

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta
Katedra analytické chemie

Doktorský studijní program: Analytická chemie

Autoreferát disertační práce



Komplexní analýza výstražných a obranných látek ploštic vysokoúčinnými
separačními metodami

Jan Krajíček

Školitel:

Doc. RNDr. Zuzana Bosáková, CSc.

Školitel-konzultanti:

Doc. Mgr. Alice Exnerová, Ph.D.

Prof. RNDr. Pavel Štys, CSc.

Doc. RNDr. Radomír Čabala, Ph.D.

Praha, 2016

Dizertační práce vznikla na základě výsledků získaných v letech 2012 – 2016 během mého postgraduálního studia na Katedře analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze.

Práce byla podporována projekty SVV, grantové agentury České republiky – GAČR P505/11/1459 a grantové agentury Univerzity Karlovy v Praze – GA UK č. 18213 a 760216.

Abstrakt

V průběhu evoluce se vyvinulo mnoho strategií obrany hmyzu před jeho predátory. Evolučně nejstarší a nejrozšířenější je chemická obrana následovaná akustickou nebo optickou obranou. Spousta druhů hmyzu však používá najednou více typů varovných signálů, které působí na různé smyslové receptory jejich predátora. Takovýto komplexní způsob varovné signalizace se nazývá multimodální. Může vznikat například současným podílem chemických a optických signálů nebo kombinací akustické a optické signalizace. Právě kombinace chemicko-optické signalizace kořisti vůči predátorovi je pravděpodobně nejčastější formou multimodální signalizace. Předkládaná práce se zabývá analýzou biologicky aktivních látek, které participují při obranných mechanismech jednoho z rozšířených druhů hmyzu – ploštic.

Deriváty pterinu představují rozsáhlou skupinu přírodních látek odvozených od bicyklického heterocyklu pteridinu a vyskytují se prakticky ve všech živých organismech od bakterií k obratlovcům. U hmyzu primárně slouží jako pigmenty a například kutikulám ploštic propůjčují jejich nápadné zbarvení. První část disertační práce byla zaměřena na identifikaci a kvantifikaci derivátů pterinu v kutikulách vybraných druhů ploštic. Pro separaci a kvantifikaci deseti derivátů pterinu (L-sepiapterin, 7,8-dihydroxanthopterin, 6-biopterin, pterin, D-neopterin, isoxanthopterin, leukopterin, xanthopterin, erythropterin, pterin-6-karboxylová kyselina) byla vyvinuta metoda kapilární zónové elektroforézy s UV detekcí a hydrofilní interakční chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní detekcí. Obě metody byly validovány z hlediska běžných validačních parametrů – linearita, správnost, přesnost, limit detekce a kvantifikace aj. Metody byly použity pro identifikaci a zjištění distribuce derivátů pterinu ve vybraných druzích ploštic.

Ploštice disponují velmi dobře vyvinutými pachovými žlázami, které při podráždění produkují velké množství silně zapáchajících látek, fungujících jako chemická ochrana proti jejich predátorům. Druhá část této práce se věnovala vhodným strategiím odběru těkavých sekretů ploštic. Byly navrženy nové, neinvazivní metody odběrů těkavých sekretů ploštic s jejich následnou separací pomocí plynové chromatografie s hmotnostní detekcí. Prekoncentrace vzorků sekretů byla provedena sorpcí na vláknech SPME. Z důvodu velké komplexnosti vzorků sekretů byly testovány tři

typy SPME vláken: nepolární polydimethylsiloxan (PDMS), polární polyakrylát (PA) a bipolární divinylbenzen/carboxen/polydimethylsiloxan (DVB/CAR/PDMS). Celá optimalizační procedura byla prováděna pomocí faktorového plánu – RSM (response surface methodology).

Pro GC separaci byla použita moderní kapilární fluorovaná fáze Rtx-200 poskytující dobrou selektivitu pro látky z široké škály polarit. Vypracovaná metodika byla aplikována pro analýzu obranných sekretů samic a samců u vybraných druhů ploštic.

1 Úvod

Ploštice (*Hemiptera: Heteroptera*) jsou velkou, rozšířenou a kosmopolitní skupinou savého hmyzu. V současné době je více než 50 000 popsanych druhů, které jsou rozděleny do 95 rodin [1]. Ploštice lze nalézt na celém světě a na různorodých stanovištích od suchozemských přes vodní až po druhy vyskytující se v mořích [2]. Spektrum potravy, kterou se ploštice živí je široké např. vysáváním rostlinných šťáv, členovci, šneci atd. Některé druhy se živí krví obratlovců a mohou být přenašeči lidských onemocnění [2]. Z celé hmyzí říše se řadí na čtvrté místo nejvíce devastujícího druhu zemědělské plodiny [3].

Antipredační strategie živočicha, která pomocí výstražných signálů informuje případné predátory o své nevýhodnosti (nepoživatelnosti) se nazývá aposematismus [4].

Nejnápadnější složkou aposematického živočicha jsou vizuální signály. Optické signály (barva, vzor, kontrast vůči podkladu, symetrie aj.) bývají často spojovány s chemickými a/nebo akustickými signály. Takový komplexní způsob výstražné signalizace se označuje jako multimodální [5]. Predátoři mohou vnímat tyto výstražné signály kořisti různými smyslovými receptory a spojit si je tak s její nepoživatelností. Smyslem multimodální signalizace je, aby predátoři aposematickou kořist snadněji rozeznali, dlouhodoběji zapamatovali a vyvarovali se opakovanému útoku [5-7]. V současné době není známo, jak přesně multimodální signalizace kořisti funguje, zda (a) urychluje detekci takové kořisti predátorem [8], nebo (b) chemické a/nebo akustické signály působí jako zesilovače optických (výstražných) signálů [8,9].

Pterin a jeho deriváty patří do skupiny heterocyklických sloučenin. Jejich základním skeletem je pteridin, který se skládá z pyrimidinu a pyrazinu. Pteriny lze rozdělit do dvou skupin podle velikosti postranního řetězce, a to na nekonjugované, které mají na pteridinovém cyklu navázány malé substituenty, a konjugované, obsahující velké substituenty s p-aminobenzoovou kyselinou, např. listová kyselina nebo riboflavin. Jednotlivé deriváty se liší substituenty v poloze C-6 a/nebo v poloze C-7 [10]. Tyto látky mají důležité biologické funkce jako inhibitory [11], senzitivizéry [12], enzymy [13], koenzymy [14], senzory [15] nebo toxiny [16]. Deriváty pterinů se nacházejí ve formě pigmentů u hmyzu, plazů, obojživelníků, krabů, mořského planktonu nebo v lidských tělních tekutinách [17].

Pteriny propůjčují hmyzu typické zbarvení jejich kutikul počínaje od bílé barvy (leukopterin), přes červenou (erythropterin) a žlutou (xanthopterin a isoxanthopterin) až po fluorescenční modrou (biopterin) [18].

Deriváty pterinu se nejčastěji stanovují v moči, plazmě, séru nebo mozkomíšním moku [10]. V současné době se pro stanovení derivátů pterinu nejvíce využívají chromatografické

metody, a to papírová chromatografie [19], reverzní [20-22], iontově-párová [23], hydrofilní interakční [24], iontoměničová [25] a chirální [26] vysokoúčinná kapalinová chromatografie. Pro analýzu derivátů pterinu se také využívají spektrometrické metody, např. povrchem zesílený Ramanův rozptyl – metoda SERS [27] nebo synchronní fluorescenční spektrometrie [28]. Biopterin a neopterin lze stanovit radioimunoanalýzou nebo metodou ELISA, v současné době jsou již dostupné komerční sety [10].

Analýza derivátů pterinu jako pigmentů kutikul hmyzu je poměrně složitý problém, především z důvodu jejich špatné rozpustnosti ve vodě a organických rozpouštědlech, a také díky jejich vzájemné chemické a strukturní podobnosti. Většina autorů používala k získání pterinů z kutikul hmyzu velmi složité, několikakrokové extrakční postupy, které se často potýkaly se špatnou opakovatelností a velkým podílem vyextrahovaných, často koelujících interferentů [18,29,30].

Chemická komunikace u hmyzu je evolučně nejstarší a nejrozšířenější způsob komunikace a je zásadní pro většinu živočichů. Chemická signalizace je výhodná kvůli své všestrannosti a velké citlivosti. Signál setrvává delší dobu v prostředí a může beze změny překonávat prostorové bariéry. Cenou za časté používání může být „rozšifrování“ signálu predátorem a jeho využití k nalákání kořisti.

Chování živočichů je do značné míry ovlivňováno nebo řízeno stopovým množstvím nízkomolekulárních organických látek. Tyto sloučeniny se mohou podílet jak v regulaci chování vnitrodruhové, tak i mezidruhové [31].

Látky používané živočichy k chemickému přenosu informací se nazývají semiochemikálie (*semion* = signál) [31].

Sekrety jsou produkovány z rozdílných typů žláz, které závisí na vývojovém stupni jedince. Tyto látky slouží k odrazení suchozemských obratlovců od útoku a mohou být toxické i pro samotné ploštice. Antipredační infochemikálie jsou obvykle produkty sekundárního metabolismu a u fytofágních druhů (býložravé druhy) mohou být převzaty z hostitelských rostlin [32-34].

Ploštice mohou typicky produkovat širokou škálu látek např. 4-oxo-(*E*)-2-alkeny, (*E*)-2-alkenů (C₆ – C₁₀), alkoholy a aldehydy (C₆ – C₁₀), nerozvětvené alkany (zejména tridekan), ketony, kyseliny (rozvětvené nebo nenasycené a jejich estery). Dalšími složkami mohou být terpenoidy (α - a β -pinen, limonen nebo linalool atd.), aromatické sloučeniny (benzyl alkohol, benzaldehyd, *p*-hydroxybenzaldehyd, fenylethanol, guajakol aj). [2,33,35-38]. Složení sekretů může záviset na fyzickém stavu jedince, potravě, vývojovém stádiu, ročním období nebo také na rostlině, kterou se živí v případě fytofágních druhů [39].

Pro odběr těkavých sekretů bylo navrženo několik postupů, z nichž většina je založena na usmrcení jedinců. Jedním z nich je jejich oplach dichlormethanem, který vede ke smrti jedince v řádu sekund [40]. Další možností je uspání jedince pomocí CO₂ nebo ethylacetátem, dále pak usmrcení mrazem s následným vypreparováním žlázy extrahované methyl-tert-butyletherem, hexanem nebo dichlormethanem [32,41-48] nebo propíchnutím žlázy skleněnou kapilárou [49]. Neletální způsoby odběru se prováděly foukáním vzduchu přes nádobu s plošticemi a následným zachycením látek na různých typech adsorbentů, např. Super Q, aktivní uhlí nebo Poropak Q [50-53], sorpcí na vlákne (SPME) [54-56] či vložení papírového ubrousku mezi ploštice a jeho následnou extrakcí dichlormethanem [57]. Tyto postupy však nezahrnují prakticky žádné dráždění, a tedy použití obranných prvků plošticemi.

Pro analýzu obranných sekretů byla využita plynová chromatografie ve spojení s plamenově ionizačním, hmotnostně spektrometrickým nebo elektroantenografickým detektorem [43,45,56,58-65]. Protože sekrety obsahují velké množství látek, může být před plynovou chromatografií předřazena vysokoúčinná kapalinová chromatografie pro předběžnou separaci [66], ale v poslední době se začíná využívat i komprehenzivní dvoudimenzionální plynová chromatografie (GCxGC) [44,67]. Pro identifikaci látek se kromě porovnávání s databází hmotnostních spekter také využívá nukleární magnetická rezonance [52].

2 Cíl práce

Tato disertační práce si klade za cíl přispět k poznání obranných mechanismů jednoho z významných zástupců hmyzu – ploštic (Insecta: Hemiptera: Heteroptera). Přítomnost či absence jednotlivých látek, které jsou odpovědné za výstražnou a obrannou signalizaci ploštic může pomoci při fylogenetickém hodnocení jednotlivých druhů, která může být v čistě biologickém přístupu značně obtížná. Na základě dostupné literatury nebyla doposud žádná práce věnována komplexní analýze výstražného zbarvení a těkavých obranných látek u stejného druhu. V tomto směru může takovýto chemicko-biologický přístup přispět k poznání evoluce bimodální obraně ploštic. Cílem první části této disertační práce byl vývoj, optimalizace a validace metod kapilární elektroforézy a vysokoúčinné kapalinové chromatografie pro stanovení derivátů pterinu v kutikulách vybraných druhů ploštic.

Úkolem druhé části bylo navržení neinvazivních způsobů odběrů těkavých složek obranných sekretů ploštic, provedení optimalizační procedury s využitím statistického

programu minitab 16 a vypracovanou metodiku aplikovat pro analýzu těkavých sekretů samic a samic vybraných druhů ploštic plynovou chromatografií spojenou s hmotnostní detekcí.

3 Materiál a metodika

3.1 Použité chemikálie

Acetonitril (gradient grade), amonium acetát ($\geq 99\%$), octová kyselina ($\geq 99,8\%$), mravenčí kyselina ($\geq 98\%$) a dimethylsulfoxid ($\geq 99,9\%$) byly dodány Sigmou-Aldrich (St. Louis, USA). Hydroxid amonný byl získán z Lach-Ner (Neratovice, ČR). L-Sepiapterin (Sigma Aldrich, Německo), 6-biopterin ($\geq 98\%$), \geq , Sigma Aldrich, Německo), neopterin ($\geq 97,5\%$, Sigma Aldrich, Německo), isoxanthopterin ($\geq 97,5\%$, Fluka, Švýcarsko), leukopterin ($\geq 95\%$, Sigma Aldrich, Německo), xanthopterin ($\geq 97,5\%$, Fluka, Švýcarsko), 7,8-dihydroxanthopterin, pterin a pterin-6-karboxylová kyselina byly poskytnuty Scottem Fabricantem a erythropterin Ronem Rutowskim. Dihydrát disodné soli ethylendiamintetraoctové kyseliny, Na₂EDTA ($\geq 99\%$, Lachema, ČR), boritá kyselina ($\geq 99,5\%$, Penta, ČR), TRIS – tris(hydroxymethyl)aminomethan ($> 98\%$, Lach-Ner, ČR), hydroxid sodný ($> 98\%$, Lach-Ner, ČR). Deionizovaná voda byla získána ze systému Milli Q, Millipore (Milford, USA).

Směs *n*-alkanů (C₈ – C₂₀) rozpuštěných v hexanu pro určení retenčních indexů byla získána z Fluka (Buchs, Switzerland). Referenční sloučeniny (+)- β -citronellen ($\geq 98,5\%$), (*E*)-2-hexen-1-ol ($> 96\%$), (*E*)-2-okten-1-ol ($> 97\%$), 1-decyne ($> 98\%$), 1-dodeken ($\geq 99\%$), 1-tridekan ($> 96\%$), (*E,E*)-2,4-dekadial ($\geq 97\%$), (*E,E*)-2,4-dodekadial ($> 90\%$), (*E,E*)-2,4-hexadial ($\geq 95\%$), (*E,E*)-2,4-nonadial ($> 89\%$), (*E,E*)-2,4-oktadial ($\geq 95\%$), 2-cyclohexan-1-ol ($> 95\%$), 2-dekanol ($> 98\%$), (*E*)-2-dekenal ($\geq 92\%$), 2-heptanol ($\geq 97\%$), 2-heptanon ($\geq 98\%$), (*E*)-2-hexen-1-ol ($\geq 95\%$), (*E*)-2-hexenal ($\geq 99\%$), 2-hexyl-1-dekanol ($> 97\%$), (*E*)-2-nonenal ($\geq 95\%$), (*E*)-2-oktenal ($\geq 95\%$), (*E*)-2-undekenal ($\geq 95\%$), (*Z*)-3-hexenyl acetát ($\geq 98\%$), 4-*tert*-butylcyklohexyl acetát (směs *E* a *Z*, $> 98\%$), acetoin ($\geq 96\%$), allyl cyklohexanpropionát ($\geq 98\%$), benzaldehyd ($\geq 99\%$), citronellol ($\geq 95\%$), cyklohexyl acetát ($\geq 98\%$), cyklopentankarboxylová kyselina ($\geq 99\%$), cyklopentanmethanol ($\geq 98\%$), cyklopentanol ($\geq 99\%$), cyklopentanon ($\geq 99\%$), dekanal ($\geq 98\%$), 1-dodekanol ($\geq 98\%$), dodecyl acetát ($> 97\%$), 1-hexadekanol ($\geq 99\%$), hexyl acetát ($\geq 99\%$), hexyl salicylát ($\geq 99\%$), isoamyl acetát ($\geq 97\%$), limonen ($> 97\%$), methyl dekanoát ($\geq 99\%$), nonanal ($\geq 97\%$), oktyl acetát ($\geq 99\%$), *p*-cymen ($> 99\%$), fenyl acetát ($\geq 99\%$), prenyl acetát ($\geq 98\%$), 1-tetradekanol ($\geq 97\%$), 1-tridekanol ($\geq 99\%$), 1-undekanol

($\geq 99\%$), a α -hexylcinnamaldehyd ($\geq 95\%$) byly dodány Sigmou Aldrich (Munich, Germany).

3.2 Vzorky ploštic

V rámci první části disertační práce analyzovány extrakty z kutikul ploštic *Scantius aegyptius*, *Pyrrhocoris apterus*, *Corizus hyoscyami*, *Eurydema ornatum cream color morph* a *Tectocoris diophthalmus*.

V druhé části (sekrece ploštic) byly studie zaměřeny na *Pyrrhocoris apterus*, *Pyrrhocoris tibialis*, *Scantius aegyptius* a *Graphosoma lineatum*.

3.3 Přístrojové vybavení

Elektroforetická měření byla prováděna na PrinCE 250 autosampler (PrinCE Technologies B.V., Nizozemsko) s UV-VIS spektrometrickým detektorem Spectra 100 (Therma Separation Products, USA). Chromatografická měření byla provedena na LC/MS series 1200 (Agilent Technologies, Waldbronn, Německo). Analýzy sekretů ploštic probíhaly na plynovém chromatografu GCMS-QP2010 Plus (Shimadzu, Japonsko). Ke sběru a vyhodnocení dat byly použity programy Clarity (DataApex, ČR), Mass Hunter Workstation (Agilent Technologies, Německo), GCMS solutions (Shimadzu, Japonsko), Origin 8 (OriginLab Corporation, USA) a Microsoft Excel 2003 (Microsoft Corporation, USA)

4 Výsledky a diskuze

4.2 Kapilární elektroforéza a vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Deriváty pterinu se ve vodných roztocích chovají jako slabé kyseliny. Kapilární elektroforéza je vhodnou alternativou k poměrně komplikovaným a finančně náročným separačním a detekčním systémům používaných pro analýzu derivátů pterinu v HPLC. Na základě dostupné literatury nebyla doposud kapilární elektroforéza pro analýzu derivátů pterinu v kutikulách hmyzu použita.

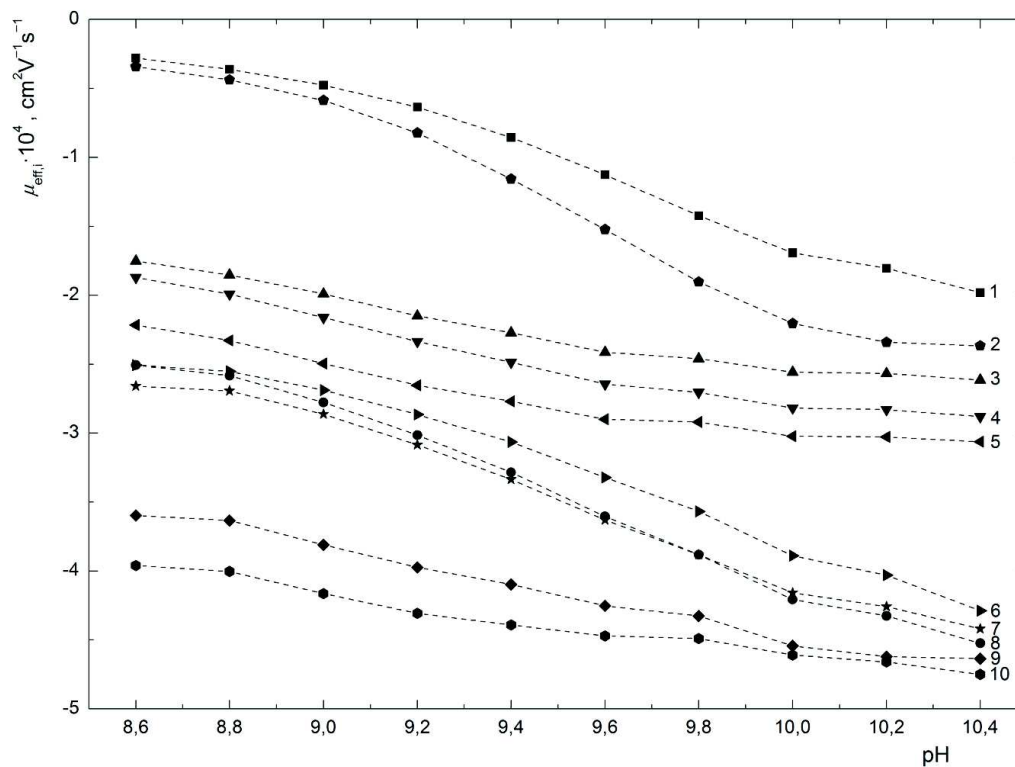
Pro identifikaci a kvantifikaci deseti derivátů pterinu - L-sepiapterinu, 7,8-dihydroxanthopterinu, 6-biopterinu, D-neopterinu, isoxanthopterinu, leukopterinu, xanthopterinu, erythropterinu, pterin-6-karboxylové kyseliny byla vyvinuta nová metoda kapilární elektroforézy.

V rámci optimalizační procedury byl studován vliv pH pufru, koncentrace jednotlivých složek základního elektrolytu, velikosti separačního napětí a vlnové délky UV detekce na

elektromigrační chování a citlivost detekce. Největší vliv na elektromigrační chování studovaných analytů měla hodnota pH (viz. obr. 4.1).

Z obr. 4.1 je patrné, že s rostoucí hodnotou pH separačního elektrolytu dochází k nárůstu záporných hodnot efektivních elektroforetických pohyblivostí všech sledovaných derivátů, což je ve shodě s předpokladem jejich větší disociovanosti. Z obr. 4.1 je také zřejmé, že separace derivátů pterinu je velmi citlivá na hodnotu pH základního elektrolytu. Oddělení všech studovaných derivátů pterinu lze získat pouze ve velmi úzkém rozmezí pH a zejména isoxanthopterin, leucopterin a xanthopterin, jež jsou si strukturně velmi podobné látky a jsou obecně hojně zastoupené v hmyzu, migrují ve velmi podobných časech.

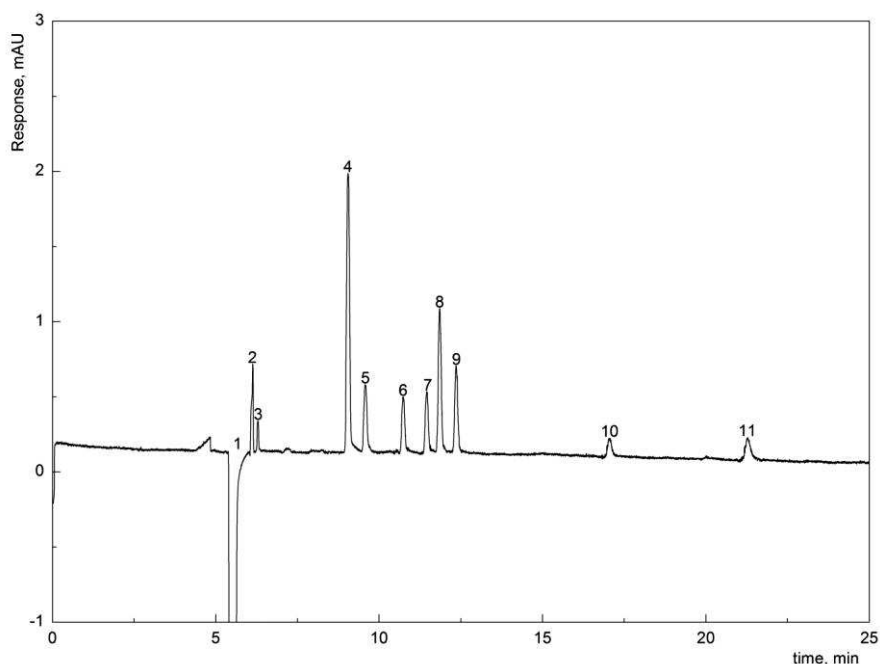
Zatímco při $\text{pH} \leq 8,8$ komigruje isoxanthopterin s leucopterinem při $\text{pH} \geq 9,6$ komigruje leucopterin s xanthopterinem a při $\text{pH} \geq 10,0$ dochází k záměně migračního pořadí leucopterinu a xanthopterinu. Celkového oddělení těchto tří derivátů lze dosáhnout pouze při pH 9,0 a 10,2.



Obr. 4.1: Závislosti efektivních elektroforetických pohyblivostí $\mu_{\text{eff},i}$ jednotlivých derivátů pterinu na pH v separačním elektrolytu skládajícího se ze $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ kyseliny borité, $2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Na_2EDTA a $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ TRIS, (1) L-sepiapterin, (2) 7,8-dihydroxanthopterin, (3) 6-biopterin, (4) D-neopterin, (5) pterin, (6) isoxanthopterin, (7) xanthopterin, (8) leukopterin, (9) erythropterin a (10) pterin-6-karboxylová kyselina.

Optimalizované podmínky separace byly: základní elektrolyt o složení $2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Na_2EDTA , $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ TRIS a $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ kyseliny borité, pH 9,0; vložené napětí 20 kV a UV detekce při 250 nm.

Za těchto podmínek došlo k separaci všech 10 studovaných derivátů pterinu až na základní linii do 22 min (obr. 4.2).



Obr. 4.2 Elektroferogram separace 10 derivátů pterinu v základním elektrolytu skládajícího se z $2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Na_2EDTA , $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ TRIS a $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ kyseliny borité, pH 9,0. Elektrokinetické dávkování 10 s při 20 kV, separace při 20 kV, teplota $30 \text{ }^\circ\text{C}$, procházející proud $19.4 \text{ }\mu\text{A}$ a UV detekce při 250 nm. Koncentrace derivátů pterinu ve směsi $2,5 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Pík (1) dimethylsulfoxid (2) L-sepiapterin, (3) 7,8-dihydroxanthopterin, (4) 6-biopterin, (5) D-neopterin, (6) pterin, (7) isoxanthopterin, (8) leukopterin, (9) xanthopterin, (10) erythropterin a (11) pterin-6-karboxylová kyselina.

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie je založena na jiném separačním mechanismu než kapilární elektroforéza a je proto vhodnou srovnávací metodou pro potvrzení identifikace derivátů pterinu přítomných v kutikulách ploštic.

Vzhledem k vysoké polaritě derivátů pterinu byla zvolena HPLC v hydrofilním interakčním módu s tandemovou hmotnostní spektrometrií. Pro analýzu byly vybrány dvě kolony: Atlantis HILIC Silica ($150 \times 4,6 \text{ mm}$, $3 \text{ }\mu\text{m}$, Waters, Milford, USA) a ZIC-HILIC ($150 \times 4,6 \text{ mm}$, $3,5 \text{ }\mu\text{m}$, Merck, Darmstadt, Německo).

V rámci optimalizační procedury byl studován vliv obsahu organického modifikátoru, typu pufru, jeho koncentrace a hodnota pH v mobilní fázi na retenční a separační chování. Nejvyšší vliv na retenční chování derivátů pterinu měl poměr organické a vodné složky v mobilní fázi.

Na základě výsledků byla zvolena kolona ZIC-HILIC s následujícími separačními podmínkami: mobilní fáze 85/15 (v/v) ACN/5mM octan amonný, pH = 6,80, průtoková rychlost $0,5 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, $30 \text{ }^\circ\text{C}$.

Nově byly navrženy metoda kapilární zónové elektroforézy a metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí pro analýzu derivátů pterinu v kutikulách ploštic. Obě metody byly validovány z hlediska linearity (CZE: $R^2 \geq 0,9980$, HPLC: $R^2 \geq 0,9975$), správnosti (CZE: relativní chyba $\pm 7,90\%$, HPLC: relativní chyba $\pm 9,63\%$), přesnosti (CZE: pro opakovatelnost $RSD \leq 6,65\%$, HPLC: pro opakovatelnost $RSD \leq 8,09\%$), limitu detekce (CZE: LOD v rozsahu $0,04 - 0,99 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, HPLC: LOD v rozsahu $0,40 - 6,20 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) a limitu kvantifikace (CZE: LOQ v rozmezí $0,13 - 3,30 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, HPLC: LOQ v rozmezí $0,3 - 19,3 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$). Doba analýzy je u obou metod přibližně stejná – 22 minut u CZE a 30 minut u HPLC. Kapilární elektroforéza je v případě účinnosti separace vhodnější volbou, protože dochází k oddělení všech 10 studovaných derivátů pterinu.

Z výše uvedeného lze konstatovat, že metoda CE-UV může kromě limitů detekce a kvantifikace poskytovat obdobné charakteristiky jako mnohem komplikovanější systém HPLC-MS/MS. Obě metody se však vzájemně doplňují, protože jsou založené na různém separačním mechanismu, a to je v případě identifikací výhodné.

Obě metody byly použity pro identifikaci a stanovení obsahu derivátů pterinu ve čtyřech druzích ploštic - *Eurydema Oleracea*, *Scantius Aegyptius*, *Pyrrhocoris Apteris* a *Corizus Hyoscyami*. Výsledky jsou uvedeny na obrázcích 4.3 a 4.4. V tabulce 2 jsou uvedeny retenční časy a SRM podmínky pro stanovení jednotlivých derivátů pterinu. Tato tabulka doplňuje publikaci III, protože HPLC-MS/MS byla následně rozšířena o separaci a kvantifikaci dalších 3 derivátů - L-sepiapterinu, pterinu a pterin-6-karboxylové kyseliny, které nebyly v uvedené publikaci sledovány.

Tabulka 2 Retenční časy a SRM podmínky použité pro analýzu derivátů pterinu metodou LC-MS/MS (ESI, pozitivní mód). První přechod byl použit pro kvantifikaci a druhý pro identifikaci. Ostatní podmínky viz. publikace III.

Derivát	Retenční čas (min)	Prekursorový iont	Produktový iont	Fragmentor (V)	Kolizní energie (V)
L-sepiapterin	7,14	238,1	220,1	120	15
Pterin	9,61	164,0	143,1	120	35
Isoxanthopterin	12,25	180,1	135,1	125	20
6-biopterin	12,44	238,1	178,1	115	17
Xanthopterin	14,45	180,1	135,1	125	20
Leukopterin	18,27	196,1	140,1	120	16
Erythropterin	23,60	266,1	220,1	110	8
D-neopterin	29,78	254,2	206,2	115	14
Pterin-6- karboxylová kys.	29,81	208,0	190,0	120	15

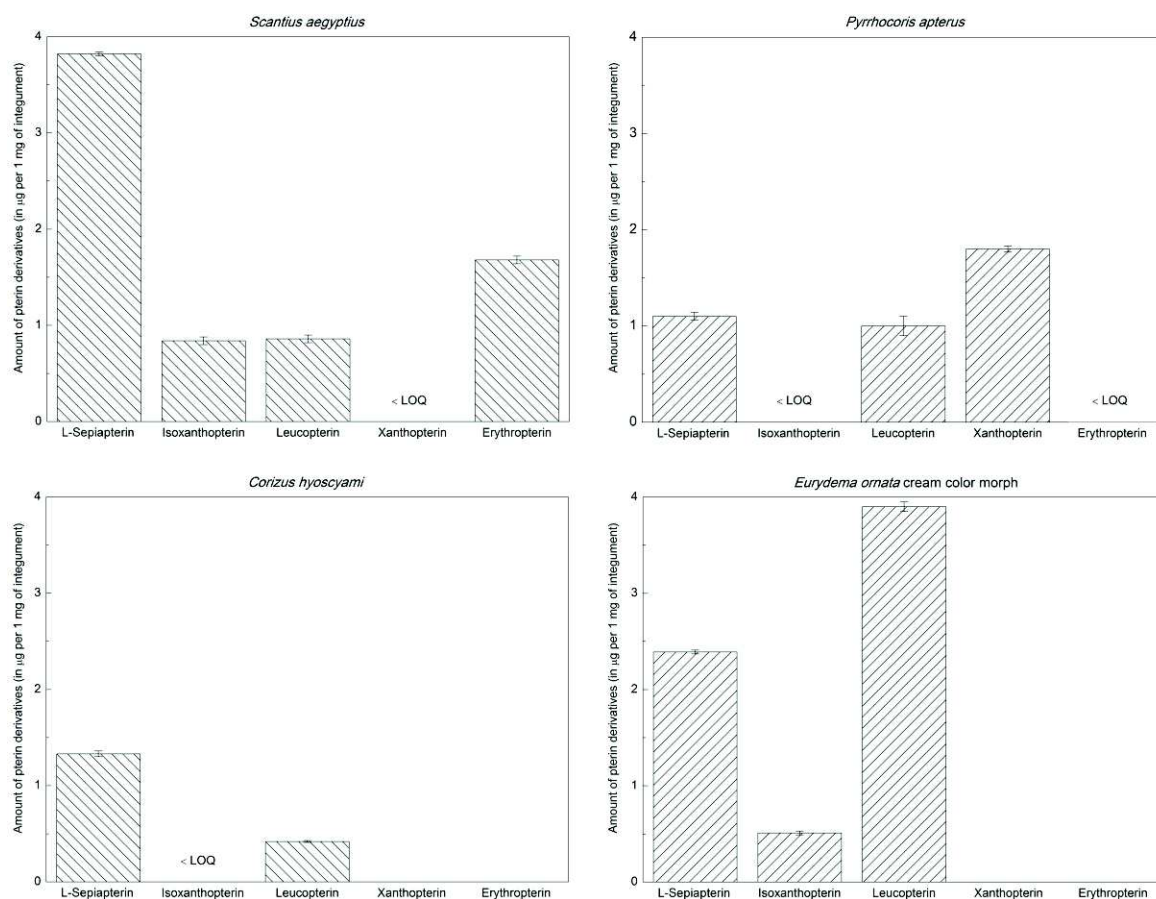
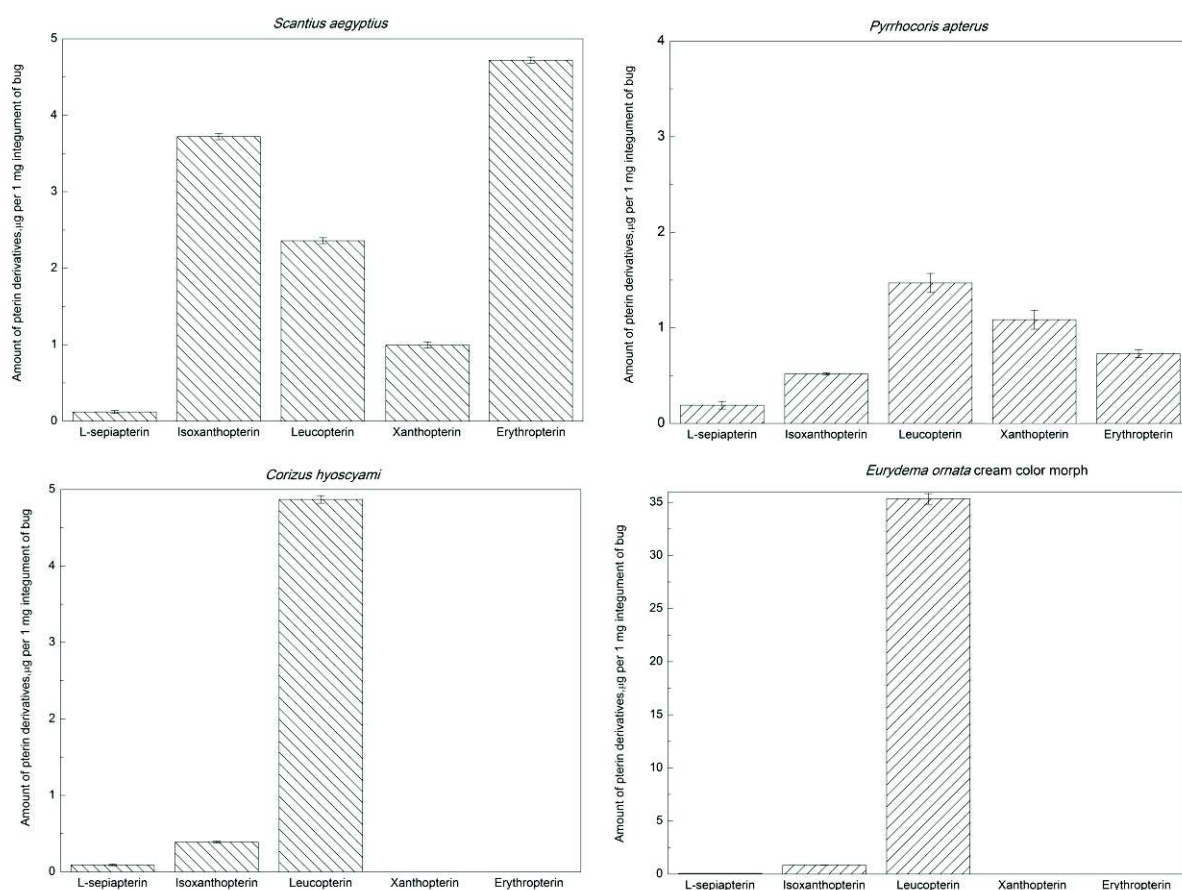


Fig. 6

Obř. 4.3 Porovnání množství derivátů pterinů nalezených ve štítcích jednotlivých plořic metodou CZE za optimalizovaných podmínek. Označení < LOQ znamená pouze přítomnost daného derivátu, jehož koncentrace je pod LOQ. Měřeno za optimalizovaných podmínek, uvedených v publikaci I.

Z obrázku 4.3 je patrné, že ve štítcích všech ploštic byl identifikován/stanoven žlutý L-sepiapterin, isoxanthopterin a bílý leukopterin, avšak v různých vzájemných poměrech. Další dva barevné deriváty - xanthopterin a erythropterin - byly buď stanoveny, nebo pouze identifikovány v *Scantius aegyptius* a v *Pyrrhocoris apterus*. Stejné výsledky byly získány metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí (obr. 4.4).



Obr. 4.4 Porovnání množství derivátů pterinů nalezených ve štítcích jednotlivých ploštic metodou HPLC za optimalizovaných podmínek. Měřeno za optimalizovaných podmínek, uvedených v publikaci III

Oběma metodami se podařilo identifikovat v daných druzích stejné analyty. Z obou obrázků jsou patrné pouze kvantifikační rozdíly, které jsou však na úrovni jednotek µg daného pterinu, vztaženého na 1 mg kutikuly. Výjimku tvoří pouze leukopterin, který byl nalezen v černo-krémové kutikule ploštic *Eurydema ornata* cream color morph v řádech desítek µg pterinu, vztaženého na 1 mg kutikuly.

Za barevnou rozdílnost kutikul jednotlivých druhů pravděpodobně může rozdílný poměr derivátů pterinu. V současnosti se však ukazuje, že také antrachinony a karotenoidy mohou přispívat k zabarvení kutikul. Tyto látky a jejich potencionální přítomnost v kutikulách budou předmětem dalšího studia v navazujícím grantovém projektu GA UK č. 760216. Využití multidimenzionálních separačních technik pro studium obranného mechanismu ploštic.

4.2 Analýza těkavých obranných sekretů

Pro analýzu těkavých obranných sekretů ploštic byla využita plynová chromatografie spojená s hmotnostně spektrometrickým detektorem. Pro odběr těkavých obranných sekretů byly navrženy a optimalizovány tři způsoby mechanického dráždění ploštic – pomocí ultrazvuku, třepačky a stlačování ploštic pístem injekční stříkačky. Nakoncentrování sekretů bylo prováděno pomocí sorpce na vláknech SPME a v rámci optimalizační procedury byla studována tři vlákna s různou polaritou – polyakrylát (PA), polydimethylsiloxan (PDMS) a kompozitní vlákno skládající se z carboxenu (CAR), polydimethylsiloxanu (PDMS) a divinylbenzenu (DVB); (CAR/PDMS/DVB). Výhodou posledního vlákna je, že dovoluje sorbovat látky z širokého rozmezí polarity. Vlákno obsahuje tři fáze: CAR pro adsorpci polárních látek a velmi těkavých látek, PDMS pro adsorpci nepolárních látek a DVB pro sorpci středně polárních a aromatických sloučenin. Pro analýzy byla využita moderní kapilární GC kolona obsahující trifluoropropylmethyl polysiloxanovou stacionární fázi, která taktéž dovoluje separovat látky z velmi širokého rozmezí polarity.

Pro jednotlivé způsoby odběrů těkavých sekretů ploštic byl studován vliv různých parametrů (např. typ vlákna, teplota dráždění, teplota při sorpci na vláknech SPME, čas sorpce na vlákno SPME aj.) na plochu a počet získaných chromatografických píků. Z důvodu většího množství zkoumaných parametrů byla provedena multiparametrická optimalizace s využitím programu Minitab 16.

Klasické pojetí optimalizace (one factor at a time, OFAT nebo one variable at a time, OVAT) využívá jen jednu veličinu jako proměnný parametr a ostatní parametry se při měření nemění. V případě, kdy je potřeba prozkoumat několik optimalizovaných parametrů se stává tento přístup velice zdoluhavým a nákladným procesem.

Proto se začaly používat nové přístupy označované jako RSM (response surface methodology), které jsou založeny na faktorových plánech. Ty minimalizují tyto náklady snížením množství pokusů na takovou míru, aby bylo možné dosáhnout nebo se alespoň

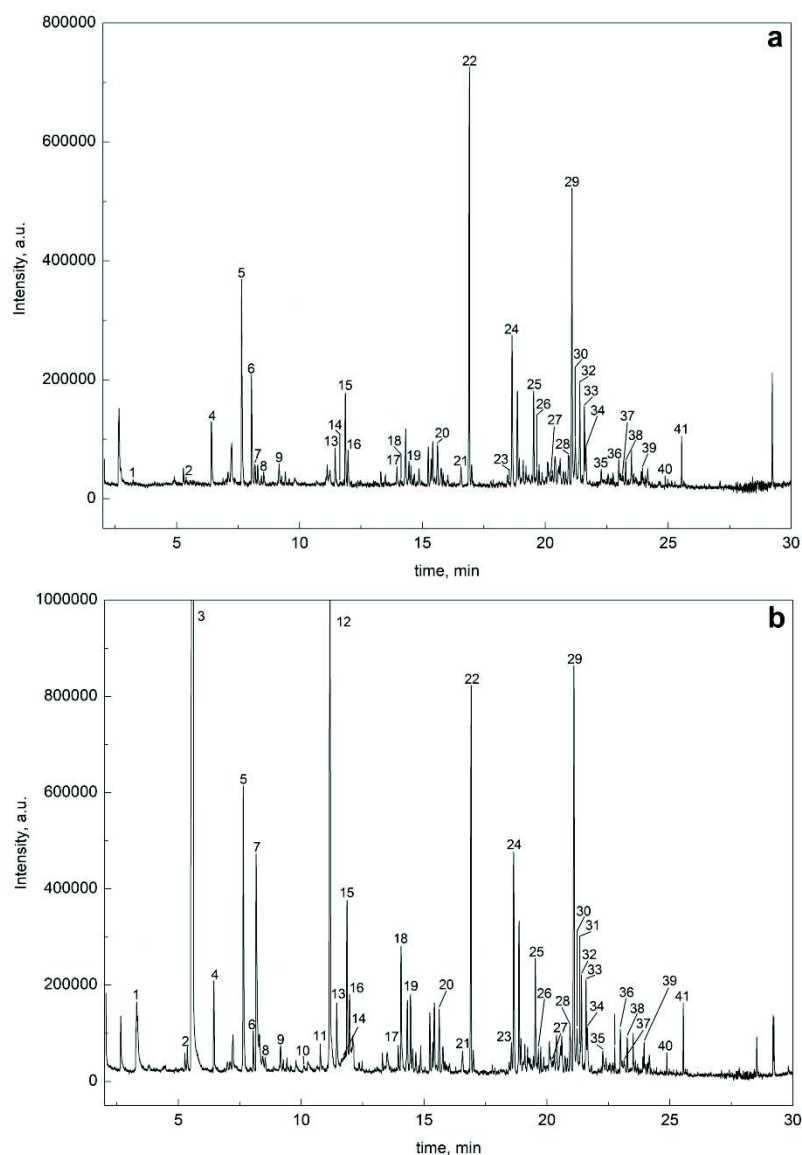
přiblížit optimálnímu bodu (nastavení) bez nutnosti hledání a proměřování všech variant zkoumaných parametrů.

Pro optimalizaci navržených metod byla vybrána ploštice *Pyrrhocoris apterus* (Hemiptera: Heteroptera: Pyrrhocoridae). Tato ploštice je běžným euroasijským druhem, jednoduše dostupná ve velkém množství a její sekrece je velmi dobře prostudována. Tento druh je také charakteristický nízkým počtem obranných látek s jejich nízkou koncentrací a obtížným uvolněním. Z tohoto důvodu se tato ploštice považuje za relativně náročnou k analýzám její obranné sekrece.

V rámci optimalizace byly sledovány dva parametry, celkový počet píků a jejich celková suma ploch. Požadavkem na navrženou metodu bylo, aby generovala co největší množství píků a sumu jejich ploch. Na základě této podmínky byla pro další studium vybrána metoda založená na stlačování ploštic pístem injekční stříkačky.

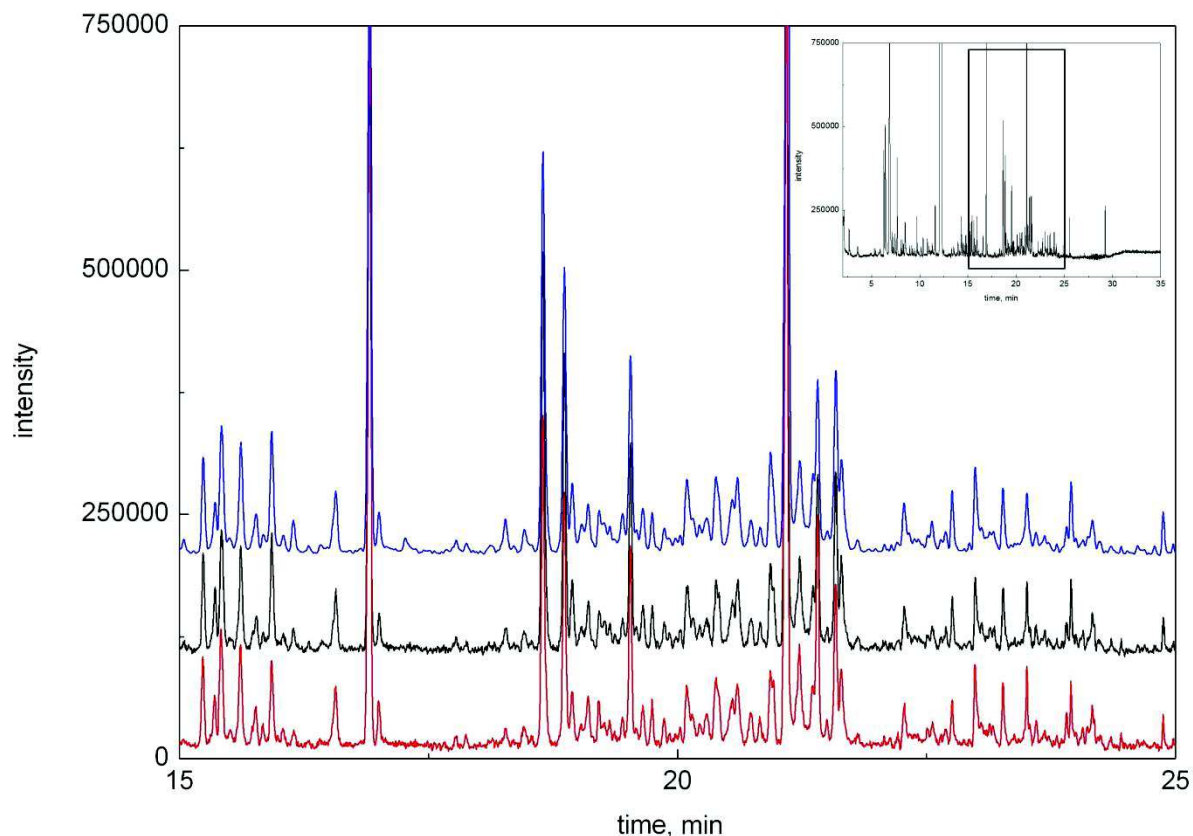
Optimalizované podmínky odběrů sekretů byly: kompozitní vlákno CAR/PDMS/DVB, teplota tří ploštic v injekční stříkačce při 40 °C po dobu 1 minuty, teplota při sorpci na vláknech SPME 40 °C, doba sorpce na vláknech SPME 90 minut.

Nově navržená metoda SPME-GC-MS byla využita pro analýzu sekretů samců a samic dvou evropských druhů – *Pyrrhocoris apterus* a *Scantius aegyptius* a jednoho čínského druhu – *Pyrrhocoris tibialis*. Příklady chromatogramů získaných analýzou sekrece samců a samic produkovaných plošticí *Pyrrhocoris tibialis* jsou uvedeny v obr. 4.5. Obr. 4.6 dokumentuje velmi dobrou opakovatelnost analýz získaných nově vyvinutou metodou SPME-GC-MS.



Obr. 4.5 SPME-GC-MS analýza *Pyrrhocoris tibialis*. Sekrece (a) samců a (b) samic plošnice *Pyrrhocoris tibialis*. Odběr vzorku sekretů metodou založenou na stlačování ploštic pístem injekční stříkačky; SPME sorpce na vlákne CAR/PDMS/DVB. Pík [1] oktan-1,3-dien; [2] hexenal; [3] (*E*)-2-hexen-1-ol; [4] 3-methylbutanová kyselina; [5] limonen; [6] 1-decyn; [7] (*E*)-2-hexenal; [8] *p*-cymene; [9] undekan; [10] (*E,E*)-2,4-hexadienal; [11] (*E*)-2-hexen-1-ol acetát; [12] (*E*)-2-okten-1-ol; [13] 2,6-dimethyl-7-okten-2-ol; [14] 6-dodeken; [15] dodekan; [16] 1-dodeken; [17] nonanal; [18] (*E*)-2-oktenal; [19] tridekan; [20] 2-isopropyl-5-methyl-1-heptanol; [21] dekanal; [22] tetradekan; [23] 2-ethylcyclohexanon; [24] 4-*tert*-butylcyclohexyl acetát; [25] pentadekan; [26] 4-*tert*-butylcyclohexyl acetát; [27] 2-methyl-1-undekanol; [28] allyl cyclohexanepropionát; [29] 1-dodekanol; [30] 3,5-Bis(1,1-dimethylethyl)fenol; [31] tetradekanal; [32] hexadekan; [33] indan-1,3-diol monoacetát; [34]

verdyl acetát; [35] 2-ethyl-1-dodekanol; [36] 1-tridekanol; [37] 1-(4-*tert*-butylfenyl)propan-2-on; [38] 1-ethoxynaftalen; [39] dodecyl acetát; [40] hexyl salicylát a [41] α -hexylcinnamaldehyde.



Obr. 4.6 Opakovatelnost analýzy sekrece samců *Scantius aegyptius*. Každá analýza byla provedena s třemi novými jedinci za optimalizovaných podmínek popsanych v sekci 4.2.

Identifikace byla provedena na základě porovnání získaných hmotnostních spekter s knihovnou hmotnostních spekter NIST 2008 a na základě porovnání retenčních časů příslušných standardů uvedených v oddíle 3.1.

V sekreci *Pyrrhocoris apterus* bylo identifikováno 25 sloučenin: 6 uhlovodíků (hlavně dodekan a tridekan), 3 alkoholy, 7 aldehydů (zvláště (*E*)-2-hexenal, (*E,E*)-2,4-hexadienal, nonanal a (*E*)-2-oktenal), 5 esterů (hlavně methyl 2-hydroxy-3-methyl pentanoát) a 3 organické kyseliny.

Sekrece *Pyrrhocoris tibialis* obsahovala 11 uhlovodíků, 9 alkoholů (hlavně 1-dodekanol, (*E*)-2-hexen-1-ol a (*E*)-2-okten-1-ol), 8 aldehydů (zvláště (*E*)-2-oktenal a (*E*)-2-hexenal), 2 ketony a 8 esterů karboxylových kyselin. Sekrece také obsahovala limonen a malé množství 1-ethoxynaftalenu.

Složení sekrece *Scantius aegyptius* bylo podobné: 10 uhlovodíků, 10 alkoholů (zejména 2-cyklohexen-1-ol, cyklopentanemethanol a 1-dodekanol), 3 aldehydy, 2 ketony a 11 esterů karboxylových kyselin. Sekrece také obsahovala limonen a 1-ethoxynaftalen. Sekrece *S. aegyptius* a *P. tibialis* je stejná ve 24 sloučeninách, zatímco sekrece *P. apterus* a *S. aegyptius* v 9 sloučeninách a *P. tibialis* a *P. apterus* ve 14 sloučeninách.

Výhodou navržené metody je, že se jedná o neinvazivní postup, pro jednu analýzu stačí pouze 3 jedinci - Farin a kol. používali až 2000 jedinců, kteří byli pro získání sekretů usmrceni [40]. Lze analyzovat i vzácné druhy např. *Pyrrhocoris tibialis*, které nejsou běžně dostupné a je nutné pro další výzkum udržovat jejich chovy.

Nově vypracována metoda SPME-GC-MS byla použita pro analýzu sekretů u dvou evropských druhů – *Pyrrhocoris apterus* a *Scantius aegyptius* a jednoho čínského druhu – *Pyrrhocoris tibialis*. Navržená metoda byla optimalizována pro plošnice z rodiny Pyrrhocoridae. Tyto druhy se vyznačují nižší koncentrací látek přítomných v sekretech.

V pilotních studiích bylo zjištěno, že některé další druhy například plošnice *Graphosoma lineatum* z rodiny Pentatomidae, uvolňují velké množství látek o vysokých koncentracích. Z výše uvedeného důvodu není následná analýza pomocí 1D-GC dostatečně účinná, protože dochází ke koelucím.

Pro rozšíření aplikovatelnosti navržené metody odběru těkavých sekretů i na druhy s vyššími koncentracemi látek přítomných v sekretech budou podmínky odběrů následně upraveny s ohledem k výše uvedeným skutečnostem, například snížením doby sorpce na SPME vlákne nebo snížením počtu jedinců při odběru jejich těkavých sekretů. V následujícím studiu bude také využita metoda komprehenzivní dvoudimenzionální plynové chromatografie (GCxGC). Problematice se bude věnovat navazující projekt grantové agentury GA UK č. 760216: Využití multidimenzionálních separačních technik pro studium obranného mechanismu ploštic.

5 Závěr

Dizertační práce se zabývá komplexní analýzou obranných látek jednoho z důležitých zástupců hmyzu – ploštic. První část dizertační práce popisuje analýzu derivátů pterinu, které jsou obsaženy v kutikulách ploštic, propůjčující jim jejich charakteristické výstražné zbarvení. Druhá část se věnuje novým způsobům odběru těkavých obranných sekretů a následným analýzám plynovou chromatografií. Výsledky dizertační práce jsou:

- 1) Byla vyvinuta, optimalizována a validována metoda kapilární elektroforézy a vysokoúčinné kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí pro stanovení derivátů pterinu v kutikulách vybraných druhů ploštic.
- 2) Ve vybraných druzích ploštic byly identifikovány a stanoveny obsahy derivátů pterinu zodpovědných za charakteristické zbarvení kutikul ploštic.
- 3) Byly navrženy nové neinvazivní způsoby odběrů těkavých složek obranných sekretů ploštic – ultrazvuk, třepačka, píst injekční stříkačky. Byly otestovány tři typy SPME vláken, nepolární polydimethylsiloxan (PDMS), polární polyakrylát (PA) a bipolární divinylbenzen/carboxen/polydimethylsiloxan (DVB/CAR/PDMS). Celá optimalizace odběru těkavých sekretů ploštic byla provedena pomocí faktorového plánu RSM. Vypracovaná metodika byla aplikována pro analýzu těkavých sekretů samců a samic ploštic *Pyrrhocoris tibialis*, *Pyrrhocoris apterus* a *Scantius aegyptius* nově vyvinutou metodou SPME-GC-MS.

6 Použitá literatura

1. Henry TJ (2007) Biodiversity of Heteroptera. In: Footitt R, Adler, PH editor. *Insect Biodiversity: Wiley-Blackwell*. pp. 223-263.
2. Millar JG (2005) Pheromones of true bugs. In: Schulz S, editor. *Chemistry of Pheromones and Other Semiochemicals Ii*. Berlin: Springer-Verlag Berlin. pp. 37-84.
3. Arnett RH (1993) *American Insects: A Handbook of the Insects of America North of Mexico*. Gainesville: Sandhill Crane Press.
4. Cott HB (1940) *Adaptive coloration in animals*. London: Methuen & Co., Ltd.
5. G.D. Ruxton TNS, M.P. Speed (2004) *Avoiding Attack The Evolutionary Ecology of Crypsis, Warning Signals and Mimicry*. New York: Oxford University Press.
6. Speed MP (2000) Warning signals, receiver psychology and predator memory. *Anim Behav* 60: 269-278.
7. Malečková D (2011) *Reakce ptačích predátorů na různé složky repelentní sekrece ploštic [Diplomová práce]*. Praha: Univerzita Karlova v Praze.
8. Rowe C, Guilford T (1996) Hidden colour aversions in domestic chicks triggered by pyrazine odours of insect warning displays. *Nature* 383: 520-522.
9. Rowe C, Guilford TIM (1999) Novelty effects in a multimodal warning signal. *Anim Behav* 57: 341-346.
10. Tomandl J (1998) Pterins. *Chem Listy* 92: 689-697.
11. Schüttelkopf AW, Hardy LW, Beverley SM, Hunter WN (2005) Structures of Leishmania major Pteridine Reductase Complexes Reveal the Active Site Features Important for Ligand Binding and to Guide Inhibitor Design. *J Mol Biol* 352: 105-116.
12. Ito K, Kawanishi S (1997) Photoinduced hydroxylation of deoxyguanosine in DNA by pterins: sequence specificity and mechanism. *Biochemistry* 36: 1774-1781.
13. Johnson JL, Hamm-Alvarez S, Payne G, Sancar GB, Rajagopalan KV, et al. (1988) Identification of the second chromophore of Escherichia coli and yeast DNA photolyases as 5,10-methenyltetrahydrofolate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 2046-2050.
14. Hevel JM, Marietta MA (1992) Macrophage nitric oxide synthase: Relationship between enzyme-bound tetrahydrobiopterin and synthase activity. *Biochemistry* 31: 7160-7165.
15. Smutna M, Svoboda M, Breinekova K (2010) Pterins as sensors of response to the application of Fe³⁺-dextran in piglets. *Sensors* 10: 890-900.
16. Basu P, Burgmayer SJN (2011) Pterin chemistry and its relationship to the molybdenum cofactor. *Coord Chem Rev* 255: 1016-1038.
17. Čopíková J, Uher M, Lapčík O, Moravcová J, Drašar P (2005) Natural colorants. *Chemicke Listy* 99: 802-816.

18. Němec V, Breuer M, De Loof A (2003) Thin layer chromatographic analysis of pteridine-like pigments in the migratory locust, *Locusta migratoria migratorioides* (Orthoptera: Oedipodidae). *Eur J Entomol* 100: 19-23.
19. Niva CC, Takeda M (2002) Color changes in *Halyomorpha brevis* (Heteroptera: Pentatomidae) correlated with distribution of pteridines: regulation by environmental and physiological factors. *Comp Biochem Physiol Part B Biochem Mol Biol* 132B: 653-660.
20. Porcar M, Bel Y, Socha R, Nemeč V, Ferre J (1996) Identification of pteridines in the firebug, *Pyrrhocoris apterus* (L.) (Heteroptera, Pyrrhocoridae) by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* 724: 193-197.
21. Mansilla AE, Meras ID, Salinas F (2001) Analysis of pteridines and creatinine in urine by HPLC with serial fluorimetric and photometric detectors. *Chromatographia* 53: 510-514.
22. de Llanos AM, Espinosa-Mansilla A, Canada-Canada F, de la Pena AM (2011) Separation and determination of 11 marker pteridines in human urine by liquid chromatography and fluorimetric detection. *J Sep Sci* 34: 1283-1292.
23. Tani Y, Ohno T (1993) Analysis of 6R- and 6S-tetrahydrobiopterin and other pterins by reversed-phase ion-pair liquid chromatography with fluorometric detection by post-column sodium nitrite oxidation. *J Chromatogr Biomed Appl* 617: 249-255.
24. Shi Z-G, Wu Y-B, Luo Y-B, Feng Y-Q (2010) Analysis of Pterins in Urine by HILIC. *Chromatographia* 71: 761-768.
25. Stea B, Halpern RM, Smith RA (1979) Separation of unconjugated pteridines by high-pressure cation-exchange liquid chromatography. *J Chromatogr* 168: 385-393.
26. Klein R (1992) Determination of the stereoconfiguration of natural pterins by chiral high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem* 203: 134-140.
27. Stevenson R, Stokes RJ, MacMillan D, Armstrong D, Faulds K, et al. (2009) In situ detection of pterins by SERS. *Analyst* 134: 1561-1564.
28. Wan YQ, Tang LJ, Tan T (2010) Simultaneous determination of xanthopterin and isoxanthopterin in human urine by synchronous fluorescence spectroscopy. *J Fluor* 20: 1191-1198.
29. Melber C, Schmidt GH (1994) Quantitative variations in the pteridines during the post-embryonic development of *Dysdercus* species (Heteroptera: Pyrrhocoridae). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 108: 79-94.
30. Melber C, Schmidt GH (1997) Body coloration related to the deposition of pteridines in the epidermis and other organs of *Dysdercus* species (Insecta; Heteroptera: Pyrrhocoridae). *Comp Biochem Physiol A: Physiol* 116A: 17-28.
31. Vet LEM (1999) From chemical to population ecology: infochemical use in an evolutionary context. *J Chem Ecol* 25: 31-49.

32. Ho HY, Millar JG (2001) Compounds in metathoracic glands of adults and dorsal abdominal glands of nymphs of the stink bugs, *Chlorochroa uhleri*, *C. sayi*, and *C. ligata* (Hemiptera: Pentatomidae). *Zool Stud* 40: 193-198.
33. Pavis C, Malosse C, Ducrot PH, Descoins C (1994) Dorsal abdominal glands in nymphs of southern green stink bug, *Nezara viridula* (L.) (Heteroptera: Pentatomidae): Chemistry of secretions of five instars and role of (E)-4-oxo-2-decenal, compound specific to first instars. *J Chem Ecol* 20: 2213-2227.
34. Moraes MCB, Pareja M, Laumann RA, Borges M (2008) The Chemical Volatiles (Semiocemicals) Produced by Neotropical Stink Bugs (Hemiptera: Pentatomidae). *Neotrop Entomol* 37: 489-505.
35. Tsuyuki T, Ogata Y, Yamamoto I, Shimi K (1965) Stink bug aldehydes. *Agric Biol Chem* 29: 419-427.
36. Borges M, Aldrich JR (1992) Instar-specific defensive secretions of stink bugs (Heteroptera: Pentatomidae). *Experientia* 48: 893-896.
37. Fucarino A, Millar JG, McElfresh JS, Colazza S (2004) Chemical and physical signals mediating conspecific and heterospecific aggregation behavior of first instar stink bugs. *J Chem Ecol* 30: 1257-1269.
38. Noge K, Prudic K, Becerra J (2012) Defensive Roles of (E)-2-Alkenals and Related Compounds in Heteroptera. *J Chem Ecol* 38: 1050-1056.
39. Gunawardena NE (1994) Seasonal changes in the chemical composition of the defensive secretion of the rice pest *Leptocoris oratorius* (Hemiptera:Coreidae). *J Natl Sci Counc Sri Lanka* 22: 239-243.
40. Farine JP, Bonnard O, Brossut R, Le Quere JL (1992) Chemistry of defensive secretions in nymphs and adults of fire bug, *Pyrrhocoris apterus* L. (Heteroptera, Pyrrhocoridae). *J Chem Ecol* 18: 1673-1682.
41. Nagnan P, Cassier P, Andre M, Llosa JF, Guillaumin D (1994) Fine structure and physicochemical analysis of the metathoracic scent glands of *Lincus Malevolus* (Rolston) and *L. Spurcus* (Rolston) (Heteroptera : Pentatomidae). *Int J Insect Morphol Embryol* 23: 355-370.
42. Zarbin PHG, Borges M, Dos Santos AA, De Oliveira ARM, Simonelli F, et al. (2000) Alarm Pheromone System of Stink Bug *Piezodorus guildinii* (Heteroptera: Pentatomidae). *J Braz Chem Soc* 11: 424-428.
43. Zhang Q-H, Aldrich JR (2003) Male-produced anti-sex pheromone in a plant bug. *Naturwissenschaften* 90: 505-508.
44. Kalinova B, Jiros P, Zdarek J, Wen X, Hoskovec M (2006) GC×GC/TOF MS technique-A new tool in identification of insect pheromones: Analysis of the persimmon bark borer sex pheromone gland. *Talanta* 69: 542-547.

45. Pareja M, Borges M, Laumann RA, Moraes MCB (2007) Inter- and intraspecific variation in defensive compounds produced by five neotropical stink bug species (Hemiptera: Pentatomidae). *J Insect Physiol* 53: 639-648.
46. Durak D, Kalender Y (2009) Fine structure and chemical analysis of the metathoracic scent gland secretion in *Graphosoma lineatum* (Linnaeus, 1758) (Heteroptera, Pentatomidae). *C R Biol* 332: 34-42.
47. Yang CY, Kim J, Ahn S-J, Kim D-H, Cho MR (2014) Identification of the Female-Produced Sex Pheromone of the Plant Bug *Apolygus spinolae*. *J Chem Ecol* 40: 244-249.
48. Aldrich JR, Zanuncio JC, Vilela EF, Torres JB, Cave RD (1997) Field tests of predaceous pentatomid pheromones and semiochemistry of *Podisus* and *Supputius* species (Heteroptera: Pentatomidae: Asopinae). *An Soc Entomol Bras* 26: 1-14.
49. Aldrich JR, Numata H, Borges M, Bin F, Waite GK, et al. (1993) Artifacts and pheromone blends from *Nezara* spp. and other stink bugs (Heteroptera: Pentatomidae). *Z Naturforsch C: Biosci* 48: 73-79.
50. Stránský K, Valterová I, Ubik K, Čejka J, Křeček J (1998) Volatiles from Stink Bug, *Graphosoma lineatum* (L.), and from Green Shield Bug, *Palomena prasina* (L.), (Heteroptera: Pentatomidae). *J High Res Chrom* 21: 475-476.
51. Miklas N, Lasnier T, Renou M (2003) Male Bugs Modulate Pheromone Emission in Response to Vibratory Signals from Conspecifics. *J Chem Ecol* 29: 561-574.
52. Takita M, Sugie H, Tabata J, Ishii S, Hiradate S (2008) Isolation and estimation of the aggregation pheromone from *Eysarcoris lewisi* (Distant) (Heteroptera: Pentatomidae). *Appl Entomol Zool* 43: 11-17.
53. Fountain M, Jåstad G, Hall D, Douglas P, Farman D, et al. (2014) Further Studies on Sex Pheromones of Female *Lygus* and Related Bugs: Development of Effective Lures and Investigation of Species-Specificity. *J Chem Ecol* 40: 71-83.
54. Ho H-Y, Kou R, Tseng H-K (2003) Semiochemicals from the predatory stink bug *Eocanthecona furcellata* (Wolff): Components of metathoracic gland, dorsal abdominal gland, and sternal gland secretions. *J Chem Ecol* 29: 2101-2114.
55. Djozan D, Baheri T, Farshbaf R, Azhari S (2005) Investigation of solid-phase microextraction efficiency using pencil lead fiber for in vitro and in vivo sampling of defensive volatiles from insect's scent gland. *Anal Chim Acta* 554: 197-201.
56. Byers JA (2006) Production and Predator-Induced Release of Volatile Chemicals by the Plant Bug *Lygus hesperus*. *J Chem Ecol* 32: 2205-2218.
57. Cheng L, Roussis V (1998) Sex attractant in the marine insect *Trochopus plumbeus* (Heteroptera: Veliidae). A preliminary report. *Mar Ecol Prog Ser* 170: 283-286.

58. Williams L, III, Evans PE, Bowers WS (2001) Defensive chemistry of an aposematic bug, *Pachycoris stallii* Uhler and volatile compounds of its host plant *Croton californicus* Muell.-Arg. *J Chem Ecol* 27: 203-216.
59. Aldrich JR, Blum MS, Fales HM (1979) Species-specific natural products of adult male leaf-footed bugs (Hemiptera: Heteroptera). *J Chem Ecol* 5: 53-62.
60. Gough AJE, Hamilton JGC, Games DE, Staddon BW (1985) Multichemical defense of plant bug *Hotea gambiae* (Westwood) (Heteroptera: Scutelleridae). *J Chem Ecol* 11: 343-352.
61. Gunawardena NE, Herath HMWKB (1992) Trans-2-hexenal/N-tridecane combination: a natural fumigant of the defensive secretion of *Coridius janus* (Hemiptera: Pentatomidae). *J Natl Sci Counc Sri Lanka* 20: 209-220.
62. Prudic KL, Noge K, Becerra JX (2008) Adults and Nymphs Do Not Smell the Same: The Different Defensive Compounds of the Giant Mesquite Bug (*Thasus neocalifornicus*: Coreidae). *J Chem Ecol* 34: 734-741.
63. Eliyahu D, Ceballos RA, Saeidi V, Becerra JX (2012) Synergy versus potency in the defensive secretions from nymphs of two Pentatomomorphan families (Hemiptera: Coreidae and Pentatomidae). *J Chem Ecol* 38: 1358-1365.
64. Jacobs DH, Apps PJ, Viljoen HW (1989) The composition of the defensive secretions of *Thaumastella namaquensis* and *T. elizabethae* with notes on the higher classification of the Thaumastellidae (Insecta: Heteroptera). *Comp Biochem Physiol, B: Comp Biochem* 93B: 459-463.
65. Evans CE, Staddon BW, Games DE. Analysis of gland secretions of Pentatomoidea (Heteroptera) by gas chromatography-mass spectrometry techniques; 1990. Plenum. pp. 321-328.
66. Krall BS, Zilkowski BW, Kight SL, Bartelt RJ, Whitman DW (1997) Chemistry and defensive efficacy of secretion of burrowing bug (*Sehirus cinctus cinctus*). *J Chem Ecol* 23: 1951-1962.
67. Sanda M, Zacek P, Streinz L, Dracinsky M, Koutek B (2012) Profiling and characterization of volatile secretions from the European stink bug *Graphosoma lineatum* (Heteroptera: Pentatomidae) by two-dimensional gas chromatography/time-of-flight mass spectrometry. *J Chromatogr B* 881-82: 69-75.

Životopis

Jméno a příjmení: Mgr. Jan Krajíček
Adresa: 28.října 17, 737 01 Český Těšín
Národnost: Česká
Datum narození: 29.6.1988

- Období (od – do) 2012 – současnost
- Název a typ školy **Univerzita Karlova v Praze – Přírodovědecká fakulta**
- Studijní obor Analytická chemie
- Disertační práce Komplexní analýza výstražných a obranných látek ploštic separačními metodami

- Období (od – do) 2010 – 2012
- Název a typ školy **Univerzita Karlova v Praze – Přírodovědecká fakulta**
- Studijní obor Analytická chemie
- Diplomová práce Analýza derivátů pterinu kapilární zónovou elektroforézou

- Období (od – do) 2007 – 2010
- Název a typ školy **Univerzita Karlova v Praze – Přírodovědecká fakulta**
- Studijní obor Klinická a toxikologická analýza
- Bakalářská práce Analýza pigmentu z integumentu *Graphosoma semipunctatum* metodou HPLC

- Období (od – do) 2003 – 2007
- Název a typ školy **Střední průmyslová škola chemická akademika Heyrovského a Gymnázium**
- Studijní obor Aplikovaná chemie – Analytická chemie

Grantové projekty:

2016-2019 Spoluřešitel projektu Grantové agentury Univerzity Karlovy GAUK č. 760216: Využití multidimenzionálních separačních technik pro studium obranného mechanismu ploštic.

2013-2016 Hlavní řešitel projektu Grantové agentury Univerzity Karlovy GAUK č. 18213: Komplexní analýza výstražných a obranných látek ploštic vysokoúčinnými separačními technikami spojenými s hmotnostní detekcí.

2011-2015 Projekt Grantové agentury České republiky GAČR č. P505/11/1459: Faktory ovlivňující variabilitu v reakcích predátorů na aposematickou kořist.

Seznam publikací a konferenčních příspěvků

Publikace:

- [1] Krajíček, J.; Kozlík, P.; Exnerová, A.; Štys, P.; Bursová, M.; Čabala, R.; Bosáková, Z.: Capillary electrophoresis of pterin derivatives responsible for the warning coloration of Heteroptera. *Journal of Chromatography A* **1336**, 94-100 (2014). IF 4.61
- [2] Fabricant, S.A.; Kemp, D.J.; Krajíček, J.; Bosáková, Z.; Herberstein, M.E.: Mechanisms of Color Production in a Highly Variable Shield-Back Stinkbug, *Tectocoris diophthalmus* (Heteroptera: Scutelleridae), and Why It Matters. *Plos One* **8**:5, 1-9 (2013). IF 4.41
- [3] Kozlík, P.; Krajíček, J.; Kalíková, K.; Tesařová, E.; Čabala, R.; Exnerová, A.; Štys, P.; Bosáková, Z.: Hydrophilic interaction liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection applied for analysis of pteridines in two *Graphosoma* species (Insecta: Heteroptera). *Journal of Chromatography B* **930**, 82-89 (2013). IF 2.49
- [4] Krajíček, J.; Havlíková, M.; Bursová, M.; Ston, M.; Čabala, R.; Exnerová, A.; Štys, P.; Bosáková, Z.: Comparative analysis of volatile defensive secretions of three species of Pyrrhocoridae (Insecta: Heteroptera) by gas chromatography-mass spectrometric method. *PlosOne* (2016) - submitted. IF 4.41.

Konferenční příspěvky:

- Krajicek, J.; Bosakova, Z.; Cabala, R.: *Analysis of vilatile defensive secretions of true bugs by gas chromatography mass spectrometry*. 43rd International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, Beijing, China 21.-25. 2015.
- Bosakova, Z.; Krajicek, J.; Exnerova, A.; Stys, P.: *A comparative analysis of pterins causing the warning coloration in the major clades of Heteroptera by hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. 43rd International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, Beijing, China 21.-25. 2015.

- Krajíček, J.; Kozlík, P.; Bosáková, Z.; Cabala, R.: *Comparison of capillary zone electrophoresis and high performance liquid chromatography for analysis of warning pigments present in bug cuticle*. 30th International symposium on chromatography, Salzburg, Austria 14.-18.9. 2014.
- Bosáková, Z.; Krajíček, J.; Kozlík, P.; Cabala, R.: *Analysis of Bug Defensive Chemistry by HILIC-MS/MS and SPME-GC-MS Techniques*. 41th International symposium on High-Performance-Liquid-Phase separations and related techniques, New Orleans, Louisiana, USA 11.-15.5. 2014.
- Krajíček, J.; Kozlík, P.; Bosáková, Z.: *Development of capillary zone electrophoresis for analysis of pterine derivatives in various kinds of bugs*. 20th International symposium on Electro- and Liquid Phase- separation techniques, Tenerife, Canary Islands, 6.-9.10. 2013.
- Kozlík, P.; Krajíček, J.; Kalíková, K.; Tesařová, E.; Bosáková, Z.: *Development of a hydrophilic interaction liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection for the analysis of pteridines in two Graphosoma species (Insecta: Heteroptera)*. 39th International symposium on High-Performance-Liquid-Phase separations and related techniques, Amsterdam, Holandsko, 16.-20.6. 2013.
- Bosáková, Z.; Krajíček, J.; Čabala, R.: *Analysis of pteridines by capillary electrophoresis with diode array detection*. 29th international symposium on MicroScale Bioseparations, Charlottesville, Virginia, USA 10.-14.3. 2013.

- Bosáková, Z.; Krajíček, J.; Kozlík, P.: *Analysis of pterin derivatives*. Czech chromatography school – HPLC 2013, Seč, Czech Republic 13.-15.5. 2013.
- Kozlík, P.; Bosáková, Z.; Krajíček, J.; Tesařová, E.; Čabala, R.: *HPLC-MS-MS analysis of pteridines in Graphosoma Lineatum by hydrophilic interaction liquid chromatography*. 36th International symposium on High-Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, Budapešť, Maďarsko 19.-23.6. 2011.

Charles University in Prague, Faculty of Science
Department of analytical chemistry

Ph.D. study program: Analytical chemistry

Summary of the Ph.D. Thesis



Comprehensive analysis of warning and defense compounds of true bugs
by high-performance separation methods

Jan Krajíček

Supervisor:

Doc. RNDr. Zuzana Bosáková, CSc.

Supervisor-consultant:

Doc. Mgr. Alice Exnerová, Ph.D.

Prof. RNDr. Pavel Štys, CSc.

Doc. RNDr. Radomír Čabala, Ph.D.

Prague, 2016

Thesis was based on the results obtained in the years 2012 - 2016 during my doctoral studies at the Department of analytical Chemistry, Faculty of Science, Charles University in Prague.

The study was supported projects SVV, Czech Science Foundation - GACR P505/11/1459 and the Grant Agency of Charles University in Prague - GA UK no. 18213 and 760216.

Abstrakt

Insects have developed many strategies of defence against predators in the course of evolution. The evolutionarily oldest and most widely used type of defence is chemical defence, followed by acoustic or optical defence. However, many species of insects use simultaneously multiple types of warning signals, which affect different sensory receptors of the given predator. Such a complex method of warning signals is called multimodal method. It may consist of a combination of simultaneous chemical and optical signals, or a combination of acoustic and optical signalling. The combination of chemical and optical signalling used against a predator is probably the most common form of multimodal signalling. The presented work deals with the analysis of biologically active substances, which participate in the defence mechanisms of a widespread species of insects – true bugs (Heteroptera).

Pterin derivatives represent a large group of natural compounds derived from pteridin, bicyclic heterocycle, and they are found in virtually all living organisms from bacteria to vertebrates. In insects, they primarily serve as pigments, resulting for example in striking coloration of cuticles of Heteroptera. The first part of the dissertation was focused on identification and quantification of pterin derivatives in cuticles of selected species of true bugs. The method of capillary zone electrophoresis with UV detection and hydrophilic interaction chromatography in combination with tandem mass spectrometry was developed for the purpose of separation and quantification of ten pterin derivatives (L-sepiapterin, 7,8-dihydroxanthopterin, 6-biopterin, pterin, D-neopterin, isoxanthopterin, leukopterin, xanthopterin, erythropterin, pterin-6-carboxylic acid). Both methods were validated in terms of conventional validation parameters - linearity, accuracy, precision, limit of detection and quantification etc. The methods were used to identify and detect distribution of pterin derivatives in selected species of true bugs.

True bugs have very well developed scent glands, which –when irritated - produce large amounts of highly odorous substances functioning as chemical protection against predators. The second part of this work dealt with appropriate strategies of collection of volatile secretions of true bugs. New, non-invasive methods of collection of volatile secretions of true bugs have been designed, with their subsequent separation

by means of gas chromatography with mass spectrometry. Pre-concentration of secretion samples was performed by adsorption on SPME fibre. Three types of SPME fibre were tested for the reason of high complexity of the secretion samples: non-polar polydimethylsiloxane (PDMS), polar polyacrylate (PA) and bipolar divinylbenzene/carboxen/polydimethylsiloxane (DVB/ CAR / PDMS). The entire optimization procedure was performed using a factorial design - RSM (response surface methodology).

Modern capillary fluorinated phase Rtx-200 was used for GC separation providing good selectivity for substances from a wide range of polarities. The elaborated methodology was applied to analyse defensive secretions of males and females in selected species of true bugs.

1 Introduction

True bugs (*Hemiptera: Heteroptera*) are a large, widespread and cosmopolitan group of sucking insects. Currently, there are more than 50,000 described species, which are divided into 95 families [1]. True bugs can be found around the globe and at various different sites, from water to land sites, or even species living in the seas [2]. The spectrum of the food, which true bugs eat, is wide e.g. sucking vegetable juices, arthropods, snails etc. Some species feed on the blood of vertebrates and they can be carriers of human diseases [2]. They rank the fourth most devastating insect species affecting agricultural crops [3].

The antipredatory strategy of an animal, which uses warning signals to inform potential predators about disadvantageousness (unpalatability) of the given animal, is called aposematism [4].

Visual signals are the most striking components of an aposematic animal. Optical signals (colour, pattern, contrast against the background, symmetry, etc.) are often associated with chemical and/or acoustic signals. Such a comprehensive way of warning signalling is called multimodal signalling [5]. Predators may perceive these warning signals of the prey by different sensory receptors and associate them with unpalatability of the prey. The purpose of multimodal signalling is to achieve that predators recognize the aposematic prey more easily, that they remember it for a longer period and that they avoid repeating of their attack [5-7]. At present, we do not know exactly how multimodal signalling of the prey works, whether (a) it accelerates detection of such prey by the predator [8] or (b) whether chemical and/or acoustic signals work as amplifiers of optical (warning) signals [8,9].

Pterin and its derivatives fall under the group of heterocyclic compounds. Their backbone is pteridine, which consists of pyrimidine and pyrazine. Pterins can be divided into two groups according to the size of the side chain, i.e. the unconjugated, which have small substituents bound on the pteridine cycle, and the conjugated containing large substituents with p-aminobenzoic acid, for example folic acid or riboflavin. Individual derivatives are different based on their substituents in the position C-6 and/or in the position C-7 [10]. These substances have important biological functions as inhibitors [11], sensitizers [12], enzymes [13], coenzymes [14], sensors [15] or toxins [16]. Derivatives of pterins exist in the form of pigments in insects, reptiles, amphibians, crabs, marine plankton or in human body fluids [17].

Pterins result in typical coloration of insect cuticles starting from white (leukopterin) through red (erythropterin) and yellow (xanthopterin and isoxanthopterin) to blue fluorescence (biopterin) [18].

Pterin derivatives are most often detected in urine, plasma, serum or cerebrospinal fluid [10]. Currently, chromatographic methods, namely paper chromatography [19], reverse [20-22], ion-pair [23], hydrophilic interaction [24], ion exchange [25] and chiral [26] high-performance liquid chromatography are used to determine pterin derivatives. Spectrometric methods, e.g. surface-enhanced Raman scattering - SERS method [27] or synchronous fluorescence spectrometry [28] are used to analyse pterin derivatives as well. Biopterin and neopterin can be determined by radioimmunoassay or ELISA and currently, commercial sets are already available [10].

Analysis of pterin derivatives as pigments of insect cuticles is a complex problem, primarily due to their poor solubility in water and organic solvents, and also because of their mutual chemical and structural similarities. Most authors used very complex, multi-step extraction procedures to obtain pterins of insect cuticles, which often result in poor repeatability and a large proportion of extracted, often coeluting interferents [18,29,30].

Chemical communication among insects is evolutionarily the oldest and most widely used method of communication and is essential for most animals. Chemical signalling is advantageous because of its versatility and great sensitivity. The signal stays longer in the environment and can overcome spatial barriers remaining unchanged. A disadvantage of frequent use may be "decoding" of the signal by a predator, who can then use it to attract the prey.

Animal behaviour is largely influenced or controlled by the trace amount of low-molecular organic compounds, and these compounds may be involved in the regulation of both intraspecific and interspecific behaviour [31].

Substances used by animals for chemical transmission of information are called semiochemicals (*semion* = signal) [31].

Secretions are produced from different types of glands depending on the stage of development of the individual. These substances are used to deter terrestrial vertebrates from attacking and they can be toxic for the true bugs themselves. Antipredatory infochemicals are usually products of secondary metabolism, and in phytophagous species (herbivorous species), they may be taken from the host plant [32-34].

True bugs can typically produce a wide range of substances, for example 4-oxo-(*E*)-2-alkenes, (*E*)-2-alkenes (C₆ – C₁₀), alcohols and aldehydes (C₆ – C₁₀), straight chain alkanes (in

particular tridecane), ketones, acids (branched or unsaturated and esters thereof). Further components may include terpenoids such as α - and β -pinene, limonene or linalool, aromatic compounds such as benzyl alcohol, benzaldehyde, p-hydroxybenzaldehyde, phenylethanol and guaiacol [2,33,35-38]. The composition of secretions may depend on the physical condition of the individual, its diet, stage of development, season of the year or also on the plant, which the individual feeds on in the case of phytophagous species [39].

Several processes have been proposed for the collection of volatile secretions, most of which are based on killing of the individual bugs. One process is rinsing them with dichloromethane, which leads to the death of the individual in seconds [40]. Another possibility is to put the individual to sleep with CO₂ or ethyl acetate or killing it by frost followed by extraction of the gland with methyl tert-butyl ether, hexane or dichloromethane [32,41-48] or piercing the gland with a glass capillary [49]. Non-lethal sampling methods were carried out by blowing air through the vessel with the bugs and subsequent capturing of the substances on various types of adsorbents, e.g. Super Q, activated carbon or Porapak Q [50-53], by adsorption on fiber (SPME) [54-56] or by inserting a paper towel between the bug and its subsequent extraction with dichloromethane [57]. These procedures, however, involve virtually no irritation or defensive element.

Gas chromatography coupled with flame ionization, mass spectrometry or electroantennographic detector were used for the analysis of defensive secretions [43,45,56,58-65]. As secretions contain large amounts of substances, high-performance liquid chromatography may precede gas chromatography for the purpose of preliminary separation [66], but there has also been an increase in the use of comprehensive two-dimensional gas chromatography (GCxGC) [44,67]. Nuclear magnetic resonance is also used for identification of substances, in addition to comparison with the database of mass spectra [52].

2 Goal of the Dissertation

This dissertation aims to contribute to the knowledge of defence mechanisms of one of the major representatives of insects – true bugs (Insecta: Hemiptera: Heteroptera). The presence or absence of individual substances, which are responsible for warning and defence signals of true bugs, may assist in evaluation of the phylogenetic species, which may be very difficult with purely biological approach. Based on the available literature, no work has yet focused on a comprehensive analysis of warning coloration and defensive volatile substances in the given species. In this respect such a chemical-biological approach may contribute to

understanding the evolution of bimodal defence of true bugs. The first part of this dissertation includes development, optimization and validation of methods of capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography for determination of pterin derivatives in cuticles of selected species of true bugs.

The purpose of the second part of the work was to design non-invasive methods of sampling of volatile components of defensive secretions of true bugs. Implementation of the optimization procedure using the statistical program Minitab 16 and the elaborated methodology shall be applied on the analysis of volatile secretions of males and females of selected species of true bugs by means of gas chromatography coupled with mass spectrometry.

3 Materials and methods

3.1 Chemicals

Acetonitrile (gradient grade), ammonium acetate ($\geq 99\%$), acetic acid ($\geq 99,8\%$), formic acid ($\geq 98\%$) was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Ammonium hydroxide was obtained from Lach-Ner (Neratovice, Czech Republic). L-Sepiapterin (Sigma Aldrich, Germany), 6-biopterin ($\geq 98\%$), Sigma Aldrich, Germany), neopterin ($\geq 97,5\%$, Sigma Aldrich, Germany), isoxanthopterin ($\geq 97,5\%$, Fluka, Switzerland), leukopterin ($\geq 95\%$, Sigma Aldrich, Germany), xanthopterin ($\geq 97,5\%$, Fluka, Switzerland), 7,8-dihydroxanthopterin, pterine and pterin-6-carboxylic acid were provided by Scott Fabricant and erythropterine by Ron Rutowski. Dihydrate disodium salt of ethylenediaminetetraacetic acid, Na₂EDTA ($\geq 99\%$, Lachema, Czech Republic), boric acid ($\geq 99,5\%$, Penta, Czech Republic), TRIS – tris(hydroxymethyl)aminomethane ($> 98\%$, Lach-Ner, Czech Republic), dimethyl sulfoxide ($> 99\%$, Lachema, Czech Republic), sodium hydroxide ($> 98\%$, Lach-Ner, Czech Republic). Deionized water was obtained from systém of Milli Q, Millipore (Milford, USA).

A mixture of n-alkanes (C₈ – C₂₀) dissolved in hexane for the determination of the retention indices were obtained from Fluka (Buchs, Switzerland). Reference compounds (+)- β -citronellene ($\geq 98.5\%$), (*E*)-2-hexen-1-ol ($> 96\%$), (*E*)-2-octen-1-ol ($> 97\%$), 1-decyne ($> 98\%$), 1-dodecene ($\geq 99\%$), 1-tridecene ($> 96\%$), (*E,E*)-2,4-decadienal ($\geq 97\%$), (*E,E*)-2,4-dodecadienal ($> 90\%$), (*E,E*)-2,4-hexadienal ($\geq 95\%$), (*E,E*)-2,4-nonadienal ($> 89\%$), (*E,E*)-2,4-octadienal ($\geq 95\%$), 2-cyclohexen-1-ol ($> 95\%$), 2-decanol ($> 98\%$), (*E*)-2-decenal ($\geq 92\%$), 2-heptanol ($\geq 97\%$), 2-heptanone ($\geq 98\%$), (*E*)-2-hexen-1-ol ($\geq 95\%$),

(*E*)-2-hexenal ($\geq 99\%$), 2-hexyl-1-decanol ($> 97\%$), (*E*)-2-nonenal ($\geq 95\%$), (*E*)-2-octenal ($\geq 95\%$), (*E*)-2-undecenal ($\geq 95\%$), (*Z*)-3-hexenyl acetate ($\geq 98\%$), 4-*tert*-butylcyclohexyl acetate (mixture of *E* and *Z*, $> 98\%$), acetoin ($\geq 96\%$), allyl cyclohexanpropionate ($\geq 98\%$), benzaldehyde ($\geq 99\%$), citronellol ($\geq 95\%$), cyclohexyl acetate ($\geq 98\%$), cyclopentanecarboxylic acid ($\geq 99\%$), cyclopentanemethanol ($\geq 98\%$), cyclopentanol ($\geq 99\%$), cyclopentanone ($\geq 99\%$), decanal ($\geq 98\%$), 1-dodecanol ($\geq 98\%$), dodecyl acetate ($> 97\%$), 1-hexadecanol ($\geq 99\%$), hexyl acetate ($\geq 99\%$), hexyl salicylate ($\geq 99\%$), isoamyl acetate ($\geq 97\%$), limonene ($> 97\%$), methyl decanoate ($\geq 99\%$), nonanal ($\geq 97\%$), octyl acetate ($\geq 99\%$), *p*-cymene ($> 99\%$), phenyl acetate ($\geq 99\%$), prenyl acetate ($\geq 98\%$), 1-tetradecanol ($\geq 97\%$), 1-tridecanol ($\geq 99\%$), 1-undecanol ($\geq 99\%$), and α -hexylcinnamaldehyde ($\geq 95\%$) were supplied by Sigma Aldrich (Munich, Germany).

3.2 Samples of true bugs

Extracts from cuticles of true bugs *Scantius aegyptius*, *Pyrrhocoris apterus*, *Corizus hyoscyami*, *Eurydema ornatum cream color morph* and *Tectocoris diopthalmus* were analysed in the first part of the work.

The studies were focused on *Pyrrhocoris apterus*, *Pyrrhocoris tibialis*, *Scantius aegyptius* and *Graphosoma lineatum* in the second part of the work (secretion of true bugs).

3.3 Instrumentation

Electrophoretic measurements were performed on PrinCE 250 autosampler (PrinCE Technologies B.V., Netherlands) with UV-VIS spectrometric detector Spectra 100 (Therma Separation Products, USA). Chromatography was carried out on LC/MS series 1200 (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). Analyses of secretions of true bugs were carried out on the gas chromatograph GCMS-QP2010 Plus (Shimadzu, Japan). The programs Clarity (DataApex, ČR), Mass Hunter Workstation (Agilent Technologies, Germany), GCMS solutions (Shimadzu, Japan), Origin 8 (OriginLab Corporation, USA) and Microsoft Excel 2003 (Microsoft Corporation, USA) were used for data collection and evaluation.

4 Results and discussion

4.1 Capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography

Pterin derivatives in aqueous solutions behave as weak acids. Capillary electrophoresis is a suitable alternative of relatively complicated and costly separation and detection systems

used for analysis of pterin derivatives in HPLC. Based on the available literature, capillary electrophoresis has not yet been used for an analysis of pterin derivatives in insect cuticles.

A new method of capillary electrophoresis has been developed for identification and quantification of ten pterin derivatives - L-Sepiapterin, 7,8-dihydroxanthopterin, 6-biopterin, D-neopterin, isoxanthopterin, leukopterin, xanthopterin, erythropterin, pterin-6-carboxylic acid.

The effect of pH buffer, concentration of individual constituents of the electrolyte, separation voltage and wavelengths of UV detection on electromigration behaviour and sensitivity of detection were explored within the optimization procedure. The pH value had the biggest effect on electromigration behaviour of the studied analytes (see. Fig. 4.1).

The Fig. 4.1 shows that an increasing value of pH of the separation electrolyte leads to an increase in negative values of effective electrophoretic mobilities of all monitored derivatives, which is in agreement with the assumption of their greater dissociation. It is also clear from the Fig. 4.1 that the separation of pterin derivatives is very sensitive to pH of the basic electrolyte. Separation of all studied pterin derivatives can be achieved only in a very narrow pH range, and particularly isoxanthopterin, leukopterin and xanthopterin, which are structurally very similar substances and are generally widespread in insects, migrate at very similar times.

Whereas isoxanthopterin comigrates with leukopterin at $\text{pH} \leq 8.8$, leukopterin comigrates with xanthopterin at $\text{pH} \geq 9.6$ and the migration order of leukopterin and xanthopterin is exchanged at $\text{pH} \geq 10.0$. The total separation of these three derivatives can be achieved only at pH 9.0 and 10.2.

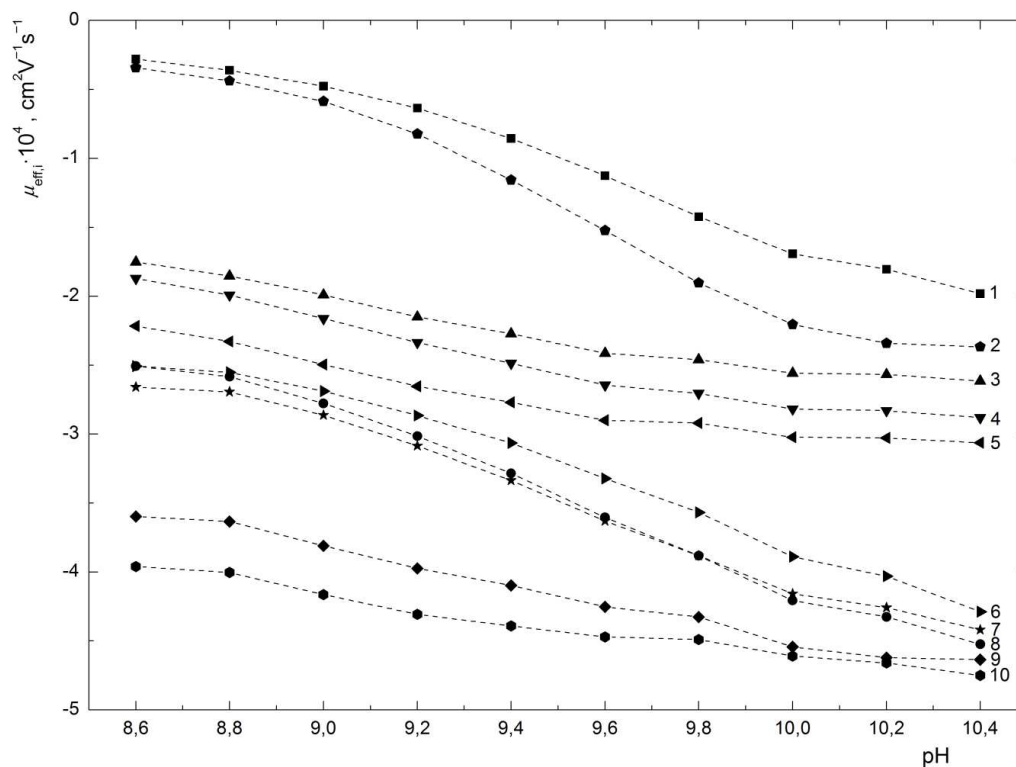


Fig. 4.1: Dependencies of efficient electrophoretic mobilities $\mu_{\text{eff},i}$ of individual pterin derivatives on pH in the separation electrolyte consisting of $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ of boric acid, $2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Na_2EDTA and $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ TRIS, (1) L-Sepiapterin, (2) 7,8-dihydroxanthopterin, (3) 6-biopterin, (4) D-neopterin, (5) pterin, (6) isoxanthopterin, (7) xanthopterin, (8) leukopterin, (9) erythropterin and (10) pterin-6-carboxylic acid.

Optimized separation conditions included: basic electrolyte with the composition of $2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Na_2EDTA , $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ TRIS and $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ of boric acid, pH 9.0; applied voltage 20 kV and UV detection at 250 nm.

Under these conditions there was a separation of all 10 studied pterin derivatives up to the baseline within 22 min (fig. 4.2).

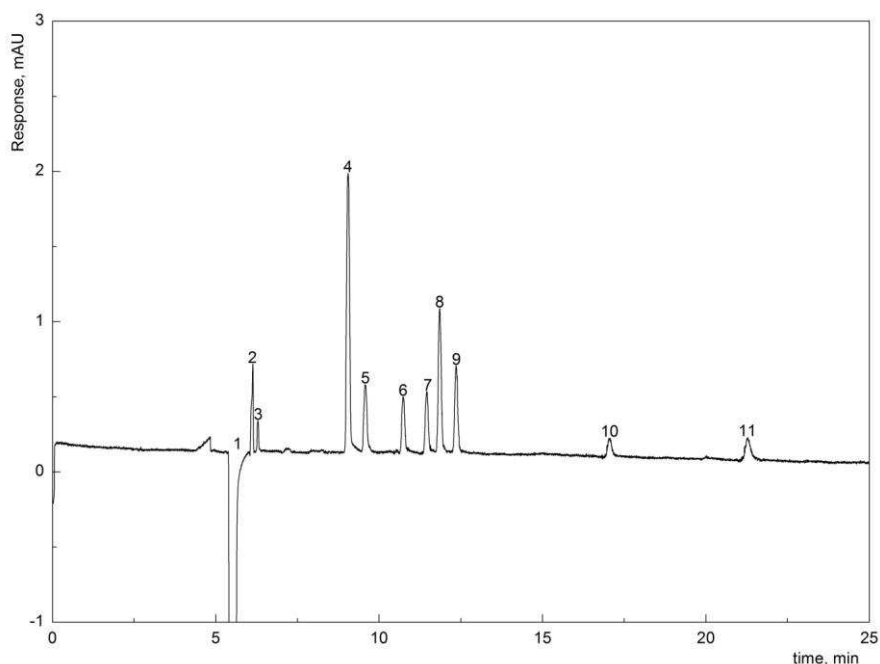


Fig. 4.2 Electropherogram of separation of 10 pterin derivatives in basic electrolyte consisting of $2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Na_2EDTA , $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ TRIS and $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ of boric acid, pH 9.0. Electrokinetic dosage 10 s at 20 kV, separation at 20 kV, temperature 30°C , passing current $19.4 \mu\text{A}$ and UV detection at 250 nm. Concentration of pterin derivatives in the mixture $2.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Peak (1) dimethyl sulfoxide (2) L-Septapterin, (3) 7,8-dihydroxanthopterin, (4) 6-biopterin, (5) D-neopterin, (6) pterin, (7) isoxanthopterin, (8) leukopterin, (9) xanthopterin, (10) erythropterin and (11) pterin-6-carboxylic acid.

High-performance liquid chromatography is based on a different separation mechanism than capillary electrophoresis and it is therefore a comparative method suitable to confirm identification of pterin derivatives present in cuticles of true bugs.

HPLC in the hydrophilic interaction mode in combination with tandem mass spectrometry was chosen because of the high polarity of pterin derivatives. Two columns were selected for the analysis: Atlantis HILIC Silica ($150 \times 4,6 \text{ mm}$, $3 \mu\text{m}$, Waters, Milford, USA) a ZIC-HILIC ($150 \times 4,6 \text{ mm}$, $3,5 \mu\text{m}$, Merck, Darmstadt, Germany).

The effect of the content of the organic modifier, buffer type, its concentration and pH value in the mobile phase on the retention and separation behaviour were studied within the optimization procedure. The ratio of the organic and aqueous component in the mobile phase had the highest effect on the retention behaviour of pterin derivatives.

Based on the results, ZIC-HILIC column was selected with the following separation conditions: mobile phase 85/15 (v/v) ACN/5 mM ammonium acetate, pH = 6,80, flow rate 0.5 ml·min⁻¹, 30 °C.

The method of capillary zone electrophoresis and the method of high-performance liquid chromatography were newly designed with tandem mass spectrometry for the analysis of pterin derivatives in cuticles of true bugs. Both methods were validated in term of linearity (CZE: $R^2 \geq 0.9980$, HPLC: $R^2 \geq 0.9975$), accuracy (CZE: relative error $\pm 7.90\%$, HPLC: relative error $\pm 9.63\%$), precision (CZE: for repeatability $RSD \leq 6.65\%$, HPLC: for repeatability $RSD \leq 8.09\%$), detection limit (CZE: LOD in the range of 0.04 – 0.99 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, HPLC: LOD in the range of 0.40 – 6.20 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) and quantification limit (CZE: LOQ in the range of 0.13 – 3.30 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, HPLC: LOQ in the range of 0.3 – 19.3 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$). The time of analysis is roughly the same in both methods – 22 minutes for CZE and 30 minutes for HPLC. Capillary electrophoresis is a preferable option in case of separation efficiency, because there is a separation of all 10 studied pterin derivatives.

It is obvious from the above-mentioned facts that the method CE-UV can, except for limits of detection and quantification, provide similar characteristics as the much more complicated system of HPLC-MS/MS. Both methods, however, are complementary, since they are based on a different separation mechanism and this is advantageous in case of identifications.

Both methods were used for identification and determination of the content of pterin derivatives in four species of Heteroptera - *Eurydema Oleracea*, *Scantius Aegyptius*, *Pyrrhocoris Apteris* and *Corizus Hyoscyami*. The results are indicated on the pictures 4.3 and 4.4. The Table 2 lists the retention times and SRM conditions for determination of individual pterin derivatives. This table complements the publication III, because HPLC-MS/MS was subsequently extended to include separation and quantification of other 3 derivatives - L-Septapterin, pterin and pterin-6-carboxylic acid, which were not studied in the given publication.

Table 2 Retention times and SRM conditions used for the analysis of pterin derivatives by means of the method LC-MS/MS (ESI, positive mode). The first transition was used for quantification and the second one for identification. For other conditions see the Publication III.

Derivative	Retention time (min)	Precursor ion	Product ion	Fragmentor (V)	Collision energy (V)
L-Sepiapterin	7.14	238.1	220.1	120	15
Pterin	9.61	164.0	143.1	120	35
Isoxanthopterin	12.25	180.1	135.1	125	20
6-biopterin	12.44	238.1	178.1	115	17
Xanthopterin	14.45	180.1	135.1	125	20
Leucopterin	18.27	196.1	140.1	120	16
Erythropterin	23.60	266.1	220.1	110	8
D-neopterin	29.78	254.2	206.2	115	14
Pterin-6-carboxylic acid	29.81	208.0	190.0	120	15

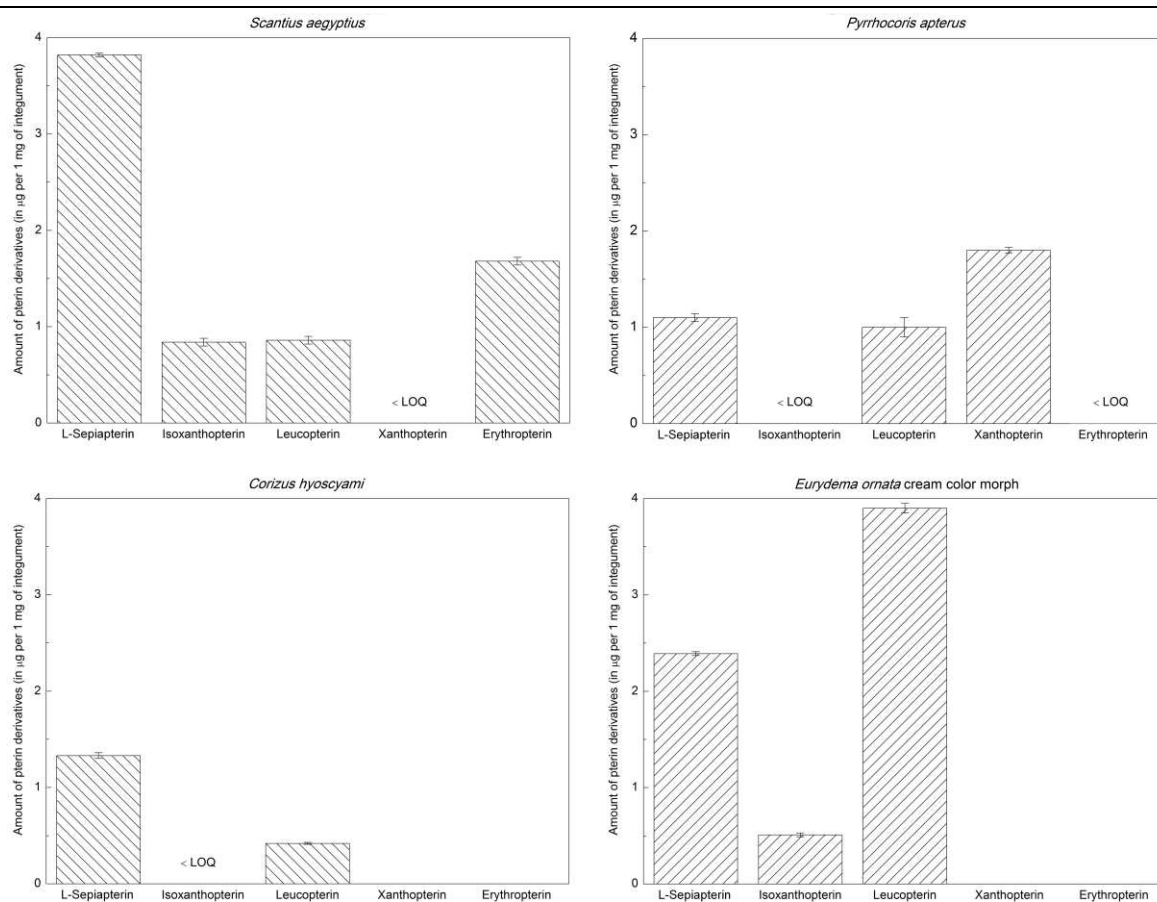


Fig. 6

Fig. 4.3 Comparing the amount of pterin derivatives found in the plates of individual true bugs by means of the method CZE under optimized conditions. Designation <LOQ means only the presence of the given derivative, the concentration of which is below LOQ. This was measured under optimized conditions described in the Publication I.

The Figure 4.3 shows that yellow L-sepiapterin, isoxanthopterin and white leukopterin, even if in different proportions, were identified/determined in the plates of all the bugs. Another two color derivatives - xanthopterin and erythropterin – were either determined, or just identified in *Scantius aegyptius* and in *Pyrrhocoris apterus*. The same results were obtained by high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry (Fig. 4.4).

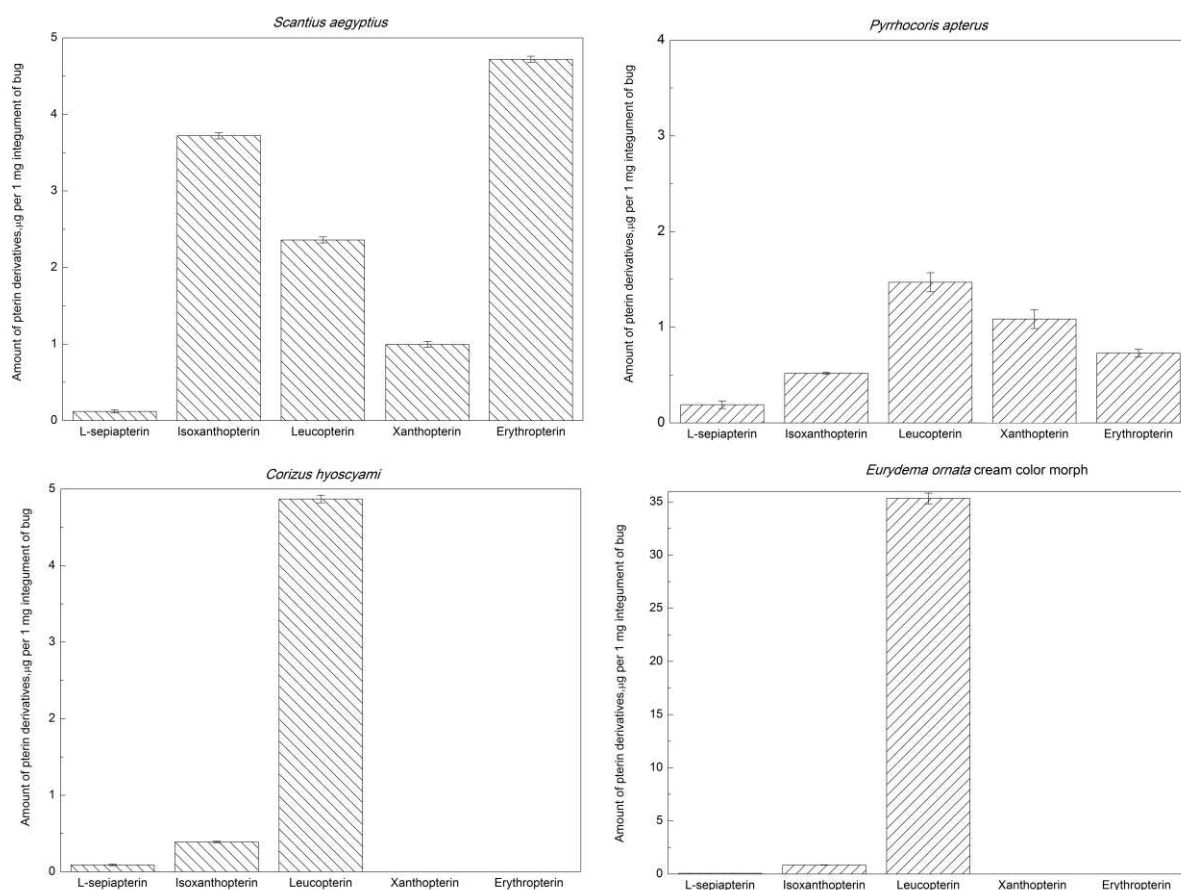


Fig. 4.4 Comparing the amount of pterin derivatives found in the plates of individual Heteroptera by means of the method HPLC under optimized conditions. This was measured under optimized conditions described in the publication III.

Both methods were used to identify the same kinds of analytes in the given types. Both figures show noticeable differences in quantification, which, however, exists only at the level of units of micrograms of the given pterin, relative to 1 mg of the cuticle. The only exception is leukopterin, which was found in black-and-cream cuticle of the true bugs *Eurydema ornata* cream color morph in tens of micrograms of pterin, relative to 1 mg cuticles.

The colour difference of the cuticles of each species is probably caused by a different ratio of pterin derivatives. At present, however, it shows that even anthraquinones and

carotenoids may contribute to coloration of cuticles. These substances and their potential presence in cuticles will be the subject of further study in the subsequent grant project GA UK no. 760216 Use of multidimensional separation techniques for the study of defence mechanism of true bugs.

4.2 Analysis of volatile defensive secretions

Gas chromatography combined with mass spectrometric detector was used for the analysis of volatile defensive secretions of true bugs. Three methods of mechanical irritation of true bugs were designed and optimized for the collection of volatile defensive secretions - ultrasound, shaker and compression of true bugs by the plunger of a syringe. Concentrating of secretions was carried out using adsorption on SPME fibre and three fibres with a different polarity were studied within the optimization procedure - polyacrylate (PA), polydimethylsiloxane (PDMS) and a composite fibre consisting of carboxen (CAR), polydimethylsiloxane (PDMS) and divinylbenzene (DVB); (CAR/PDMS/DVB). An advantage of the last fibre is that it allows to adsorb substances from a wide range of polarities. The fibre consists of three phases: CAR for adsorbing polar substances and very volatile substances, PDMS for adsorption of non-polar substances, DVB for adsorption of medium polar and aromatic compounds. A modern capillary GC column was used for the analysis, comprising trifluoropropylmethyl polysiloxane stationary phase, which also allows the separation of substances from a wide range of polarities.

The influence of various parameters (e.g. fibre type, temperature of irritation, temperature during the adsorption on SPME fibre, adsorption time on the SPME fibre etc.) on the surface area and the number of obtained chromatographic peaks was explored for all individual methods of collection of volatile secretions of true bugs. Due to the large number of investigated parameters, a multi-parameter optimization was conducted using the program Minitab 16.

The traditional approach to optimization (one factor at a time – OFAT, or one variable at a time - OVAT) uses only one value as a variable parameter and other parameters are not changed during the measurement. When it is necessary to explore several optimized parameters, this approach becomes a very lengthy and expensive process.

Therefore, new approaches have been used increasingly more often, known as RSM (response surface methodology), which are based on factorial designs. They minimize these costs by reducing the number of attempts to such a degree, so as to achieve or at least

approach the optimum point (setting) without having to search for and measure all variants of the studied parameters.

The true bug *Pyrrhocoris apterus* (Hemiptera: Heteroptera: Pyrrhocoridae) was selected for optimization of the proposed methods. This bug is a common Eurasian species, easily available in large quantities, and its secretion is very well studied. This species is also characterized by a low number of defence substances with a low concentration and difficult secretion. For this reason, it is believed that it is relatively challenging to analyse defensive secretions of this particular bug.

Two parameters were monitored within the optimization, namely the total number of peaks and the total sum of their areas. A requirement for the proposed method was that it should generate the greatest number of peaks and the sum of their areas. Based on this requirement, a method based on compressing of true bugs by a syringe plunger was chosen for further study.

Optimized conditions for collecting secretions included: composite fiber CAR/PDMS/DVB, tempering of three bugs in a syringe at 40°C during 1 minutes, temperature during adsorption on the fibre SPME 40°C, time of adsorption on SPME fibre is 90 minutes.

Newly designed method SPME-GC-MS was used for the analysis of secretions of males and females of two European species – *Pyrrhocoris apterus* and *Scantius aegyptius* and one Chinese species – *Pyrrhocoris tibialis*. Examples of chromatograms obtained by the analysis of male and female secretions produced by the bugs *Pyrrhocoris tibialis* are indicated on the Fig. 4.5. The Fig. 4.6 demonstrates very good repeatability of the analyses obtained by means of the newly developed method SPME-GC-MS.

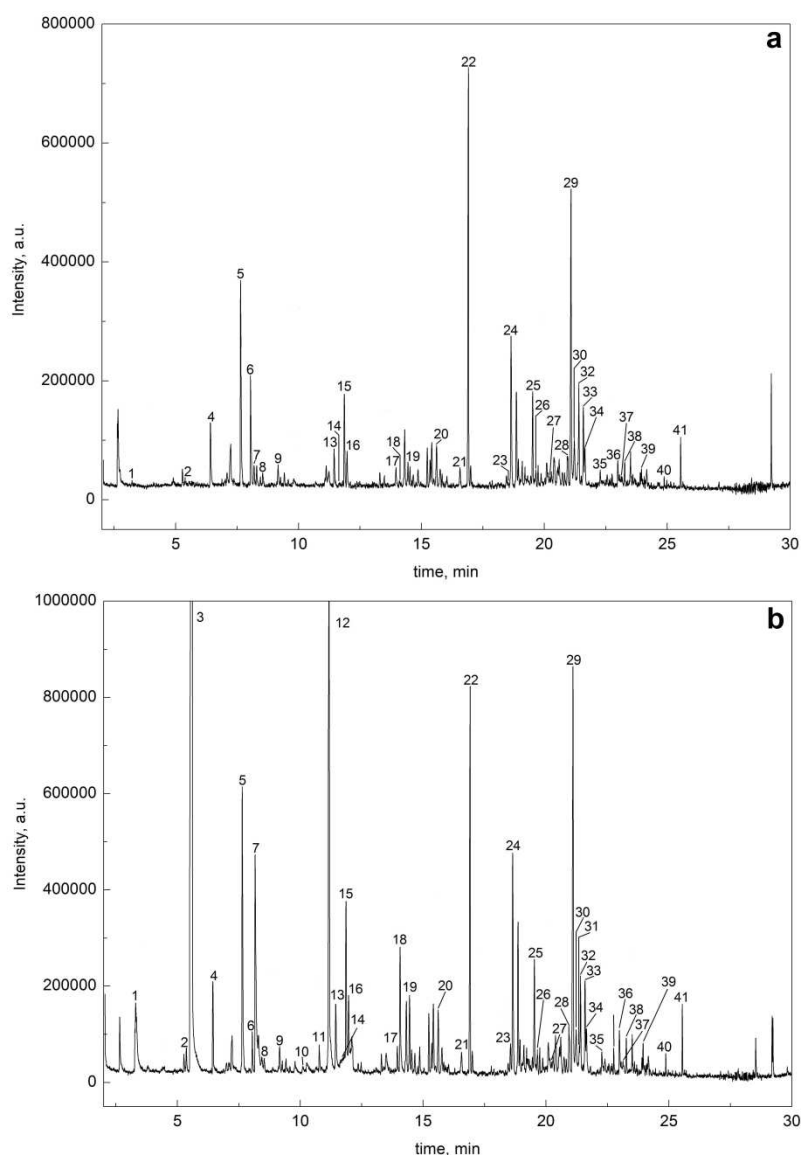


Fig. 4.5 SPME-GC-MS analysis of *Pyrrhocoris tibialis*. Secretion of (a) male and (b) female *Pyrrhocoris tibialis*. Sampling secretions method based on compression bugs with plunger of the syringe; SPME sorption on fiber CAR/PDMS/DVB. Peak [1] octan-1,3-diene; [2] hexenal; [3] (*E*)-2-hexen-1-ol; [4] 3-methylbutanoic acid; [5] limonene; [6] 1-decyne; [7] (*E*)-2-hexenal; [8] *p*-cymene; [9] undecane; [10] (*E,E*)-2,4-hexadienal; [11] (*E*)-2-hexen-1-ol acetate; [12] (*E*)-2-octen-1-ol; [13] 2,6-dimethyl-7-octen-2-ol; [14] 6-dodecene; [15] dodecane; [16] 1-dodecene; [17] nonanal; [18] (*E*)-2-octenal; [19] tridecane; [20] 2-isopropyl-5-methyl-1-heptanol; [21] decanal; [22] tetradecane; [23] 2-ethylcyclohexanone; [24] 4-*tert*-butylcyclohexyl acetate; [25] pentadecane; [26] 4-*tert*-butylcyclohexyl acetate; [27] 2-methyl-1-undecanol; [28] allyl cyclohexanepropionate; [29] 1-dodecanol; [30] 3,5-Bis(1,1-dimethylethyl)phenol; [31] tetradecanal; [32] hexadecane; [33] indan-1,3-diol monoacetate;

[34] verdyl acetate; [35] 2-ethyl-1-dodecanol; [36] 1-tridecanol; [37] 1-(4-*tert*-butylphenyl)propan-2-one; [38] 1-ethoxynaphtalene; [39] dodecyl acetate; [40] hexyl salicylate and [41] α -hexylcinnamaldehyde.

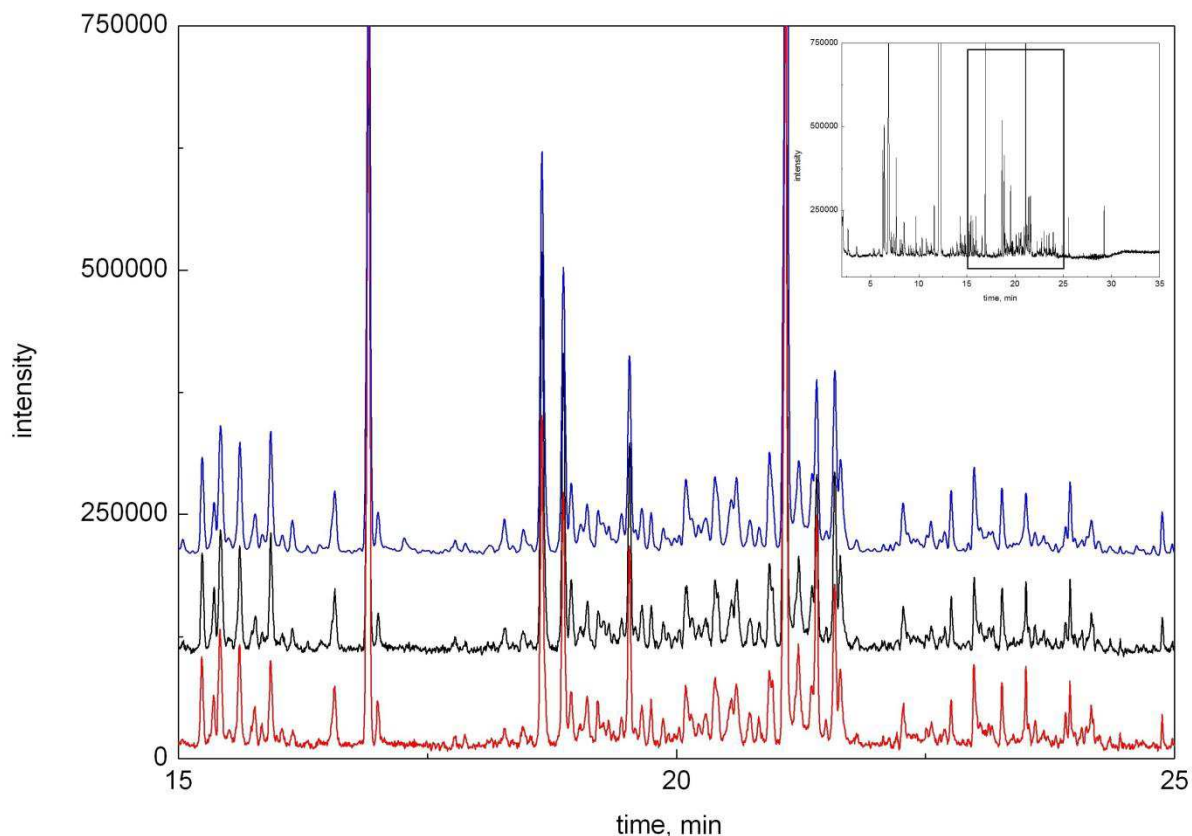


Fig. 4.6 Repeatability of the analysis of secretions of male *Scantius aegyptius*. Each analysis was performed with three new individuals under optimized conditions described in the section 4.2.

Identification was performed by comparing the obtained mass spectra with the mass spectra library NIST 2008, and by comparing the respective retention times of the corresponding standards specified in the Section 3.1.

25 compounds were identified in the secretion of *Pyrrhocoris apterus*: 6 hydrocarbons (mainly dodecane and tridecane), 3 alcohols, aldehydes 7 (particularly the (*E*)-2-hexenal, (*E,E*)-2,4-hexadienal, nonanal and (*E*)-2-octenal), 5 esters (especially methyl 2-hydroxy-3-methyl pentanoate) and three organic acids.

Secretion of *Pyrrhocoris tibialis* contained 11 carbons, 9 alcohols (mainly 1-dodecanol, (*E*)-2-hexen-1-ol and (*E*)-2-octen-1-ol), 8 aldehydes (especially (*E*)-2-octenal and

(*E*)-2-hexenal), 2 ketones and 8 esters carboxylic acids. Secretion also included limonene and a small amount of 1-ethoxynaphthalen.

The composition of secretions of *Scantius aegyptius* was similar: 10 carbons, 10 alcohols (mainly 2-cyclohexen-1-ol, cyklopentanemethanol and 1-dodecanol), 3 aldehydes, 2 ketones and 11 esters of carboxylic acids. Secretion also included limonene and 1-ethoxynaphthalen. Secretion of *S. aegyptius* and *P. tibialis* is the same in 24 compounds, while secretion of *P. apterus* and *S. aegyptius* in 9 compounds and *P. tibialis* and *P. apterus* in 14 compounds.

The advantage of the proposed method is that it is a non-invasive procedure, only 3 individuals are needed for an analysis - Farin et al. used up to 2,000 individuals, which were killed to obtain secretions [40]. This means that rare species such as *Pyrrhocoris tibialis*, which are not readily available and it is necessary to maintain their breeding for further research, can also be analysed.

The newly developed method SPME-GC-MS was used to analyse secretions of two European species– *Pyrrhocoris apterus* and *Scantius aegyptius* and one Chinese species– *Pyrrhocoris tibialis*. The proposed method was optimized for true bugs from the family of Pyrrhocoridae. These species are characterized by a lower concentration of substances present in their secretions.

It was found out in the pilot studies that some other species, for example *Graphosoma lineatum* from the family Pentatomidae, releases large amounts of substances with high concentrations. For the above-mentioned reason, the subsequent analysis using 1D-GC is not efficient enough, as coelutions occur.

In order to extend the applicability of the proposed method of collection of volatile secretions to species with higher concentrations of substances present in their secretions, the sampling conditions will be subsequently adjusted in view of the foregoing, for example by reducing the time of adsorption on SPME fibre or by reducing the number of individuals during collection of their volatile secretions. The method of comprehensive two-dimensional gas chromatography (GCxGC) will also be used in the subsequent study. The issue will also be addressed in the follow-up project of the grant agencies GA UK no. 760216 Use of multidimensional separation techniques for the study of defence mechanisms of true bugs.

5 Conclusions

The dissertation deals with the analysis of complex defence compounds one of the most important representatives of insects – true bugs. The first part of the dissertation describes the analysis of pterin derivatives, which are included in cuticles of true bugs and which result in their characteristic warning coloration. The second part is focused on new ways of sampling of volatile defensive secretions and their subsequent analyses by means of gas chromatography. The results of this dissertation are:

- 1) A method of capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry to determine pterin derivatives in cuticles of selected species of true bugs was developed, optimized and validated.
- 2) The content of pterin derivatives responsible for the characteristic colouring of cuticles of true bugs was identified and determined in selected species of true bugs.
- 3) New non-invasive methods of sampling of volatile components of defensive secretions of true bugs were designed - ultrasound, shaker, syringe plunger. Three types of SPME fibre were tested, namely non-polar polydimethylsiloxane (PDMS), polar polyacrylate (PA) and bipolar divinylbenzene/carboxen/polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS). The entire optimization of collection of volatile secretions of true bugs was performed using factorial design RSM. The developed methodology was applied on the analysis of volatile secretions of males and females of *Pyrrhocoris tibialis*, *Pyrrhocoris apterus* and *Scantius aegyptius* by means of the newly developed method SPME-GC-MS.

6 References

1. Henry TJ (2007) Biodiversity of Heteroptera. In: Footitt R, Adler, PH editor. *Insect Biodiversity: Wiley-Blackwell*. pp. 223-263.
2. Millar JG (2005) Pheromones of true bugs. In: Schulz S, editor. *Chemistry of Pheromones and Other Semiochemicals Ii*. Berlin: Springer-Verlag Berlin. pp. 37-84.
3. Arnett RH (1993) *American Insects: A Handbook of the Insects of America North of Mexico*. Gainesville: Sandhill Crane Press.
4. Cott HB (1940) *Adaptive coloration in animals*. London: Methuen & Co., Ltd.
5. G.D. Ruxton TNS, M.P. Speed (2004) *Avoiding Attack The Evolutionary Ecology of Crypsis, Warning Signals and Mimicry*. New York: Oxford University Press.
6. Speed MP (2000) Warning signals, receiver psychology and predator memory. *Anim Behav* 60: 269-278.
7. Malečková D (2011) *Reakce ptačích predátorů na různé složky repelentní sekrece ploštic [Diplomová práce]*. Praha: Univerzita Karlova v Praze.
8. Rowe C, Guilford T (1996) Hidden colour aversions in domestic chicks triggered by pyrazine odours of insect warning displays. *Nature* 383: 520-522.
9. Rowe C, Guilford TIM (1999) Novelty effects in a multimodal warning signal. *Anim Behav* 57: 341-346.
10. Tomandl J (1998) Pterins. *Chem Listy* 92: 689-697.
11. Schüttelkopf AW, Hardy LW, Beverley SM, Hunter WN (2005) Structures of Leishmania major Pteridine Reductase Complexes Reveal the Active Site Features Important for Ligand Binding and to Guide Inhibitor Design. *J Mol Biol* 352: 105-116.
12. Ito K, Kawanishi S (1997) Photoinduced hydroxylation of deoxyguanosine in DNA by pterins: sequence specificity and mechanism. *Biochemistry* 36: 1774-1781.
13. Johnson JL, Hamm-Alvarez S, Payne G, Sancar GB, Rajagopalan KV, et al. (1988) Identification of the second chromophore of Escherichia coli and yeast DNA photolyases as 5,10-methenyltetrahydrofolate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 2046-2050.
14. Hevel JM, Marietta MA (1992) Macrophage nitric oxide synthase: Relationship between enzyme-bound tetrahydrobiopterin and synthase activity. *Biochemistry* 31: 7160-7165.
15. Smutna M, Svoboda M, Breinekova K (2010) Pterins as sensors of response to the application of Fe³⁺-dextran in piglets. *Sensors* 10: 890-900.
16. Basu P, Burgmayer SJN (2011) Pterin chemistry and its relationship to the molybdenum cofactor. *Coord Chem Rev* 255: 1016-1038.
17. Čopíková J, Uher M, Lapčík O, Moravcová J, Drašar P (2005) Natural colorants. *Chemicke Listy* 99: 802-816.

18. Němec V, Breuer M, De Loof A (2003) Thin layer chromatographic analysis of pteridine-like pigments in the migratory locust, *Locusta migratoria migratorioides* (Orthoptera: Oedipodidae). *Eur J Entomol* 100: 19-23.
19. Niva CC, Takeda M (2002) Color changes in *Halyomorpha brevis* (Heteroptera: Pentatomidae) correlated with distribution of pteridines: regulation by environmental and physiological factors. *Comp Biochem Physiol Part B Biochem Mol Biol* 132B: 653-660.
20. Porcar M, Bel Y, Socha R, Nemeč V, Ferre J (1996) Identification of pteridines in the firebug, *Pyrrhocoris apterus* (L.) (Heteroptera, Pyrrhocoridae) by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* 724: 193-197.
21. Mansilla AE, Meras ID, Salinas F (2001) Analysis of pteridines and creatinine in urine by HPLC with serial fluorimetric and photometric detectors. *Chromatographia* 53: 510-514.
22. de Llanos AM, Espinosa-Mansilla A, Canada-Canada F, de la Pena AM (2011) Separation and determination of 11 marker pteridines in human urine by liquid chromatography and fluorimetric detection. *J Sep Sci* 34: 1283-1292.
23. Tani Y, Ohno T (1993) Analysis of 6R- and 6S-tetrahydrobiopterin and other pterins by reversed-phase ion-pair liquid chromatography with fluorometric detection by post-column sodium nitrite oxidation. *J Chromatogr Biomed Appl* 617: 249-255.
24. Shi Z-G, Wu Y-B, Luo Y-B, Feng Y-Q (2010) Analysis of Pterins in Urine by HILIC. *Chromatographia* 71: 761-768.
25. Stea B, Halpern RM, Smith RA (1979) Separation of unconjugated pteridines by high-pressure cation-exchange liquid chromatography. *J Chromatogr* 168: 385-393.
26. Klein R (1992) Determination of the stereoconfiguration of natural pterins by chiral high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem* 203: 134-140.
27. Stevenson R, Stokes RJ, MacMillan D, Armstrong D, Faulds K, et al. (2009) In situ detection of pterins by SERS. *Analyst* 134: 1561-1564.
28. Wan YQ, Tang LJ, Tan T (2010) Simultaneous determination of xanthopterin and isoxanthopterin in human urine by synchronous fluorescence spectroscopy. *J Fluor* 20: 1191-1198.
29. Melber C, Schmidt GH (1994) Quantitative variations in the pteridines during the post-embryonic development of *Dysdercus* species (Heteroptera: Pyrrhocoridae). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 108: 79-94.
30. Melber C, Schmidt GH (1997) Body coloration related to the deposition of pteridines in the epidermis and other organs of *Dysdercus* species (Insecta; Heteroptera: Pyrrhocoridae). *Comp Biochem Physiol A: Physiol* 116A: 17-28.
31. Vet LEM (1999) From chemical to population ecology: infochemical use in an evolutionary context. *J Chem Ecol* 25: 31-49.

32. Ho HY, Millar JG (2001) Compounds in metathoracic glands of adults and dorsal abdominal glands of nymphs of the stink bugs, *Chlorochroa uhleri*, *C. sayi*, and *C. ligata* (Hemiptera: Pentatomidae). *Zool Stud* 40: 193-198.
33. Pavis C, Malosse C, Ducrot PH, Descoins C (1994) Dorsal abdominal glands in nymphs of southern green stink bug, *Nezara viridula* (L.) (Heteroptera: Pentatomidae): Chemistry of secretions of five instars and role of (E)-4-oxo-2-decenal, compound specific to first instars. *J Chem Ecol* 20: 2213-2227.
34. Moraes MCB, Pareja M, Laumann RA, Borges M (2008) The Chemical Volatiles (Semi-chemicals) Produced by Neotropical Stink Bugs (Hemiptera: Pentatomidae). *Neotrop Entomol* 37: 489-505.
35. Tsuyuki T, Ogata Y, Yamamoto I, Shimi K (1965) Stink bug aldehydes. *Agric Biol Chem* 29: 419-427.
36. Borges M, Aldrich JR (1992) Instar-specific defensive secretions of stink bugs (Heteroptera: Pentatomidae). *Experientia* 48: 893-896.
37. Fucarino A, Millar JG, McElfresh JS, Colazza S (2004) Chemical and physical signals mediating conspecific and heterospecific aggregation behavior of first instar stink bugs. *J Chem Ecol* 30: 1257-1269.
38. Noge K, Prudic K, Becerra J (2012) Defensive Roles of (E)-2-Alkenals and Related Compounds in Heteroptera. *J Chem Ecol* 38: 1050-1056.
39. Gunawardena NE (1994) Seasonal changes in the chemical composition of the defensive secretion of the rice pest *Leptocorisa oratorius* (Hemiptera:Coreidae). *J Natl Sci Counc Sri Lanka* 22: 239-243.
40. Farine JP, Bonnard O, Brossut R, Le Quere JL (1992) Chemistry of defensive secretions in nymphs and adults of fire bug, *Pyrrhocoris apterus* L. (Heteroptera, Pyrrhocoridae). *J Chem Ecol* 18: 1673-1682.
41. Nagnan P, Cassier P, Andre M, Llosa JF, Guillaumin D (1994) Fine structure and physicochemical analysis of the metathoracic scent glands of *Lincus Malevolus* (Rolston) and *L. Spurcus* (Rolston) (Heteroptera : Pentatomidae). *Int J Insect Morphol Embryol* 23: 355-370.
42. Zarbin PHG, Borges M, Dos Santos AA, De Oliveira ARM, Simonelli F, et al. (2000) Alarm Pheromone System of Stink Bug *Piezodorus guildinii* (Heteroptera: Pentatomidae). *J Braz Chem Soc* 11: 424-428.
43. Zhang Q-H, Aldrich JR (2003) Male-produced anti-sex pheromone in a plant bug. *Naturwissenschaften* 90: 505-508.
44. Kalinova B, Jiros P, Zdarek J, Wen X, Hoskovec M (2006) GC×GC/TOF MS technique-A new tool in identification of insect pheromones: Analysis of the persimmon bark borer sex pheromone gland. *Talanta* 69: 542-547.

45. Pareja M, Borges M, Laumann RA, Moraes MCB (2007) Inter- and intraspecific variation in defensive compounds produced by five neotropical stink bug species (Hemiptera: Pentatomidae). *J Insect Physiol* 53: 639-648.
46. Durak D, Kalender Y (2009) Fine structure and chemical analysis of the metathoracic scent gland secretion in *Graphosoma lineatum* (Linnaeus, 1758) (Heteroptera, Pentatomidae). *C R Biol* 332: 34-42.
47. Yang CY, Kim J, Ahn S-J, Kim D-H, Cho MR (2014) Identification of the Female-Produced Sex Pheromone of the Plant Bug *Apolygus spinolae*. *J Chem Ecol* 40: 244-249.
48. Aldrich JR, Zanuncio JC, Vilela EF, Torres JB, Cave RD (1997) Field tests of predaceous pentatomid pheromones and semiochemistry of *Podisus* and *Supputius* species (Heteroptera: Pentatomidae: Asopinae). *An Soc Entomol Bras* 26: 1-14.
49. Aldrich JR, Numata H, Borges M, Bin F, Waite GK, et al. (1993) Artifacts and pheromone blends from *Nezara* spp. and other stink bugs (Heteroptera: Pentatomidae). *Z Naturforsch C: Biosci* 48: 73-79.
50. Stránský K, Valterová I, Ubik K, Čejka J, Křeček J (1998) Volatiles from Stink Bug, *Graphosoma lineatum* (L.), and from Green Shield Bug, *Palomena prasina* (L.), (Heteroptera: Pentatomidae). *J High Res Chrom* 21: 475-476.
51. Miklas N, Lasnier T, Renou M (2003) Male Bugs Modulate Pheromone Emission in Response to Vibratory Signals from Conspecifics. *J Chem Ecol* 29: 561-574.
52. Takita M, Sugie H, Tabata J, Ishii S, Hiradate S (2008) Isolation and estimation of the aggregation pheromone from *Eysarcoris lewisi* (Distant) (Heteroptera: Pentatomidae). *Appl Entomol Zool* 43: 11-17.
53. Fountain M, Jåstad G, Hall D, Douglas P, Farman D, et al. (2014) Further Studies on Sex Pheromones of Female *Lygus* and Related Bugs: Development of Effective Lures and Investigation of Species-Specificity. *J Chem Ecol* 40: 71-83.
54. Ho H-Y, Kou R, Tseng H-K (2003) Semiochemicals from the predatory stink bug *Eocanthecona furcellata* (Wolff): Components of metathoracic gland, dorsal abdominal gland, and sternal gland secretions. *J Chem Ecol* 29: 2101-2114.
55. Djozan D, Baheri T, Farshbaf R, Azhari S (2005) Investigation of solid-phase microextraction efficiency using pencil lead fiber for in vitro and in vivo sampling of defensive volatiles from insect's scent gland. *Anal Chim Acta* 554: 197-201.
56. Byers JA (2006) Production and Predator-Induced Release of Volatile Chemicals by the Plant Bug *Lygus hesperus*. *J Chem Ecol* 32: 2205-2218.
57. Cheng L, Roussis V (1998) Sex attractant in the marine insect *Trochopus plumbeus* (Heteroptera: Veliidae). A preliminary report. *Mar Ecol Prog Ser* 170: 283-286.

58. Williams L, III, Evans PE, Bowers WS (2001) Defensive chemistry of an aposematic bug, *Pachycoris stallii* Uhler and volatile compounds of its host plant *Croton californicus* Muell.-Arg. *J Chem Ecol* 27: 203-216.
59. Aldrich JR, Blum MS, Fales HM (1979) Species-specific natural products of adult male leaf-footed bugs (Hemiptera: Heteroptera). *J Chem Ecol* 5: 53-62.
60. Gough AJE, Hamilton JGC, Games DE, Staddon BW (1985) Multichemical defense of plant bug *Hotea gambiae* (Westwood) (Heteroptera: Scutelleridae). *J Chem Ecol* 11: 343-352.
61. Gunawardena NE, Herath HMWKB (1992) Trans-2-hexenal/N-tridecane combination: a natural fumigant of the defensive secretion of *Coridius janus* (Hemiptera: Pentatomidae). *J Natl Sci Counc Sri Lanka* 20: 209-220.
62. Prudic KL, Noge K, Becerra JX (2008) Adults and Nymphs Do Not Smell the Same: The Different Defensive Compounds of the Giant Mesquite Bug (*Thasus neocalifornicus*: Coreidae). *J Chem Ecol* 34: 734-741.
63. Eliyahu D, Ceballos RA, Saeidi V, Becerra JX (2012) Synergy versus potency in the defensive secretions from nymphs of two Pentatomomorphan families (Hemiptera: Coreidae and Pentatomidae). *J Chem Ecol* 38: 1358-1365.
64. Jacobs DH, Apps PJ, Viljoen HW (1989) The composition of the defensive secretions of *Thaumastella namaquensis* and *T. elizabethae* with notes on the higher classification of the Thaumastellidae (Insecta: Heteroptera). *Comp Biochem Physiol, B: Comp Biochem* 93B: 459-463.
65. Evans CE, Staddon BW, Games DE. Analysis of gland secretions of Pentatomoidea (Heteroptera) by gas chromatography-mass spectrometry techniques; 1990. Plenum. pp. 321-328.
66. Krall BS, Zilkowski BW, Kight SL, Bartelt RJ, Whitman DW (1997) Chemistry and defensive efficacy of secretion of burrowing bug (*Sehirus cinctus cinctus*). *J Chem Ecol* 23: 1951-1962.
67. Sanda M, Zacek P, Streinz L, Dracinsky M, Koutek B (2012) Profiling and characterization of volatile secretions from the European stink bug *Graphosoma lineatum* (Heteroptera: Pentatomidae) by two-dimensional gas chromatography/time-of-flight mass spectrometry. *J Chromatogr B* 881-82: 69-75.

Curriculum vitae

- Name and Surname: Mgr. Jan Krajiček
Address: 28.října 17, 737 01 Český Těšín
Nationality: Czech
Date of Birth: June 29, 1988
- Period (from - to) 2012 – present
 - School Name and type **Charles University in Prague – Faculty of Natural Science**
 - Study Field Analytical chemistry
 - Dissertation Comprehensive analysis of warning and defence compounds of true bugs by high-performance separation methods
-
- Period (from - to) 2010 – 2012
 - School Name and type **Charles University in Prague – Faculty of Natural Science**
 - Study Field Analytical chemistry
 - Diploma Thesis Analysis of pterin derivatives by means of capillary zone electrophoresis
-
- Period (from - to) 2007 – 2010
 - School Name and type **Charles University in Prague – Faculty of Natural Science**
 - Study Field Clinical and toxicological analysis
 - Bachelor's Thesis Pigment analysis from the integument of *Graphosoma semipunctatum* by HPLC method
-
- Period (from - to) 2003 – 2007
 - School Name and type **Secondary Technical School of Chemistry of academician Heyrovský and Grammar School**
 - Study Field Applied chemistry – Analytical chemistry

Grant projects:

2016-2019 Co-investigator of the project of the Grant Agency of Charles University GAUK no. 760216: Use of multidimensional separation techniques for the study of defence mechanism of true bugs.

2013-2016 Main investigator of the project of the Grant Agency of Charles University GAUK no. 18213: Comprehensive analysis of warning and defence substances of true bugs by means of high-performance separation techniques associated with mass spectrometry.

2011-2015 Project of the Grant Agency of the Czech Republic GACR no. P505/11/1459:
Factors affecting variability in the response of predators to an aposematic prey.

List of publications and conference papers

Publications:

- [1] Krajíček, J.; Kozlík, P.; Exnerová, A.; Štys, P.; Bursová, M.; Čabala, R.; Bosáková, Z.: Capillary electrophoresis of pterin derivatives responsible for the warning coloration of Heteroptera. *Journal of Chromatography A* **1336**, 94-100 (2014). IF 4.61
- [2] Fabricant, S.A.; Kemp, D.J.; Krajíček, J.; Bosáková, Z.; Herberstein, M.E.: Mechanisms of Color Production in a Highly Variable Shield-Back Stinkbug, *Tectocoris diopthalmus* (Heteroptera: Scutelleridae), and Why It Matters. *Plos One* **8**:5, 1-9 (2013). IF 4.41
- [3] Kozlík, P.; Krajíček, J.; Kalíková, K.; Tesařová, E.; Čabala, R.; Exnerová, A.; Štys, P.; Bosáková, Z.: Hydrophilic interaction liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection applied for analysis of pteridines in two *Graphosoma* species (Insecta: Heteroptera). *Journal of Chromatography B* **930**, 82-89 (2013). IF 2.49
- [4] Krajíček, J.; Havlíková, M.; Bursová, M.; Ston, M.; Čabala, R.; Exnerová, A.; Štys, P.; Bosáková, Z.: Comparative analysis of volatile defensive secretions of three species of Pyrrhocoridae (Insecta: Heteroptera) by gas chromatography-mass spectrometric method. *Plos One* (2016) - submitted. IF 4.41

Conference papers:

- ▶ Krajíček, J.; Bosáková, Z.; Čabala, R.: *Analysis of volatile defensive secretions of true bugs by gas chromatography mass spectrometry*. 43rd International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, Beijing, China 21.-25. 2015.

- ▶ Bosakova, Z.; Krajicek, J.; Exnerova, A.; Stys, P.: *A comparative analysis of pterins causing the warning coloration in the major clades of Heteroptera by hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. 43rd International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, Beijing, China 21.-25. 2015.

- ▶ Krajicek, J.; Kozlik, P.; Bosakova, Z.; Cabala, R.: *Comparison of capillary zone electrophoresis and high performance liquid chromatography for analysis of warning pigments present in bug cuticle*. 30th International symposium on chromatography, Salzburg, Austria 14.-18.9. 2014.

- ▶ Bosakova, Z.; Krajicek, J.; Kozlik, P.; Cabala, R.: *Analysis of Bug Defensive Chemistry by HILIC-MS/MS and SPME-GC-MS Techniques*. 41th International symposium on High-Performance-Liquid-Phase separations and related techniques, New Orleans, Louisiana, USA 11.-15.5. 2014.

- ▶ Krajíček, J.; Kozlík, P.; Bosáková, Z.: *Development of capillary zone electrophoresis for analysis of pterine derivatives in various kinds of bugs*. 20th International symposium on Electro- and Liquid Phase- separation techniques, Tenerife, Canary Islands, 6.-9.10. 2013.

- ▶ Kozlík, P.; Krajíček, J.; Kalíková, K.; Tesařová, E.; Bosáková, Z.: *Development of a hydrophilic interaction liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection for the analysis of pteridines in two Graphosoma species (Insecta: Heteroptera)*. 39th International symposium on High-Performance-Liquid-Phase separations and related techniques, Amsterdam, Holandsko, 16.-20.6. 2013.

- ▶ Bosáková, Z.; Krajíček, J.; Čabala, R.: *Analysis of pteridines by capillary electrophoresis with diode array detection*. 29th international symposium on MicoScale Bioseparations, Charlottesville, Virginia, USA 10.-14.3. 2013.

- ▶ Bosáková, Z.; Krajíček, J.; Kozlík, P.: *Analysis of pterin derivatives*. Czech chromatography school – HPLC 2013, Seč, Czech Republic 13.-15.5. 2013.
- ▶ Kozlík, P.; Bosáková, Z.; Krajíček, J.; Tesařová, E.; Čabala, R.: *HPLC-MS-MS analysis of pteridines in Graphosoma Lineatum by hydrophilic interaction liquid chromatography*. 36th International symposium on High-Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, Budapešť, Maďarsko 19.-23.6. 2011.