

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Bc. Tereza Vejvodová

Analýza vybraných pterinů a jejich extraktů z integumentu
Pyrrhocoris apterus metodou HPLC-MS/MS

Analysis of selected pterins and their extracts from
integument of *Pyrrhocoris apterus* by HPLC-MS/MS

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce doc. RNDr. Zuzana Bosáková, CSc.

Praha 2020

Prohlášení

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

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

V Praze dne 15. června 2020

Abstrakt

Tato diplomová práce byla zaměřena na vývoj separační metody pro kvalitativní analýzu dvanácti vybraných pterinových derivátů pomocí hydrofilní interakční kapalinové chromatografie (HILIC) ve spojení s tandemovou hmotnostní detekcí. Pro separaci byly použity dvě zwiterionické kolony, kde na silikagelovém nosiči byl navázán buď sulfobetainový ligand (kolona ZIC-HILIC) nebo fosforylcholin jako ligand (kolona ZIC-cHILIC). Optimalizace separačních podmínek byla vedena s cílem zajistit dostatečnou separaci analytů v akceptovatelném čase. Byl sledován vliv obsahu organického modifikátoru a vliv koncentrace soli a jejího pH ve vodné složce mobilní fáze na separaci analytů. Optimalizované separační podmínky (kolona ZIC-HILIC, mobilní fáze o složení 83/17 (v/v) acetonitril/10 mM octan amonný, pH 6,8) byly aplikovány pro analýzu extraktů z integumentu plošnice *Pyrrhocoris apterus*. Extrakty byly získány pomocí pěti rozdílných extrakčních činidel, konkrétně acetonitrilu, methanolu, dimethylsulfoxidu (DMSO) a dvou typů tzv. deep eutectic solvents obsahujících směs cholinchloridu a mléčné kyseliny (DES 1) a směs cholinchloridu a ethylenglykolu (DES 2). Jako nejúčinnější extrakční činidlo se, s celkovým počtem osmi extrahovaných derivátů z dvanácti studovaných, ukázal být DMSO, a naopak nejméně vhodnou extrakční soustavou byl jeden z typů tzv. deep eutectic solvents, konkrétně DES 1, se čtyřmi extrahovanými deriváty. Byly nalezeny podmínky hmotnostní detekce pro drosopterin a byla provedena jeho pilotní separace.

Klíčová slova

pteriny, hydrofilní interakční kapalinová chromatografie, tandemová hmotnostní spektrometrie, ZIC-HILIC a ZIC-cHILIC kolony

Abstract

This diploma thesis was focused on the development of a separation method for qualitative analysis of twelve chosen pterin derivatives by hydrophilic interaction liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry detection. Two silica gel-based columns with different ligands attached were used for the chromatographic separation – a ZIC-HILIC column containing sulfobetaine as a ligand and a ZIC-cHILIC column containing phosphorylcholine as a ligand. The optimizing procedure was performed to achieve sufficient separation of the analytes in an acceptable time. Therefore, the effect of the amount of organic modifier in mobile phases and salt concentrations and the pH of the aqueous phase on the separation of pterin derivatives was studied. Under the optimized separation conditions (column ZIC-HILIC, mobile phase composition 83/17 (v/v) acetonitrile/10 mM ammonium acetate, pH 6.8) the method was used for the analysis of extracts from the integument of *Pyrrhocoris apterus*. The extracts were obtained using five different extraction systems, namely acetonitrile, methanol, dimethyl sulfoxide (DMSO) and two types of so-called deep eutectic solvents containing a mixture of choline chloride and lactic acid (DES 1) and a mixture of choline chloride and ethylene glycol (DES 2). DMSO was shown to be the most effective extractant, with a total of eight extracted derivatives from the twelve studied, and in the opposite, the least suitable extraction system was one of the so-called deep eutectic solvents, namely DES 1, with four extracted derivatives. The conditions for tandem-mass spectrometric detection of drosopterin were found and its pilot separation was performed.

Key words

pterins, hydrophilic interaction liquid chromatography, tandem-mass spectrometry, ZIC-HILIC and ZIC-cHILIC columns

Poděkování

Ráda bych touto cestou vyjádřila poděkování vedoucí mé diplomové práce doc. RNDr. Zuzaně Bosákové, CSc. za odborné vedení, trpělivost, ochotu a cenné rady během měření experimentální části práce a za pomoc, věcné rady, připomínky a doporučení při finálním sepisování práce.

Mé poděkování taktéž patří kolektivu ze skupiny separačních metod na Katedře analytické chemie Přírodovědecké fakulty za pomoc a vytvoření příjemného pracovního prostředí. Děkuji také doc. RNDr. Alici Exnerové, Ph.D. za poskytnutí vzorků integumentu ploštice *Pyrrhocoris apterus* a Mgr. Tomáši Hložkovi, Ph.D. za přípravu extrakčních činidel.

V neposlední řadě patří velké poděkování mé rodině, která mě během doby celého studia a sepisování této práce velmi podporovala.

Obsah práce

Seznam zkratk a symbolů	8
1 Úvod	10
2 Teoretická část.....	11
2.1 Pteriny	11
2.1.1 Chemické a fyzikální vlastnosti pterinů	14
2.1.2 Funkce a výskyt pterinů v živých organismech.....	15
2.1.3 Metody analýzy pterinů	17
2.2 Iontové kapaliny	19
2.3 Hydrofilní interakční kapalinová chromatografie	20
2.3.1 Mechanismus	21
2.3.2 Mobilní a stacionární fáze používané v HILIC chromatografii.....	22
2.3.3 Hmotnostní detekce	24
3 Experimentální část	26
3.1 Použité chemikálie	26
3.1.1 Standardy analyzovaných látek.....	26
3.2 Přípravy roztoků	27
3.2.1 Příprava mobilní fáze	27
3.2.2 Příprava standardních roztoků	27
3.2.3 Příprava směsného roztoku 12 pterinů	28
3.2.4 Příprava vzorku extraktu z integumentu <i>Pyrrhocoris apterus</i>	28
3.2.5 Příprava extrakčních činidel DES	29
3.3 Instrumentace.....	29
3.3.1 Použité přístroje a pomůcky	29
3.3.2 Používaný software	30
3.4 Experimentální podmínky měření	30

3.4.1	Podmínky hmotnostní detekce.....	30
3.4.2	Podmínky chromatografické separace.....	31
4	Výsledky a diskuze.....	33
4.1	Kolona ZIC-HILIC (150 x 4,6 mm)	33
4.1.1	Vliv organického modifikátoru na separaci.....	34
4.1.2	Vliv koncentrace soli na separaci.....	35
4.1.3	Vliv pH vodné složky mobilní fáze na separaci	38
4.1.4	Separace pterinů z extraktů integumentu ploštic <i>Pyrrhocoris apterus</i>	41
4.2	Kolona ZIC-cHILIC.....	46
4.3	Nalezení vhodných experimentálních podmínek hmotnostní detekce pro drosopterin.....	49
5	Závěr	53
	Seznam použité literatury.....	54

Seznam zkratek a symbolů

2H-BIO	7,8-dihydro-L-biopterin
2H-NEO	7,8-dihydroneopterin
4H-BIO	(6 <i>R</i>)-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin (sapropterin)
A.U.	arbitrární jednotka, (Arbitrary Unit)
BIO	biopterin
CID	kolizí indukovaná disociace, (Collision-Induced Dissociation)
CZE	kapilární zónová elektroforéza, (Capillary Zone Electrophoresis)
DAD	detektor s diodovým polem, (Diode Array Detector)
DES	deep eutectic solvents
ERY	erythropterin
ESI	ionizace eletrosprejem, (Electrospray ionization)
HILIC	hydrofilní interakční kapalinová chromatografie, (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography)
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie, (High Performance Liquid Chromatography)
IEC	iontově výměnná chromatografie, (Ion Exchange Chromatography)
IL	iontové kapaliny (Ionic Liquids)
ISO	isoxanthopterin
LC	kapalinová chromatografie, (Liquid Chromatography)
LC-MS, LC-MS/MS	kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní (tandemovou) detekcí, (Liquid Chromatography Coupled with Mass (Tandem Mass) Spectrometry Detection)
LEU	leukopterin
LIF	laserem indukovaná fluorescence, (Laser Induced Fluorescence)
MF	mobilní fáze, (Mobile Phase)
MRM	měřicí mód sledování vícero reakcí, (Multiple Reaction Monitoring)
MS	hmotnostní spektrometr/hmotnostně-spektrometrický detektor, (Mass Spectrometer)
NEO	D-(+)-neopterin

NP	system s normálními fázemi v kapalinové chromatografii, (Normal Phase)
PC	papírová chromatografie (Paper Chromatography)
PTE	pterin
PTE-6-COOH	pterin-6-karboxylová kyselina
QQQ	trojitý kvadrupólový analyzátor iontů, (Triple-Quadrupole Analyser)
ROS	reaktivní formy kyslíku, (Reactive Oxygen Species)
RP	system s obrácenými fázemi v kapalinové chromatografii, (Reversed Phase)
RTILs	iontové kapaliny, které jsou kapalné při pokojové teplotě, (Room Temperature Ionic Liquid)
SEP	L-sepiapterin
SF	stacionární fáze, (Stationary Phase)
SIM	měřicí mód sledování vybraného iontu, (Selected Ion Monitoring)
SRM	mód sledování vybrané reakce, (Selected Reaction Monitoring)
TIC	chromatogram celkového iontového proudu, (Total Ion Current Chromatogram)
TLC	chromatografie na tenké vrstvě, (Thin-Layer Chromatography)
UHPLC	ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie, (Ultra-High Performance Liquid Chromatography)
XAN	xanthopterin

1 Úvod

Pteriny byly v přírodě objeveny jakožto zvířecí pigmenty a poprvé byly izolovány již v roce 1895 z motýlů z čeledi *Pieridae* (čeleď běláskovití) [1]. Díky úspěšnému experimentu pteriny obdrželi svůj název, který byl odvozen z řeckého slova *pteron*, což znamená křídlo [2]. Bylo prokázáno, že u motýlů rodu běláskovitých (*Pieris*), v octomilkách (rod *Drosophila*), různých obojživelnících a bakteriích dochází ke vzniku pteridinového bicyklu z guanosinu nebo guanosin monofosfátu, konkrétně z jejich purinového kruhu [1]. Co se týče prokaryotických organismů, jako první byl objev pterinů zmíněn u *Cyanobakterií* [3].

Ne všechny přirozeně se vyskytující pteriny slouží jako pigmenty, je dokázáno, že některé deriváty jsou zapojeny do syntézy nukleových kyseliny, aminokyselin, neurotransmiterů, monooxidů obsahujících dusík a mají klíčový význam jako kofaktory enzymů [2]. Obecně jsou deriváty pterinů skupinou endogenních metabolitů, tudíž mohou v diagnostice sloužit jako biomarkery různých druhů onemocnění od autoimunitních až po rakovinu [4].

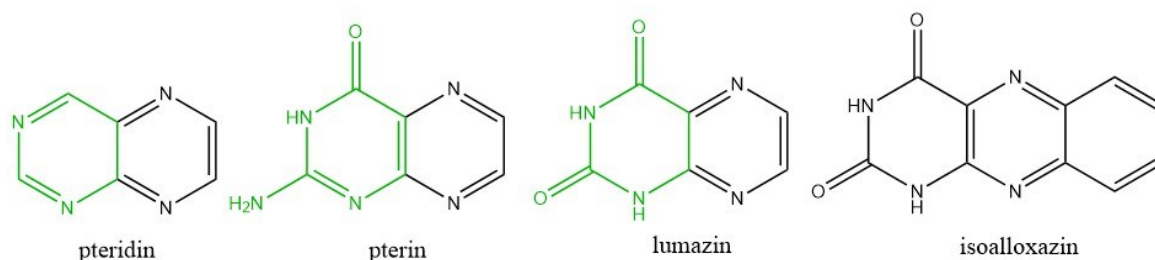
Cílem této diplomové práce bylo vyvinout separační metodu pro analýzu dvanácti vybraných pterinových derivátů pomocí hydrofilní interakční kapalinové chromatografie (HILIC) ve spojení s tandemovou hmotnostní detekcí. Byla provedena optimalizace separačních podmínek pro zajištění dostatečné separace všech studovaných derivátů v co možná nejkratším čase analýzy pro dva typy HILIC kolon zwitterionického typu. Následně byly výsledky, získané na obou kolonách porovnány, včetně analýzy extraktů z integumentu ploštic *Pyrrhocoris apterus* získaných za použití pěti extrakčních soustav. Závěrem byly optimalizovány podmínky hmotnostní detekce pro drosopterin a byla provedena jeho pilotní separace.

2 Teoretická část

2.1 Pteriny

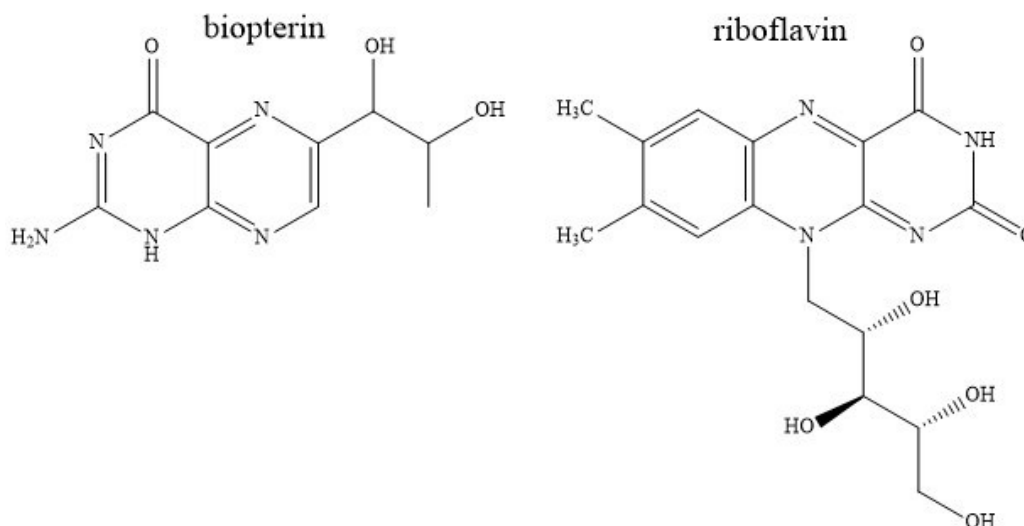
Pteriny jsou heterocyklické sloučeniny, jejichž chemická struktura je odvozená od pyrazino-[2,3-*d*]-pyrimidinového bicyklického kruhu. Takto kondenzované jádro se označuje jako pteridin [5]. Pteridiny jsou produkovány různými organismy, tudíž i jejich biologické funkce mají velmi široké spektrum působení [2]. Pteridinový kruh je významným biosyntetickým stavebním kamenem několika molekul mj. listové kyseliny [3].

Deriváty pteridinu lze dle různých hledisek rozdělit do několika skupin. Podle substituce pyrimidinové části cyklu se pteridiny dělí na pteriny (deriváty 2-amino-4-oxo-3,4-dihydropteridinu) a lumaziny (deriváty 2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydropteridinu), jejichž struktury jsou znázorněny na obrázku 1 [5]. Dalším významným derivátem, je isoalloxazin. Jedná se také o přirozeně se vyskytující látku, současně sloužící jako základní skelet pro mnoho dalších sloučenin. Lumaziny a isoalloxaziny mají shodně substituovaný pyrimidinový cyklus a u obou sloučenin se vyskytují oxosubstituenty v poloze 2 a 4. [6]



Obrázek 1: Strukturální vzorce pteridinu a jeho derivátů, zeleně je znázorněna rozdílná substituce pyrimidinové části skeletu.

Dle velikosti substituentu navázaného na pyrimidinový cyklus se mohou deriváty pteridinu dělit na pteriny s navázanými malými substituenty (např. neopterin, biopterin), jež se nazývají nekonjugované a na pteriny s většími vázanými substituenty (př. riboflavin), které se nazývají konjugované [6], [7]. Na obrázku 2 jsou pro ilustraci znázorněny struktury biopterinu a riboflavinu jakožto zástupců ze skupiny nekonjugovaných, respektive konjugovaných pterinů. Jak je z obrázku 2 patrné, riboflavin obsahuje oproti biopterinu isoalloxazin jako základní skelet.

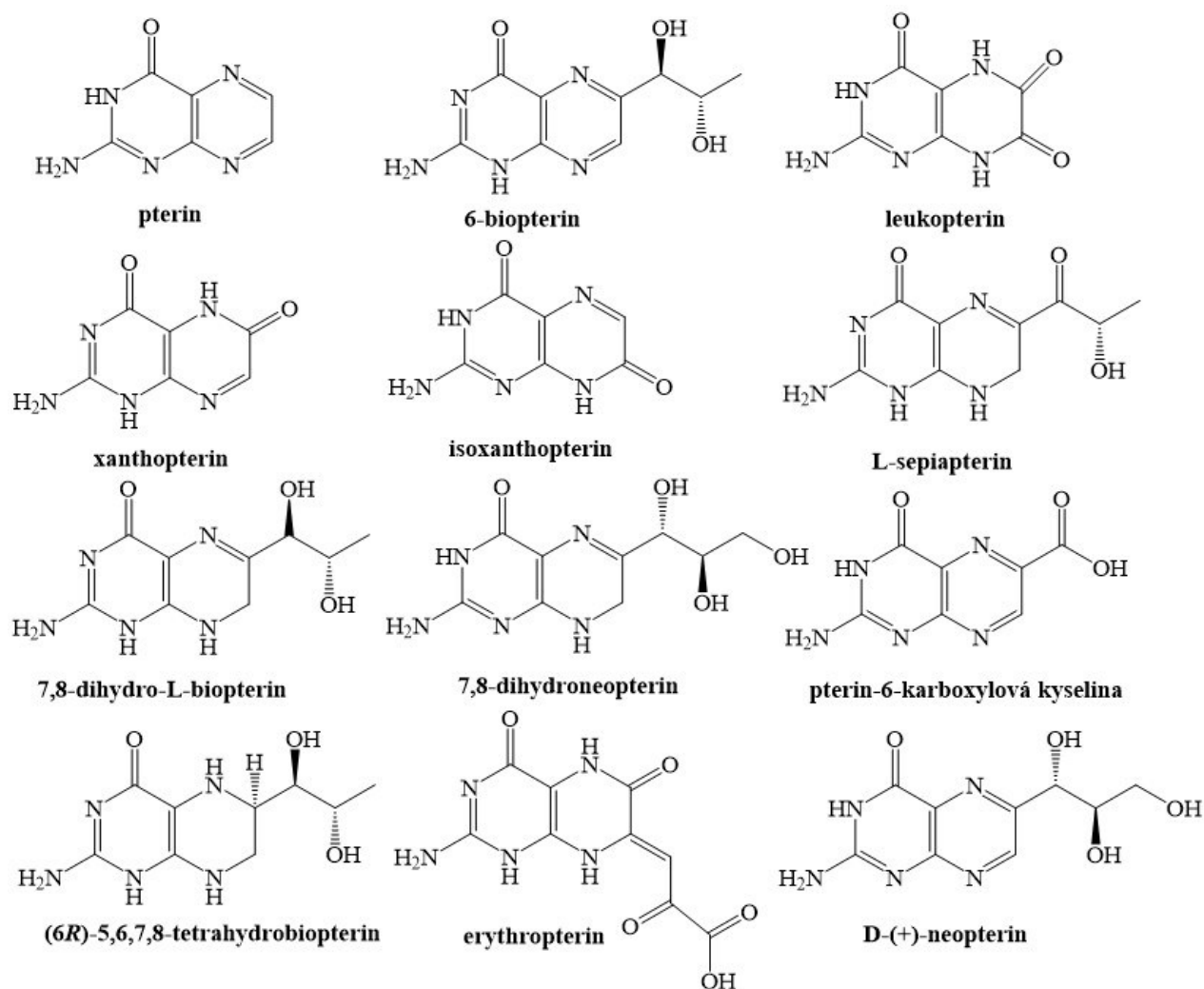


Obrázek 2: Struktury biopterinu a riboflavinu pro srovnání velikosti jejich substituentů.

Tato diplomová práce se zaměřuje na analýzu nekonjugovaných derivátů, které obsahují jednodušší substituenty navázané na bicyklickém kruhu. Mezi studované nekonjugované pteriny patří níže uvedené sloučeniny:

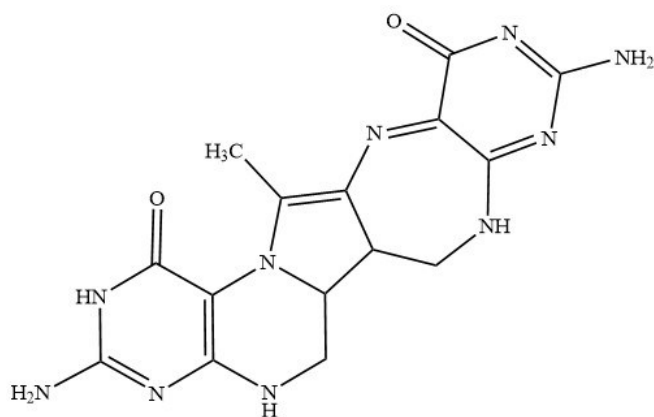
- 6-biopterin (BIO),
 - 7,8-dihydro-L-biopterin (2H-BIO),
 - (6*R*)-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin (4H-BIO),
 - D-(+)-neopterin (NEO),
 - 7,8-dihydroneopterin (2H-NEO),
 - erythropterin (ERY),
 - leukopterin (LEU),
 - L-sepiapterin (SEP),
 - pterin (PTE),
 - isoxanthopterin (ISO),
 - xanthopterin (XAN),
 - pterin-6-karboxylová kyselina (PTE-6-COOH).
- } konstituční polohové izomery

Struktury těchto zmíněných derivátů jsou znázorněny na obrázku 3.



Obrázek 3: Struktury dvanácti vybraných studovaných derivátů pterinů.

Byl analyzován taktéž methanolický extrakt z očí octomilky obecné (*Drosophila melanogaster*) obsahující drosopterin. Oranžově zbarvený extrakt byl připraven v laboratoři prof. E. Fonta na Univerzitě ve Valencii, ve Španělsku. Strukturně je drosopterin oproti výše zmíněným pterinovým derivátům složitější, je to dimerický pterin, jehož struktura je znázorněna na obrázku 4.



Obrázek 4: Struktura drosopterinu.

2.1.1 Chemické a fyzikální vlastnosti pterinů

Přírozně se vyskytující pteriny jsou fotosenzitivní sloučeniny, které na světle podléhají degradaci a následné přeměně na různé deriváty. Pteriny existují ve třech hlavních oxidačních stavech, v plně oxidovaném (aromatickém), semi-redukovaném (dihydroforma) nebo v plně redukovaném (tetrahydroforma) stavu. Redukované deriváty bývají poměrně snadno oxidovány v aerobním prostředí, zvláště v přítomnosti iontů kovů [5], [8]. Při těchto reakcích mohou vznikat reaktivní formy kyslíku. V přírodě jsou významnými především dihydro- a tetrahydroformy pterinů [6], [9].

Velké množství pterinů je začleněno do řady redoxně aktivních kofaktorů, dokonce se předpokládá, že jsou látky redoxně aktivní samy o sobě. Tento mechanismus ovšem stále zůstává ne zcela objasněn. Existují ovšem i pteriny, které nejsou spjaty s redoxními reakcemi s příslušnými biologickými funkcemi. Takové pteriny byly v některých případech označeny jako pigmenty (např. xanthopterin, L-sepiapterin) [6].

Pteriny mají vysoký bod tání a jsou špatně rozpustné ve vodě [10]. Ve vodných roztocích mají slabě kyselou povahu. Při pH 5 lze říct, že se v rovnováze nachází jak amidová (kyselá forma), tak fenolová skupina (bazická forma). Hodnota pK_a je pro aromatické deriváty přibližně rovna 8 a pro dihydropterinové deriváty přibližně 10. Přítomnost aminoskupiny v pozici 2 zvyšuje hodnotu pK_a , zatímco stejně umístěná hydroxylová skupina konstantu pK_a snižuje [11]–[13].

Pteriny jsou zahrnuty v různých fotobiologických procesech [14]. Pokud podléhají excitaci UV-A zářením (320–400 nm) mohou pteriny fluoreskovat, podléhat fotooxidaci za vzniku různých produktů a také generovat reaktivní formy kyslíku např. singletový kyslík (1O_2) [12]. Bylo zjištěno, že fluorescenční vlastnosti 4 vybraných

k jejich akumulaci u dospělých jedinců je především hlava a tělní pokryv (integument) [18].

Z hmyzu je nejlépe zdokumentována *Drosophila melanogaster*. Zbarvení očí toho drobného hmyzu je dáno přítomností několika pterinů, a to žlutým L-sepiapterinem (dihydropterin), který vykazuje intenzivní fluorescenci a vyskytuje se také u obratlovců, dále pak drosoppterinem (dimerický pterin) a jeho dvěma izomery – isodrosoppterinem a neodrosoppterinem, které jsou zodpovědné za oranžové až červené zbarvení očí. Pteriny jsou přítomny také v motýlích křídlech [9], [16], zejména L-sepiapterin, xanthoppterin a leukoppterin [12]. Výskyt drosoppterinu a jeho derivátů je také částečně zodpovědný za ornamentální zbarvení integumentu ještěrek (červené zbarvení), k němuž mimo jiné přispívají i karotenoidy (žluto-oranžové zbarvení) [19]. Taktéž bylo prokázáno, že za zbarvením dorzální části kůže u vybraných druhů žab stojí některé pteridinové deriváty, konkrétně pterin-6-karboxylová kyselina, xanthoppterin, isoxanthoppterin a erythro-bioppterin spolu s 6-hydroxymethylpterinem [20].

Pteriny se nalézají v poměrně velkém množství v modro-zelených řasách, ve fotosyntetických (molybdoppteriny) i nefotosyntetických bakteriích, stejně tak jako v methanobakteriích (methanoppterin) [3], [16].

Pteriny fungují jako enzymy i jako významné kofaktory enzymů. Fyziologicky nejvýznamnějším nekonjugovaným derivátem je tetrahydrobioppterin. Je přítomen v každé buňce lidského těla. Právě díky své významné roli kofaktoru je součástí skupiny enzymů z třídy oxidoreduktas, konkrétně hydroxylas působících na aromatické aminokyseliny, alkylglycerol monooxygenas a všech tří izoform NO-synthas [17]. Deriváty pterinů jsou obecně různorodou skupinou endogenních metabolitů, čímž mohou fungovat v diagnostice jako biomarkery zánětů, autoimunitních onemocnění nebo rakoviny [11], [4], [17], [21]. V eukaryotických organismech byly role pteridinových derivátů intenzivně studovány především pro jejich metabolickou roli redoxních kofaktorů [3].

Pteriny také fungují jako inhibitory. Enzym pteridinreduktasa se nachází v protozoárních parazitech z řádu *Trypanosom*. Jeho vlastnosti byly studovány s cílem zlepšit terapii infekčních onemocnění, které tyto prvoci způsobují. [22].

2.1.3 Metody analýzy pterinů

Nejvíce používanými chromatografickými technikami pro studium pterinů je vysokoúčinná kapalinová chromatografie v reverzním módu (RP-HPLC) nebo hydrofilní interakční kapalinová chromatografie (HILIC). Plně aromatické formy pterinových derivátů vykazují fluorescenci a jejich analýza je tedy možná již při nízkých koncentracích za použití fluorescenčního detektoru. Pro analýzu redukovaných derivátů (tetrahydropterinových) se mohou s výhodou využívat elektrochemické detektory [8].

Vzhledem k velkému významu tetrahydrobiopterinu ve fyziologických procesech u člověka je značná pozornost věnována analýzám pterinů v biologických vzorcích, zejména v tělních tekutinách (krevní sérum, moč atd.). Jako potenciální biomarkery rakoviny byly pteriny, přítomné v moči, analyzovány pomocí RP-HPLC a HILIC chromatografie s UV a fluorescenční detekcí. Tyto techniky se nejvíce využívají pro kvantitativní analýzu. Testovány byly dvě kolony C8 a C18 pro RP-HPLC a HILIC kolona s navázanými zesíťovanými diolovými skupinami na silikagelu. Vyvinuté metody byly následně aplikovány na osm vybraných pterinových derivátů, konkrétně 6,7-dimethylpterin, pterin, 6-OH-methylpterin, biopterin, isoxanthopterin, D-neopterin, xanthopterin a pterin-6-karboxylovou kyselinu. Pro lepší pochopení separačního mechanismu byly využívány rozdílné mobilní fáze s acetonitrilem nebo methanolem jako organickým modifikátorem a jako vodná složka byly testovány octan amonný, fosfátový pufr a Tris-HCl. Nejnižší retenci vykazovaly pteriny na HILIC koloně, ovšem na úkor kvality separace [23].

Metoda HILIC ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií byla použita pro analýzu dvanácti vybraných pterinových derivátů včetně oxidovaných, dihydro- a tetrahydroforem, nacházejících se v lidské moči. Pro separaci byla vybrána ZIC-HILIC zwitterionická sulfobetainová kolona. Byla optimalizována metoda, při které došlo pomocí gradientové eluce k separaci analytů do 20 minut. Mimo jiné byla testována stabilita reálných vzorků po přidání stabilizačního činidla dithiothreitolu [24]. Na skupinu polárních bazických pterinů, jmenovitě D-neopterinu, biopterinu, 7,8-dihydroneopterinu a 7,8-dihydrobiopterinu, byla aplikována hybridní HILIC-UHPLC technika ve spojení s fluorescenční a hmotnostní detekcí. Cílem bylo zjištění retenčních vlastností stacionární fáze jejím otestováním několika parametry – vlivem složení MF, typem pufru a jeho

hodnotou pH – pro separaci pterinů. Bylo zjištěno, že největší vliv měl obsah ACN jako organického modifikátoru [25].

Pro analýzu vybraných pterinů, konkrétně biopterinu, isoxanthopterinu, xanthopterinu, leukopterinu, D-neopterinu a erythropterinu, které se vyskytují u dvou druhů ploštic rodu *Graphosoma*, byla vyvinuta metoda HILIC chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií. Byly použity dva typy kolon se silikagelovou a zwitterionickou, sulfobetainovou stacionární fází. Jako vodná složka mobilní fáze byly použity pufr octan amonný a mravenčan amonný. Byl sledován vliv objemového poměru organického modifikátoru k vodné složce a ukázalo se, že ZIC-HILIC kolona (se sulfobetainem v SF) poskytuje vyšší retenci sledovaných analytů a zároveň vyšší účinnost a selektivitu separace oproti druhé koloně [26].

Iontově-výměnná chromatografie s fluorescenční detekcí byla aplikována na skupinu nekonjugovaných pterinů – isoxanthopterinu, xanthopterinu, pterinu, pterin-6-karboxylové kyseliny, biopterinu, *D-erythro*-neopterinu, *L-threo*-neopterinu, 6-methylpterinu, pterin-6-karboxaldehydu a 6-hydroxymethylpterinu. Pro separaci byl použit silný katex s navázanými sulfoskupinami (-SO₃H). S methanolem jako organickým modifikátorem došlo k separaci všech derivátů, včetně problematické dvojice pterin-6-karbaldehyd a xanthopterin [27].

Spojení LC-MS bylo využito i pro analýzu pterinů v rostlinných vzorcích [28] a v extraktech z rajčat [29]. U analýz zaměřených na hmyzí jedince, bylo pro identifikaci pteridinů v *Anastrepha ludens* využito RP-HPLC současně s tenkovrstevnou chromatografií (TLC) [18]. Pro analýzu pterinů, přítomných ve vzorcích z řas byla využita i papírová chromatografie (PC) [30].

Deset pterinových derivátů, jmenovitě L-sepiapterin, 7,8-dihydroxanthopterin, 6-biopterin, D-neopterin, pterin, isoxanthopterin, leukopterin, xanthopterin, erythropterin a pterin-6-karboxylová-kyselina, bylo identifikováno a kvantifikováno pomocí kapilární zónové elektroforézy (CZE) s detekcí diodovým polem (DAD). Optimalizovaná metoda byla aplikována na extrakty z integumentu ploštic. Doba analýzy nepřesáhla 22 minut [31]. Citlivá, laserem indukovaná fluorescenční detekce (LIF) byla použita pro CZE analýzu pterinů, vyskytujících se v moči [32], [33].

2.2 Iontové kapaliny

V této diplomové práci byly pro extrakci pterinů z integumentu ploštic *Pyrrhocoris apterus* jako extrakční činidla používány dva druhy speciálních iontových kapalin.

Pojmem iontové kapaliny (ILs) se označují soli, které mají bod tání nižší než 100 °C a sestávají se ze dvou částí. Z většího organického kationtu a menšího anorganického či organického aniontu. V současnosti je známo velké množství iontových kapalin a více jak 400 je jich komerčně dostupných [34], [35]. Středem pozornosti jsou především ty iontové kapaliny, které jsou v kapalném stavu při laboratorní teplotě a označují se zkratkou RTILs z anglického room temperature ionic liquids [34]. Jako kation se nejčastěji používá amonný, méně fosfoniový nebo sulfoniový a jako anion se využívá například chloridový, hydrogensulfátový nebo dimethylfosfátový [35]. Právě obsahem organického kationtu se RTILs odlišují od konvenčních roztavených solí obsahujících anorganický kation [36].

Chemické i fyzikální vlastnosti jsou závislé na délce alkylového řetězce a povaze aniontu. Právě těmito parametry lze při syntéze iontových kapalin jejich vlastnosti ovlivnit [34]. Mezi základní vlastnosti iontových kapalin patří jejich schopnost se solvatovat [34], avšak povaha solvatačního procesu zůstává nadále málo objasněna, podobně jako vztah mezi strukturou a polaritou rozpouštědla [37].

Nespornou výhodou iontových kapalin je téměř nulová tenze par (nedochází k jejich odpařování ani při vyšší teplotě), díky čemuž jsou využitelné tam, kde je nežádoucí těkavost organických rozpouštědel. Vyznačují se také nehořlavostí, nízkou toxicitou a vysokou teplotní stabilitou, která je taktéž závislá na jejich složení. Termostabilita roste se zvětšující se velikostí aniontu [34].

Iontové kapaliny se v současnosti těší velké oblibě i pro jejich nízkou nebo nulovou toxicitu, čímž naplňují pojem „green chemistry“ [34] a jejich výzkum neustále probíhá, čemuž odpovídá značné množství publikovaných prací.

Za novou třídu iontových kapalin by se daly považovat tzv. deep eutectic solvents, zkráceně DESs, protože sdílí některé vlastnosti s výše popsanými iontovými kapalinami (ILs) [38]. V literatuře jsou pojmy DESs a ILs často zaměňovány, ačkoli se jedná o rozdílné typy rozpouštědel. Oproti ILs, které se sestávají z jednoho aniontu a kationtu, jsou DESs vytvořené z eutektické směsi. Obecně jsou DESs molekulární komplexy, vytvořené z eutektické směsi Lewisovy nebo Brønstedovy kyseliny nebo báze s různými

kationty či anionty. Typicky se tvoří mezi jednoduchou halogenidovou solí (cholinchlorid, halogenidy fosfonia) a donorem vodíkové vazby (močovina, karboxylová skupina atd.). Fyzikální vlastnosti ILs a DESs jsou shodné, liší se chemickou povahou, která následně definuje oblast jejich použití [38]–[40].

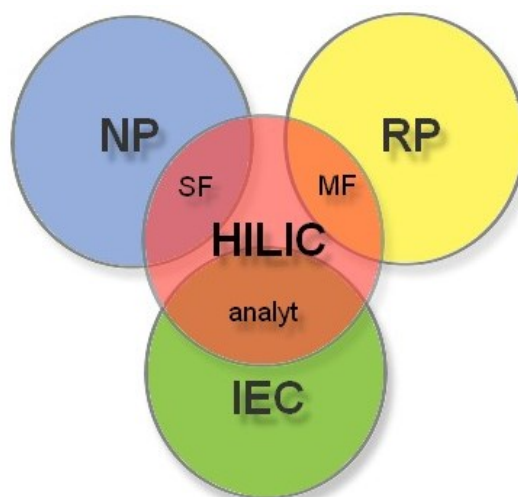
DESs mají větší potenciál k přizpůsobení rozpouštědel určitému typu chemie. Mezi další nesporné výhody patří nízká tenze par, nehořlavost a relativně široký rozsah, v němž se nalézají v kapalném skupenství. Přestože jsou jednotlivé složky DESs rozpouštědel dobře toxikologicky charakterizovány, existuje doposud velmi málo informací o toxikologických vlastnostech samotných rozpouštědel [38], [41].

Jejich příprava je snadná, obvykle stačí smísit dvě vybrané složky při současném mírném zahřívání směsi. Právě díky jednoduchosti přípravy jsou v porovnání s ILs výrobní náklady nízké, což umožňuje jejich použití ve velkém měřítku. [38]. Dva typy těchto DESs směsí byly v této diplomové práci využity jako extrakční činidla pro extrakci pterinů z integumentu ploštic *Pyrrhocoris apterus*.

2.3 Hydrofilní interakční kapalinová chromatografie

Termín hydrofilní interakční kapalinová chromatografie (HILIC) byl poprvé použit v publikaci Andrewa J. Alperta v roce 1990, ačkoli tato technika byla využívána již dříve [42]. Oproti chromatografii s normálními fázemi (NP-LC) a chromatografii s obrácenými fázemi (RP-LC) má HILIC mnoho výhod, avšak některé parametry sdílí HILIC s ostatními módy LC. Využívá polární stacionární fáze jako u NP-LC, umožňuje analýzu nabitých sloučenin stejně jako iontově-výměnná chromatografie (IEC) a povaha mobilní fáze je obdobná jako u RP-LC. Prolínání aspektů jednotlivých chromatografických technik je zobrazeno na obrázku 6.

Obliba této techniky v současnosti stále roste, a to právě díky zvyšující se potřebě analýzy polárních látek v komplexních směsích. Dalším důvodem je i časté spojení HILIC chromatografie s hmotnostní detekcí. Mobilní fáze s vyšším obsahem organického modifikátoru jsou vhodné pro ionizaci elektrosprejem při hmotnostní detekci [43]. Úspěšně je HILIC chromatografie využívána v analýzách peptidů [44], sacharidů [45], polárních léčiv [46] a nabitých sloučenin [47]. Pteridiny a jejich deriváty se řadí do skupiny polárních bazických sloučenin, a jsou proto vhodnými adepty na HILIC analýzu [48].



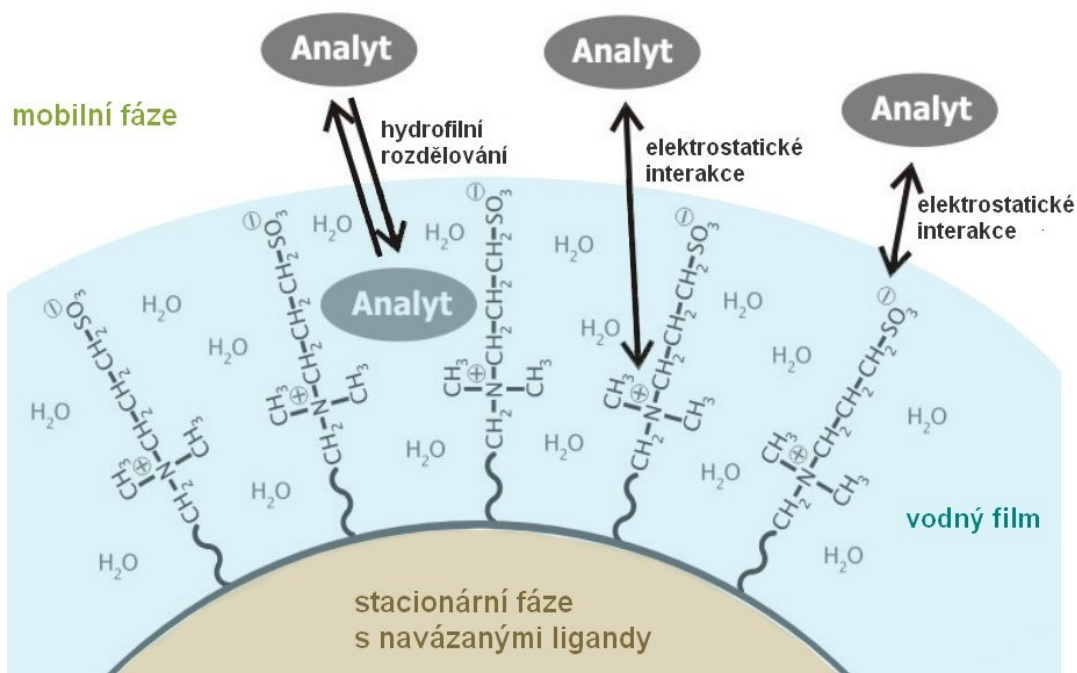
Obrázek 6: Schéma naznačující překryv HILIC módu s jednotlivými LC módy; HILIC – hydrofilní interakční kapalinová chromatografie, NP – chromatografie s normálními fázemi, RP – chromatografie s obrácenými fázemi, IEC – iontově-výměnná chromatografie, SF – stacionární fáze, MF – mobilní fáze; převzato a upraveno dle [47].

2.3.1 Mechanismus

Mechanismus hydrofilní interakční kapalinové chromatografie je poměrně komplikovaný proces. Je založen jednak na přímé interakci stacionární fáze s analytem (adsorpce) a také na nepřímé interakci analytu se stacionární fází, která je dána rozdělováním polárního analytu mezi mobilní fázi a vodnou vrstvu, imobilizovanou na povrchu hydrofilní stacionární fáze. Imobilizovaný vodný film vzniká v důsledku adsorpce molekul vody na stacionární fázi [47].

Čím více je tedy analyt hydrofilní, tím více je dělicí rovnováha posunutá směrem k imobilizované vodné vrstvě v SF, a tudíž je analyt více zadržován. Dochází tedy k separaci založené na polaritě sloučeniny a stupni solvatace [47].

Hlavním parametrem, ovlivňujícím retenci je právě rozdělování analytu mezi vodou obohacenou vrstvu stacionární fáze a relativně hydrofobní mobilní fázi [43]. Významným podílem zde přispívají taktéž sekundární elektrostatické interakce [49] a vodíkové vazby [50]. Tyto sekundární interakce se mohou podstatně odlišovat v závislosti na použitých aditivech v mobilní fázi (kyseliny nebo soli) [48]. Schematicky je separační mechanismus v HILIC chromatografii zobrazen na obrázku 7.



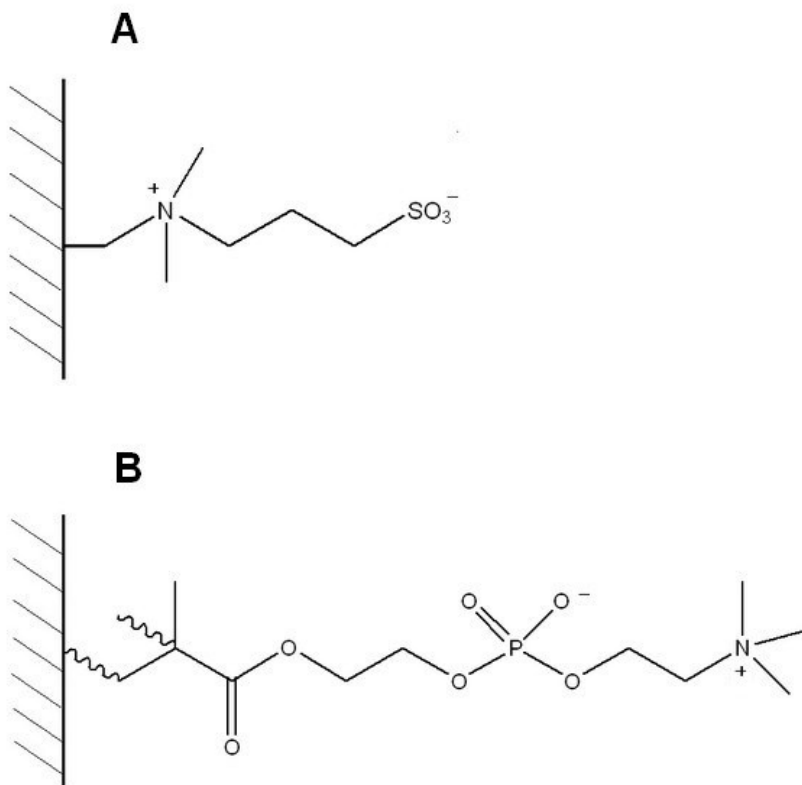
Obrázek 7: Mechanismus HILIC chromatografie, převzato a upraveno dle [51].

2.3.2 Mobilní a stacionární fáze používané v HILIC chromatografii

Stacionární fáze používané v hydrofilní interakční kapalinové chromatografii jsou polárního charakteru, obdobně jako u chromatografie s normálními fázemi (NP-LC). Mohou být neutrální nebo nabité. Používá se čistý silikagel, popř. silikagel modifikovaný aminem, polysukcinimidem nebo jinými polárními funkčními skupinami (diolovou, polyethylenglykolovou, kyano- nebo nitrilovou skupinou) [47], [52]. Dále se využívají fáze založené na polymerních sloučeninách [47] nebo stacionární fáze na bázi cyklodextrinu vhodné pro chirální separace [52]. Zwitterionické stacionární fáze byly původně určeny pro použití v iontově-výměnné chromatografii, našly ovšem uplatnění i v HILIC módu. Komerčně se prodávají pod obchodními značkami ZIC-HILIC (s silikagelovým nosičem) a ZIC-pHILIC (s polymerním nosičem) [52].

V této práci jsou používány dva typy zwitterionických kolon. Obě jako nosič obsahují silikagel, na kterém je navázaný sulfobetain (kolona ZIC-HILIC) nebo fosforylcholin (kolona ZIC-cHILIC). Oba navázané deriváty obsahují kladně nabitý kvarterní amoniový dusík. Sulfobetain mimo jiné obsahuje záporně nabitý zbytek sulfonové kyseliny (sulfoskupinu) a fosforylcholin naproti tomu negativní zbytek

fosforečné kyseliny (fosfokupinu). Anion i kation u obou stacionárních fází jsou v poměru jedna ku jedné, náboje se navzájem kompenzují, a proto je výsledná molekula elektroneutrální. Struktury sulfobetainové a fosforylcholinové stacionární fáze jsou znázorněny na obrázku 8.



Obrázek 8: Struktury stacionárních fází v HILIC chromatografii používaných v této diplomové práci; **A** – struktura sulfobetainové SF (kolona ZIC-HILIC), **B** – struktura fosorylcholinové SF (kolona ZIC-cHILIC).

Mobilní fáze, které se v HILIC využívají jsou podobné fázím, používaným v chromatografii s obrácenými fázemi (RP-LC). Jsou polární s velkým podílem organického modifikátoru (60 - 90 obj. %), nejčastěji se jedná o acetonitril případně methanol, a vodnou složku, která je tvořena roztokem pufru, organické kyseliny nebo báze [47].

HILIC se poměrně snadno kombinuje s různými detekčními technikami jako je např. UV spektrofotometrie, fluorescenční nebo refraktometrická detekce. Díky vysokému obsahu organického modifikátoru v mobilní fázi v HILIC chromatografii je tento separační mód výhodný pro spojení s hmotnostní detekcí [47].

2.3.3 Hmotnostní detekce

Ve spojení s HILIC chromatografickou metodou byla v této práci jako detekční technika zvolena hmotnostní detekce (MS) s ionizací elektrosprejem a trojitým kvadrupólovým analyzátozem.

Ionizace elektrosprejem (ESI) patří mezi nejměkčí ionizačních techniky, protože množství energie dodávané analytu je relativně malé. Z tohoto důvodu dochází u ESI k malé fragmentaci v porovnání s jinými, tvrdšími ionizačními technikami [53]. Při fragmentaci může docházet jak ke ztrátě vodíkového protonu $[M-H]^-$, tak k jeho přijetí $[M+H]^+$, podle toho, v jakém módu přístroj operuje (negativní/pozitivní) a k vytvoření tzv. molekulového iontu. V přítomnosti solí může docházet ke vzniku aduktů s anionty (často Cl^-) nebo kationty (nejčastěji K^+ , Na^+) [53], [54]. Velkou výhodou ESI je jeho aplikovatelnost pro široký okruh sloučenin, od anorganických iontů [55] až po větší biomolekuly (peptidy, proteiny, aminokyseliny) [54]. Tento poměrně jednoduchý způsob ionizace probíhá za atmosférického tlaku a při mírné teplotě. Celý proces probíhající v ESI-MS lze primárně rozdělit do třech základních kroků. Prvně dochází k rozprášení vzorku (tzv. nebulizaci) na drobné elektricky nabitě kapičky, následované uvolněním jednotlivých iontů z kapiček, jež jsou transportovány z oblasti zdroje ionizace do hmotnostního analyzátoru, který již pracuje pod plným vakuem [56].

Kvadrupólový analyzátor se sestává ze čtyř podélných kovových tyčí, na které je přiváděno napětí. Kombinací měnícího se (vysokofrekvenčního) a konstantního napětí lze vyselektovat poměrně úzké pásmo hodnot m/z (poměr hmotnosti ku náboji). Právě změnou napětí v čase, lze skenovat napříč rozsahem m/z hodnot a následně získat hmotnostní spektrum. Spojení třech kvadrupólových analyzátorů (QQQ) je jednou z možností realizace tandemové hmotnostní spektrometrie (MS/MS). Značnou výhodou tandemové MS je zvýšená specifita hmotnostní analýzy oproti jednokrokové [53]. První (Q1) a poslední (Q3) kvadrupól slouží jako hmotnostní filtry (pro hmotnostní analýzu). Prostřední (Q2) potom jako oblast pro zadržování iontů a jako kolizní cela, kde mohou ionty ve styku s inertním plynem podléhat fragmentaci. [54], [57].

Díky sériovému zapojení kvadrupólů lze první a poslední kvadrupóly nastavit buď na konstantní hodnoty m/z , nebo skenovat v rozsahu hodnot m/z , což umožňuje využití MS v několika operačních módech [54].

V módu SCAN pracuje hmotnostní analyzátor v režimu jednoho kvadrupólu, který umožňuje propouštění všech iontů přímo na detektor. Tím lze obdržet celkové hmotnostní spektrum daného vzorku, z něž lze vybrat konkrétní hodnotu m/z jako prekurzorový ion.

V módu SIM, z angl. selected ion monitoring, přístroj operuje v režimu jednoho kvadrupólu, který umožní propustit jednu nebo více zvolených specifických hodnot m/z , které následně dopadají na detektor [57], [58].

Módy Product Ion a MRM, z angl. multiple reaction monitoring, mají společné, že hmotnostní analyzátor pracuje v režimu všech tří kvadrupólů a druhý kvadrupól funguje jako kolizní cela. V módu Product Ion prochází zvolená hodnota m/z prvním kvadrupólem, v Q2 podléhá fragmentaci a vzniklé ionty prochází Q3 až na detektor. V módu MRM opět prvním kvadrupólem projde definovaná hodnota m/z , která je následně štěpena v kolizní cele Q2 a třetím kvadrupólem prochází zvolená hodnota m/z , která je detekována. MRM je velmi často využíván ve spojení s kapalinovou chromatografií (LC-MS) a poskytuje poměrně velkou citlivost (nejvyšší citlivost měření ze všech módů) [53], [54], [58].

3 Experimentální část

3.1 Použité chemikálie

Seznam chemikálií používaných pro přípravu mobilních fází, pufrů, rozpouštědla používaná k přípravě standardních roztoků analyzovaných pterinů aj.:

- acetonitril (ACN), čistota 99,9 % pro LC-MS (Honeywell Riedel-de-HaënTM, Seelze, Německo)
- dimethylsulfoxid, čistota pro headspace GC (SupraSolv[®], Sigma-Aldrich[®], St. Louis, USA)
- octan amonný, čistota $\geq 98,5$ % p.a. (Penta s.r.o., Praha, Česká republika)
- octová kyselina, čistota ≥ 99 % p.a. (Penta s.r.o., Praha, Česká republika)
- deionizovaná voda, úprava pomocí zařízení Ultrapur pro přípravu ultračisté vody deionizací (vodivost $0,06 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$) (Watrex[®], Praha, Česká republika).

Jako kolizní, nebulizační a sušící plyn byl používán dusík.

3.1.1 Standardy analyzovaných látek

Pro analýzy byly používány standardy dvanácti pterinů:

- 6-biopterin (BIO), čistota ≥ 97 % (Sigma-Aldrich[®], St. Louis, USA)
- (6*R*)-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin dihydrochlorid (4H-BIO), čistota ≥ 98 % (Sigma-Aldrich[®], St. Louis, USA)
- 7,8-dihydro-L-biopterin (2H-BIO), čistota ≥ 94 % (Sigma-Aldrich[®], St. Louis, USA)
- D-(+)-neopterin (NEO), čistota $\geq 97,5$ % (Sigma-Aldrich[®], St. Louis, USA)
- 7,8-dihydroneopterin (2H-NEO), čistota ≥ 97 % (Sigma-Aldrich[®], St. Louis, USA)
- erythropterin (ERY) (Serva Feinbiochemica, Heidelberg, Německo)
- isoxanthopterin (ISO), čistota $\geq 97,5$ % (Honeywell FlukaTM, Seelze, Německo)
- xanthopterin monohydrát (XAN), čistota ≥ 97 % (Honeywell FlukaTM, Seelze, Německo)
- leukopterin (LEU), čistota 95 % (Sigma-Aldrich[®], St. Louis, USA)
- L-sepiapterin (SEPIA) (Sigma-Aldrich[®], St. Louis, USA)

- pterin (PTE), čistota 95 % (Sigma-Aldrich[®], St. Louis, USA)
- pterin-6-karboxylová kyselina (PTE-6-COOH), čistota ≥ 98 % (Sigma-Aldrich[®], St. Louis, USA).

Jelikož standard drosopterinu není komerčně dostupný, byl pro analýzy využíván methanolický extrakt z očí octomilky obecné (*Drosophila melanogaster*).

3.2 Přípravy roztoků

3.2.1 Příprava mobilní fáze

Jako mobilní fáze byla pro separaci používána směs acetonitrilu a octanu amonného, která byla zvolena na základě publikace [26]. Mobilní fáze byla připravena smícháním příslušných objemů organického modifikátoru (ACN) a vodné složky (pufru). Octanový pufr byl připraven odvážením odpovídajícího množství octanu amonného, kvantitativním převedením a rozpuštěním navážky v deionizované vodě, popř. následnou úpravou pH. Navážky používané pro přípravu pufru o objemu 250 ml dané koncentrace jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1: Navážky $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ používané pro přípravu 250 ml vodné složky mobilní fáze o příslušné koncentraci.

$c_{\text{CH}_3\text{COONH}_4}$ [$\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$]	$m_{\text{CH}_3\text{COONH}_4}$ [g]
5	0,0964
10	0,1927
25	0,4818

3.2.2 Příprava standardních roztoků

Zásobní roztoky standardů pterinů o rozdílných koncentracích byly připraveny navážením odpovídajícího množství standardu, kvantitativním převedením a rozpuštěním v 1 ml dimethylsulfoxidu. Zásobní roztoky byly skladovány v tmavých vialkách obalených parafilmem a překrytých alobalem, umístěných v lednici.

3.2.3 Příprava směsného roztoku 12 pterinů

Příprava směsného vzorku byla provedena smícháním odpovídajících objemů zásobních roztoků standardů jednotlivých derivátů tak, aby výsledná koncentrace směsného vzorku byla $0,01 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Objemy odměřené k přípravě 1 ml směsného roztoku jsou uvedeny v tabulce 2.

Tabulka 2: Objemy a koncentrace jednotlivých standardních roztoků pterinů použitých k přípravě 1 ml směsného roztoku 12 pterinů o výsledné koncentraci pterinů $0,01 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, objem do 1 ml doplněn 398 μl ACN.

derivát	$c_m [\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}]$	$V [\mu\text{l}]$
SEPIA	0,20	50
PTE	0,06	167
4H-BIO	1,00	10
BIO	1,00	10
ISO	0,05	200
2H-BIO	1,00	10
XAN	1,00	10
LEU	0,40	25
NEO	1,00	10
ERY	0,20	50
2H-NEO	1,00	10
PTE-6-COOH	0,20	50

3.2.4 Příprava vzorku extraktu z integumentu *Pyrrhocoris apterus*

Integumenty z ploštic *P. apterus*, dodané doc. Exnerovou z Katedry zoologie, byly nejprve rozstříhány na kousky cca 2 x 2 mm a přibližně 7 mg integumentu bylo poté pomocí pinzety vloženo do každé Eppendorfovy mikrozkušavky a zalito 1,0 ml příslušného rozpouštědla. Poté byly mikrozkušavky umístěny na temné místo a ponechány samovolné extrakci při laboratorní teplotě. Ze vzorku bylo v určitých časových intervalech odebíráno 200 μl extraktu, který byl následně analyzován a poté vrácen do mikrozkušavky k původnímu roztoku.



Obrázek 9: Ploštice *Pyrrhocoris apterus*.

3.2.5 Příprava extrakčních činidel DES

Jako extrakční soustavy byly využívány dva typy tzv. deep eutectic solvents. DES 1 obsahoval cholinchlorid a mléčnou kyselinu, DES 2 byl směsí cholinchloridu a ethylenglykolu. Obě směsi byly připraveny smísením výchozích látek v molárním poměru 1:1 a zahříváním na 80 °C až do vzniku homogenní směsi.

3.3 Instrumentace

3.3.1 Použité přístroje a pomůcky

- analytické váhy APX-100 (Denver Instrument, New York, USA)
- hmotnostní spektrometr Agilent Technologies 6460 Triple Quad LC/MS (Agilent Technologies, Waldbronn, Německo) s trojitým kvadrupólovým analyzátozem
- pH metr Jenway 3510 (Jenway[®], Stone, Velká Británie)
- ultrazvuk LC30H (P-LAB a.s., Praha, Česká republika)
- vysokoúčinný kapalinový chromatograf Agilent Technologies series 1290 (Agilent Technologies, Waldbronn, Německo) s UV-Vis spektrofotometrickým detektorem s diodovým polem, termostatovaným autosamplerem, kolonovým termostatem a kvarterní vysokotlakou pumpou se zabudovaným odplyňovačem mobilní fáze
- kolony:
 1. SeQuant ZIC-HILIC, 150 x 4,6 mm, zrnění 3,5 μm
 2. SeQuant ZIC-CHILIC, 100 x 2,1 mm, zrnění 3,0 μmobě (Merck, Darmstadt, Germany)

3.3.2 Používaný software

Pro jednotlivé úkony spojené s měřením a vyhodnocováním experimentálních dat byl využíván níže uvedený software:

- pro sbírání dat byl používán LC/MS Data Acquisition for 6400 Series Triple Quadrupole, verze: B.07.00 (Agilent Technologies, Santa Clara, USA)
- pro vyhodnocování chromatogramů: Qualitative Analysis, verze: B.06.00 (Agilent Technologies, Santa Clara, USA).
- pro tvoření grafů: OriginPro 2016 (64-bit), verze: b9.3.226 (OriginLab Corporation, USA).
- pro vytváření strukturních vzorců: ChemDraw, verze: 16.0.1.4 (77) (PerkinElmer Informatics, Inc., USA).

3.4 Experimentální podmínky měření

3.4.1 Podmínky hmotnostní detekce

Veškerá měření byla provedena metodou LC/MS s ionizací elektrosprejem a trojitým kvadrupólovým analyzátozem. Experimentální podmínky ESI byly převzaty z publikace [26]:

- polarita ionizace: pozitivní
- napětí na sprejovací kapiláře: +5,5 kV
- průtok sušicího plynu: 10 l·min⁻¹
- teplota sušicího plynu: 350 °C (623,2 K)
- tlak nebulizačního plynu: 55 psi (379,2 kPa).

Výchozí experimentální podmínky hmotnostního analyzátoru byly také převzaty z publikace [26] a [59], s výjimkou drosopterinu. Shrnutí podmínek pro tandemovou hmotnostní detekci je uvedeno v tabulce 3.

Tabulka 3: Přehled relativních molekulových hmotností (M_r) m/z prekurzorových a produktových iontů a optimálních hodnot kolizních energií a fragmentačních napětí pro MS/MS detekci, převzato z publikace [26] a [59].

derivát	M_r	prekurzorový ion [m/z]	produktový ion [m/z]	fragmentační napětí [V]	kolizní energie [eV]
PTE	163,13	164,1	119,1	100	20
ISO	179,14	180,1	135,1	125	20
XAN	179,14	180,1	135,1	125	20
LEU	195,14	196,1	140,1	120	16
PTE-6-COOH	207,15	208,1	162,1	100	15
BIO	237,22	238,1	178,1	115	17
SEP	237,22	238,2	165,1	120	20
2H-BIO	239,24	239,9	164,9	100	20
4H-BIO	241,25	241,9	165,9	130	15
NEO	253,22	254,2	206,0	115	14
2H-NEO	255,23	256,0	164,9	100	20
ERY	265,19	266,1	220,1	110	8

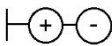
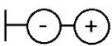
3.4.2 Podmínky chromatografické separace

Jako výchozí experimentální podmínky chromatografické separace byly na základě publikace [26] určeny:

- mobilní fáze: ACN/CH₃COONH₄
- koncentrace mobilní fáze: 5 mM
- průtok mobilní fáze: 0,5 ml·min⁻¹
- teplota na koloně: 30 °C

Pro chromatografickou separaci byly v této práci vybrány dvě chromatografické kolony, jejich srovnání je uvedeno v tabulce 4. Kolony mají stejný typ nosiče stacionární fáze – silikagel, na první z nich je na nosič navázaný sulfobetainový ligand (ZIC-HILIC), na druhé je na silikagel navázaný fosforylcholin (ZIC-cHILIC). Kolony se také liší rozměry, velikostí pórů a zrněním.

Tabulka 4: Srovnání parametrů obou používaných chromatografických kolon.

Srovnání parametrů používaných separačních kolon		
pořadí:	1	2
typ kolony:	SeQuant® ZIC®-HILIC	SeQuant® ZIC®-cHILIC
základní částice	silikagel	silikagel
funkční skupina	sulfobetain 	fosforylcholin 
velikost částic	3,5 μm	3 μm
velikost pórů	200 Å	100 Å
délka kolony	150 mm	100 mm
vnitřní průměr kolony	4,6 mm	2,1 mm

4 Výsledky a diskuze

Tato kapitola se zaměřuje na popis a shrnutí dosažených výsledků během optimalizace LC-MS metody pro kvalitativní analýzu vybraných pterinů. Jsou porovnávány a diskutovány výsledky získané z měření extraktů z integumentu plošnice *Pyrrhocoris apterus* a porovnání profilu pterinů, detekovaných pro jednotlivá extrakční činidla v různých časových úsecích.

Díky polární povaze funkčních skupin analyzovaných derivátů pterinů byl pro separaci využit HILIC mód. V pořadí první testovaná zwitterionická sulfobetainová kolona ZIC-HILIC (150 x 4,6 mm) byla použita k základnímu studiu vlivu jednotlivých parametrů (obsah organického modifikátoru, koncentrace pufru, pH) na retenci a separaci dvanácti derivátů pterinů. Optimalizované podmínky pak byly vyzkoušeny i pro druhou testovanou kolonu a výsledky, dosažené v obou separačních systémech, byly navzájem porovnány a diskutovány.

Jako mobilní fáze byla pro chromatografickou separaci použita směs acetonitrilu (ACN) jako organického modifikátoru a roztok octanu amonného ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$), o různých koncentracích a hodnotách pH, jako vodná složka mobilní fáze, kompatibilní s ESI-MS detekcí.

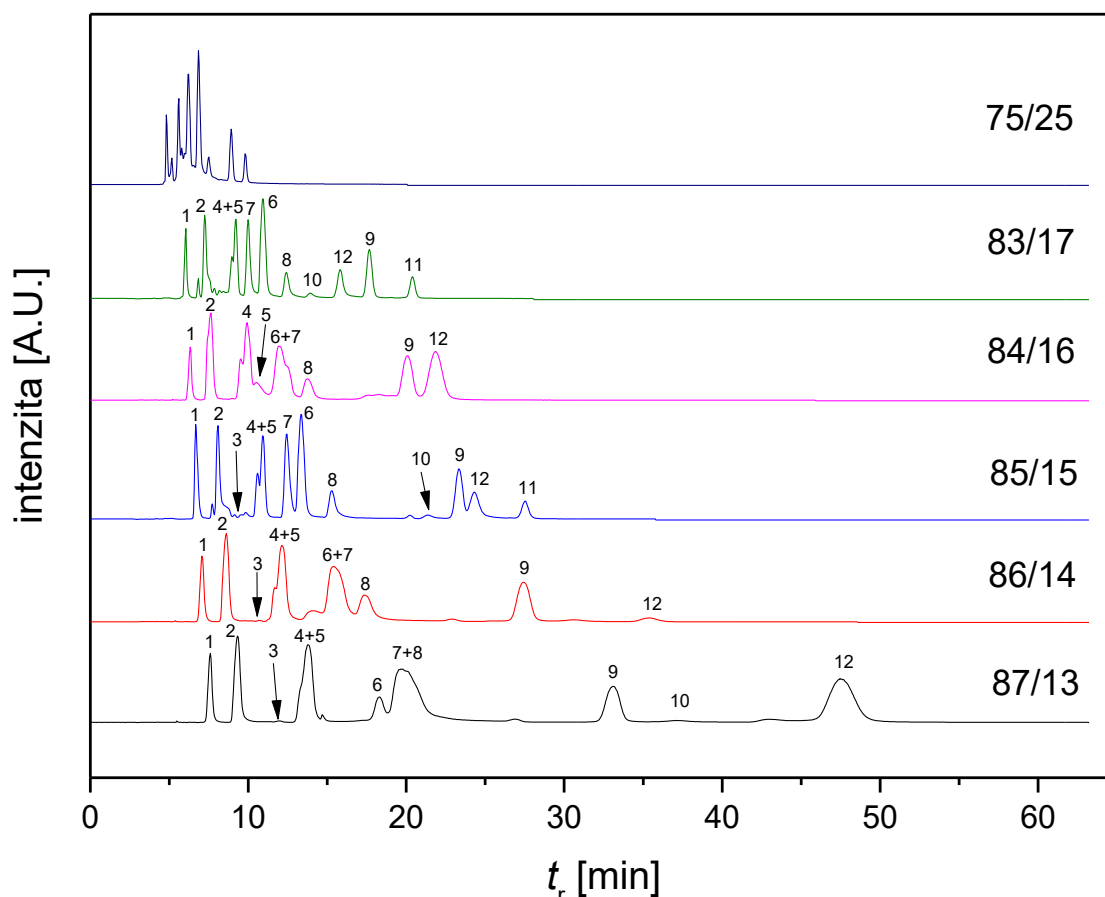
Následující parametry byly stejné pro obě testované kolony: dávkovaný objem vzorku 10 μl a teplota na koloně 30 °C. Objemová průtoková rychlost byla pro první testovanou kolonu 0,5 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$, pro druhou, kratší kolonu byl vhodnější průtok 0,2 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Optimalizace separace byla vedena směrem k rozdělení co nejvíce analytů v akceptovatelném čase při zachování dostatečné separační účinnosti.

4.1 Kolona ZIC-HILIC (150 x 4,6 mm)

Stěžejním oddílem experimentální části této diplomové práce jsou analýzy pterinů prováděné na zwitterionické koloně ZIC-HILIC, jejíž základ je tvořen silikagelovou maticí s navázanými sulfobetainovými ligandy. Na této první testované koloně proběhlo testování jednotlivých parametrů a optimalizace separačních podmínek a následně analyzování reálných extraktů.

4.1.1 Vliv organického modifikátoru na separaci

Na základě informací z publikace [26] bylo pro první experimenty zvoleno následující složení MF: ACN/5 mM CH₃COONH₄, pH 6,8. Pro testování vlivu obsahu organického modifikátoru na separaci pterinů bylo vybráno rozmezí 75–87 obj. % ACN v mobilní fázi a mobilní fáze byly proměřovány od nejnižšího obsahu acetonitrilu směrem k nejvyššímu obsahu. Výsledky měření jsou uvedeny na obrázku 10 jako soubor TIC chromatogramů.



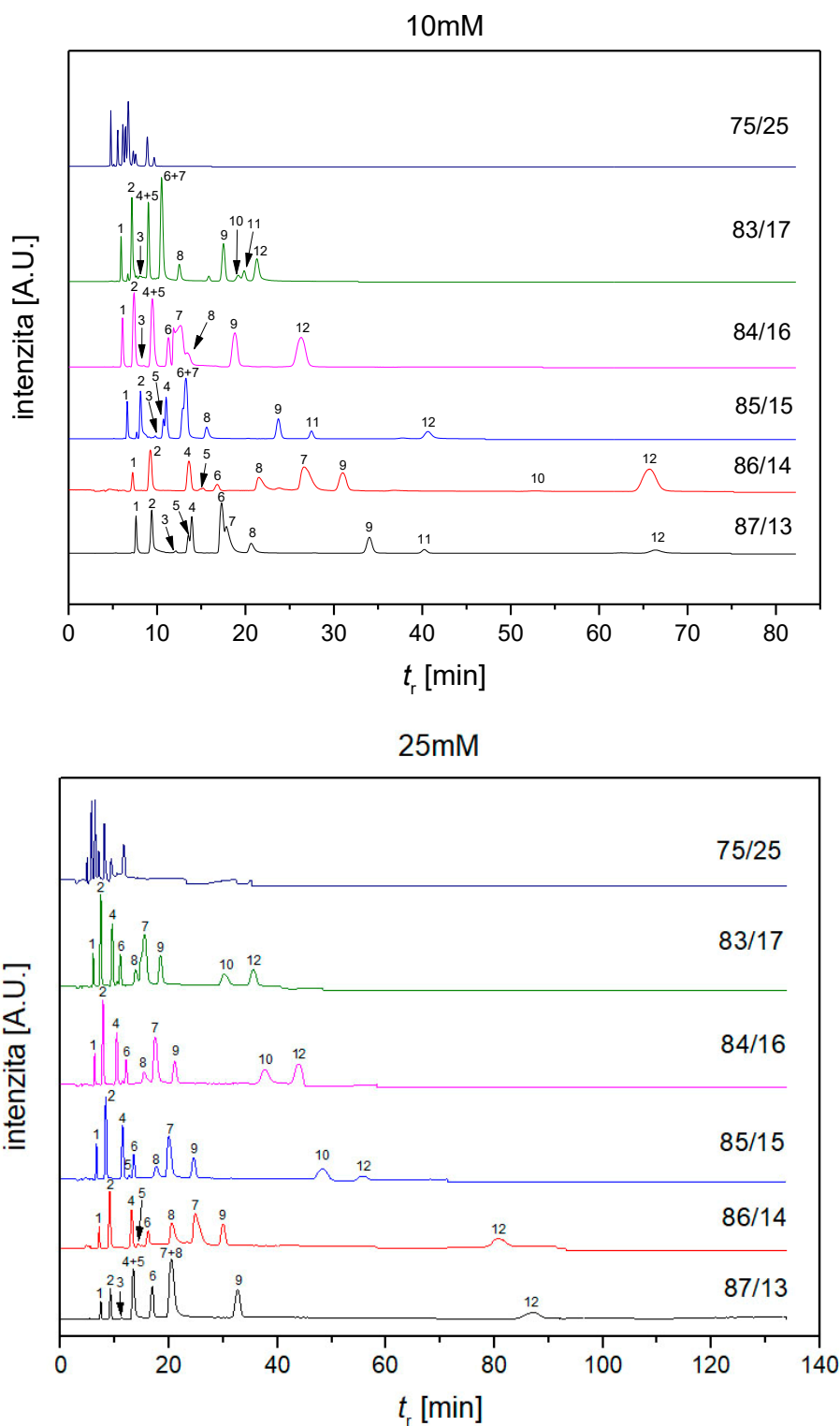
Obrázek 10: Srovnání vlivu obsahu organického modifikátoru (acetonitrilu) na separaci směsi standardů pterinů ($c = 0,01 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) na chromatografické koloně ZIC-HILIC (150 x 4,6 mm) v MF: ACN/5 mM CH₃COONH₄ (pH 6,8), průtok $0,5 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, dávkovaný objem vzorku $10 \mu\text{l}$, teplota na koloně $30 \text{ }^\circ\text{C}$. Pod sebou jsou zobrazeny TIC chromatogramy separace analytů s rostoucím obsahem ACN v MF. Píky odpovídají: 1 – SEPIA, 2 – PTE, 3 – 4H-BIO, 4 – BIO, 5 – ISO, 6 – 2H-BIO, 7 – XAN, 8 – LEU, 9 – NEO, 10 – ERY, 11 – 2H-NEO, 12 – PTE-6-COOH.

Z obrázku 10 je na první pohled patrné, že s narůstajícím obsahem acetonitrilu v mobilní fázi dochází k prodlužování celkové doby analýzy. Tento jev je v souladu se separačním mechanismem chromatografie HILIC. V mobilní fázi 75/25 (v/v) ACN/pufr, byla analýza velmi rychlá (doba analýzy do 15 minut), avšak neposkytující dobrou separaci. Při poměru 83/17 a 85/15 došlo prohození elučního pořadí píků 6 a 7, tedy 2H-BIO a XAN a při poměru 83/17 a 84/16 ACN/pufr není viditelný pík 4H-BIO, který se v analýzách ukázal jako problematicky detekovatelný, vzhledem k oxidaci na příslušné deriváty 2H-BIO a BIO a nízkému signálu, potlačenému v důsledku vyšších intenzit ostatních píků. Zároveň je vidět, že píky 9–12 odpovídající NEO, ERY, 2H-NEO a PTE-6-COOH jsou na koloně zadržovány nejvíce. Tyto deriváty obsahují v postranním řetězci, navázaném na pteridinovém jádře, polární funkční skupiny – tři hydroxylové skupiny -OH (obsahují NEO, 2H-NEO) a karboxylovou skupinu -COOH (obsahuje ERY, PTE-6-COOH). Se vzrůstajícím podílem organické složky v mobilní fázi, tudíž i vzrůstající tloušťkou imobilizovaného vodného filmu na stacionární fázi, se rozdělovací rovnováha těchto polárnějších analytů posouvá směrem k vodnému filmu, a tím pádem jejich retence roste. Na druhou stranu retenční chování PTE a SEPIA se s proměnným složením mobilní fáze v podstatě nemění. Retenční povaha ostatních derivátů se mění, avšak v porovnání s polárnějšími deriváty pouze minimálně. Souhrnně lze říct, že změny o pouhé 1 obj. % organického modifikátoru ACN v MF, mají velký vliv na retenční chování zejména polárnějších derivátů pterinů.

4.1.2 Vliv koncentrace soli na separaci

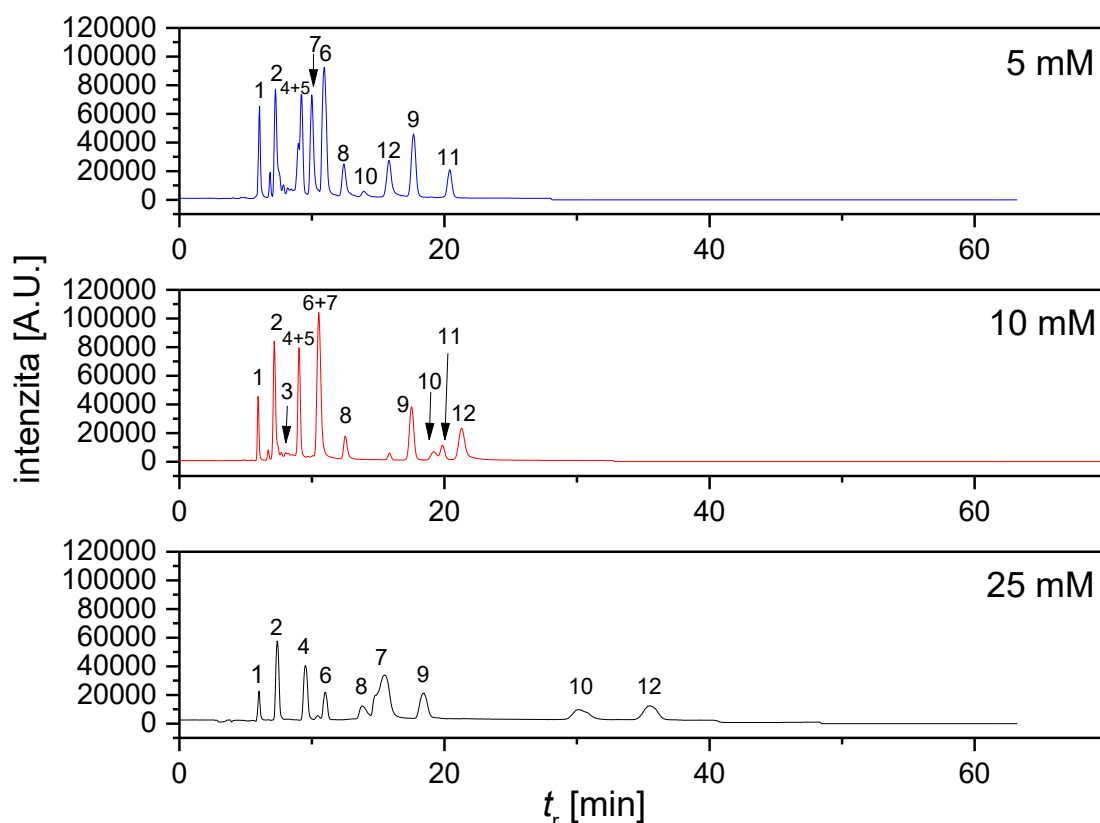
Jako druhý parametr byl sledován vliv koncentrace octanového pufru na retenční a separační chování studovaných pterinů. Byly proměřeny mobilní fáze o stejných objemových poměrech jako v předchozím případě, avšak s 10 mM a 25 mM koncentrací vodného roztoku octanu amonného o pH 6,8.

Na obrázku 11 jsou uvedeny TIC chromatogramy získané pro 10 mM a 25 mM octanový pufr při různých objemových poměrech acetonitril/pufr. Z porovnání průběhu separace pro 10 mM a 25 mM pufr je patrné, že v mobilní fázi s koncentrovanějším pufrem došlo u všech proměřovaných poměrů acetonitril/pufr k výraznému prodloužení retence.



Obrázek 11: TIC chromatogramy separace směsi standardů pterinů ($c = 0,01 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) na chromatografické koloně ZIC-HILIC (150 x 4,6 mm) v MF: **nahore** ACN/10 mM $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ a **dole** ACN/25 mM $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ (pH 6,8) s postupně rostoucím obsahem ACN v MF, průtok $0,5 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, dávkovaný objem vzorku $10 \mu\text{l}$, teplota na koloně $30 \text{ }^\circ\text{C}$. Píky odpovídají: 1 – SEPIA, 2 – PTE, 3 – 4H-BIO, 4 – BIO, 5 – ISO, 6 – 2H-BIO, 7 – XAN, 8 – LEU, 9 – NEO, 10 – ERY, 11 – 2H-NEO, 12 – PTE-6-COOH.

Jako nejvhodnější složení mobilní fáze se pro všechny tři studované koncentrace pufru jevil poměr ACN/pufr 83/17 (v/v), a proto je pro větší přehlednost uvedeno srovnání separací, dosažených v tomto poměru při všech proměřovaných koncentracích pufru, na obrázku 12.



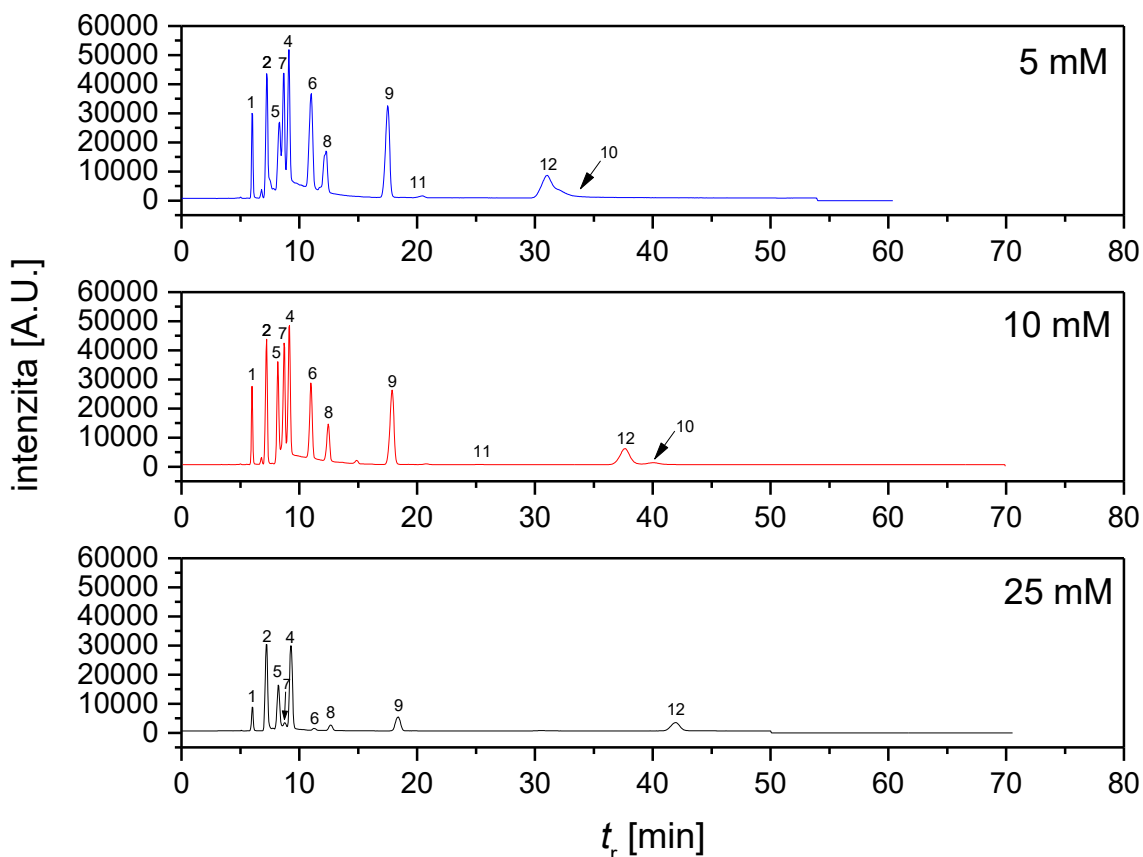
Obrázek 12: Porovnání separace studovaných pterinů na chromatografické koloně ZIC-HILIC (150 x 4,6 mm) v MF: **83/17** (v/v) ACN/CH₃COONH₄ (**pH 6,8**) o různé koncentraci pufru, průtok 0,5 ml·min⁻¹, dávkovaný objem vzorku 10 μl, teplota na koloně 30 °C. Píky odpovídají: 1 – SEPIA, 2 – PTE, 3 – 4H-BIO, 4 – BIO, 5 – ISO, 6 – 2H-BIO, 7 – XAN, 8 – LEU, 9 – NEO, 10 – ERY, 11 – 2H-NEO, 12 – PTE-6-COOH.

Z obrázku 12 je patrné, že zatímco zvýšení koncentrace pufru z 5 mM na 10 mM vedlo v zásadě k lepšímu rozdělení dříve eluujících píků (2–8), celková doba analýzy se nijak výrazně neprodloužila. Výměna 10 mM pufru za 25 mM měla dramatický vliv na retenci a separaci zejména později eluujících analytů (10 a 12), jejichž retence se výrazně prodloužila, prakticky zdvojnásobila. Vyšší koncentrace solvatovaných molekul soli, přítomných ve vodném filmu SF, pravděpodobně způsobuje zvětšení jeho objemu. To může vést k silnější interakci polárnějších pterinů (ERY a PTE-6-COOH),

které obsahují karboxylovou skupinu, s touto vrstvou molekul vody, a tím i k jejich vyšší retenci. Vysoké koncentrace soli navíc zřejmě potlačují elektrostatické repulzní síly mezi záporně nabitými sulfoskupinami amfoterní SF a záporně nabitou karboxylovou skupinou ERY a PTE-6-COOH. V důsledku toho nejsou tyto pteriny elektrostaticky odpuzovány a jejich retence je prodloužena. Ve všech testovaných mobilních fázích, s výjimkou fáze o složení 87/13 (v/v) ACN/10 mM CH₃COONH₄ (pH 6,8), nebylo prakticky možné detekovat 4H-BIO pro jeho velmi nízkou odezvu a problematická byla také detekce 2H-NEO. Jejich stabilita je nízká a po nějaké době přecházejí na svoje plně oxidované formy, tj. BIO a NEO.

4.1.3 Vliv pH vodné složky mobilní fáze na separaci

Vzhledem k retenčnímu mechanismu HILIC chromatografie je pH vodné složky mobilní fáze nezanedbatelným faktorem, který může ovlivňovat jak náboj analytů, tak i náboj stacionární fáze. V případě zwitterionické sulfobetainové ZIC-HILIC kolony s permanentním kladným a záporným nábojem to platí pouze pro analyty. Při všech předchozích experimentech byla hodnota pH octanového pufru 6,8, což je pH hodnota vlastního, neupravovaného pufru. S ohledem na pracovní rozsah pH kolony ZIC-HILIC byl pro studium vlivu pH octanový pufr titrován ledovou octovou kyselinou na pH 3,0 a pro porovnání separace dosažené při těchto dvou rozdílných hodnotách pH byl vybrán opět poměr acetonitril/pufr 83/17 (v/v) a výsledky, získané pro tři různé koncentrace octanového pufru jsou uvedeny na obrázku 13. Z obrázku 13 je vidět, že došlo se zvyšující se koncentrací pufru v mobilní fázi k prodloužení retence, hlavně pro později eluující pteriny. Je také vidět, že v mobilní fázi s nejvyšší koncentrací pufru došlo již k snížení intenzity signálu všech derivátů, které vedlo i k vymizení signálu (píku) ERY (10).



Obrázek 13: Porovnání separace studovaných pterinů na chromatografické koloně ZIC-HILIC (150 x 4,6 mm) v MF: **83/17** (v/v) ACN/CH₃COONH₄ (**pH 3,0**) o různé koncentraci pufru, průtok 0,5 ml·min⁻¹, dávkovaný objem vzorku 10 μl, teplota na koloně 30 °C. Píky odpovídají: 1 – SEPIA, 2 – PTE, 3 – 4H-BIO, 4 – BIO, 5 – ISO, 6 – 2H-BIO, 7 – XAN, 8 – LEU, 9 – NEO, 10 – ERY, 11 – 2H-NEO, 12 – PTE-6-COOH.

Z porovnání obrázků 12 a 13 je vidět, že při nižším pH dochází k menší disociaci karboxylových skupin (pteriny ztrácejí svůj záporný náboj), které tím pádem nejsou tolik odpuzovány negativně nabitou sulfoskupinou, přítomnou v sulfobetainovém ligandu stacionární fáze a tím pádem dochází ke zvýšení retence těchto derivátů. Opačně, se zvyšující se hodnotou pH nastává větší disociace -COOH skupin, které jsou tím pádem více odpuzovány od záporně nabitou stacionární fáze a jejich retence se zmenšuje a celková doba analýzy se zkracuje.

Ze získaných souhrnných výsledků vyplynulo, že pro separaci všech dvanácti studovaných derivátů pterinů je nejvhodnější mobilní fáze o složení 83/17 (v/v) ACN/10 mM CH₃COONH₄ o pH 6,8. V tabulce 5 je uvedeno eluční pořadí jednotlivých pterinů v této mobilní fázi spolu s jejich retenčními časy. Je také vidět, že doba analýzy nepřesáhla 22 minut, což je pro separaci 12 analytů akceptovatelné.

Tabulka 5: Souhrnná tabulka obsahující pořadí eluujících píků s jejich retenčními časy (t_r), změřenými v mobilní fázi o složení: 83/17 (v/v) ACN/10 mM CH₃COONH₄ (pH 6,8), průtok: 0,5 ml·min⁻¹, dávkovaný objem vzorku 10 µl, teplota na koloně: 30°C.

eluční pořadí	zkratka	t_r [min]
1.	SEPIA	5,9
2.	PTE	7,2
3.	4H-BIO	8,2
4.	BIO	9,0
5.	ISO	9,1
6.	2H-BIO	10,5
7.	XAN	10,5
8.	LEU	12,5
9.	NEO	17,5
10.	ERY	19,2
11.	2H-NEO	19,9
12.	PTE-6-COOH	21,3

4.1.4 Separace pterinů z extraktů integumentu ploštic

Pyrrhocoris apterus

Optimalizovaná metoda pro kvalitativní analýzu 12 pterinů byla použita na analýzu reálného vzorku, extraktu z ploštic *Pyrrhocoris apterus*. Extrakce byla prováděna pěti různými extrakčními činidly, a to methanolem, acetonitrilem, dimethylsulfoxidem, směsí DES 1 a směsí DES 2. Do každé vialky s integumentem byl přidán 1 ml extrakčního činidla a vialky byly ponechány v temnu a za laboratorní teploty samovolné extrakci. Třetí a šestý den extrakce byly odebrány vzorky extraktů a analyzovány vyvinutou metodou na přítomnost pterinů. Další odběr byl bohužel realizován až za dva měsíce vzhledem k nouzovému stavu v době epidemie koronaviru. Vzorky byly analyzovány vypracovanou HPLC-MS/MS metodou v mobilní fázi 83/17 (v/v) ACN/10 mM CH₃COONH₄, pH 6,8, průtok 0,5 ml·min⁻¹, dávkovaný objem vzorku 10 μl, teplota na koloně 30 °C.

Tabulka 6 sumarizuje přítomnost/absenci sledovaných pterinů v jednotlivých časech odběru extraktu. Z tabulky 6 je vidět, že již třetí den došlo k extrakci některých pterinů, nejvíce jich bylo extrahováno pomocí DMSO a DES 2 (5 derivátů) a až na 4H-BIO vs NEO, byly extrahovány stejné pteriny. Jako nejslabší extrakční činidlo se ukázal být acetonitril, který extrahoval pouze 4H-BIO. Mírného zlepšení bylo dosaženo 6. den extrakce methanolem, acetonitrilem a kapalinou DES 1. Po dvou měsících bylo dimethylsulfoxidem extrahováno 8 z 12 sledovaných derivátů pterinů, 6 derivátů iontovou kapalinou DES 2, 5 derivátů acetonitrilem a po čtyřech derivátech methanolem a kapalinou DES 1. Jako nejlepší se ukázal být dimethylsulfoxid, který pokrýval extrakci všech derivátů pterinů, extrahovaných ostatními extrakčními činidly. Z extrakčních činidel na bázi DES se ukázal být lepší polární DES 2, sestávající se ze směsi ethylenglykolu a cholinchloridu. Po dvou měsících nebyl v žádném extraktu přítomný původně detekovaný 4H-BIO, který podléhá oxidaci a pravděpodobně přešel na svoji plně oxidovanou formu BIO. Pomocí DMSO byl extrahován žlutý L-sepiapterin (SEPIA), oranžový xanthopterin (XAN) a červený erythropterin (ERY), jež jsou zodpovědné za červeno-oranžové zbarvení integumentu *Pyrrhocoris apterus*. Pomocí DES 2 se bohužel xanthopterin extrahovat nepodařilo.

Na obrázku 14 jsou pro ilustraci uvedeny MRM chromatogramy pterinů, detekovaných ve vzorku po 3. dni extrakce v DMSO (4H-BIO, BIO, ISO, LEU, ERY). Na obrázku 15 je MRM chromatogram D-neopterinu (NEO), který bylo možno detekovat 3. den extrakce pouze v extraktu získaném pomocí kapaliny DES 2. MRM chromatogram separace isoxanthopterin a xanthopterin (ISO a XAN) v methanolickém extraktu je na obrázku 16. Isoxanthopterin a xanthopterin jsou polohové izomery, které mají stejné m/z přechody (180,1 → 135,1), a tak je pro jejich identifikaci nutná dobrá chromatografická separace.

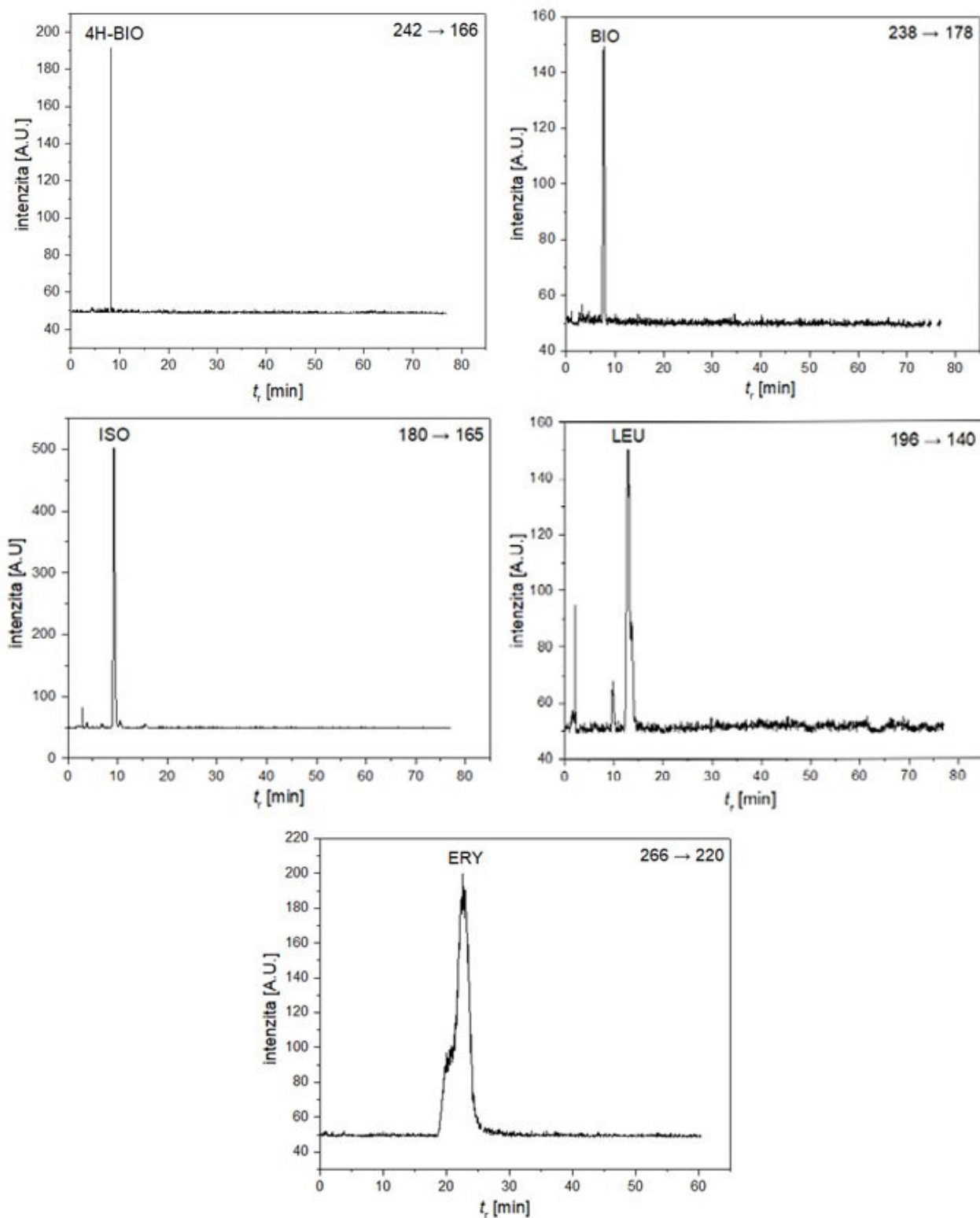
Tabulka 6: Přehled jednotlivých detekovaných pterinů z extraktu integumentu plošnice *Pyrrhocoris apterus* po 3. dni, 6. dni a 2 měsících od počátku samovolné extrakce pomocí rozdílných extrakčních činidel, podmínky měření: složení MF 83/17 (v/v) ACN/10 mM CH₃COONH₄, pH 6,8, průtok 0,5 ml·min⁻¹, dávkovaný objem vzorku 10 μl, teplota na koloně 30 °C; vysvětlivky: ✓ detekováno, - nedetekováno.

3. DEN					
extrakční činidlo					
látka	ACN	MeOH	DMSO	DES 1	DES 2
SEPIA	-	-	-	-	-
PTE	-	-	-	-	-
XAN	-	✓	-	-	-
ISO	-	✓	✓	✓	✓
BIO	-	✓	✓	✓	✓
2H-BIO	-	-	-	-	-
LEU	-	-	✓	-	✓
4H-BIO	✓	-	✓	-	-
NEO	-	-	-	-	✓
2H-NEO	-	-	-	-	-
PTE-6-COOH	-	-	-	-	-
ERY	-	-	✓	✓	✓

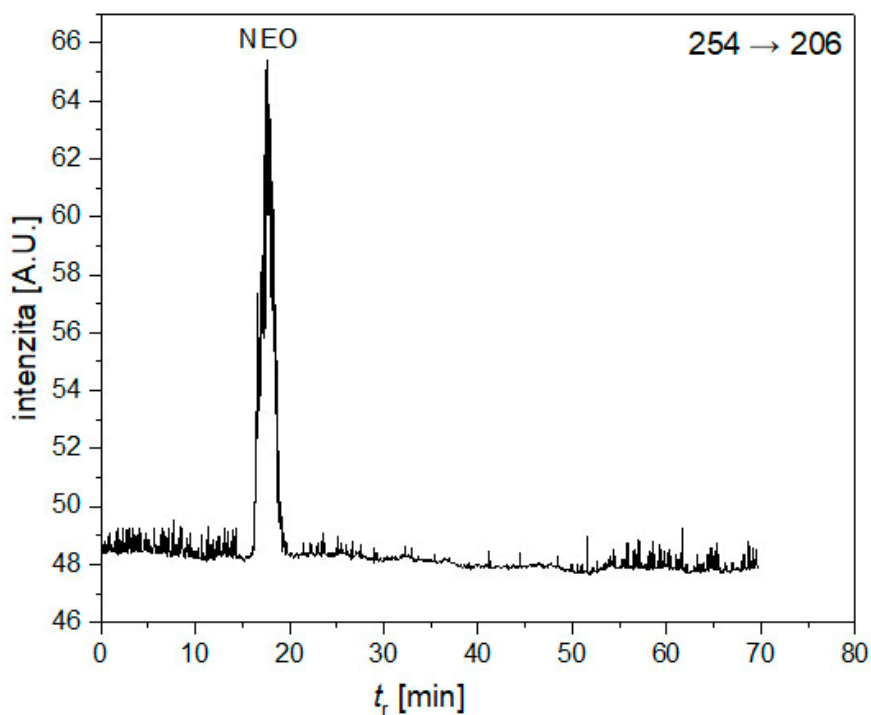
Pokračování tabulky 6

6. DEN					
extrakční činidlo					
látka	ACN	MeOH	DMSO	DES 1	DES 2
SEPIA	-	-	-	-	-
PTE	-	✓	-	-	-
XAN	-	✓	-	-	-
ISO	-	✓	✓	✓	✓
BIO	-	✓	✓	✓	✓
2H-BIO	-	-	-	-	-
LEU	-	-	✓	-	✓
4H-BIO	✓	-	✓	-	-
NEO	✓	-	-	-	✓
2H-NEO	-	-	-	-	-
PTE-6-COOH	-	-	-	-	-
ERY	-	-	✓	✓	✓

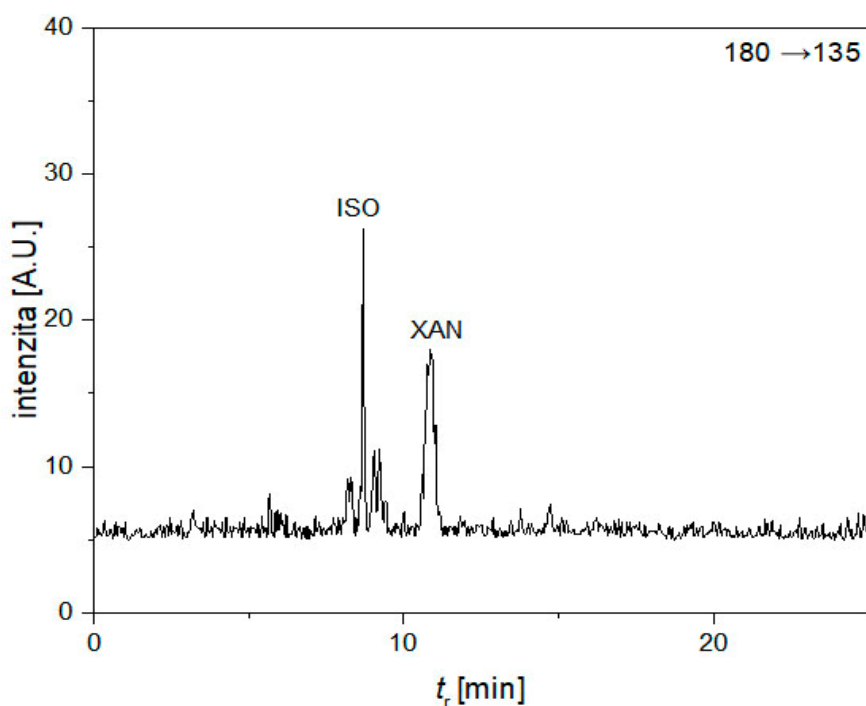
2 MĚSÍCE					
extrakční činidlo					
látka	ACN	MeOH	DMSO	DES 1	DES 2
SEPIA	-	-	✓	✓	✓
PTE	✓	✓	✓	-	✓
XAN	✓	-	✓	-	-
ISO	✓	✓	✓	✓	✓
BIO	✓	✓	✓	✓	✓
2H-BIO	-	-	-	-	-
LEU	-	-	✓	-	✓
4H-BIO	-	-	-	-	-
NEO	✓	✓	✓	-	✓
2H-NEO	-	-	-	-	-
PTE-6-COOH	-	-	-	-	-
ERY	-	-	✓	✓	✓



Obrázek 14: MRM chromatogramy jednotlivých detekovaných pterinů po 3 dnech extrakce integumentu *P. apterus* v **DMSO (4H-BIO, BIO, ISO, LEU, ERY)**, složení MF 83/17 (v/v) ACN/10 mM CH₃COONH₄ (pH 6,8), průtok 0,5 ml·min⁻¹, dávkovaný objem vzorku 10 μl, teplota na koloně 30 °C.



Obrázek 15: MRM chromatogram D-neopterinu (**NEO**) detekovaného po 3 dnech extrakce integumentu *P. apterus* v **DES 2** extrakčním činidle, složení MF 83/17 (v/v) ACN/10 mM CH₃COONH₄ (pH 6,8), průtok 0,5 ml·min⁻¹, dávkovaný objem vzorku 10 µl, teplota na koloně 30 °C.

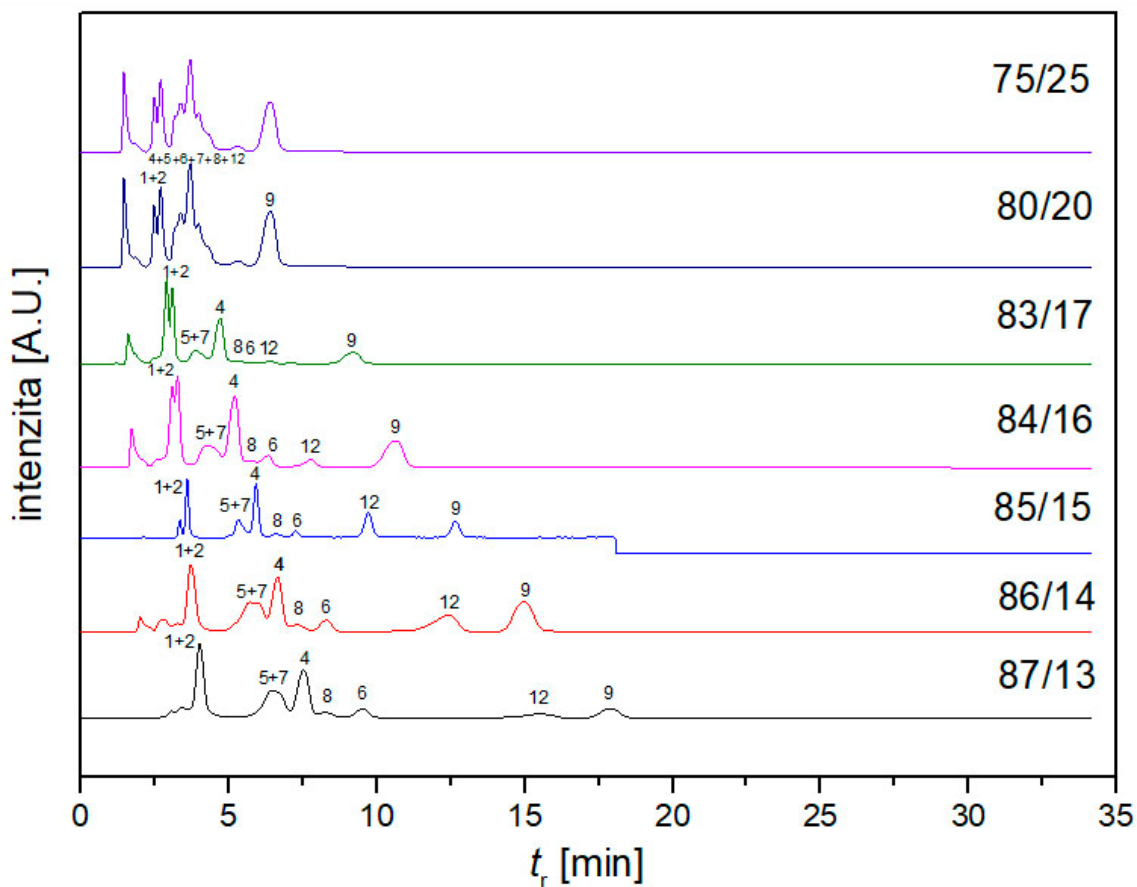


Obrázek 16: MRM chromatogram isoxantopterinu a xantopterinu (**ISO**, **XAN**) detekovaných po 3 dnech extrakce integumentu *P. apterus* v **methanolu**, složení MF 83/17 (v/v) ACN/10 mM CH₃COONH₄ (pH 6,8), průtok 0,5 ml·min⁻¹, dávkovaný objem vzorku 10 µl, teplota na koloně 30 °C.

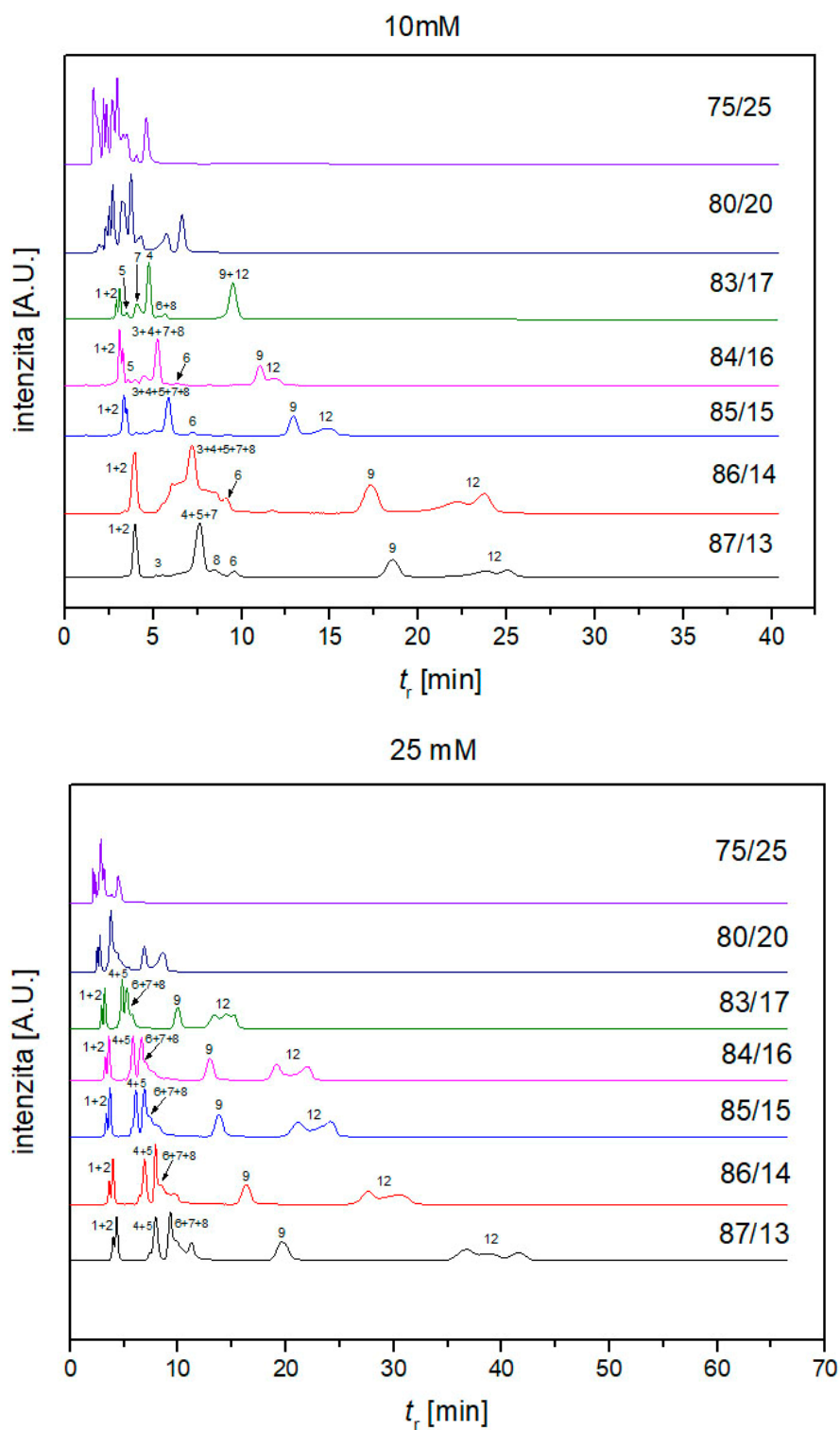
4.2 Kolona ZIC-cHILIC

Jako druhá byla pro separaci derivátů vyzkoušena kolona ZIC-cHILIC. Na silikagelovém nosiči je navázán fosforylcholinový zbytek, který je na volném konci zakončen permanentně kladně nabitou amoniovou skupinou a záporně nabitá fosforylová skupina je vázána lineárně v ligandu, takže umístění nabitých skupin je opačné než u sulfobetainového ligandu. Bohužel tento typ kolony nebyl komerčně dostupný ve stejných rozměrech a velikosti zrnění jako kolona ZIC-HILIC (150 x 4,6 mm; 3,5 μ m), takže je kolona ZIC-cHILIC kratší a s menší velikostí částí (100 x 2,1, mm; 3,0 μ m), což může přispívat k jiné retenci a separaci studovaných derivátů.

Aby mohly být obě kolony porovnány, byla analyzovaná směs pterinů měřena opět při třech koncentracích pufru ve vodné složce mobilní fáze (5 mM, 10 mM a 25 mM) a s proměnlivým obsahem organického modifikátoru v rozmezí 75–90 obj. % acetonitrilu, jako tomu bylo v předchozím případě s kolonou ZIC-HILIC. Výsledné TIC chromatogramy jsou uvedeny na obrázcích 17–18. Opět byly pozorovány obdobné trendy jako v případě kolony ZIC-HILIC, a to, že se vzrůstajícím obsahem acetonitrilu v mobilní fázi došlo k prodlužování retence zejména později eluujících pterinů a také, že zvyšující se koncentrace octanového pufru vedla k prodloužení retence prakticky všech analytů (s výjimkou analytů 1 a 2, tedy L-sepiapterinu a pterinu). Při porovnání obrázků 10 a 11 získaných pro ZIC-HILIC kolonu a obrázků 17 a 18 pro kolonu ZIC-cHILIC je patrné, že ve srovnatelných mobilních fázích došlo na koloně ZIC-cHILIC k podstatnému zkrácení retence ve všech proměřovaných mobilních fázích, doprovázené zhoršenou separační účinností. Řada studovaných derivátů pterinů koeluovala a zejména izomerní dvojici xanthopterin a isoxanthopterin se podařilo rozdělit pouze v mobilní fázi 83/17 (v/v) ACN/10 mM octanový pufr (pH 6,8).



Obrázek 17: TIC chromatogramy separace směsi standardů pterinů ($c = 0,01 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) v mobilní fázi ACN/5 mM $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ (pH 6,8), s rostoucím obsahem ACN v MF na koloně ZIC-cHILIC, průtok $0,2 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, dávkovaný objem vzorku $10 \mu\text{l}$, teplota na koloně $30 \text{ }^\circ\text{C}$. Píky odpovídají: 1 – SEPIA, 2 – PTE, 3 – 4H-BIO, 4 – BIO, 5 – ISO, 6 – 2H-BIO, 7 – XAN, 8 – LEU, 9 – NEO, 10 – ERY, 11 – 2H-NEO, 12 – PTE-6-COOH.



Obrázek 18: TIC chromatogramy separace směsi standardů pterinů ($c = 0,01 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) na chromatografické koloně ZIC-chILIC v MF: **nahore** ACN/10 mM $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ (pH 6,8) a **dole** ACN/25 mM $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ (pH 6,8), s postupně rostoucím obsahem ACN v MF, průtok $0,2 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, dávkovaný objem vzorku $10 \mu\text{l}$, teplota na koloně $30 \text{ }^\circ\text{C}$. Píky odpovídají: 1 – SEPIA, 2 – PTE, 3 – 4H-BIO, 4 – BIO, 5 – ISO, 6 – 2H-BIO, 7 – XAN, 8 – LEU, 9 – NEO, 10 – ERY, 11 – 2H-NEO, 12 – PTE-6-COOH.

Z porovnání výsledků získaných na obou kolonách lze usuzovat, že pro retenci analytů jsou důležité elektrostatické interakce mezi negativně nabitou, koncovou sulfoskupinou sulfobetainové stacionární fáze s alespoň částečně protonizovanými atomy dusíku v pteridinovém skeletu. Také tloušťka vodného filmu, adsorbovaného na povrchu stacionární fáze, může být v daných mobilních fázích u obou kolon rozdílná a tím i přispívat k rozdílné retenci, získané na obou kolonách. Jednoznačně vhodnější stacionární fází pro separaci studovaných pterinů se jeví sulfobetainová stacionární fáze kolony ZIC-HILIC.

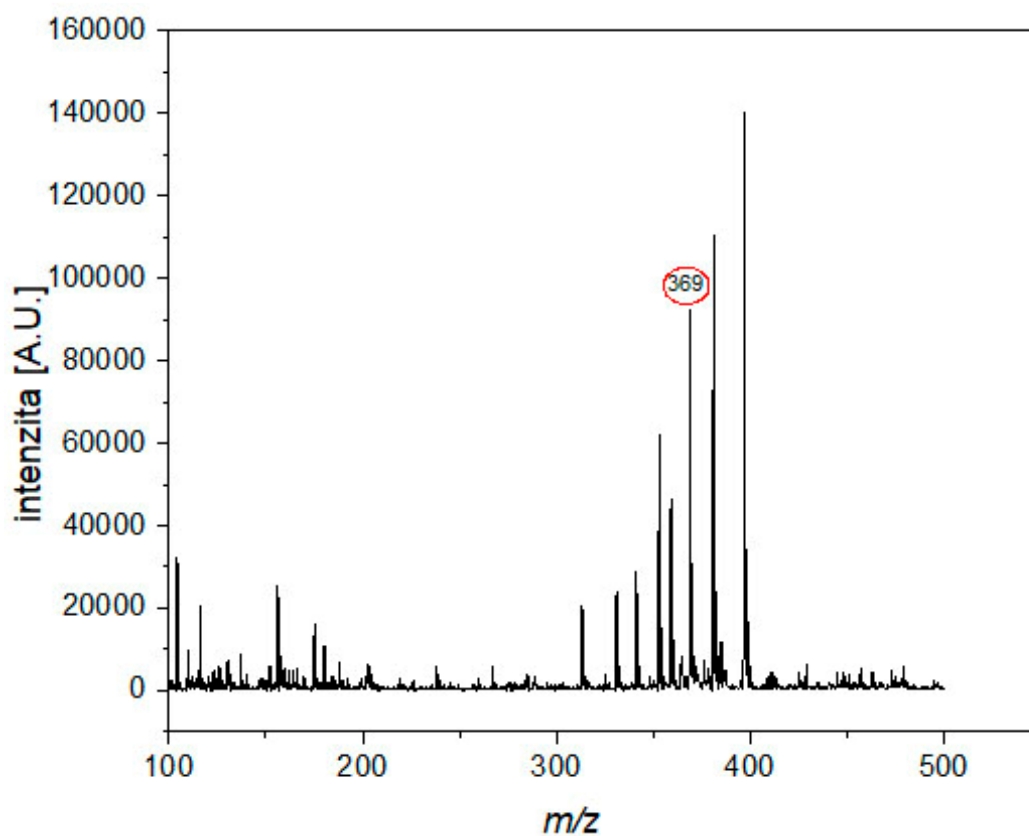
4.3 Nalezení vhodných experimentálních podmínek hmotnostní detekce pro drosopterin

Drosopterin, jakožto dimerický pterin, je poměrně velká molekula, v porovnání s ostatními analyzovanými pteriny. Je také polárnější, protože jsou v jeho struktuře vázány dvě aminoskupiny na rozdíl od ostatních studovaných derivátů pterinů, u nichž je vázána pouze jedna aminoskupina ve struktuře. Pro dosažení dostatečné citlivosti jeho MS/MS detekce byly testovány různé experimentální podmínky hmotnostního analyzátoru. Byly hledány prekurzorové a produktové ionty, vhodná hodnota fragmentačního napětí a kolizní energie tak, aby byla intenzita signálu prekurzorového iontu, respektive produktového iontu co nejvyšší, a naopak intenzita ostatních signálů v hmotnostním spektru co nejnižší.

Objem 200 μ l methanolického extraktu získaného z očí octomilek, obsahující oranžově-červený drosopterin, byl proměřen v módu SCAN při pozitivní polaritě ionizace v rozsahu hodnot m/z 100–700. Vybrané parametry hmotnostního analyzátoru při hledání vhodných detekčních podmínek jsou uvedeny v tabulce 6. Po tomto skenování vzorku byl v TIC (total ion current chromatogram) chromatografickém záznamu přítomen signál, v jehož hmotnostním spektru byl nalezen prekurzorový ion. Ten má obvykle nejvyšší intenzitu a jeho M_r odpovídá protonované molekule měřené látky, obecně tedy $[M+H]^+$. Drosopterin má relativní molekulovou hmotnost $M_r = 368,35$ a v hmotnostním spektru byl nalezen poměrně intenzivní signál s hodnotou $m/z = 369$ odpovídající protonovanému molekulárnímu iontu tohoto derivátu pterinu. Naměřené hmotnostní spektrum získané v módu SCAN je uvedeno na obrázku 19.

Tabulka 6: Parametry hmotnostního analyzátoru při hledání vhodných podmínek detekce pro drosopterin.

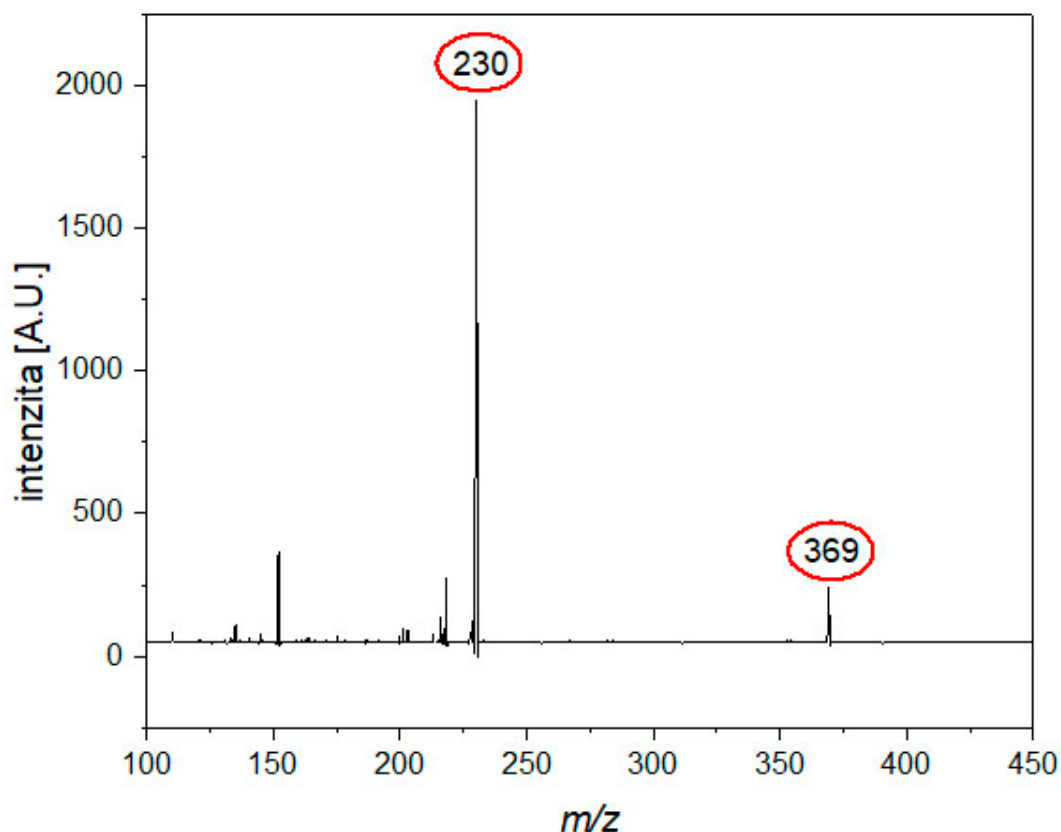
parametr	hodnota
rozsah m/z v módu SCAN a Product Ion	100–700 m/z
čas skenu	500 ms
výchozí hodnota fragmentačního napětí	100 V
akcelerační napětí v kolizní cele	7 V
polarita ionizace	pozitivní
„dwell time“	200 ms



Obrázek 19: Záznam hmotnostního spektra methanolického extraktu z očí octomilky, obsahující drosopterin m/z 369 v módu SCAN.

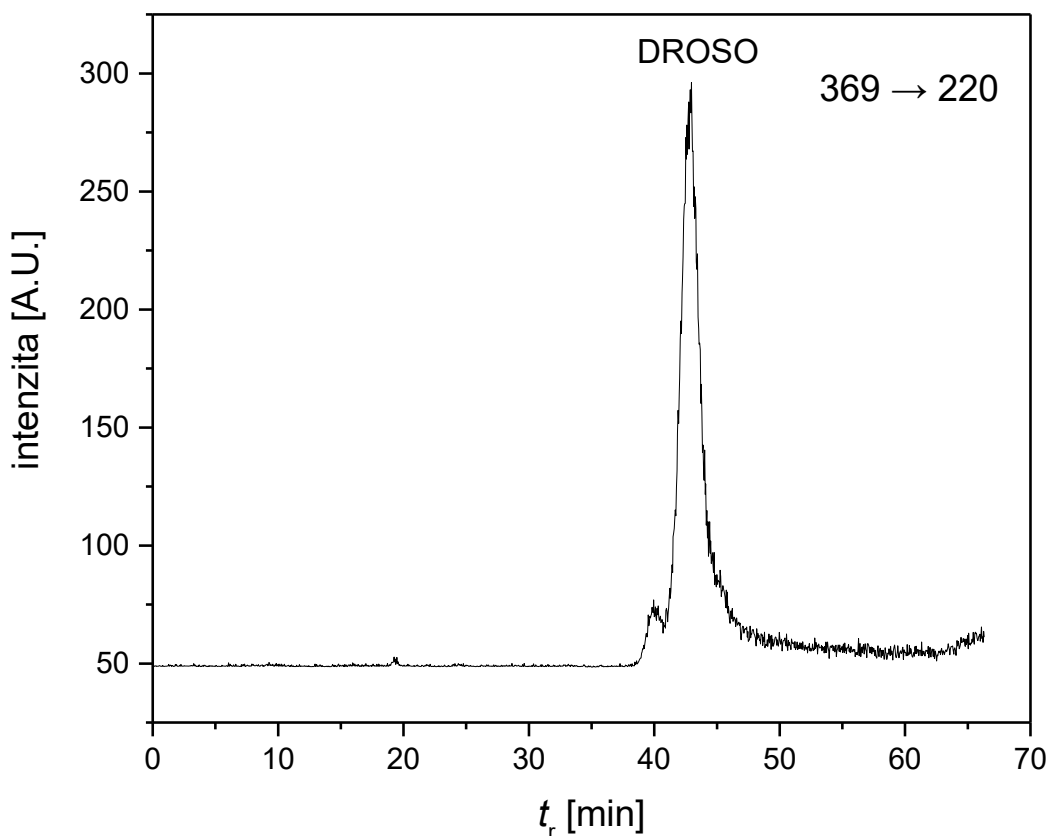
Jak je z obrázku 19 patrné, že hmotnostní spektrum získané po změření vzorku extraktu drosopterinu v módu SCAN je poměrně bohaté, kromě vyznačeného píku odpovídajícího hodnotě m/z 369 – drosopterinu, spektrum obsahuje řadu píků což je způsobeno tím, že se jednalo o methanolický extrakt, ve kterém byly koextrahovány ještě další látky, zejména další pteriny, obsažené v očích octomilky.

V módu SIM byly otestovány různé hodnoty fragmentačního napětí (110, 115, 125 a 135 V), v módu Product Ion vyzkoušeny různé hodnoty kolizní energie (15, 18, 20, 25 a 30 eV) a nalezen vhodný produktový ion. Jako produktový ion po fragmentaci prekurzorového iontu byl zvolen nejintenzivnější signál ve spektru s $m/z = 230$, při fragmentačním napětí 125 V a kolizní energii 30 eV. Hmotnostní spektrum drosopterinu, získané v módu Product Ion, je zobrazeno na obrázku 20.



Obrázek 20: Záznam MS/MS hmotnostního spektra drosopterinu změřeného v módu Product Ion po fragmentaci prekurzorového iontu m/z 369 na produktový ion m/z 230 při fragmentačním napětí 125 V a kolizní energii 30 eV.

Pilotní experimenty, v nichž bylo 10 μl methanolického extraktu, obsahujícího drosopterin, nadávkováno na kolonu ZIC-HILIC (150 x 4,6 mm) za optimalizovaných separačních podmínek nalezených pro separaci ostatních derivátů pterinů – mobilní fáze o složení 83/17 (v/v) ACN/10 mM $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ (pH 6,8), průtok 0,5 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$, teplota na koloně 30 $^\circ\text{C}$ – ukázaly, že drosopterin neeluuje do 60 min. Podstatně polárnější drosopterin byl velmi silně zadržován i v mobilních fázích s nižším obsahem acetonitrilu. Pro jeho eluci bylo nezbytné použít vyšší průtok mobilní fáze, a to 0,8 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ a obsah acetonitrilu v mobilní fázi snížit na 60 obj. %. Potvrzení přítomnosti drosopterinu po separaci je vidět na MRM chromatogramu, znázorněném na obrázku 21. Pro separaci všech sledovaných derivátů pterinů včetně drosopterinu bude nutné navrhnout vhodnou gradientovou eluci.



Obrázek 21: MRM chromatogram drosopterinu při experimentálních podmínkách: MF 60/40 (v/v) ACN/10 mM $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ (pH 6,8), průtok 0,8 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$, dávkovaný objem extraktu 10 μl , teplota na koloně 30 $^\circ\text{C}$.

5 Závěr

Byla vyvinuta metoda pro kvalitativní analýzu 12 studovaných derivátů pterinů pomocí hydrofilní interakční chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní detekcí. Jako iontový zdroj byl pro hmotnostní detekci využíván elektrosprej a jako hmotnostní analyzátor byl využíván trojitý kvadrupól. Směs standardů 12 pterinových derivátů byla separovaná na dvou různých kolonách zwitterionického typu – koloně ZIC-HILIC (obsahující sulfobetainový ligand) a koloně ZIC-cHILIC (obsahující fosforylcholinový ligand). Byl testován vliv množství organického modifikátoru, vliv koncentrace soli a pH vodné složky mobilní fáze na separaci pterinů. Fosforylcholinová kolona se ukázala jako nevhodná pro analýzu studovaných pterinů. Na koloně ZIC-HILIC se podařilo separovat všech 12 vybraných derivátů v mobilní fázi o složení ACN/10 mM CH₃COONH₄ (pH 6,8), průtok 0,5 ml·min⁻¹, dávkovaný objem vzorku 10 µl, teplota na koloně 30 °C.

Optimalizované podmínky byly následně aplikovány pro analýzu extraktů z integumentu plošnice *P. apterus*. Extrakty byly získány pomocí pěti rozdílných extrakčních činidel – acetonitrilu, methanolu, dimethylsulfoxidu a dvou typů tzv. deep eutectic solvents obsahujících cholinchlorid v kombinaci s mléčnou kyselinou (DES 1) nebo ethylenglykolem (DES 2).

Jako nejméně úspěšným extrakčním činidlem se v dlouhodobém horizontu ukázal být jeden z typů tzv. deep eutectic solvents, konkrétně DES 1. Po 2 měsících došlo k extrakci a následné detekci pouze čtyř pterinů. Naopak nejúspěšnějším extrakčním činidlem byl DMSO, po 6 dnech se povedlo vyextrahovat 5 derivátů (obdobně jako při použití DES 2). Ovšem po 2 měsících bylo v DMSO extraktech identifikováno osm pterinů. V případě DES 2 bylo detekováno pouze šest pterinů. Pomocí DMSO byl extrahován žlutý L-sepiapterin, oranžový xanthopterin a červený erythropterin, jež jsou zodpovědné za červeno-oranžové zabarvení integumentu *P. apterus*. Pomocí DES 2 se bohužel xanthopterin extrahovat nepodařilo.

Závěrem byly nalezeny vhodné podmínky pro hmotnostní detekci dalšího barevného pterinu – drosopterinu, a byla provedena jeho pilotní separace na koloně ZIC-HILIC.

Seznam použité literatury

- [1] W. B. Watt, “Pteridine Biosynthesis in the Butterfly *Colias eurytheme*”, *J. Biol. Chem.*, vol. 242, no. February 25, pp. 565–572, 1967.
- [2] V. Carmona-Martínez, A. J. Ruiz-Alcaraz, M. Vera, A. Guirado, M. Martínez-Esparza, and P. García-Peñarrubia, “Therapeutic potential of pteridine derivatives: A comprehensive review”, *Med. Res. Rev.*, vol. 39, no. 2, pp. 461–516, Mar. 2019, doi: 10.1002/med.21529.
- [3] N. Feirer and C. Fuqua, “Pterin function in bacteria”, *Pteridines*, vol. 28, no. 1, pp. 23–36, 2017, doi: <https://doi.org/10.1515/pterid-2016-0012>.
- [4] C. Burton, R. Weng, L. Yang, Y. Bai, H. Liu, and Y. Ma, “High-throughput intracellular pteridinic profiling by liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry”, *Anal. Chim. Acta*, vol. 853, no. 1, pp. 442–450, 2015, doi: 10.1016/j.aca.2014.10.044.
- [5] J. Tomandl, “Pteriny”, *Chem. List.*, vol. 92, pp. 689–697, 1998.
- [6] S. Goswami, M. K. Das, D. Sain, and B. Goswami, “A concise treatment of pterins: some recent synthetic and methodology aspects and their applications in molecular sensors”, *Pteridines*, vol. 29, no. 1, pp. 15–41, 2018, doi: <https://doi.org/10.1515/pteridines-2018-0002>.
- [7] S. Kaufman, “Pteridine Cofactors”, *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 36, no. 1, pp. 171–184, Jun. 1967, doi: 10.1146/annurev.bi.36.070167.001131.
- [8] S. Murata, H. Ichinose, and F. Urano, “Tetrahydrobiopterin and Related Biologically Important Pterins”, in *Bioactive Heterocycles II*, Springer Berlin Heidelberg, 2007, pp. 127–171.
- [9] P. Galland and H. Senger, “The role of pterins in the photoreception and metabolism of plants”, *Photochem. Photobiol.*, vol. 48, no. 6, pp. 811–820, Dec. 1988, doi: 10.1111/j.1751-1097.1988.tb02896.x.
- [10] W. Pfeleiderer, “Pteridines. Properties, reactivities and biological significance”, *J. Heterocycl. Chem.*, vol. 29, no. 3, pp. 583–605, May 1992, doi: 10.1002/jhet.5570290301.
- [11] C. Lorente and A. H. Thomas, “Photophysics and photochemistry of pterins in aqueous solution”, *Acc. Chem. Res.*, vol. 39, no. 6, pp. 395–402, Jun. 2006, doi: 10.1021/ar050151c.

- [12] E. Oliveros, M. L. Dántola, M. Vignoni, A. H. Thomas, and C. Lorente, “Production and quenching of reactive oxygen species by pterin derivatives, an intriguing class of biomolecules”, *Pure Appl. Chem.*, vol. 83, no. 4, pp. 801–811, 2010, doi: <https://doi.org/10.1351/PAC-CON-10-08-22>.
- [13] Albert and A., “Quantitative studies of the avidity of naturally occurring substances for trace metals. III. Pteridines, riboflavin and purines.”, *Biochem. J.*, vol. 54, no. 4, pp. 646–654, 1953, doi: 10.1042/bj0540646.
- [14] C. Lorente, A. L. Capparelli, A. H. Thomas, A. M. Braun, and E. Oliveros, “Quenching of the fluorescence of pterin derivatives by anions”, *Photochem. Photobiol. Sci.*, vol. 3, no. 2, pp. 167–173, Feb. 2004, doi: 10.1039/b313076b.
- [15] C. Chahidi, M. Aubailly, A. Momzikoff, M. Bazin, and R. Santus, “Photophysical and photosensitizing properties of 2-amino-4 pteridinone: a natural pigment”, *Photochem. Photobiol.*, vol. 33, no. 5, pp. 641–649, May 1981, doi: 10.1111/j.1751-1097.1981.tb05470.x.
- [16] P. Basu and S. J. N. Burgmayer, “Pterin chemistry and its relationship to the molybdenum cofactor”, *Coordination Chemistry Reviews*, vol. 255, no. 9–10. NIH Public Access, pp. 1016–1038, May-2011, doi: 10.1016/j.ccr.2011.02.010.
- [17] H. Tomšíková, P. Tomšík, P. Solich, and L. Nováková, “Determination of pteridines in biological samples with an emphasis on their stability”, *Bioanalysis*, vol. 5, no. 18, pp. 2307–2326, Sep. 2013, doi: 10.4155/bio.13.194.
- [18] N. Tomic-Carruthers, D. C. Robacker, and R. L. Mangan, “Identification and age-dependence of pteridines in the head of adult Mexican fruit fly, *Anastrepha ludens*”, *J. Insect Physiol.*, vol. 42, no. 4, pp. 359–366, Apr. 1996, doi: 10.1016/0022-1910(95)00116-6.
- [19] S. L. Weiss, K. Foerster, and J. Hudon, “Pteridine, not carotenoid, pigments underlie the female-specific orange ornament of striped plateau lizards (*Sceloporus virgatus*)”, *Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol.*, vol. 161, no. 2, pp. 117–123, Feb. 2012, doi: 10.1016/j.cbpb.2011.10.004.
- [20] T. Suga and K. Munesada, “The pigments in the dorsal skin of frogs”, *J. Nat. Prod.*, vol. 51, no. 4, pp. 713–718, 1988, doi: 10.1021/np50058a008.
- [21] A. Jiménez Girón, E. Martín-Tornero, M. C. Hurtado Sánchez, I. Durán Merás, and A. Espinosa Mansilla, “A simple HPLC-ESI-MS method for the direct

- determination of ten pteridinic biomarkers in human urine”, *Talanta*, vol. 101, pp. 465–472, Nov. 2012, doi: 10.1016/j.talanta.2012.09.061.
- [22] A. W. Schüttelkopf, L. W. Hardy, S. M. Beverley, and W. N. Hunter, “Structures of *Leishmania* major pteridine reductase complexes reveal the active site features important for ligand binding and to guide inhibitor design”, *J. Mol. Biol.*, vol. 352, no. 1, pp. 105–116, Sep. 2005, doi: 10.1016/j.jmb.2005.06.076.
- [23] P. Kośliński, P. Jarzowski, M. J. Markuszewski, and R. Kaliszan, “Determination of pterins in urine by HPLC with UV and fluorescent detection using different types of chromatographic stationary phases (HILIC, RP C8, RP C18)”, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 91, pp. 37–45, Mar. 2014, doi: 10.1016/j.jpba.2013.12.012.
- [24] X. Xiong, Y. Zhang, and W. Zhang, “Simultaneous determination of twelve polar pteridines including dihydro- and tetrahydropteridine in human urine by hydrophilic interaction liquid chromatography with tandem mass spectrometry”, *Biomed. Chromatogr.*, vol. 32, no. 8, Aug. 2018, doi: 10.1002/bmc.4244.
- [25] L. Nováková, I. Kaufmannová, and R. Jánská, “Evaluation of hybrid hydrophilic interaction chromatography stationary phases for ultra-HPLC in analysis of polar pteridines”, *J. Sep. Sci.*, vol. 33, no. 6–7, pp. 765–772, Mar. 2010, doi: 10.1002/jssc.200900734.
- [26] P. Kozlík *et al.*, “Hydrophilic interaction liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection applied for analysis of pteridines in two *Graphosoma* species (Insecta: Heteroptera)”, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 930, pp. 82–89, Jul. 2013, doi: 10.1016/j.jchromb.2013.05.004.
- [27] B. Stea, R. M. Halpern, and R. A. Smith, “Separation of unconjugated pteridines by high-pressure cation-exchange liquid chromatography”, *J. Chromatogr. A*, vol. 168, no. 2, pp. 385–393, Jan. 1979, doi: 10.1016/0021-9673(79)80008-4.
- [28] J. Van Daele, D. Blancquaert, F. Kiekens, D. Van Der Straeten, W. E. Lambert, and C. P. Stove, “Degradation and interconversion of plant pteridines during sample preparation and ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry”, *Food Chem.*, vol. 194, pp. 1189–1198, Mar. 2016, doi: 10.1016/j.foodchem.2015.08.098.

- [29] E. Martín-Tornero, D. G. Gómez, I. Durán-Merás, and A. Espinosa-Mansilla, “Development of an HPLC-MS method for the determination of natural pteridines in tomato samples”, *Anal. Methods*, vol. 8, no. 34, pp. 6404–6414, Sep. 2016, doi: 10.1039/c6ay01519k.
- [30] D. L. Hatfield, C. Van Baalen, and H. S. Forrest, “Pteridines in blue green algae”, *Plant Physiol.*, vol. 36, no. 2, pp. 240–243, 1961, doi: 10.1104/pp.36.2.240.
- [31] J. Krajčiček *et al.*, “Capillary electrophoresis of pterin derivatives responsible for the warning coloration of Heteroptera”, *J. Chromatogr. A*, vol. 1336, pp. 94–100, Apr. 2014, doi: 10.1016/j.chroma.2014.02.019.
- [32] F. Han, B. H. Huynh, H. Shi, B. Lin, and Y. Ma, “Pteridine analysis in urine by capillary electrophoresis using laser-induced fluorescence detection”, *Anal. Chem.*, vol. 71, no. 7, pp. 1265–1269, Apr. 1999, doi: 10.1021/ac981218v.
- [33] W. Grochocki, M. Buszewska-Forajta, S. Macioszek, and M. J. Markuszewski, “Determination of urinary pterins by capillary electrophoresis coupled with LED-induced fluorescence detector”, *Molecules*, vol. 24, no. 6, 2019, doi: 10.3390/molecules24061166.
- [34] J. Hanusek, “Příprava iontových kapalin”, *Chem. List.*, pp. 263–294, 2005.
- [35] J. Žitka and Z. Pientka, “Iontové kapaliny a jejich polymerní analogy: nové membránové materiály | Chemické listy”, *Chem. List.*, vol. 111, pp. 192–196, 2017.
- [36] J. D. Holbrey *et al.*, “Physicochemical Properties”, in *Ionic Liquids in Synthesis*, vol. 1, Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2008, pp. 57–174.
- [37] C. Chiappe, M. Malvaldi, and C. S. Pomelli, “Ionic liquids: Solvation ability and polarity”, *Pure Appl. Chem.*, vol. 81, no. 4, pp. 767–776, 2009, doi: 10.1351/PAC-CON-08-09-08.
- [38] E. L. Smith, A. P. Abbott, and K. S. Ryder, “Deep Eutectic Solvents (DESs) and Their Applications”, *Chem. Rev.*, vol. 114, no. 21, pp. 11060–11082, Nov. 2014, doi: 10.1021/cr300162p.
- [39] L. Peng, Z. Hu, Q. Lu, Z. Tang, Y. Jiao, and X. Xu, “DESs: Green solvents for transition metal catalyzed organic reactions”, *Chinese Chem. Lett.*, vol. 30, no. 12, pp. 2151–2156, Dec. 2019, doi: 10.1016/j.ccllet.2019.05.063.

- [40] J. Huang, X. Guo, T. Xu, L. Fan, X. Zhou, and S. Wu, “Ionic deep eutectic solvents for the extraction and separation of natural products”, *J. Chromatogr. A*, vol. 1598, pp. 1–19, Aug. 2019, doi: 10.1016/j.chroma.2019.03.046.
- [41] X. Xu, Z. Guo, and L.-Z. Cheong, *Ionic liquids in lipid processing and analysis: opportunities and challenges*. AOCS Press/Academic Press. 2016.
- [42] A. J. Alpert, “Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds”, *J. Chromatogr. A*, vol. 499, no. C, pp. 177–196, Jan. 1990, doi: 10.1016/S0021-9673(00)96972-3.
- [43] P. Hemström and K. Irgum, “Hydrophilic interaction chromatography”, *Journal of Separation Science*, vol. 29, no. 12, pp. 1784–1821, Aug-2006, doi: 10.1002/jssc.200600199.
- [44] A. R. Oyler *et al.*, “Hydrophilic interaction chromatography on amino-silica phases complements reversed-phase high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis for peptide analysis”, *J. Chromatogr. A*, vol. 724, no. 1–2, pp. 378–383, Feb. 1996, doi: 10.1016/0021-9673(95)00987-6.
- [45] A. J. Alpert *et al.*, “Hydrophilic-interaction chromatography of complex carbohydrates”, *J. Chromatogr. A*, vol. 676, no. 1, pp. 191–202, Jul. 1994, doi: 10.1016/0021-9673(94)00467-6.
- [46] M. A. Strega, S. Stevenson, and S. M. Lawrence, “Mixed-mode anion-cation exchange/hydrophilic interaction liquid chromatography-electrospray mass spectrometry as an alternative to reversed phase for small molecule drug discovery”, *Anal. Chem.*, vol. 72, no. 19, pp. 4629–4633, Oct. 2000, doi: 10.1021/ac000338b.
- [47] B. Buszewski and S. Noga, “Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) a powerful separation technique”, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 402, no. 1, pp. 231–247, Jan-2012, doi: 10.1002/jssc.200900734.
- [48] X. Xiong and Y. Liu, “Chromatographic behavior of 12 polar pteridines in hydrophilic interaction chromatography using five different HILIC columns coupled with tandem mass spectrometry”, *Talanta*, vol. 150, pp. 493–502, Apr. 2016, doi: 10.1016/j.talanta.2015.12.066.

- [49] A. J. Alpert, “Electrostatic repulsion hydrophilic interaction chromatography for isocratic separation of charged solutes and selective isolation of phosphopeptides”, *Anal. Chem.*, vol. 80, no. 1, pp. 62–76, Jan. 2008, doi: 10.1021/ac070997p.
- [50] W. Bicker, J. Y. Wu, M. Lämmerhofer, and W. Lindner, “Hydrophilic interaction chromatography in nonaqueous elution mode for separation of hydrophilic analytes on silica-based packings with noncharged polar bondings”, *J. Sep. Sci.*, vol. 31, no. 16–17, pp. 2971–2987, Sep. 2008, doi: 10.1002/jssc.200800246.
- [51] “SeQuant® HILIC HPLC Columns | Analytics and Sample Preparation | Merck.” [Online]. Available: https://www.merckmillipore.com/CZ/cs/products/analytics-sample-prep/chromatography-for-analysis/analytical-hplc/sequent-zic-hilic-hplc-columns/wK6b.qB.PM0AAAE_R_Z3.Lxi,nav. [Accessed: 09-Feb-2020].
- [52] P. Jandera, “Stationary and mobile phases in hydrophilic interaction chromatography: a review”, *Anal. Chim. Acta*, vol. 692, no. 1–2, pp. 1–25, Apr. 2011, doi: 10.1016/J.ACA.2011.02.047.
- [53] J. J. Pitt, “Principles and applications of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical biochemistry”, *Clin. Biochem. Rev.*, vol. 30, no. 1, pp. 19–34, Feb. 2009.
- [54] K. C. Dooley, “Tandem mass spectrometry in the clinical chemistry laboratory”, *Clin. Biochem.*, vol. 36, no. 6, pp. 471–481, Sep. 2003, doi: 10.1016/S0009-9120(03)00105-X.
- [55] P. Kebarle and U. H. Verkcerk, “Electrospray: From Ions in solution to Ions in the gas phase, what we know now”, *Mass Spectrom. Rev.*, vol. 28, no. 6, pp. 898–917, Nov. 2009, doi: 10.1002/mas.20247.
- [56] A. P. Bruins, “Mass spectrometry with ion sources operating at atmospheric pressure”, *Mass Spectrom. Rev.*, vol. 10, no. 1, pp. 53–77, Jan. 1991, doi: 10.1002/mas.1280100104.
- [57] C. Dass, “Tandem Mass Spectrometry”, in *Fundamentals of Contemporary Mass Spectrometry*, Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2006, pp. 119–150.
- [58] K. K. Murray, R. K. Boyd, M. N. Eberlin, G. J. Langley, L. Li, and N. Yasuhide, “Definitions of terms relating to mass spectrometry (IUPAC Recommendations 2013) in: Pure and Applied Chemistry Volume 85 Issue 7 (2013)”, *Pure Appl.*

Chem., vol. 85, no. 7, 2013, doi: doi.org/10.1351/PAC-REC-06-04-06.

- [59] J. Bílek, “Analýza vybraných derivátů pterinů metodou LC-MS”, *Diplomová práce*, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2019.