysis of 6-(hydroxymethyl)pterin in alkaline aqueous solutions. *Helvetica Chimica Acta* **87**, 349-365 (2004).
- [35] Zorzi, G.; Redweik, U.; Trippe, H.; Penzien, J. M.; Thöny, B.; Blau, N.: Detection of sepiapterin in CSF of patients with sepiapterin reductase deficiency. *Molecular Genetics and Metabolism* **75**, 174-177 (2002).
- [36] Melber, Ch.; Schmidt, G. H.: Quantitative variations in the pteridines during the post-embryonic development of *Dysdercus* species (Heteroptera: Pyrrhocoridae). *Comparative Biochemistry and Physiology B* **108**:1, 79-94 (1994).
- [37] Ziegler, I.; McDonald, T.; Hesslinger, Ch.; Pelletier, I.; Boyle, P.: Development of the pteridine pathway in the zebrafish, *Danio rerio*. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 18926-18932 (2000).
- [38] Grygar, T.; Kučková, Š.; Hradil, D.; Hradilová, D.: Electrochemical analysis of natural solid organic dyes and pigments. *Journal of Solid State Electrochemistry* **7**, 706-713 (2003).
- [39] Kinjo, J.; Ikeda, T.; Watanabe, K.; Nohara, T.: An anthraquinone glycoside from *Cassia angustifolia* leaves. *Phytochemistry* **37**:6, 1685-1687 (1994).
- [40] Liou, M.-J.; Wu, P.-L.; Wu, T.-S.: Constituents of the roots of *Rubia yunnanensis*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **50** (2), 276-279 (2002).

[41] Koyama, J.; Morita, I.; Tagahara, K.; Bakari, J.; Aqil, M.: Capillary electrophoresis of Anthraquinones from *Cassia siamea*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **50** (8), 1103-1105 (2002).

[42] Li, Y.; Qi, S.; Chen, X.; Hu, Z.: Separation and determination of the anthraquinones in *Xanthophytum atropvensis pierre* by nonaqueous capillary electrophoresis. *Talanta* **65**, 15-20 (2005).

[43] Bosáková, Z.; Coufal, P.; Jelínek, I.; Pacáková, V.; Ševčík, J. G. K.; Štulík, K.: *Analytické separační metody*. Skriptum Univerzity Karlovy v Praze. Dotisk 1. vydání. Praha, Nakladatelství Karolinum, 2005.

[44] Bosáková, Z.; Peršl, J.; Jegorov, A.: Determination of lucidin in *Rubia tinctorum* aglycones by an HPLC method with isocratic elution. *Journal of High Resolution Chromatography* **23**:10, 600-602 (2000).

[45] Derksen, G. C. H.; Niederländer, H. A. G.; Beek, T. A. van: Analysis of anthraquinones in *Rubia tinctorum* L. by liquid chromatography coupled with diode-array UV and mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A* **978**, 119-127 (2002).

[46] Husain, S.; Sarma, P. N.; Rao, K. S. R.; Lakshmi, V. V. S.: Separation and determination of reaction mixtures of anthraquinone by gas chromatography. *Journal of chromatography A* **685**, 356-359 (1994).

[47] Wyk, B.-E.; Yenesew, A.; Dagne, E.: Chemotaxonomic survey of anthraquinones and pre-anthraquinones in roots of *Aloe* Species. *Biochemical Systematics and Ecology* **23**:3, 267-275 (1995).

[48] Huber, J. F. K.; Lamprecht, G.: Assay of neopterin in serum by means of two-dimensional high-performance liquid chromatography with automated column

switching using three retention mechanisms. *Journal of Chromatography B* **666**, 223-232 (1995).

[49] Altindag, Z. Z.; Baydar, T.; Isimer, A.; Sahin, G.: Neopterin as a new biomarker for the evaluation of occupational exposure to silica. *International Archives of Occupational and Environmental Health* **76**, 318-322 (2003).

[50] Tomandl, J.; Tallová, J; Tomandlová, M.; Palyza, V.: Determination of total oncopterin, neopterin and biopterin in human urine by high performance liquid chromatography with solid phase extraction. *Journal of Separation Science* **26**, 674-678 (2003).

[51] Wormell, P.; Gready, J. E.: Electronic spectra of some pterins and deazapterins. *Chemical Physics* **179**, 55-69 (1994).

[52] Coufal, P.: *High Performance Liquid Chromatography, HPLC*. Dostupné na URL: <<http://www.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html>> [cit. 9. 3. 2009]