

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta
Katedra analytické chemie
2010

**ANALÝZA PIGMENTŮ Z INTEGUMENTU *GRAPHOSOMA*
*SEMIPUNCTATUM***

**ANALYSIS OF PIGMENTS FROM INTEGUMENT OF
*GRAPHOSOMA SEMIPUNCTATUM***

Bakalářská práce
studijního programu Klinická a toxikologická analýza

Vedoucí bakalářské práce:

Doc. RNDr. Zuzana Bosáková, CSc.

Vypracoval:

Jan Krajíček

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně pod vedením školitele Doc. RNDr. Zuzany Bosákové, CSc. a že jsem všechny použité prameny řádně citoval.

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

V Praze dne

.....

Je mi milou povinností na tomto místě poděkovat své školitelce Doc. RNDr. Zuzaně Bosákové, CSc. za ochotu, odborné vedení a všestrannou pomoc při získávání i zpracování teoretické a experimentální části mé práce. Dále bych chtěl poděkovat pracovníkům z Katedry analytické chemie za všestrannou pomoc a Mgr. Alici Exnerové, Ph.D. a Prof. RNDr. Pavlu Štysovi, CSc. za poskytnutí vzorků plošnice. Tato bakalářská práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620857.

Předmětová hesla: analytická chemie, separace, vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Klíčová slova: reverzní separační mód, identifikace, deriváty pterinů, integument

Graphosoma semipunctatum

Abstrakt

Pteriny patří do důležité skupiny látek, fungující jako pigmenty u řady druhů živočichů. Některé z nich jsou pravděpodobně zodpovědné za charakteristické zbarvení skupiny hmyzu. Toto zbarvení funguje jako varovný signál pro vizuálně se orientující predátory (ptáky, ještěrky aj.). Tato práce byla zaměřena na vývoj HPLC separační metody pro analýzu pterinů, obsažených v *Graphosoma semipunctatum*. Pro vývoj metody byl zvolen reverzní separační mód s C18 stacionární fází (Spherisorb ODS 2) a binární mobilní fází (organický modifikátor/fosfátový pufr nebo voda). V rámci optimalizační procedury byl sledován vliv typu a obsahu organického modifikátoru (methanol, ethanol, tetrahydrofuran) a koncentrace fosfátového pufru, pH 3,0 (10 - 30 mM) v mobilní fází na retenční a separační chování studovaných pterinů (leukopterin, biopterin, xanthopterin, isoxanthopterin a erythropterin). Za optimalizovaných separačních podmínek (5/95 (v/v) methanol/20 mM fosfátový pufr, pH 3,0, průtoková rychlost 0,7 ml.min⁻¹, UV detekce při 290 nm) byl analyzován extrakt z integumentu ploštice *Graphosoma semipunctatum*.

Abstract

Pterines belong to an important group of compounds, acting as pigments in many species. Some of them are probably responsible for characteristic coloration of the insect group (*Hereroptera*). This coloration is considered to be a visual warning signal for optically orientating predators (birds, lizards etc.). In this work, pterines in the species of *Graphosoma semipunctatum* have been investigated by high performance liquid chromatography. To develop an appropriate separation method, the reverse-phase separation mode with C18 stationary phase (Spherisorb ODS 2) and binary mobile phase (organic modifier/buffer or water) was used. The effect of type and content of organic modifiers (methanol, ethanol, tetrahydrofuran) and concentration of phosphate buffer pH 3.0 (10 - 30 mM) in the mobile phases on retention and separation behavior of the studied pterines (leukopterin, biopterin, xanthopterin, isoxanthopterin and erythropterin) was studied. Under the optimized separation conditions (5/95 (v/v) methanol/20 mM phosphate buffer, pH 3.0, flow rate 0.7 ml.min⁻¹, UV detection at 290 nm), the extract from the integument of *Graphosoma semipunctatum* was analyzed.

Obsah

1	Seznam zkratk	3
2	Úvod	5
3	Teoretická část	6
3.1	Pteriny a jejich vlastnosti.....	6
3.2	Studované analyty	7
3.3	Použité metody pro stanovení derivátů pteridinu	10
3.3.1	Spektrometrie	10
3.3.2	Kapilární elektroforéza.....	10
3.3.3	Chromatografické metody.....	11
3.4	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie	12
3.4.1	Rozdělovací kapalinová chromatografie	14
3.4.2	Příprava chemicky vázaných fází	15
4	Experimentální část	16
4.1	Použité chemikálie.....	16
4.2	Použité analyty	16
4.3	Použité přístroje.....	16
4.4	Postup přípravy pufrů, zásobních roztoků analytů a reálného vzorku	17
4.4.1	Příprava pufrů.....	17
5	Výsledky a diskuze	18
5.1	Separace na koloně Spherisorb ODS-2	18
5.2	Separace reálného vzorku šitku <i>Graphosoma semipunctatum</i>	21
6	Závěr	24
7	Literatura	25

1 Seznam zkratek

A_s	faktor asymetrie
c	molární koncentrace
c_m	koncentrace solutu v mobilní fázi
c_s	koncentrace solutu ve stacionární fázi
F_m	průtok mobilní fáze
k	retenční faktor
K_D	distribuční konstanta
m_m	hmotnost složky v mobilní fázi
M_r	relativní molekulová hmotnost
m_s	hmotnost složky ve stacionární fázi
pK_a	záporný dekadický logaritmus disociační konstanty
$pK_{a,1}$	záporný dekadický logaritmus disociační konstanty do prvního stupně
$pK_{a,2}$	záporný dekadický logaritmus disociační konstanty do druhého stupně
T	teplota
t'_R	redukovaný retenční čas
t_M	mrtvý retenční čas
t_R	retenční čas
T_t	teplota tání
T_v	teplota varu
$T_{vzpl.}$	teplota vzplanutí
V'_R	redukovaný retenční objem
V_M	mrtvý retenční objem
V_m	objem mobilní fáze
V_R	retenční objem
V_s	objem stacionární fáze
λ	vlnová délka
ρ	hustota
BIO	biopterin

CAS	Chemical Abstracts
CASRN	registrační číslo CAS
DMSO	dimethylsulfoxid
ERY	erythropterin
EtOH	ethanol
GTP	guanosintrifosfát
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IR	infračervená oblast
ISO	isoxanthopterin
LEU	leukopterin
MeOH	methanol
MF	mobilní fáze
MS	hmotnostní spektrometrie
NPC	chromatografie s normálními fázemi
RPC	chromatografie s obrácenými fázemi, reverzní chromatografie
TFA	trifluoroctová kyselina
THF	tetrahydrofuran
TLC	tenkovrstvá chromatografie
UV	ultrafialová oblast
XAN	xanthopterin

2 Úvod

Mezi nejvýznamnější skupinu přírodních pigmentů patří pteriny. Vysoké koncentrace pterinů se nacházejí u hmyzu, obojživelníků, plazů, ryb a dokonce je můžeme najít i v mořském planktonu. V křídlech motýlů se vyskytuje červený erythropterin, žlutý leukopterin a oranžový xanthopterin. Xanthopterin se dále vyskytuje i v těle krabů¹.

Pteriny jsou přítomny i v lidských tělních tekutinách. Nejprve byly objeveny v moči, která je snadno dostupná v neomezeném množství. Zvýšená koncentrace neopterinu byla nalezena v séru nebo moči u pacientů, kteří trpí rakovinou. Objevení dalších takových látek, které by mohly sloužit jako markery těchto onemocnění, by umožnilo ještě před klinickými projevy onemocnění zahájit včasnou léčbu.

U některých druhů ploštic lze nalézt pteriny v zabarvení jejich štítků. Kresba a velikost skvrn, popřípadě pásků na různobarevném podkladě, je u každé ploštice trochu odlišná. Její výrazné zabarvení ji chrání před predátory – ptáky. Tímto zabarvením dává najevo, že není jedlá a to ji ochraňuje. Je známo, že se barva těchto štítků mění s ročním obdobím.

Cílem této práce bylo vyzkoušet jiné experimentální podmínky, které by mohly vést ke zlepšení separace pěti vybraných derivátů pterinů (biopterin, erythropterin, isoxanthopterin, leukopterin a xanthopterin) a následně provést analýzu pigmentů z integumentu ploštice *Graphosoma semipunctatum* (obr. 1). Integument kryje všechny části povrchu ploštic jako je kutikula a epidermis. Tato práce navazuje na některé dílčí výsledky získané z diplomové práce Jany Vaníkové².

3 Teoretická část

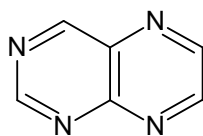
3.1 Pteriny a jejich vlastnosti

První žlutý pigment byl izolován z křídel motýlů (čeleď Pieridae³) již v roce 1889⁴. Časem takových látek přibývalo a tato skupina pigmentů dostala název pteriny.



Obr.1: *Graphosoma semipunctatum*, převzato z^{5,6}

Primárním skeletem pterinových pigmentů je pteridin. Je to aromatický heterocyklus, který se skládá z pyrimidinu a pyrazinu. Pteriny spolu s lumaziny patří mezi deriváty pteridinu. Pteriny lze také rozdělit podle velikosti substituovaného kruhu, a to na konjugované a nekonjugované. Rozdíl mezi nimi spočívá v tom, že konjugované mají na pteridinovém cyklu navázány větší substituenty a nekonjugované menší substituenty. Mezi konjugované pteriny patří např. listová kyselina, riboflavin a mezi nekonjugované např. leukopterin, xanthopterin, biopterin aj.



Pteridin

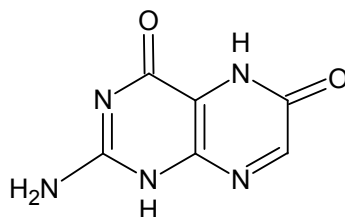
Pteriny jsou fotosenzitivní sloučeniny, to znamená, že pokud jsou vystaveny světlu, rozkládají se na různé deriváty pteridinu. Další zajímavou vlastností je jejich silná fluorescence, která se může lišit v různých oblastech pH. Například xanthopterin v kyselé oblasti vykazuje červenou fluorescenci, zatímco v alkalické oblasti vykazuje modrou fluorescenci⁷.

Vyskytují se jak v oxidovaných, tak v redukováných formách. Redukované formy vzdušným kyslíkem snadno podlehnou oxidaci a mají silné antioxidační účinky. Štěpením guanosintrifosfátu (GTP) začíná biosyntéza všech známých pterinů⁴.

3.2 Studované analyty

V následující části budou uvedeny strukturální vzorce a v tabulkách 1-2 vypočítané a experimentálně získané konstanty studovaných analytů. Všechny konstanty byly získány pomocí Chemical Abstracts a vypočítány pomocí programu ACD/labs V8.14.

Xanthopterin ($M_r = 179,14$)

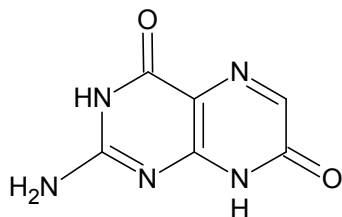


2-amino-4,6(3H,5H)-pteridindion

CASRN: 119-44-8

Xanthopterin je žlutá krystalická látka, která není rozpustná v běžných organických rozpouštědlech a ve vodě, ale je rozpustná v horkém ethylenglykolu a glycerolu⁷. Tato látka poskytuje murexidovou reakci, protože vykazuje jistou podobnost s kyselinou močovou, avšak je stabilnější vůči kyselině dusičné než kyselina močová.

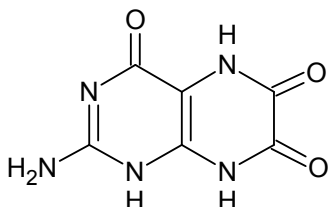
Murexidová reakce je založena na oxidaci pevného vzorku v kyselém prostředí, kdy po následném odpaření a přidání amonných iontů vzniká purpurové zbarvení, které náleží murexidů⁸. Jedná se o prokázání kyseliny močové a purinů.

Isoxanthopterin ($M_r = 179,14$)

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

CASRN: 529-69-1

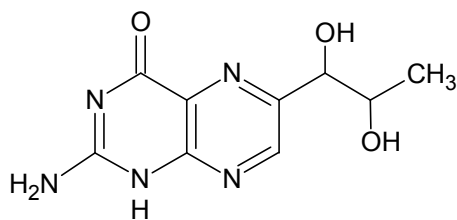
Isoxanthopterin je bezbarvá krystalická látka⁷, která se liší od xanthopterinu v poloze ketonové skupiny.

Leukopterin ($M_r = 195,14$)

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

CASRN: 492-11-5

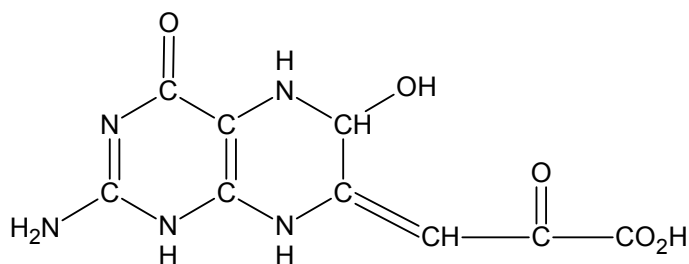
Leukopterin je bezbarvá krystalická látka, která je rozpustná v amoniaku. Tato sloučenina také poskytuje murexidovou reakci⁷. Dříve se předpokládalo, že leukopterinu je kyselina močová³.

Biopterin ($M_r = 237,22$)

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

CASRN: 22150-76-1

U člověka byl biopterin poprvé objeven v moči. Existuje v redukované formě – 5,6,7,8-tetrahydrobiopterin a v oxidované formě – dihydrobiopterin. Redukovaná forma biopterinu funguje jako kofaktor některých monooxygenas⁴.

Erythropterin ($M_r = 265,18$)

2-oxo- 3-(2-amino-4,5,6,8-tetrahydro-4,6-dioxo-7(3H)-pteridinylidene)

CASRN: 7449-03-8

Erythropterin je červenooranžové barvivo. Červené nebo oranžové zabarvení křídel některých motýlů je způsobeno obsahem tohoto barviva^{1,9}.

Tabulka 1: Vypočítané konstanty studovaných analytů. Xanthopterin (XAN), isoxanthopterin (ISO), leukopterin (LEU), biopterin (BIO) a erythropterin (ERY). Kde ρ - hustota v $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ při teplotě 20 °C a tlaku 760 torr ≈ 101325 Pa; T_v – teplota varu ve °C při tlaku 760 torr ≈ 101325 Pa; $T_{vzpl.}$ – teplota vzplanutí ve °C; $pK_{a,1}$ – záporný dekadický logaritmus disociační konstanty při teplotě 25 °C.

Analyty	ρ $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$	T_v °C	$T_{vzpl.}$ °C	$pK_{a,1}$ -	$pK_{a,2}$ -
XAN	$2,17 \pm 0,1$	-	-	$4,77 \pm 0,2$	$9,42 \pm 0,2$
ISO	$2,17 \pm 0,1$	-	-	$7,32 \pm 0,2$	$11,32 \pm 0,2$
LEU	$2,45 \pm 0,1$	-	-	$0,43 \pm 0,2$	$6,74 \pm 0,2$
BIO	$1,86 \pm 0,1$	$502,6 \pm 53,0$	$257,7 \pm 30,9$	$3,19 \pm 0,4$	$13,5 \pm 0,2$
ERY	$2,16 \pm 0,1$	-	-	$1,54 \pm 0,5$	$3,94 \pm 0,2$

- nenalezená hodnota v CAS

Tabulka 2: Experimentální konstanty studovaných analytů. Xanthopterin (XAN), isoxanthopterin (ISO), erythropterin (ERY) (ρ – hustota v $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$, T_v – teplota varu ve °C, T_t – teplota tání ve °C).

Analyty	ρ $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$	T_v °C	T_t °C
XAN	1,559 [cit. 10]	98 – 100 [cit. 10]	>300 [cit. 11]; >410
ISO	-	-	>300 [cit. 11]
LEU	-	-	>300 [cit. 12]

- nenalezená hodnota v CAS

3.3 Použité metody pro stanovení derivátů pteridinu

Deriváty pteridinu se nejčastěji stanovují v lidské moči, dále pak v plazmě, séru nebo v mozkomíšním moku⁴. Nejvíce se využívají chromatografické metody, počínaje papírovou chromatografií až po vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií. Dále se pak používají spektrometrické metody nebo kapilární elektroforéza.

3.3.1 Spektrometrie

Měření spekter derivátů pteridinů je důležité z hlediska určení jejich struktury. Porovnáním spektra standardu se spektrem směsi různých látek lze identifikovat jednotlivé komponenty, ze kterých se směs skládá. Existují rozsáhlé databáze a knihovny spekter jak v tištěné tak v elektronické podobě. Pomocí spekter bylo možné identifikovat pteriny obsažené v pigmentech různých matric.

Xanthopterin, isoxanthopterin, 6-karboxypterin a další pteriny byly nalezeny ve hřbetní kůži žab na základě porovnání UV, IR a MS spekter se standardy. Za zbarvení těla žab jsou zodpovědné melaniny, karotenoidy, pteridiny a guaniny¹³.

Xanthopterin byl také nalezen v těle jedovatých orientálních sršňů. Melanin poskytuje hnědé zbarvení a ochraňuje sršně proti slunci, xanthopterin mu zase propůjčuje žluté zbarvení. Žluté granule se tvoří asi 2 dny před vylíhnutím. Jejich produkce trvá asi 3 dny¹⁴.

3.3.2 Kapilární elektroforéza

Kapilární elektroforézou s detekcí založenou na laserem indukované fluorescenci byly analyzovány deriváty pteridinů v lidské moči u zdravých pacientů a pacientů s rakovinou. Každá skupina nádorových chorob se vyznačuje různými koncentracemi derivátů pteridinů v moči. Nalezené limity detekce byly velmi nízké – méně než $1 \cdot 10^{-10}$ M. V moči byl identifikován neopterin, pterin, xanthopterin a pterin-6-karboxylová kyselina a bylo zjištěno, že koncentrace těchto pterinů byly zvýšené v moči u pacientů s rakovinou. Množství isoxanthopterinu bylo snižené a žádná významná změna nebyla zjištěna u biopterinu¹⁵.

3.3.3 Chromatografické metody

Pomocí chromatografických metod byly analyzovány různé deriváty pteridinu – pterin, xanthopterin, isoxanthopterin, biopterin, leukopterin, pterin-6-karboxylová kyselina, neopterin, erythropterin a další. Některé z těchto pterinů byly analyzovány pomocí papírové a tenkovrstvé chromatografie (TLC).

Xanthopterin byl analyzován v lidské moči pomocí TLC ve směsi propan-1-ol:čpavková voda v poměru 2:3 (v/v)¹⁶. Barevné změny byly pozorovány a analyzovány v *Halyomorpha brevis* (*Heteroptera: Pentatomidae*) pomocí papírové chromatografie ve 3 vyvíjecích soustavách (3% NH₄Cl, 2% mravenčí kyselina a 0,3% roztok citrátu) s následnou UV detekcí při 312 nm a byl identifikován erythropterin, leukopterin, isoxanthopterin a kyselina močová¹⁷.

Pomocí HPLC byla nalezena velmi pestrá škála derivátů pteridinu. Metodou RPC bylo nalezeno 8 nekonjugovaných derivátů pteridinu: pterin-6-karboxylová kyselina, erythro-neopterin, threo-neopterin, xanthopterin, isoxanthopterin, 6-hydroxymethylpterin, biopterin a pterin. Tyto deriváty byly nalezeny v banánech, různých semenech, rýži, špenátu, hrášku, bobech, arašídech, pistáciích aj. v řádech jednotek až desítek ng na g plodu. K této separaci byla použita kolona SS-10 ODS-B (250 x 4,6 mm I.D., zrnění 10 μm), mobilní fáze byl 5% vodný roztok methanolu, $F_m = 1,25 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ s fluorescenční detekcí. Excitace byla provedena při $\lambda = 365 \text{ nm}$ a emise při $\lambda = 440 \text{ nm}$ ¹⁸.

V extraktech ruměnice pospolné, která se jako druh plošnice hojně vyskytuje ve střední Evropě, byl identifikován: neopterin, biopterin, isoxantholumazin (violapterin), isoxanthopterin a 7-methylxanthopterin. Biopterin a neopterin byl v ruměnici pospolné nalezen poprvé. K této separaci byla použita kolona C₁₈ μ-Bondapak (300 x 9 mm I.D.), mobilní fáze 4/96 (v/v) MeOH/10 mM fosfátový pufr (pH = 3,2), $F_m = 1,0 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ s fluorescenční detekcí (excitace $\lambda = 335 \text{ nm}$, emise $\lambda = 440 \text{ nm}$). Pro 7-methylxanthopterin byla excitace provedena při $\lambda = 365 \text{ nm}$ a emise při $\lambda = 490 \text{ nm}$ ¹⁹.

V práci Jany Vaníkové² byl analyzován integument dvou vybraných ploštic. Standardy se rozpouštěly v dimethylsulfoxidu a pro optimalizaci separace byly použity mobilní fáze s vysokým obsahem vodného roztoku 20 mM fosfátového pufru a methanolem jako organickým modifikátorem mobilní fáze. Díky přirozené fluorescenci pterinů byla proměřena jejich fluorescenční spektra a bylo zjištěno, že při použití

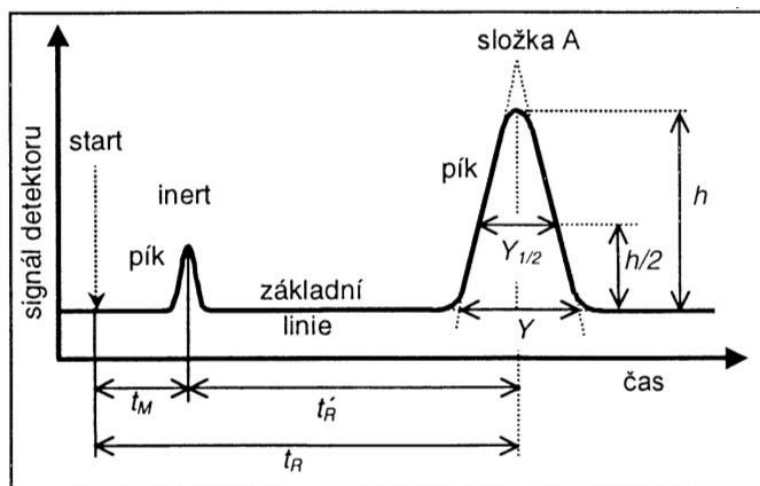
fluorescenčního detektoru je vhodné zvolit pro excitaci $\lambda = 372$ nm a pro emisi $\lambda = 428$ nm. Pro UV detekci byla jako nejvhodnější nalezena vlnová délka 290 nm.

Pro separaci byly vyzkoušeny tři kolony - Purospher C18, LiChrospher RP-8 a Spherisorb ODS-2. Důvodem pro použití tří kolon byla skutečnost, že na prvních dvou kolonách nebylo dosaženo dostatečně dlouhé retence a analyty by se nedaly od sebe oddělit ve směsi, nebo by docházelo k vzájemné koeluci standardů. Jako nejvhodnější se jevila kolona Spherisorb ODS-2 a separační podmínky: MF 5/95 (v/v) MeOH/20mM fosfátový pufr (pH = 3,0), $F_m = 0,7$ ml.min⁻¹ a UV detekce při $\lambda = 290$ nm.

3.4 Vysokoučinná kapalinová chromatografie

Je metoda, při které se separují složky obsažené ve vzorku. Chromatografie je děj, při kterém se vzorek nanáší mezi dvě nemísitelné fáze. Stacionární fáze je nepohyblivá a skládá se nejčastěji z malých, pravidelných částic, které vyplňují celou kolonu. Mobilní fáze je pohyblivá a jejím pohybem přes fázi stacionární je vzorek unášen. Složky vzorku jsou různě zachycovány (zdržovány), a tím dochází k separaci, kdy jako první z kolony vystupují složky, které jsou nejméně zachycovány a jako poslední ty, které jsou stacionární fází poutány nejsilněji. U výstupu z kolony je citlivý detektor, který reaguje na přítomnost separovaných složek.

Detektor vysílá signál, který je zaznamenáván počítačem, v závislosti na čase. Počítač vyhodnotí signál ve formě chromatogramu, který se skládá z řady píků (obr. 2).



Obr 2: Chromatogram (převzato z ²⁰)

Složky vzorku jsou různě zadržovány stacionární fází, a proto stráví v koloně různě dlouhou dobu. Tato doba se nazývá retenční čas t_R . Některé složky nemusí být zadržovány stacionární fází vůbec, pak je jejich retenční čas stejná jako mrtvý retenční čas t_M . Čas, který stráví složky ve stacionární fází, se nazývá redukovaný retenční čas t'_R :

$$t_R = t_M + t'_R \quad (1)$$

Vynásobíme-li retenční čas objemovým průtokem F_m , získáme objem mobilní fáze potřebný k eluci složky – retenční objem V_R . Stejně to platí i pro mrtvý retenční objem (V_M) a redukovaný retenční objem V'_R :

$$V_R = t_R F_M = t_M F_m + t'_R F_m = V_M + V'_R \quad (2)$$

Retenční veličiny (objem i čas) se využívají pro kvalitativní analýzu, a proto za daných podmínek můžeme složky vzorku charakterizovat jejich retenčními časy nebo objemy. Kvantitativní informaci nám poskytuje distribuční konstanta K_D . Je to rovnovážný poměr koncentrací, nebo doby, kterou složky stráví ve stacionární a mobilní fází.

$$K_D = \frac{c_s}{c_m} = \frac{t'_R}{t_M} \quad (3)$$

$$\frac{c_s}{c_m} = \frac{M_r \cdot V_m \cdot m_s}{M_r \cdot V_s \cdot m_m} \Rightarrow \frac{m_s}{m_m} = \frac{c_s}{c_m} \cdot \frac{V_s}{V_m} \quad (4)$$

Kde je: c_s - koncentrace solutu ve stacionární fází, c_m - koncentrace solutu v mobilní fází, M_r – relativní molekulová hmotnost, V_m – objem mobilní fáze, V_s – objem stacionární fáze, m_s – hmotnost složky ve stacionární fází, m_m – hmotnost složky v mobilní fází.

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

Jednou z nejpoužívanějších a nejzákladnějších veličin v chromatografii je retenční faktor k , který říká, o kolik více času stráví složka ve stacionární fázi než ve fázi mobilní.

3.4.1 Rozdělovací kapalinová chromatografie

Nejčastěji používaným typem kapalinové chromatografie je dnes rozdělovací chromatografie. V rozdělovací chromatografii se složky rozdělují mezi dvě nemísitelné kapalné fáze. Složky jsou unášeny mobilní fází, stacionární fázi je kapalina zakotvena na pevném nosiči.

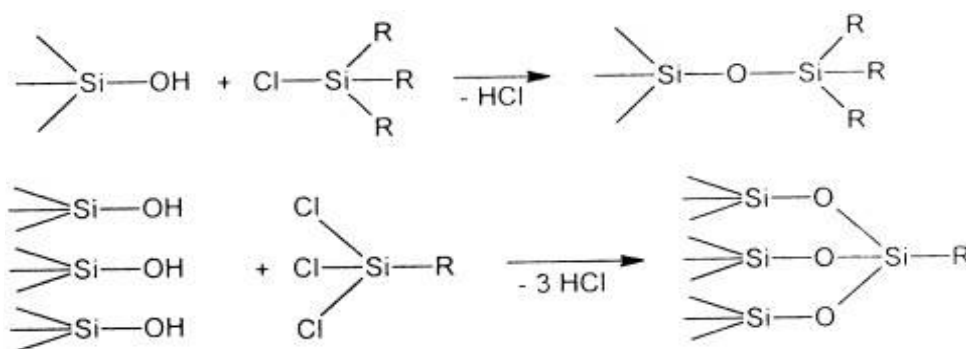
V počátcích vývoje kapalinové chromatografie se používaly systémy, kdy stacionární fáze byla polárnější než fáze mobilní, tzn. zvýšením polaritý mobilní fáze se snižuje retenční čas složek. Stacionární fází může být voda na silikagelu a mobilní fází např. hexan. Nejrychleji opouští kolonu složka, která je nejméně polární. Polární složky opouštějí kolonu jako poslední. Platí pravidlo, že „podobné se rozpouští v podobném“. Jde o chromatografii na normálních fázích NPC (Normal-Phase Chromatography). Interakce polárních látek se stacionární fází může být natolik silná, že celá separace může trvat velmi dlouhou dobu. Takový systém je však z ekonomického hlediska nepoužitelný, protože by se spotřeboval velký objem rozpouštědla. Proto byla vyvinuta metoda, při které je celý systém „obrácený“. Mobilní fáze je polárnější než fáze stacionární – chromatografie na obrácených fázích RPC (Reverse-Phase Chromatography). Jako stacionární fáze se mohou použít různé uhlovodíky nebo alkyly navázané na silikagel a jako mobilní fází lze použít např. vodu nebo acetonitril. RPC má široký aplikační okruh – asi 80 % veškerých aplikací. Dále dochází k rychlejšímu ustavení rovnováhy v koloně, separace je rychlejší a reprodukovatelnější. Mobilní fáze jsou levnější a lépe se s nimi pracuje (binární směsi organických rozpouštědel (methanol, acetonitril aj.) s vodou nebo pufrem). RPC se hodí pro látky, které mají $M_r < 2000$.

V praxi nešlo zcela splnit podmínku nemísitelnosti stacionární a mobilní fáze. Tuto nevýhodu odstranily až stacionární fáze, kdy kapalina je chemicky navázaná na nosič tzv. chemicky vázané stacionární fáze.

Jako nosič se nejvíce využívá silikagel (SiO_2), který se vyrábí z křemičitanu sodného. Na povrchu silikagelu jsou silanolové ($-\text{SiOH}$) a siloxanové ($-\text{Si-O-Si-}$) skupiny. Přítomnost silanolových skupin propůjčuje silikagelu kyselý charakter.

3.4.2 Příprava chemicky vázaných fází

Reakcí silanolových skupin silikagelu s mono-, di- a trichloralkylsilanovou sloučeninou lze připravit stacionární fáze s různými vlastnostmi. Rozhodující vliv na charakter chromatografického materiálu má navázaná alkylová (modifikační) skupina. Schéma vzniku těchto fází je znázorněno na obr. 3. Takto se připravují např. fáze s navázanou ethylovou, oktylovou, oktadecylovou, fenylovou, aminovou nebo kyanopropylovou skupinou. Nejpoužívanější stacionární fáze jsou s navázaným oktylovým (C_8) nebo oktadecylovým (C_{18}) řetězcem, protože jsou nepolární a jako mobilní fáze lze použít vodné roztoky organických rozpouštědel. Čím delší je navázaný alkylový řetězec, tím více má materiál nepolární charakter.



Obr. 3: Vznik chemicky vázaných fází (převzato z ²⁰)

Důležitým faktem je, že se pro derivatizaci nevyužijí všechny silanolové skupiny, a ty zbylé se pak podílejí na nežádoucích elektrostatických (silanofilních) interakcích. Tyto skupiny lze blokovat dodatečnou silanizací např. s trimethylchlorsilanem, tzv. endcapping. Další nevýhodou stacionárních fází se silikagelovým nosičem je omezený pracovní rozsah pH a to 2 – 8. V alkalické oblasti se silikagel rozpouští a při nízkých hodnotách pH dochází k hydrolyze vazby mezi silikagelem a alkylovým řetězcem.

4 Experimentální část

4.1 Použité chemikálie

- Kyselina trihydrogenfosforečná (85%, p.a., Lach – Ner s.r.o., ČR)
- Trifluoroctová kyselina (98%, Fluka Chemie, Německo)
- Ethanol (96%, Lachema, ČR)
- Methanol CHROMASOLV pro HPLC (99,9%, Sigma Aldrich, Německo)
- Amoniak (25 – 27%, p.a., Penta, ČR)
- Tetrahydrofuran CHROMASOLV pro HPLC (Sigma Aldrich, Německo)
- Deionizovaná voda Milli Q, Millipore (Milford, USA)

4.2 Použité analyty

- 6-biopterin (97%, Sigma Aldrich, Německo)
- Leukopterin (95%, Sigma Aldrich, Německo)
- Xanthopterin, monohydrát (97%, Sigma Aldrich, Německo)
- Isoxanthopterin (97,5%, Sigma Aldrich, Německo)
- Erythropterin (Serva Heidelberg, Německo)
- *Graphosoma semipunctatum* (poskytnuto Mgr. Alicí Exnerovou, Ph.D. a Prof. RNDr. Pavlem Štysem, CSc., Katedra zoologie, PřF UK, Praha, původ Kypr)

4.3 Použité přístroje

Standardy pterinů byly váženy na analytických vahách APX – 100 (Denver Instrument, Německo). Mobilní fáze byly odplyněny v ultrazvuku LC30H (Elma, ČR).

K separaci vzorků byl použit kapalinový chromatograf, který se skládal z vysokotlaké pumpy LC/XPD a UV detektoru PU4020 (PYE UNICAM, UK). Vzorky byly dávkovány šesticestným ventilem RHEODYNE 7725 (Cotati, California, USA) se smyčkou o objemu 20 µl pomocí stříkačky Hamilton o objemu 20 µl (Reno, Nevada, USA).

Všechna měření byla prováděna při laboratorní teplotě $T = (21 \pm 2) ^\circ\text{C}$. Ke sběru a vyhodnocení dat byly použity programy Clarity 2.8.1.584 (DataApex, ČR) a Origin 8 (OriginLab Corporation, USA). Požadované pH pufru bylo upravováno pomocí pH metru 4330 (Jenway, UK).

Separace byly prováděny na koloně 250-4 Spherisorb ODS-2 s oktadecylovými řetězci navázanými na silikagelový nosič, 250 x 4,6 mm I.D., zrnění 5 μm (Waters, USA) s předklonkou 4-4 LiChrospher 60 RP-select B, 10 x 4 mm I.D. (Merck, Německo).

4.4 Postup přípravy pufrů, zásobních roztoků analytů a reálného vzorku

4.4.1 Příprava pufrů

Fosfátový pufr o koncentraci 20 mM byl připraven přidáním 0,580 ml kyseliny trihydrogenfosforečné do 450 ml deionizované vody a pH pufru bylo upraveno přidáním vodného roztoku amoniaku až na požadovanou hodnotu ($\text{pH} = 3$). Objem pufru byl pak doplněn v odměrné baňce na celkový objem 500 ml. Pufrů o koncentraci 10 mM ($\text{pH} = 3$) a 30 mM ($\text{pH} = 3$) byly připraveny obdobným způsobem. V případě 10 mM koncentrace bylo přidáno 0,290 ml a pro 30 mM koncentraci bylo přidáno 0,870 ml kyseliny trihydrogenfosforečné.

Zásobní roztoky leukopterinu, biopterinu, xanthopterinu a isoxanthopterinu byly připraveny rozpouštěním 0,25 mg standardu v 2 ml dimethylsulfoxidu (DMSO). Byly uchovávány v tmavých vialkách, aby byly chráněny před světlem a při teplotě $5 ^\circ\text{C}$. Zásobní roztok erythropterinu byl připraven obdobným způsobem navážením 0,1 mg standardu, který byl rozpuštěn v 1 ml DMSO.

Vystříhané oranžově zabarvené proužky s příměsí černých pigmentů (1 mg) z *Graphosoma semipunctatum* byly rozdrceny a rozpuštěny v 0,5 ml DMSO. Vzniklý roztok byl ve vialce na 45 minut vložen do ultrazvuku za současného zahřívání na $50 ^\circ\text{C}$. Protože se nerozpustily všechny oranžově zabarvené proužky s černými pigmenty, byl poté roztok přefiltrován pomocí injekční stříkačky s nasazeným filtrem (velikost pórů 5 μm) a uchován v tmavé vialce při teplotě $5 ^\circ\text{C}$.

5 Výsledky a diskuze

5.1 Separace na koloně Spherisorb ODS-2

Na základě diplomové práce Jany Vaníkové² bylo pro separaci pterinů pokračováno na koloně 250-4 Spherisorb ODS-2. Výsledky získané v její práci ukázaly, že jako nejvhodnější se v kombinaci s touto kolonou jevíly následující experimentální podmínky: 5/95 (v/v) MeOH/20 mM fosfátový pufr pH 3,0, průtok $F_m = 0,7 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, UV detekce při 290 nm. Jak již bylo uvedeno v kapitole 3.3.3, v tomto experimentálním uspořádání docházelo ke vzájemné koeluci standardů leukopterinu a xanthopterinu.

Nejdříve bylo vyzkoušeno zda změna koncentrace fosfátového pufru nebude mít vliv na prodloužení retence a symetrii píků. Výsledek této separace je shrnut v tabulce 3.

Tabulka 3: Vliv změny koncentrace fosfátového pufru na retenci studovaných analytů v mobilní fázi 5/95 (v/v) MeOH/fosfátový pufr, pH 3,0, průtok $F_m = 0,7 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, UV detekce při 290 nm (c – koncentrace pufru v $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ (M), xanthopterin (XAN), isoxanthopterin (ISO), leukopterin (LEU), biopterin (BIO), erythropterin (ERY) , k – retenční faktor, A_s – faktor asymetrie).

c (mM)		XAN	ISO	LEU	BIO	ERY
10	k	1,31	2,20	1,19	1,67	1,16
	A_s	0,87	0,51	0,40	0,63	0,47
20	k	1,47	2,55	1,51	2,02	1,37
	A_s	0,79	0,55	0,53	0,43	0,61
30	k	1,19	2,42	1,21	1,57	1,07
	A_s	0,77	0,61	0,37	0,62	0,58

Při použití 20 mM fosfátového pufru byla retence nejdelší. Nejvíce symetrické píky byly pozorovány při použití 10 mM a 20 mM pufru, ale z důvodu pravděpodobného výskytu isoxanthopterinu, leukopterinu a erythropterinu v integumentu plošnice je pro další použití výhodnější 20 mM pufr. Při použití 30 mM fosfátového pufru se navíc u leukopterinu a erythropterinu velmi zhoršila symetrie píků.

Dále bylo zkoumáno, zda přídavek trifluoroctová kyseliny (TFA), používané jako iontově-párové činidlo, nebude mít vliv na retenci. Všechny studované analyty se

vyznačují tím, že mají v poloze 2 navázanou aminoskupinu, která je v kyselém prostředí protonizována. Výsledek této separace je shrnut v tabulce 4.

Tabulka 4: Vliv přídavku TFA do mobilní fáze na retenci studovaných analytů v mobilní fázi 5/95 (v/v) MeOH/vodný roztok TFA, průtok $F_m = 0,7 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, UV detekce při 290 nm (c_{TFA} – koncentrace vodného roztoku TFA v %, xanthopterin (XAN), isoxanthopterin (ISO), leukopterin (LEU), biopterin (BIO), erythropterin (ERY), k - retenční faktor).

c_{TFA} (%)		XAN	ISO	LEU	BIO	ERY
0,00	k	1,50	2,55	1,51	1,90	1,35
0,05	k	1,36	2,41	1,29	1,49	1,29
0,10	k	1,53	2,53	1,33	1,29	1,38

Z tabulky 4 je vidět, že v přítomnosti vyšší proměřované koncentrace TFA došlo u xanthopterinu a erythropterinu k velmi mírnému prodloužení retence, zatímco retence isoxanthopterinu se naopak velmi mírně zkrátila. U leukopterinu a biopterinu došlo k výraznějšímu zkrácení retence v přítomnosti vyšší proměřované koncentrace TFA. Přidání TFA nemělo výraznější vliv na prodloužení retence.

Protože studované analyty jsou špatně rozpustné ve vodě, bylo vyzkoušeno, zda použití tetrahydrofuranu (THF) jako organického modifikátoru namísto methanolu nepřinese výraznější prodloužení retence, protože THF je méně polární než methanol.

Separace byla prováděna při těchto experimentálních podmínkách: složení mobilní fáze (40/60, 20/80, 10/90 a 5/95) (v/v) THF/H₂O, průtok $F_m = 0,7 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, UV detekce při 290 nm. I přes snižující se obsah THF eluovaly analyty velmi rychle z kolony a téměř s mrtvým časem. Použití THF tedy nepřineslo žádné zlepšení.

Dále byl zkoušen ethanol jako organický modifikátor mobilní fáze, který je mnohem více polární než THF, ale méně polární než methanol. Výsledek této separace je zobrazen v tabulce 5.

Tabulka 5: Vliv obsahu ethanolu v mobilní fázi EtOH/H₂O či 20mM fosfátový pufr pH 3,0, na retenci a symetrii studovaných analytů, průtok $F_m = 0,7 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, UV detekce při 290 nm (MF – mobilní fáze, xanthopterin (XAN), isoxanthopterin (ISO), leukopterin (LEU), biopterin (BIO), erythropterin (ERY), k – retenční faktor, A_s – faktor asymetrie).

MF (v/v)		XAN	ISO	LEU	BIO	ERY
5/95 ^a	k	0,68	1,23	0,60	1,16	0,35
	A_s	0,55	0,74	0,49	0,81	1,23
5/95 ^b	k	0,55	0,95	0,56	0,59	-
	A_s	0,96	0,83	0,74	0,50	-
3/97 ^a	k	1,10	1,66	0,93	1,51	0,40
	A_s	1,43	0,45	0,41	0,79	0,58

- eluce s mrtvým časem

^a EtOH/H₂O

^b EtOH/20 mM fosfátový pufr pH 3,0

U všech analytů došlo k velmi výraznému snížení retence, dokonce erythropterin v mobilní fázi s 20 mM fosfátovým pufrem o pH 3,0 eluoval s mrtvým časem. Avšak, při použití ethanolu v kombinaci s 20 mM fosfátovým pufrem jako mobilní fáze se velmi výrazně zlepšila symetrie píku.

Při použití methanolu jako organického modifikátoru je retence nejdelší, u ethanolu je naopak nejlepší symetrie píků, proto byla vyzkoušena mobilní fáze tvořená směsí methanolu a ethanolu. V tabulce 6 jsou zaznamenány výsledky získané v mobilní fázi 3/2/95 (v/v/v) MeOH/EtOH/H₂O a pro srovnání i v mobilní fázi 5/95 (v/v) MeOH/20 mM fosfátový pufr pH 3,0.

Tabulka 6: Vliv změny složení mobilní fáze na retenci a symetrii píků studovaných analytů v MF 3/2/95 (v/v/v) MeOH/EtOH/H₂O a MF 5/95 (v/v) MeOH/20 mM fosfátový pufr, pH 3,0, průtok $F_m = 0,7 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, UV detekce při 290 nm (MF – mobilní fáze, xanthopterin (XAN), isoxanthopterin (ISO), leukopterin (LEU), biopterin (BIO), erythropterin (ERY), k – retenční faktor, A_s – faktor asymetrie).

MF		XAN	ISO	LEU	BIO	ERY
5/95	k	1,47	2,55	1,51	2,02	1,37
	A_s	0,79	0,55	0,53	0,43	0,61
3/2/95	k	0,93	1,47	0,75	1,40	0,76
	A_s	0,59	0,67	0,44	0,73	0,69

Použití směsi methanolu a ethanolu nepřineslo žádnou změnu. U xanthopterinu, leukopterinu, biopterinu a erythropterinu se retence snížila a u isoxanthopterinu se retence velmi výrazně snížila. Symetrie píku se výrazněji zlepšila u biopterinu, u xanthopterinu zhoršila, u ostatních látek se výrazněji nezměnila.

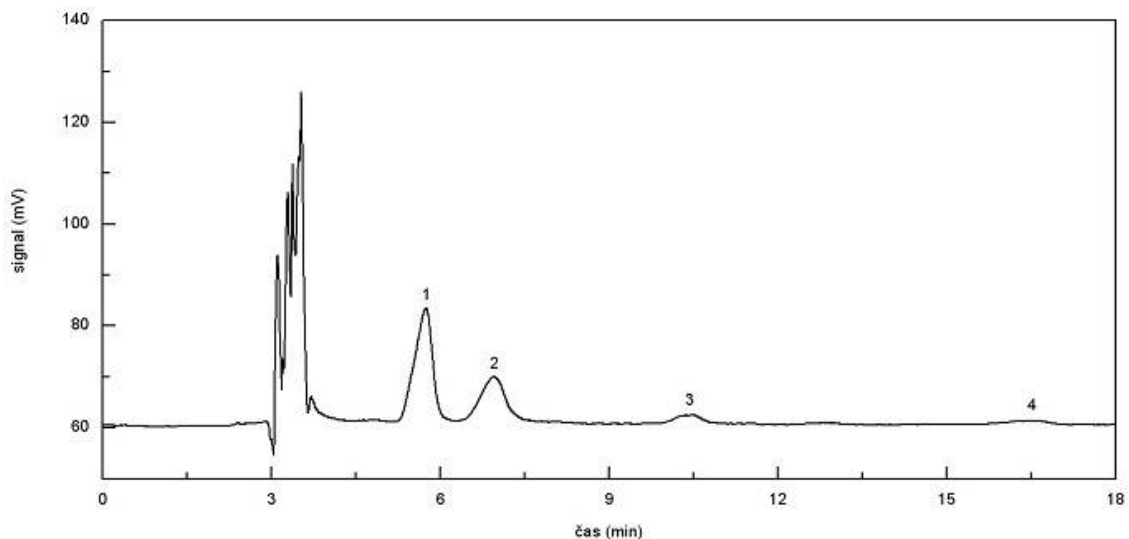
Použití mobilních fází s různou koncentrací fosfátového pufru, přidavkem trifluoroctové kyseliny, použitím tetrahydrofuranu, ethanolu a směsi methanolu/ethanolu jako organického modifikátoru nepřineslo žádné podstatnější prodloužení retence. Protože ve všech testovaných mobilních fázích eluuje xanthopterin, leukopterin a erythropterin téměř ve stejném čase, nešlo by tyto látky vzájemně od sebe ve směsi separovat.

Z dosažených výsledků je zřejmé, že jako nejvhodnější separační podmínky pro separaci derivátů pterinů nadále zůstaly: 5/95 (v/v) MeOH/20 mM fosfátový pufr pH 3,0, průtok $F_m = 0,7 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, UV detekce při 290 nm.

5.2 Separace reálného vzorku štitku *Graphosoma semipunctatum*

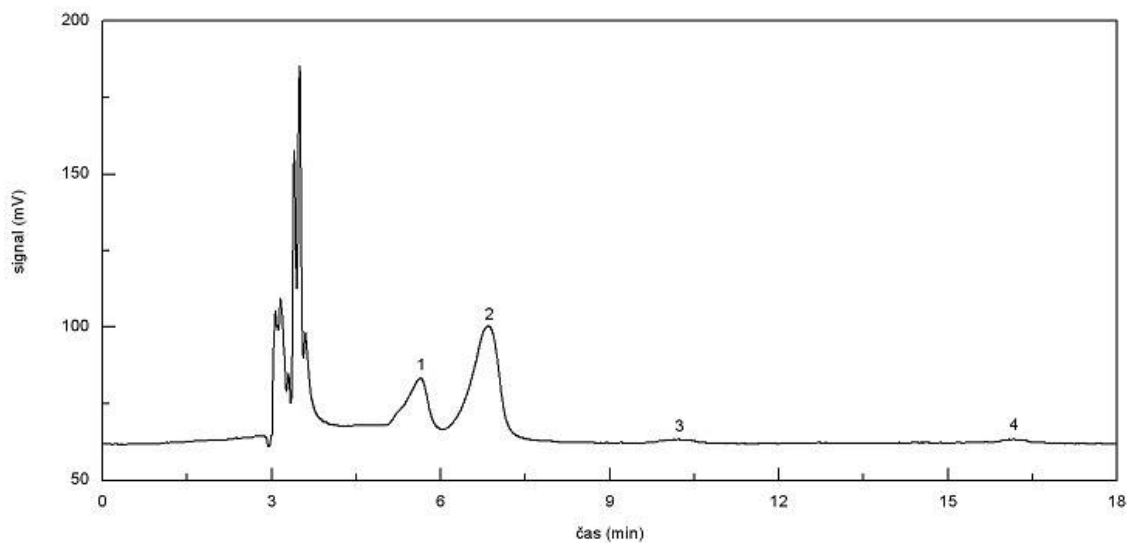
Za výše uvedených „optimalizovaných“ experimentálních podmínek byl analyzován reálný vzorek. Nejdříve byl připraven vzorek z integumentu *Graphosoma semipunctatum* (viz kapitola 4.4.2).

Na kolonu Spherisorb ODS-2 byl nadávkován reálný vzorek (20 μl) a na obrázku 4 je uveden výsledek separace.



Obr. 4: Separace reálného vzorku integumentu *Graphosoma semipunctatum* na koloně Spherisorb ODS-2 při separačních podmínkách 5/95 (v/v) MeOH/20 mM fosfátový pufr pH 3,0 při průtoku $F_m = 0,7 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ a UV detekci při 290 nm. Předpokládá se, že pík 2 odpovídá xanthopterinu, leukopterinu nebo erythropterinu, pík 3 isoxanthopterinu. Pík 1 a 4 neodpovídá žádnému použitému standardu.

Z integumentu se do roztoku dostaly 4 látky. Srovnáním retenčních časů se standardy lze předpokládat, že pík 2 odpovídá xanthopterinu, leukopterinu nebo erythropterinu a pík 3 isoxanthopterinu. Pík 1 a 4 neodpovídá žádnému studovanému standardu. Z literatury vyplývá, že by se v případě píku 2 mohlo s největší pravděpodobností jednat o přítomnost leukopterinu nebo erythropterinu. Proto byla použita metoda standardního přídávku. K 20 μl reálného vzorku bylo přidáno 5 μl roztoku standardu leukopterinu a takto připravený vzorek byl analyzován za stejných experimentálních podmínek. Na obrázku 5 je zobrazen získaný chromatogram.



Obr. 5: Separace směsi reálného vzorku s přidavkem leukopterinu (pík 2) na koloně Spherisorb ODS-2 při separačních podmínkách 5/95 (v/v) MeOH/20 mM fosfátový pufr, pH 3,0 při průtoku $F_m = 0,7 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ a UV detekci při 290 nm.

Při porovnání získaných chromatogramů bez přidavku leukopterinu (obr. 4) a se standardním přidavkem leukopterinu (obr. 5) je vidět, že s přidavkem došlo k nárůstu plochy píku 2. Analogické výsledky byly dosaženy i pro přidavek erythropterinu.

Vzhledem k tomu, že erythropterin, leukopterin a xanthopterin eluují z kolony s podobnými retenčními časy, nelze s jistotou říci, zda pík 2 odpovídá některé z uvedených látek nebo jejich směsi.

6 Závěr

Pro separaci pěti vybraných derivátů pterinu (xanthopterin, isoxanthopterin, leukopterin, biopterin a erythropterin) byla navržena analytická HPLC metoda. Separace byla realizována binární mobilní fází s methanolem, ethanolem nebo tetrahydrofuranem jako organickými modifikátory v kombinaci s fosfátovým pufrům, pH 3,0 nebo s vodou. I přes velmi nízký obsah organického modifikátoru (3 -5 obj. %) v mobilní fázi docházelo k rychlé retenci studovaných analytů, dokonce erythropterin při použití ethanolu jako organického modifikátoru v kombinaci s 20 mM fosfátovým pufrům, pH 3,0, eluoval z kolony s mrtvým časem. Při použití methanolu byla retence nejdelší a při použití ethanolu byly píky více symetrické. Použití jejich směsi při zachování celkově nízkého obsahu organické fáze nepřineslo podstatnější změnu v separačním chování studovaných analytů. Také přítomnost různě koncentrovaného fosfátového pufru (10, 20 a 30 mM) nebo přídavek trifluoroctové kyseliny v mobilní fázi nevedly k výraznějšímu prodloužení retence.

Ukázalo se, že nejvhodnějšími experimentálními podmínkami jsou: 5/95 (v/v) MeOH/20 mM fosfátový pufr, pH 3,0, průtok $F_m = 0,7 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ s UV detekcí při 290 nm. Separace byly prováděny na koloně 250-4 Spherisorb ODS-2 s oktadecylovými řetězci navázanými na silikagelový nosič.

Za těchto podmínek byl analyzován reálný vzorek - extrakt z integumentu ploštice *Graphosoma semipunctatum*. Získaný chromatogram obsahoval čtyři píky (mimo systémové píky) z nichž píky 1 a 4 se nepodařilo identifikovat, protože retenční časy píků neodpovídaly retenčním časům žádného studovaného standardu. U píku 3 došlo ke shodě s retenčním časem isoxanthopterinu. Z důvodu podobných retenčních časů leukopterinu, xanthopterinu a erythropterinu, shodujících se s retencí píku 2 se nepodařilo identifikovat pík 2. Na základě dostupné literatury se xanthopterin v integumentu nevyskytuje²¹, proto lze předpokládat, že druhý pík odpovídá erythropterinu, leukopterinu nebo jejich směsi. K úplné identifikaci by bylo nutné použít jiný typ detekce, například hmotnostní spektrometrii.

7 Literatura

- [1] Čopíková, J.; Uher, M.; Lapčík, O.; Moravcová, J.; Drašar, P.: Přírodní barevné látky. *Chemické listy* **99**, 802-816 (2005).
- [2] Vaníková, J.: Separace hydroxylovaných derivátů anthrachinonu a derivátů pterinu metodou HPLC. Diplomová práce. PřF UK v Praze, Katedra analytické chemie, 2009.
- [3] Hopkins, F.G.: A contribution to the chemistry of pterins. *Biological Sciences* **130**, 861, 359-379 (1942).
- [4] Tomandl, J.: Pteriny. *Chemické listy* **92**, 689-697 (1998).
- [5] obrázek plošnice *Graphosoma semipunctatum*, dostupné z URL: <<http://www.biolib.cz/IMG/GAL/26074.jpg>> [cit. 24.4.2010]
- [6] obrázek plošnice *Graphosoma semipunctatum*, dostupné z URL: <http://heteropterologie.de/pictures/Graphosoma_semipunctatum_1.jpg> [cit. 5.12.2009]
- [7] Marshall, G.: The chemistry of the Pteridines. Pennsylvania, Bryn Mawr College, Department of chemistry, 1947, p.67.
- [8] Luhová, L.; Galuszka, P.: Laboratorní technika pro biochemiky. Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci, Katedra biochemie, 2005.
- [9] Wijnen, B.; Leertouwer, H.L.; Stavenga, D.G.: Colors and pterin pigmentation of pierid butterfly wings. *Journal of Insect Physiology* **53**, 1206-1217 (2007).
- [10] Korte, F.; Fuchs, E.G.: The synthesis of xanthopterin. *Chemische Berichte* **86**, 114-116 (1953). *CA* **1954**:7250.

- [11] Taylor, E.C.; Abdulla, R.F.; Tanaka, K.; Jacobi, P.A.: Pteridines. XXXVI. Syntheses of xanthopterin and isoxanthopterin. Application of N-oxide chemistry to highly functionalized pyrazines and pteridines. *Journal of Organic Chemistry* **40**:16, 2341-2347 (1975). *CA* **1975**:497206.
- [12] Bartke, M.; Pflinder, W.: Pteridines, XC. Syntheses, oxidations, properties, and reactions of 2-thiopteridine-4,6,7-trione derivatives. *Pteridines* **1**:2, 83-90 (1989). *CA* **1990**:55440.
- [13] Suga, T.; Munesada, K.: The pigments in the dorsal skin of frogs. *Journal of Natural Products* **51**:4, 713-718 (1988).
- [14] Plotkin, M.; Volynchik, S.; Ermakov, N.Y.; Benyamini, A.; Boiko, Y.; Bergman, D.J.; Ishay, J.S.: Xanthopterin in the Oriental Hornet (*Vespa orientalis*): Light absorbance is increased with maturation of yellow pigment granules. *Photochemistry and Photobiology* **85**, 955-961 (2009).
- [15] Han, F.; Huynh, H.B.; Shi, H.; Lin, B.; Ma, Y.: Pteridine analysis in urine by capillary electrophoresis using laser-induced fluorescence detection. *Analytical Chemistry* **71**, 1265-1269 (1999).
- [16] Guo, L.; Wan, Y-Q.; Liao, K.: Determination of Xanthopterin in urine by thin-layer chromatography-fluorescence analysis. *Fenxi Shiyanshi* **24**:7, 77-79 (2005). *CA* **2005**:810521
- [17] Cinta, C.N.; Makio, T.: Color changes in *Halyomorpha brevis* (Heteroptera: Pentatomidae) correlated with distribution of pteridines: regulation by environmental and physiological factors. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* **132**, 653-660 (2002).

- [18] Masahiro, K.; Kazuhiro, T.; Kazuo, I.: Analysis of unconjugated pterins in food resources and human urine. *Agricultural and Biological Chemistry* **44**:9, 2089-2094 (1980).
- [19] Porcar, M.; Bel, Y.; Socha, R.; Němec, V.; Ferré, J.: Identification of pteridines in the firebug, *Pyrrhocoris apterus* (L.) (Heteroptera, Pyrrhocoridae) by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **724**, 193-197 (1996).
- [20] Klouda, P.: *Moderní analytické metody*. 2. přeprac. vyd. Ostrava, Nakladatelství Pavel Klouda 2003.
- [21] Bel, Y.; Porcar, M.; Socha, R.; Němec, V.; Ferré, J.: Analysis of Pteridines in *Pyrrhocoris apterus* (L.) (Heteroptera, Pyrrhocoridae) During Development and in Body-Color Mutants. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **34**, 83-98 (1997).