

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza

Studijní obor: Klinická a toxikologická analýza



Sofiya Grybinik

Analýza derivátů pterinu v biologickém vzorku *Podarcis muralis* metodou HPLC-MS/MS

Analysis of pterine derivatives in biological sample *Podarcis muralis* by HPLC-MS/MS

Bakalářská práce

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

Praha 2017

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.....

.....

podpis

Na tomto místě bych chtěla poděkovat své školitelce Doc. RNDr. Zuzaně Bosákové, CSc. a Mgr. Zuzaně Hampejsové za odborné vedení, trpělivost, s níž se mi věnovaly a pomoc při zpracování výsledků v této bakalářské práci.

Obsah

Seznam zkratk	6
Úvod	8
Teoretická část	9
1 PTERINY	9
1.1 Historie pterinů	9
1.2 Struktura a fyzikálně-chemické vlastnosti pterinů	9
1.3 Biologická role pterinů	12
1.3.1 Pteriny jako pigmenty.....	12
1.3.2 Pteriny v lidském těle	13
1.3.3 Toxické pteriny.....	13
1.4 Metody pro analýzu pterinů.....	14
1.5 Vysokoučinná kapalinová chromatografie	15
1.5.1 Počátky chromatografie a typy chromatografických systémů v HPLC	15
1.5.2 Kolony a typy stacionárních fází.....	16
1.5.3 Důležité parametry chromatogramu	17
1.5.4 Metody kvantitativní analýzy v HPLC.....	18
1.5.5 Detektory v HPLC.....	19
1.6 Hmotnostní spektrometrie.....	19
2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	22
2.1 Chemikálie	22
2.2 Přístroje a pomůcky	22
2.3 Složení mobilní fáze a příprava kalibračních roztoků	23
2.4 Příprava biologických vzorků.....	23
3 VÝSLEDKY A DISKUZE	24

3.1	Optimalizace podmínek hmotnostní detekce pro analyzované pteriny	24
3.1.1	L-Sepiapterin	24
3.1.2	Pterin -6-karboxylová kyselina.....	26
3.1.3	Pterin.....	27
3.2	Kalibrační závislosti	31
3.3	Měření reálných vzorků	35
	Závěr	38
	Seznam literatury	39

Seznam zkratek

A	plocha píku
a.u.	relativní jednotka
ACN	acetonitril
BH4	tetrahydropterin
DMSO	dimethylsulfoxid
ELISA	enzymoimunoanalýza
h	výška píku
HILIC	hydrofilní interakční chromatografie
HPLC – MS	kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí
k	retenční faktor
LOD	limit detekce
LOQ	limit kvantifikace
MALDI	laserová desorpce v přítomnosti matrice
M_r	relativní molekulová hmotnost
MRM	skan jedné nebo více iontových reakcí (Multiple Reaction Monitoring)
n	počet teoretických pater
NP-HPLC	vysokoúčinná chromatografie na normálních fázích
pK_a	záporně vzaty logaritmus kyselých disociačních konstant
PT6	pterin-6-karboxylová kyselina

R	rozlišení analytů
ROS	reaktivní formy kyslíku
RP-HPLC	vysokoúčinná chromatografie na obrácených fázích
SCAN	základní sken hmotnostních spekter v určitém rozsahu m/z
SIM	selektivní záznam vybraného iontu (Selected Ion Monitoring)
SR	sepiapterin reduktasa
t'_R	redukovaný retenční čas
t_M	mrtvý retenční čas
TOF	průletový analyzátor
t_R	retenční čas analytu
w	šířka píku při základně
α	separační faktor

Úvod

Pteriny jsou dusíkaté, heterocyklické sloučeniny, které se hojně vyskytují v organismech živočichů a podílejí se na celé řadě důležitých biologických funkcí. Hrají velkou roli jako biomarkery různých onemocnění a jsou součástí některých enzymů. Kromě toho tvoří pteriny velkou skupinu pigmentů. Lze je najít v motýlích křídlech a v tělech velkého množství hmyzích druhů, kterým pteriny poskytují aposematické (výstražné) anebo kryptické (součástí maskování) obranné zbarvení. Pomocí hydrofilní interakční kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí (HPLC-MS/MS) byla zjištěna přítomnost šesti pterinů v kutikulách ploštic [1].

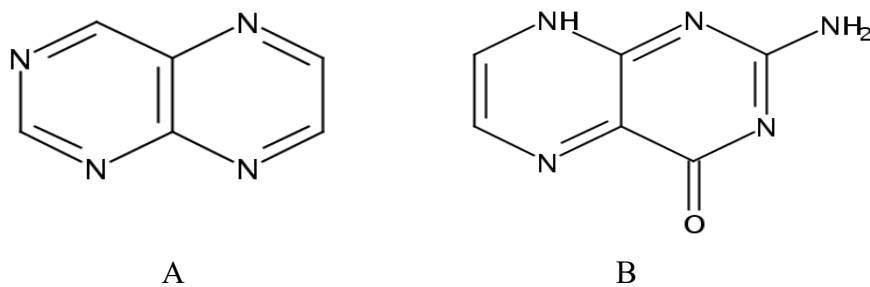
Cílem této práce bylo provést optimalizaci HPLC-MS/MS podmínek pro identifikaci dalších tří derivátů pterinu (L-sepiapterinu, pterin-6-karboxylové kyseliny a pterinu) a pro všech devět sledovaných derivátů proměřit kalibrační závislosti. Nově vyvinutá metoda pak byla aplikována pro identifikaci a kvantifikaci studovaných derivátů v reálné matici, a to ve vzorcích kůže ještěrky rodu *Podarcis muralis*.

Teoretická část

1 Pteriny

1.1 Historie pterinů

Za začátek historie pterinů se považuje rok 1889, kdy anglický biochemik F. G. Hopkins izoloval žlutý pigment z motýla žluťáčka řešetlákového (*Gonepteryx rhamni*) a bílý pigment z běláčka řepového (*Pieris rapae*). V roce 1940 se povedlo určit strukturu těchto pigmentů, které byly podle svých barev pojmenovány jako xanthopterin (žlutý) a leukopterin (bílý). Později byly z tropických motýlů izolované také isoxanthopterin a erythropterin [2]. Jako pteriny se původně označovaly všechny hmyzí pigmenty. Jejich společná struktura se vyznačovala přítomností heterocyklického konjugovaného systému, který byl v roce 1941 označen jako pteridin (z řeckého pteron – křídlo) [2]. V dnešní době se pteridin používá jako triviální název pro pyrazino[2,3-d]pyrimidin (viz obr. 1). Deriváty pteridinu se podle substituce na pyrimidinovém kruhu dělí na dvě skupiny. Pteriny jsou deriváty 2-amino-4-oxodihydropteridinu (obr. 1), zatímco lumaziny jsou odvozené od 2,4-dioxotetrahydropteridinu [3].



Obr. 1: **A.** Pyrazino[2,3-d] pyrimidin. **B.** 2-amino-4-oxodihydropteridin.

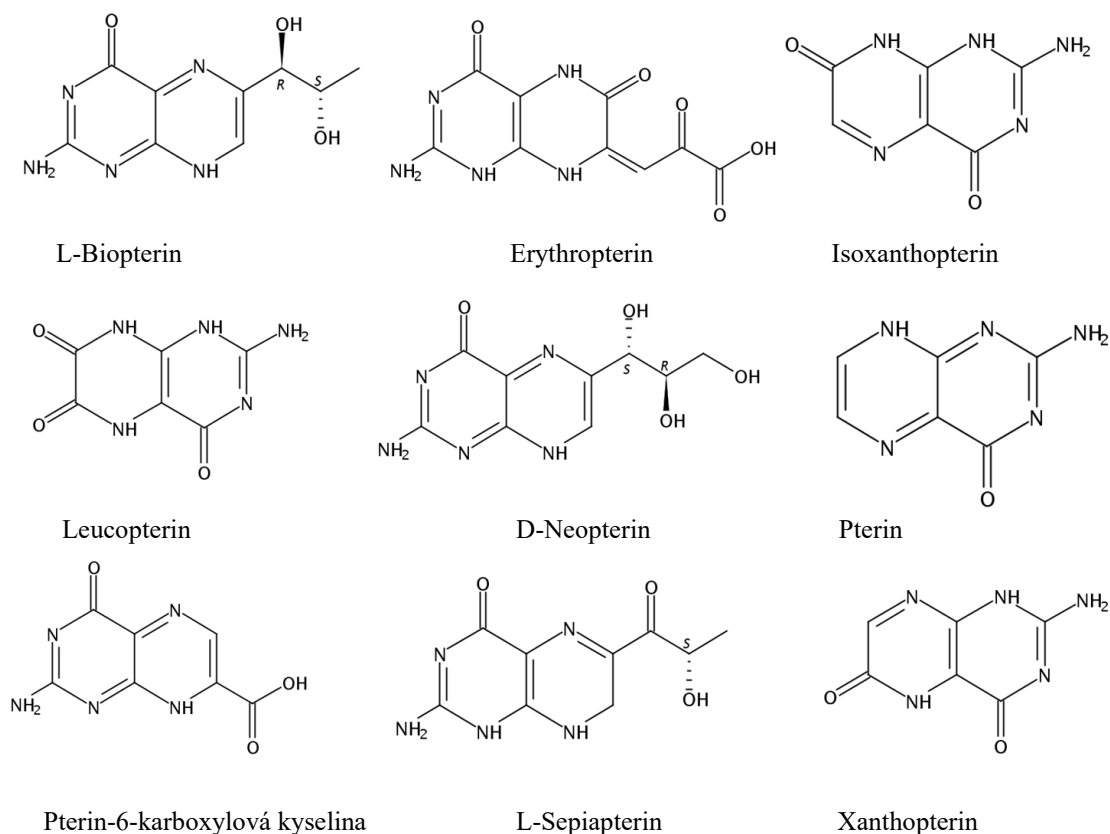
1.2 Struktura a fyzikálně-chemické vlastnosti pterinů

Pteriny patří mezi dusíkaté, heterocyklické sloučeniny. Čtyři dusíky ve struktuře pteridinu přispívají ke snížení jeho aromatických vlastností, díky čemuž se pteridin stává náchylnější

k nukleofilním reakcím. Pteriny se mohou vyskytovat ve třech oxidačních formách, a to jako 5,6,7,8-tetrahydro- nebo 7,8-dihydro- formě, anebo v plně oxidované (aromatické) formě. Redukované pteriny snadno podléhají oxidaci vzdušným kyslíkem a jsou zvláště citlivé na přítomnost některých iontů kovů. Mají také silné oxidační schopnosti a mohou *in vivo* působit proti volným radikálům. Oxidací redukovaných forem pterinů může docházet k tvorbě biopterinu a neopterinu [4]. Pteriny jsou fotosenzitivní látky. Při vlnových délkách ultrafialového záření v rozsahu 320 - 400 nm tyto biomolekuly vykazují fluorescenci, mohou podléhat fotooxidaci anebo generovat reaktivní formy kyslíku (singletový kyslík, peroxid, superoxid). Vystavení světlu může rovněž způsobit jejich degradaci. Některé z pterinů jsou barevné, jako například žlutý L-sepiapterin, isoxanthopterin nebo xanthopterin a červený erythropterin. Deriváty pterinu jsou nejčastěji molekuly s navázaným substituentem v poloze 6. Podle molekulové hmotnosti a funkční skupiny substituentu lze tyto deriváty dělit na konjugované a nekonjugované. Ke konjugovaným patří například riboflavin, foliová kyselina a methanopterin, k nekonjugovaným pterin, biopterin, neopterin, molybdopterin, onkopterin a pteriny, které mají ve své struktuře glukosidové jednotky [5]. Nesubstituovaný pteridin je dobře rozpustný ve vodě, kdežto jeho substituované formy jsou podstatně méně rozpustné, protože mezi nimi dochází ke tvorbě intermolekulárních vodíkových můstků, zvláště mezi aminovými a amidovými skupinami. Tyto skupiny rovněž přispívají ke snížení acido-bazických vlastností pterinů a zvyšují jejich bod varu. Vybrané fyzikálně-chemické vlastnosti studovaných derivátů pterinu jsou uvedeny v tabulce 1, jejich struktury jsou ukázány na obr. 2.

Tabulka 1: Vybrané fyzikálně-chemické charakteristiky pterinů analyzovaných v této práci, M_r - relativní molekulová hmotnost, pK_a – záporně vzatý logaritmus kyselé disociační konstanty, pterin-6-karboxylová kyselina (PT6)

název látky	M_r	pK_a	bod varu [C°]
erythropterin	265,18	1,37	-
D-neopterin	253,21	12,6	590
L-sepiapterin	237,22	12,3	448
L-biopterin	237,22	13,2	503
PT6	207,15	5,40	434
leucopterin	195,14	6,74	300
isoxanthopterin	179,14	11,3	-
xanthopterin	179,14	9,34	98 — 100
pterin	163,14	2,29	336



Obr. 2: Struktury studovaných derivátů pterinu

1.3 Biologická role pterinů

1.3.1 Pteriny jako pigmenty

Pteriny jsou významné monomerní chromofory, které se vyskytují v těle hmyzu a živočichů. Jsou zároveň živočišnými pigmenty s největším obsahem dusíku [6]. Barevnost očí octomilky obecné je způsobena přítomností žlutého L-sepiapterinu, drosopterinu a jeho isomerních forem – isodrosopterinu a neodrosopterinu [7].

Žlutý xanthopterin lze najít v těle vosy obecné (*Vespula vulgaris*) a erythropterin se hojně vyskytuje v ruměnici pospolné (*Pyrrhocoris uterus*). Pteriny lze také najít ve velkém množství v křídlech různých motýlů. Například bělásek řeřichový (*Anthocharis cardamines*) obsahuje ve svých křídlech erythropterin a samci žluťáčka řešetlákového (*Gonepteryx rhamni*) mají výraznější žluté zbarvení než samice kvůli vyšším koncentracím chrysopterinu [8].

1.3.2 Pteriny v lidském těle

Jedním z nejvýznamnějších pterinů, který se vyskytuje v lidském organismu, je foliová kyselina, neboli vitamin B9. Její úplně redukovaná forma, tetrahydrofolát, hraje důležitou roli při biosyntéze aminokyselin a nukleových kyselin. Nedostatek foliové kyseliny může vést k anémii a je obzvláště nebezpečný pro těhotné ženy, jelikož vitamin B9 je nezbytný pro vývoj nervové trubice plodu [7].

L-Sepiapterin, vylučovaný tělem, může sloužit jako neinvazivní a spolehlivý marker při určitých onemocněních. Bylo zjištěno, že zvýšené hladiny L-sepiapterinu v moči jsou charakteristické pro pacienty s deficitem sepiapterinreduktasy (SR) [9]. Tetrahydrobiopterin (BH4) je velice důležitá biomolekula, která se hojně vyskytuje v těle živočichů. Je kofaktorem hydrolas aromatických aminokyselin a NO syntasy [4]. Poruchy biosyntézy BH4 vedou k nedostatku dopaminu a serotoninu, mají za následek rozvoj fenyلكetonurie a řady neurodegenerativních onemocnění, mezi které patří především Alzheimerova a Parkinsonova nemoc [10].

Neopterin hraje důležitou roli při zahájení buněčné apoptózy a podílí se na obraně buňky před oxidačním stresem. Je také důležitým biomarkerem při pneumokoniózách. Zvýšené hladiny neopterinu byly prokázány u pacientů se silikózou (usazování oxidu křemičitého v plicích) a také u dělníků, vystavených anorganickému prachu. Zvýšená produkce neopterinu je důsledkem působení alveolárních makrofágů [11].

1.3.3 Toxické pteriny

Některé pteriny mohou mít na organismus nepříznivé účinky. Například surugatoxin a prosurugatoxin, které byly izolovány z japonského měkkýše (*Babylonia japonica*) blokují nikotin acetylcholinové receptory a vyvolávají dlouhodobou hypotenzi. [7].

Při vystavení UV záření může foliová kyselina degradovat na 6-formylpterin a pterin-6-karboxylovou kyselinu, které generují reaktivní formy kyslíku (ROS) a tudíž mohou být fototoxické. Tyto reaktivní formy kyslíku mohou vést k degradaci folátu v krvi, destrukci DNA a v konečném důsledku i k výskytu nádorových onemocnění [12].

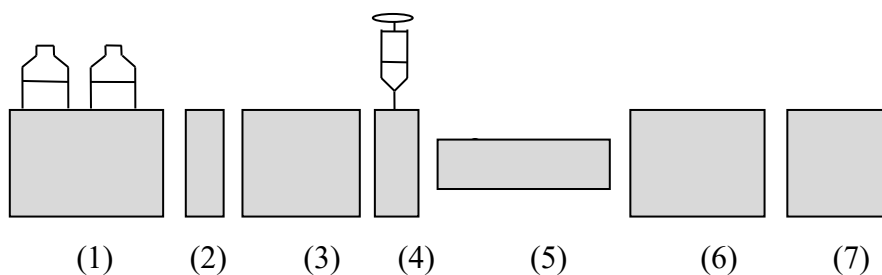
1.4 Metody pro analýzu pterinů

Pteriny lze analyzovat pomocí různých analytických metod. Patří sem imunochemické metody, jako například ELISA, anebo se provádí stanovení pomocí enzymů fenylalanin-4-monooxygenasy a dihydropterinreduktasy. Celkový biopterin lze také stanovit použitím bakterie *Crithidia fasciculata*. Tato metoda však není selektivní. Mezi nejčastěji používané metody pro stanovení pterinů patří hydrofilní interakční chromatografie (HILIC), iontově-výměnná chromatografie, chirální vysokoúčinná chromatografie a vysokoúčinná chromatografie na obrácených fázích (RP-HPLC), která je zvláště vhodná pro oxidované pteriny. Jelikož jsou pteriny látky hydrofilní povahy, je pro jejich separaci zvláště vhodná hydrofilní interakční chromatografie (HILIC) [4]. Předkládaná práce navazuje na studii, která se zabývala optimalizací a stanovením šesti derivátů pterinu v kutikulách ploštic (*Heteroptera: Graphosoma*) na koloně ZIC-HILIC [1]. Byla navržena extrakce derivátů pterinu ze štítků ploštic pomocí dimethylsulfoxidu (DMSO) a pro následnou analýzu deseti pterinů, potenciálně obsažených ve štítcích ploštic, byla vypracována metoda kapilární elektroforézy [13]. Průběh separace 12 derivátů pterinu na pěti různých HILIC kolonách byl porovnáván s využitím hmotnostní detekce. Separace probíhala při stejném složení mobilní fáze na následujících kolonách: Atlantis HILIC, XBridge Amide, Luna diol, Cosmosil HILIC (s navázaným triazolem) a ZIC-HILIC s navázanou sulfobetainovou stacionární fází. Kolona ZIC-HILIC poskytovala nejvyšší retenci derivátů a nejlepší selektivitu [14]. V další studii pro separaci osmi pterinů byly použité dvě RP-HPLC kolony se stacionárními fázemi C₈ a C₁₈ a kolona HILIC Luna. Nejrychlejší analýza proběhla na koloně HILIC Luna, zatímco kolony s reverzními stacionárními fázemi poskytly symetričtější píky a lepší rozlišení analytů [15]. Některé studie uvádějí také použití fenyl-hexylové stacionární fáze [16]. Před samotnou analýzou jsou pteriny často oxidovány buď jodem v zásaditém prostředí anebo neutrálním roztokem manganistanu draselného. Oxidované pteriny jsou mnohem stabilnější, než jejich redukované formy a poskytují silnější fluorescenční signály [14].

1.5 Vysokoučinná kapalinová chromatografie

1.5.1 Počátky chromatografie a typy chromatografických systémů v HPLC

Počátky chromatografie jsou datovány na konec 19. století, kdy ruský botanik M. Tswett použil kolonu, naplněnou uhličitánem vápenatým, pro separaci rostlinných pigmentů, a to chlorofylu, xantofylu a spirilloxanthinu. Principem chromatografie je tedy rozdělení látek – analytů, mezi stacionární a mobilní fázi, kde se postupně ustálí dynamická rovnováha. Dnes se chromatografie používá ve vysokotlakém provedení, jak je znázorněno na obr. 3. V tomto provedení existuje celá řada chromatografických systémů, z nichž následující tři jsou velmi často používané.



Obr. 3: Schéma HPLC systému: (1) zásobník mobilní fáze, (2) odplynovač mobilní fáze, (3) vysokotlaké čerpadlo, (4) dávkovač, (5) kolona, (6) detektor, (7) vyhodnocovací zařízení.

Chromatografie s normálními fázemi (NP-HPLC): Tento druh chromatografie se vyvinul jako první a byl hojně používán do 70. let 20. století. V NP-HPLC je stacionární fáze je polární (například silikagel) a mobilní fáze je nepolární (toluen, hexan, apod.).

Chromatografie s obrácenými fázemi (RP-HPLC): Stacionární fáze je v tomto případě nepolární, zatímco mobilní fáze je polární. Mobilní fáze se připravuje smícháním organického rozpouštědla (např. acetonitril, metanol, tetrahydrofuran) s vodnou složkou (pufry, voda) v různých poměrech.

Hydrofilní interakční chromatografie (HILIC): HILIC se dnes široce využívá pro analýzu velmi polárních látek. Tyto látky se obtížně separují pomocí NP-HPLC jako důsledek jejich špatné rozpustnosti v nepolární mobilní fázi anebo příliš velké retenci na polární stacionární fázi. V případě použití RP-HPLC tyto analyty naopak mají krátký retenční čas vzhledem k jejich nízké afinitě k nepolární stacionární fázi. HILIC využívá polární stacionární fázi v kombinaci s vodně - organickou mobilní fází, kde obsah rozpouštědla (nejčastěji acetonitril nebo methanol) se pohybuje v rozmezí 55 - 99 obj. %. Při separaci dochází k rozdělování polárního analytu mezi vodnou složku mobilní fáze a vodný film, adsorbovaný na povrchu polární stacionární fáze. Dominantními interakcemi jsou pak vodíková vazba nebo elektrostatické interakce s příslušnými skupinami stacionární fáze [17].

1.5.2 Kolony a typy stacionárních fází

Kolona, určená pro HPLC, by měla být vysoce odolná vůči vysokému tlaku a chemické korozi. Nejčastějšími materiály pro výrobu chromatografických kolon jsou nerezová ocel, PEEK (polyether-ether-keton), tvrzené borsilikátové sklo a také různé kombinace nerezové oceli se sklem a polymery. Typická délka kolony je 3 až 25 cm. Obecně platí, že čím je delší kolona, tím je lepší separace analytů díky zvýšení počtu teoretických pater. Kratší kolona však umožňuje rychlejší separaci. Obvyklý průměr kolony se pohybuje mezi 1 až 5 mm. Kolony o velkém průměru (10 až 25 mm) se používají pro preparativní účely. Kolony s menším průměrem snižují spotřebu mobilní fáze a zvyšují citlivost detekce [18].

Velmi rozšířeným typem stacionární fáze jsou chemicky vázané fáze na nosiči, kterým je nejčastěji silikagel (oxid křemičitý), v porézním či neporézním provedení [19]. Nejčastější modifikací jsou chemicky vázané alkyly (např. oktadodecyl-, oktyl-, fenylo- nebo alkylfenylové zbytky), dioly aj. Často se provádí pokrytí nezreagovaných silanolových skupin silikagelu (tzv. endcapping), které redukuje jejich počet a zlepšuje tak separaci některých látek, zejména bazické povahy. V poslední době také nacházejí uplatnění hybridní stacionární fáze, jejichž výhody spočívají ve vysoké účinnosti, mechanické odolnosti a chemické a teplotní stabilitě [20].

1.5.3 Důležité parametry chromatogramu

Chromatogram je záznam, obsahující píky jednotlivých analytů. Retenční čas analytu je čas, který látka stráví v koloně od nástřiku do okamžiku detekce. V praxi se také využívá redukovaný retenční čas t_R' :

$$t_R' = t_R - t_M,$$

kde t_r je retenční čas analytu a t_M je mrtvý čas

Dalším užitečným parametrem je retenční faktor k :

$$k = \frac{t_R'}{t_M}$$

jehož hodnoty by se měly pohybovat v rozmezí 1 až 10.

Separační faktor α je definován jako podíl retenčních faktorů dvou sousedních píků:

$$\alpha = \frac{k_B}{k_A}$$

přičemž v čitateli je retenční faktor více zadržované látky k_B a ve jmenovateli je retenční faktor méně zadržované látky k_A .

Účinnost separace vyjadřuje počet teoretických pater n

$$n = 16 \frac{t_r^2}{w^2}$$

kde t_r je retenční čas analytu a w je šířka píku analytu při základně. V každém teoretickém patře analyt dosáhne rovnovážného rozdělení mezi stacionární a mobilní fází. Větší počet teoretických pater tedy znamená vyšší účinnost separace.

Pro výpočet rozlišení dvou analytů ($R_{1,2}$) se používá následující vztah:

$$R_{1,2} = 2 \frac{(t_{R2} - t_{R1})}{(w_2 + w_1)},$$

kde t_{R1} a t_{R2} jsou retenční časy dříve eluujícího (t_{R1}) a později eluujícího (t_{R2}) analytu, w_1 a w_2 jsou šířky píků těchto dvou analytů při základně.

Mez detekce (LOD) je definována jako nejnižší koncentrace analyzované látky, jejíž signál lze statisticky odlišit od základní linie:

$$LOD = \frac{3h_n}{m}$$

kde h_n je šum základní linie a m je směrnice kalibrační křivky, která vyjadřuje závislost výšky píku na koncentraci.

Mez stanovitelnosti (LOQ) je definována jako nejnižší koncentrace analytu, statisticky spolehlivě stanovitelná:

$$LOQ = \frac{10h_n}{m}$$

kde h_n je šum základní linie a m je směrnice kalibrační křivky.

1.5.4 Metody kvantitativní analýzy v HPLC

V HPLC je plocha píku pod křivkou závislá na koncentraci analytu. Níže jsou uvedené dvě základní metody pro kvantitativní vyhodnocování, použité v dané práci.

Metoda vnějšího standardu (metoda kalibrační křivky): Při této metodě se pro standard/ y připraví koncentrační řada a následně se sestrojí závislosti plochy píku na koncentraci, jež se zpracuje metodou lineární regrese. Výsledkem je rovnice přímky ($y = kx + q$), ze které lze neznámou koncentraci vzorku vypočítat dosazením jeho plochy za hodnotu y . Použití této metody je problematické zejména u vzorků se složitou maticí.

Metoda standardního přídavku: V této metodě se změří plocha vzorku (A_i) o neznámé koncentraci (c_i), poté se do vzorku přidá standard o známém objemu (V_s) a koncentraci (c_s) a opět se změří plocha (A_{is}). Koncentrace (c_i) se pak dá vypočítat z následující rovnice (1) [21]:

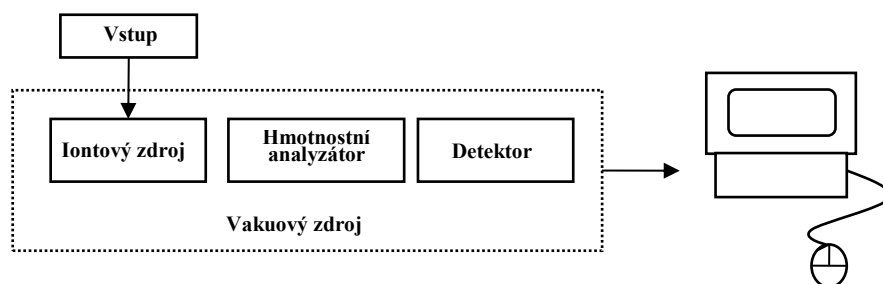
$$c_2 = \frac{A_i c_s V_s}{(A_{is} (V_i + V_s) - A_i V_i)} \quad (1)$$

1.5.5 Detektory v HPLC

Detektory zaznamenávají změny v mobilní fázi a převádí je na elektrický signál, který je následně zpracován vyhodnocovacím zařízením. Ideální detektor by měl být specifický, robustní, vysoce citlivý a mít co nejmenší příspěvek k rozmývání elučních zón. Mezi nejpoužívanější detektory v HPLC patří UV detektory, refraktometrické, fluorescenční a elektrochemické detektory. V dnešní době se ve velké míře používají i hmotnostní detektory.

1.6 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometr se skládá z iontového zdroje, hmotnostního analyzátoru a detektoru (viz obr. 4). Molekuly analytu se pomocí různých ionizačních technik převádějí na ionty. Ionty dále podléhají fragmentaci a tyto fragmenty jsou pak rozdělené podle m/z v hmotnostním analyzátoru a dále jsou detekovány. Všechny hmotnostní spektrometry pracují za vysokého vakua, které zajišťuje, aby se ionty dostaly do detektoru, aniž by docházelo ke kolizím s ostatními molekulami plynu. Tyto kolize by mohly způsobit nežádoucí fragmentaci molekul, která by komplikovala získané spektrum.



Obr. 4: Blokové schéma hmotnostního spektrometru

Ionizační techniky se mezi sebou liší hlavně energií, která se předá molekulám analyzovaného vzorku a lze je dělit na tvrdé a měkké. Tvrdé techniky způsobují intenzivní fragmentaci molekul. Mezi ně patří například elektronová ionizace. K měkkým ionizačním technikám patří laserová desorpce v přítomnosti matrice (MALDI), bombardování urychlenými částicemi a chemická ionizace. V této práci byla použita ionizace elektrosprejem. Princip této techniky je následující. Analyty se po separaci dostávají do nebulizační kapiláry, jsou sprejovány a následně ionizovány v důsledku působení silného elektrického pole za atmosférického tlaku. Toto elektrické pole způsobuje nahromadění nabitých kapiček na hrotu kapiláry. Rozpouštědlo je z nabitých kapiček během velmi krátkého času postupně odpařováno obvykle proudem plynu o zvýšené teplotě, čímž se zvyšuje jejich povrchový náboj. V určitém okamžiku columbické síly překonají povrchové napětí a dochází k explozi nabitě kapičky. Když jsou kapičky dostatečně malé, ionty analytu se uvolní z jejich povrchu do plynné fáze [22].

Hmotnostní analyzátory pracují ve vakuu a jejich úkolem je rozdělení iontů podle jejich poměru m/z . Jsou založené na interakcích iontů s elektrickým a magnetickým polem. Existuje několik druhů hmotnostních analyzátorů jako například průletový analyzátor (TOF, time of flight), analyzátory s Fourierovou transformací anebo trojitě kvadrupóly. V této práci byl při analýze pterinů použit kvadrupólový analyzátor. Kvadrupólové analyzátory se používají nejčastěji. Jsou tvořené čtyřmi kruhovými anebo hyperbolickými tyčemi, které musí být dokonale rovnoběžné. Na každou z dvojic protilehlých tyčí se vkládá různé napětí, které ovlivňuje směr pohybu iontů. Přes kvadrupólový filtr mohou procházet pouze ionty o určitém poměru m/z , zatímco ostatní ionty se vychýlí. Kvadrupólové analyzátory jsou zpravidla schopné rozlišit píky, jejichž hmotnosti se liší o jedno desetinné místo. Trojitý kvadrupól se skládá ze tří propojených kvadrupólů. První a třetí kvadrupól slouží jako hmotnostní filtry, zatímco druhý jako kolizní cela. Takové uspořádání umožňuje pracovat ve čtyřech následujících režimech:

SCAN mód, který pracuje v režimu jednoduchého kvadrupólu. K filtraci iontů dochází na třetím kvadrupólu a první a druhý kvadrupól (tzv. kolizní cela) slouží v tomto případě jako iontová optika. Pomocí tohoto módu lze získat celkové hmotnostní spektrum dané látky.

SIM (selected ion monitoring) mód, kde je aktivní první kvadrupól, který je nastaven tak, aby propouštěl pouze požadovanou hodnotu m/z . V tomto případě slouží jako iontová optika druhý a třetí kvadrupól. Záznam tohoto módu vykazuje pouze intenzity iontu požadované hodnoty m/z .

Product Ion (režim produktového iontu), při kterém jsou aktivní všechny tři kvadrupóly. Pomocí tohoto módu lze získat hmotnostní spektrum fragmentů, vzniklých při štěpení iontu o definované hodnotě m/z v druhém kvadrupólu a lze určit m/z produktového iontu.

MRM (multiple reaction monitoring), při kterém jsou opět aktivní všechny tři kvadrupóly. Prvním kvadrupólem projde iont o definované hodnotě m/z , tzv. prekurzorový iont, ten je štěpen v kolizní cele na fragmenty, třetím kvadrupólem projde pouze fragment, iont o definované hodnotě m/z , tzv. produktový iont, a ten je následně detekován.

2 Experimentální část

2.1 Chemikálie

- acetonitril (čistota LC - MS, Sigma-Aldrich, Německo)
- dimethylsulfoxid (čistota pro headspace gas chromatogramy SupraSolv, Sigma-Aldrich, Německo)
- octan amonný (čistota $\geq 98,5$ %, PENTA, Česká republika)
- deionizovaná voda (vodivost $1,85 \mu\text{S}$, Milli-Q Millipore, Bedford, USA)
- L-biopterin (čistota ≥ 98 %, Sigma Aldrich, Německo)
- leukopterin (čistota ≥ 95 %, Sigma Aldrich, Německo)
- pterin-6-karboxylová kyselina (čistota $\geq 98\%$, Sigma Aldrich, Německo)
- pterin (čistota $\geq 97.8\%$, Sigma Aldrich, Německo)
- D-neopterin (čistota $\geq 97,5$ %, Sigma-Aldrich, Německo)
- xanthopterin (čistota $\geq 97,5$ %, Fluka, Švýcarsko)
- isoxanthopterin (čistota $\geq 97,5$ %, Fluka, Švýcarsko)
- erythropterin (Serva Feinbiochemica, Německo, poskytnut doc. Mgr. Alicí Exnerovou, Ph.D.)
- L-sepiapterin (čistota $\geq 99\%$, Cayman Chemical, USA)

2.2 Přístroje a pomůcky

- HPLC – kapalinový chromatograf Agilent serie 1290 (Agilent Technologies, Německo)
- trojitý kvadrupólový hmotnostní spektrometr Agilent 6460 (Agilent Technologies, Německo) a vyhodnocovací Mass Hunter workstation software
- kolona ZIC-HILIC ($4,6 \text{ mm} \times 150 \text{ mm}$, $3,5 \mu\text{m}$) s vázanou zwitterionickou, sulfobetainovou skupinou (Merck, Německo)
- ultrazvuk LC30H (Elma, Česká republika)
- centrifuga Gusto (P-LAB, Česká republika)

- analytické váhy APX-100 (Denver Instrument, Německo)
- pHmetr 3540 Combined pH & Conductivity (Jenway, Velká Británie)

2.3 Složení mobilní fáze a příprava kalibračních roztoků

Pro separaci studovaných pterinů byla použita mobilní fáze acetonitril/5mM octan amonný, pH 6,8 v objemovém poměru 85/15. Průtoková rychlost mobilní fáze byla 0,5 ml/min.

Ze standardů jednotlivých pterinů byl připraven směsný kalibrační roztok v DMSO tak, aby každý standard měl koncentraci 10 µg/ml. Z tohoto roztoku pak byla příslušným ředěním v DMSO připravena kalibrační řada o koncentracích 10, 5; 1; 0,5; 0,1; 0,05 a 0,01 µg/ml.

2.4 Příprava biologických vzorků

Tři části ocasu z ještěrky *Podarcis muralis*, původem z Itálie (vypreparované kůže byly dodány Mgr. J. Brejchou, Katedra zoologie, PřF UK, Praha) byly naváženy separátně na analytických váhách a následně převedeny do mikrozkušavek. Do každé mikrozkušavky bylo přidáno 0,5 ml DMSO a vzorky byly extrahovány. Nejprve byly umístěny do ultrazvukové lázně. Sonikace probíhala 20 minut za teploty 37 °C. Poté byly vzorky ponechány v mikrozkušavkách 11 dnů za laboratorní teploty a ve tmě. Po této době byly vzorky centrifugovány po dobu 10 min při otáčkách 10 000 otáček/minutu, supernatant byl odpipetován do vialky a připraven pro měření.

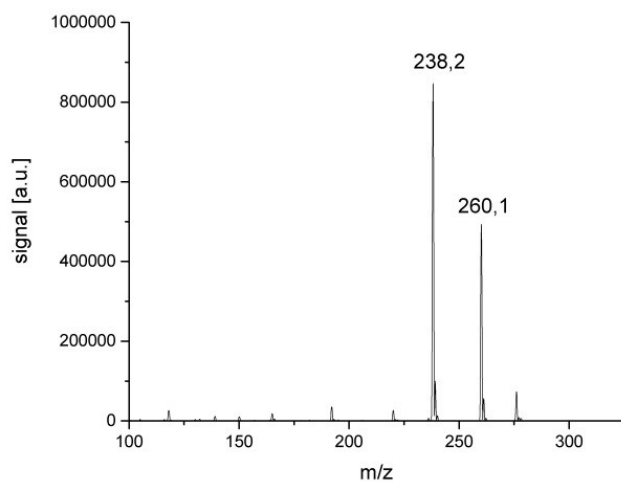
3 Výsledky a diskuze

3.1 Optimalizace podmínek hmotnostní detekce pro analyzované pteriny

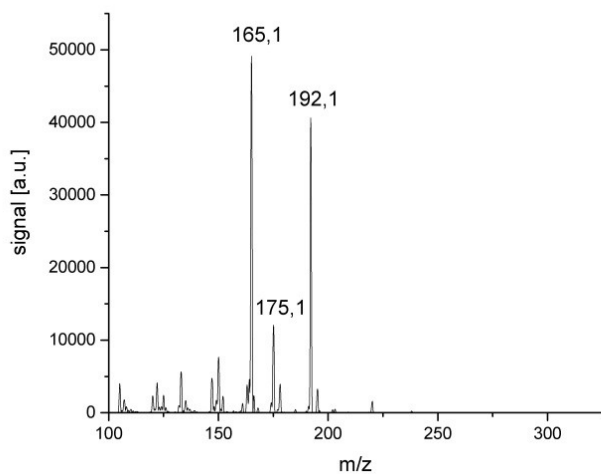
Detekční podmínky pro erythropterin, D-neopterin, xanthopterin, isoxanthopterin, leukopterin a L-biopterin byly převzaty ze článku [1]. V této práci se optimalizovaly detekční podmínky pro tři další deriváty pterinu, a to pro L-sepiapterin, pterin-6-karboxylovou kyselinu a pterin.

3.1.1 L-Sepiapterin

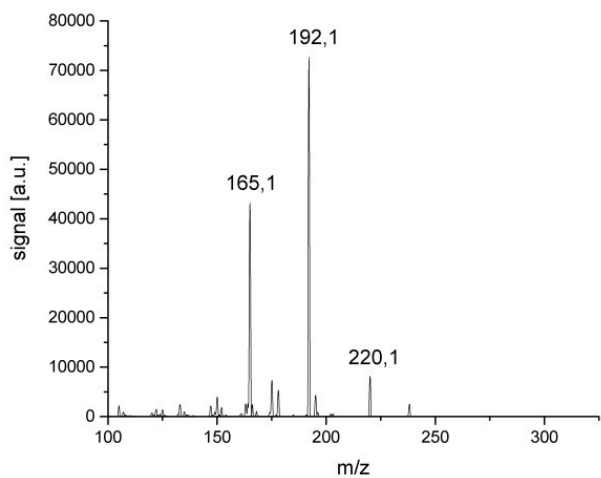
Měření se provádělo v pozitivním ionizačním módu. Nejdříve bylo proměřeno spektrum L-sepiapterinu v režimu SCAN při fragmentačním napětí 100 V v rozsahu m/z 100 – 300. Z hmotnostního spektra získaného ve SCAN módu (viz obr. 5) byl vybrán prekurzorový iont o $m/z = 238,2$. V SIM módu byly pak vyzkoušeny hodnoty fragmentačního napětí 100, 115, 120 a 125 V. Nejvyšší intenzita vybraného prekurzorového iontu byla dosažena při fragmentačním napětí 120 V, které bylo zvoleno jako optimální.



Obr. 5: Hmotnostní spektrum L-sepiapterinu, změřené v režimu SCAN.



Obr. 6: Hmotnostní spektrum L-sepiapterinu, změřené v režimu produktového iontu při kolizní energii 20 V.

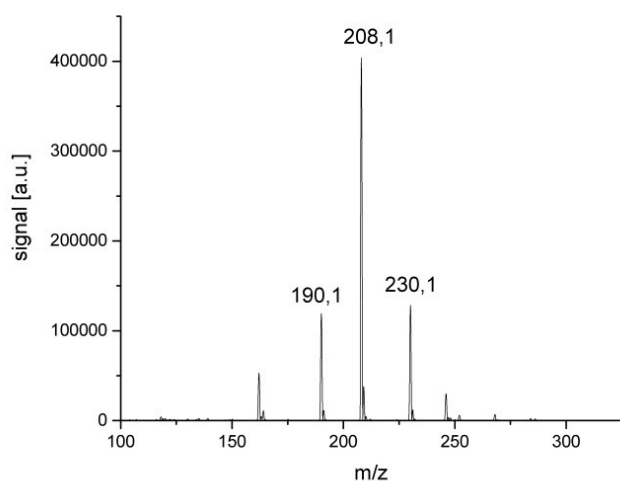


Obr. 7: Hmotnostní spektrum L-sepiapterinu, změřené v režimu produktového iontu při kolizní energii 15 V.

V režimu produktového iontu byly pak vyzkoušeny hodnoty kolizní energie 15, 20 a 25 V v rozsahu m/z 100 - 300. Pro L-sepiapterin byly zvoleny dva různé produktové ionty s odlišnými optimálními hodnotami kolizní energie. Pro produktový iont o $m/z = 192,1$ byla zvolena kolizní energie 15 V a pro druhý iont o $m/z = 165,1$ hodnota 20 V (tabulka 2). Obě naměřená hmotnostní spektra L-sepiapterinu v režimu produktového iontu jsou uvedena na obr. 6 a 7.

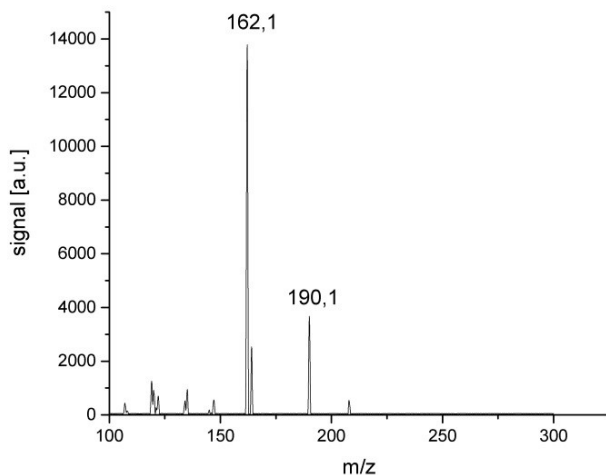
3.1.2 Pterin -6-karboxylová kyselina

Optimalizační postup pro pterin-6-karboxylovou kyselinu byl obdobný jako v případě L-sepiapterinu. V hmotnostním spektru SCAN módu, změřeném v rozsahu m/z 100 - 300 byl zvolen nejintenzivnější pík o $m/z = 208,1$, jak je vidět na obr. 8. Pro tento prekurzorový iont pak byly v SIM módu vyzkoušeny fragmentační energie o hodnotách 80, 100 a 120 V. Nejintenzivnější pík byl pozorován při fragmentační energii 100 V.



Obr. 8: Hmotnostní spektrum pterin-6-karboxylové kyseliny, změřené v režimu SCAN při fragmentačním napětí 120 V

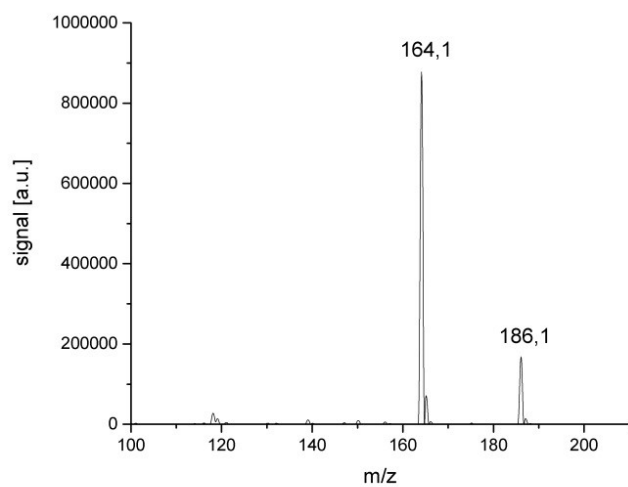
Dále byly v režimu produktového iontu změřena spektra při kolizních energiích 20 a 25 V v rozsahu m/z 100 - 300. Jako optimální hodnota kolizní energie bylo zvoleno 20 V a hodnota m/z pro produktový iont jako 162,1 (viz obr. 9).



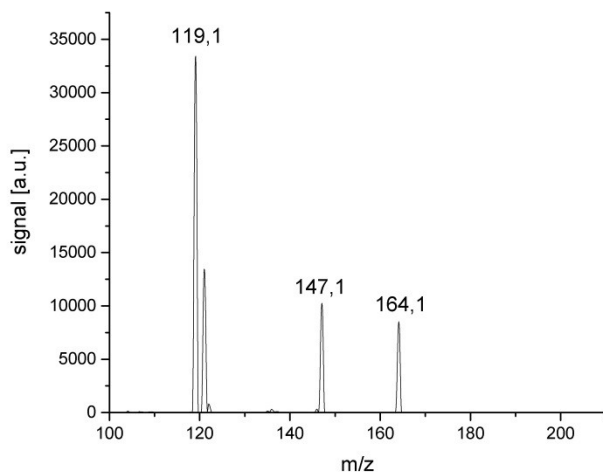
Obr. 9: Hmotnostní spektrum pterin-6-karboxylové kyseliny, změřené v režimu produktového iontu při kolizní energii 20 V.

3.1.3 Pterin

Standard pterinu byl nejdříve proměřen v režimu SCAN při fragmentační hodnotě 120 V v rozsahu m/z 100 - 200. Jako prekurzorový iont byl zvolen iont o $m/z = 164,1$ (viz obr. 10) Testované hodnoty fragmentační energie v SIM módu byly 100, 110, 120 a 135 V a nejintenzivnější pík, který odpovídal poměru m/z prekurzorového iontu, byl pozorován při fragmentační energii 100 V. Spektrum produktového iontu bylo změřeno při hodnotách kolizní energie 20 a 25 V v rozsahu m/z 100 - 200. Jako optimální hodnota kolizní energie byla zvolena hodnota 20 V, při které byl pozorován nejintenzivnější pík s poměrem $m/z = 119,1$ (viz obr. 11).



Obr. 10: Hmotnostní spektrum pterinu, změřené v režimu SCAN při fragmentačním napětím 100 V.



Obr. 11: Hmotnostní spektrum pterinu, změřené v režimu produktového iontu při kolizní energii 20 V.

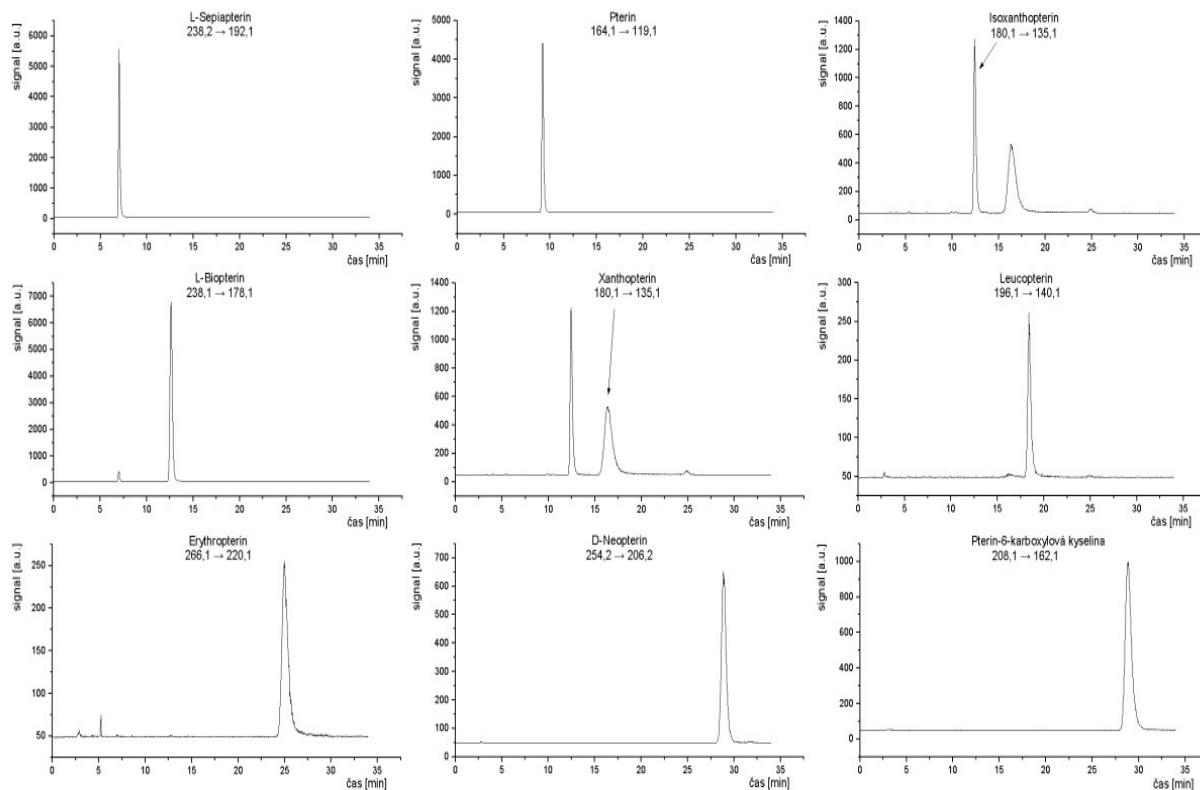
V tabulce 2 jsou uvedeny optimalizované hodnoty pro deriváty pterinu, určené v rámci této bakalářské práce. U derivátů pterinu, označených hvězdičkou, byly optimalizované parametry přejaty z literatury [1]. V tabulce 3 jsou sumarizovány vybrané chromatografické charakteristiky, získané za optimalizovaných podmínek. Rozlišení (*R*) bylo spočítáno pouze pro polohové izomery xanthopterin a isoxanthopterin, jelikož tyto látky poskytují identický fragmentační vzor a měly tedy stejné hmotnostní přechody. Rozlišení mezi nimi činilo 2,1. Na obr. 12 jsou uvedené chromatogramy jednotlivých pterinů, získané změřením směsi všech studovaných derivátů pterinu v DMSO za optimalizovaných podmínek včetně příslušných hmotnostních přechodů; koncentrace každého derivátu byla 5 µg/ml.

Tabulka 2: Optimalizované podmínky hmotnostní detekce pro L-sepiapterin, pterin-6-karboxylovou kyselinu (PT6), pterin a ostatní studované deriváty, označené hvězdičkou, pro něž byly podmínky převzaty z práce [1], M_r - relativní molekulová hmotnost.

látka	M_r	fragmentační energie [V]	prekurzorový iont [m/z]	kolizní energie [V]	produktový iont [m/z]
L-sepiapterin	237,2	120	238,2	20	165,1
				15	192,1
PT6	207,2	100	208,1	15	162,1
pterin	163,1	100	164,1	20	119,1
L-biopterin*	237,1	115	238,1	17	178,1
erythropterin*	265,1	110	266,1	8	220,1
isoxanthopterin*	179,1	125	180,1	20	135,1
leucopterin*	195,1	120	196,1	16	140,1
D-neopterin*	253,2	115	254,2	14	206,2
xanthopterin*	179,1	125	180,1	20	135,1

Tabulka 3: Vybrané chromatografické charakteristiky pro analyzované látky, kde t_r je retenční čas, k je retenční faktor a n je počet teoretických pater, přepočítaný na 1 m kolony

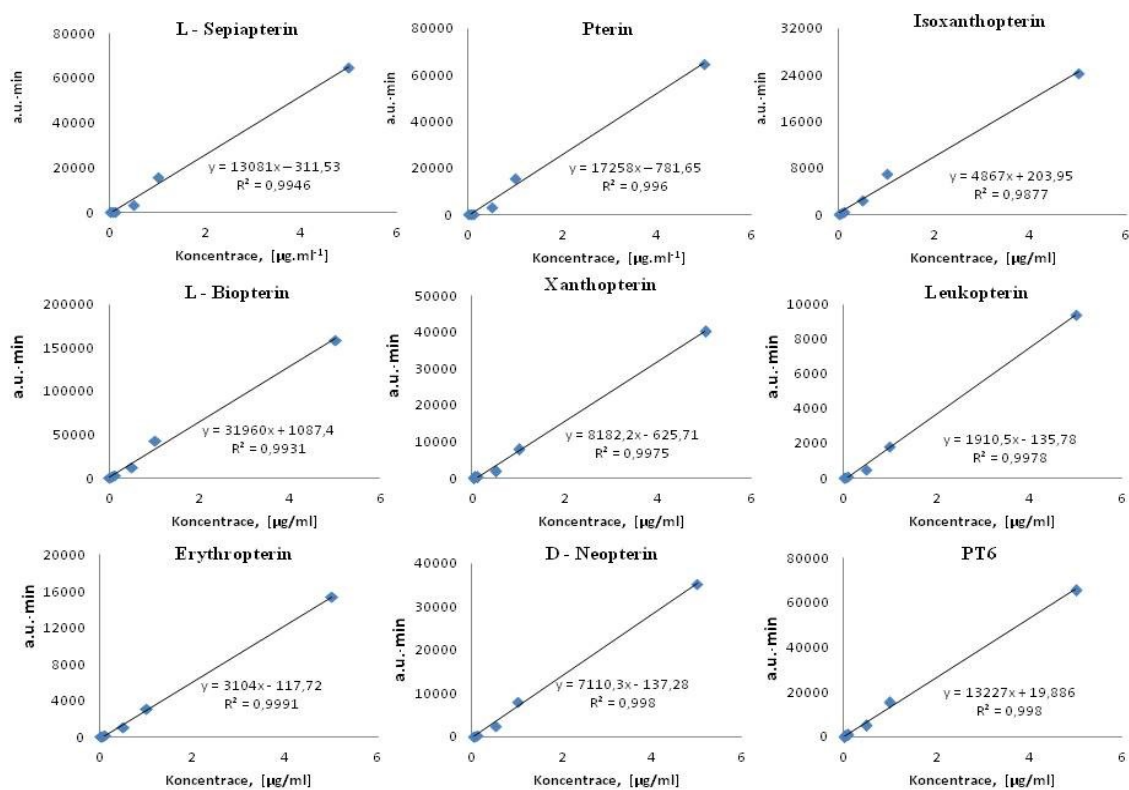
látka	t_r , [min]	k	n
L-sepiapterin	6,90	1,56	12268
pterin	9,20	2,41	17849
isoxanthopterin	12,4	3,59	12355
L-biopterin	12,5	3,64	3920
xanthopterin	15,3	4,67	44970
leukopterin	18,4	5,81	37406
erythropterin	25,1	8,30	26512
D-neopterin	28,8	9,67	46022
PT6	29,0	2,41	1561



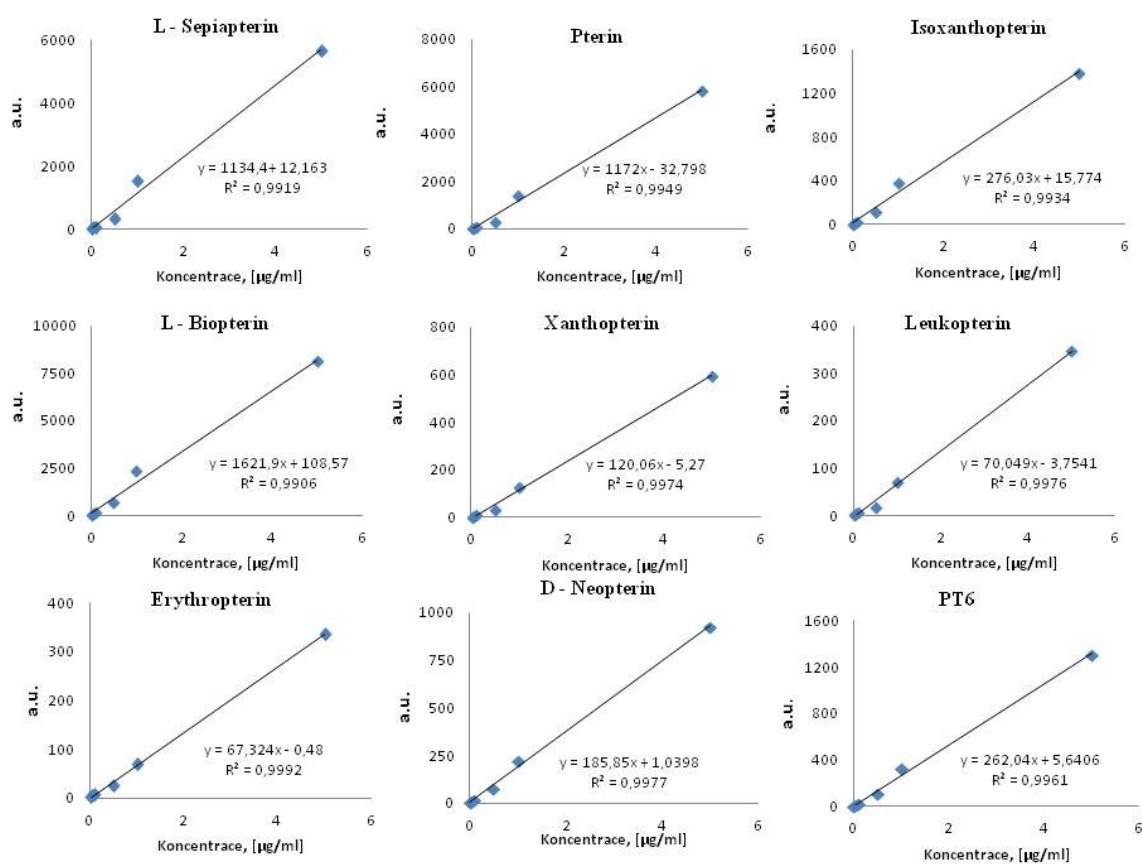
Obr. 12: Chromatogramy jednotlivých pterinů, získané změřením směsi všech studovaných derivátů pterinu v DMSO za optimalizovaných podmínek včetně příslušných hmotnostních přechodů; koncentrace každého derivátu 5 $\mu\text{g/ml}$.

3.2 Kalibrační závislosti

Závislost plochy a výšky píku na koncentraci studovaných derivátů pterinu byla proměřena v koncentračním rozsahu 0,01 až 10 $\mu\text{g/ml}$. Každý vzorek obsahoval směs všech devíti studovaných derivátů o totožné koncentraci a každý vzorek byl proměřen třikrát ($n = 3$). Kalibrační řada byla připravena příslušným ředěním směsného roztoku standardů DMSO. Získané závislosti byly zpracovány metodou lineární regrese a bylo zjištěno, že nejvyšší proměřovaná koncentrace derivátů (10 $\mu\text{g/ml}$) již neleží v lineární oblasti, a proto byla tato koncentrace z regresní analýzy vynechána. Výsledky, získané pro závislost plochy píku na koncentraci, jsou uvedeny na obr. 13 a pro závislost výšky píku na koncentraci na obr. 14.



Obr. 13: Kalibrační závislosti ploch píků na koncentraci, změřené pro jednotlivé deriváty pterinu včetně výsledků regresní analýzy, (R^2) – koeficient determinace.



Obr. 14: Kalibrační závislosti výšek píků na koncentraci, změřené pro jednotlivé deriváty pterinu včetně výsledků regresní analýzy, (R^2) – koeficient determinace.

V tabulce 4 jsou uvedené parametry kalibračních závislostí změřené pro plochy píku a hodnoty limitu detekce (LOD) a kvantifikace (LOQ), vypočtené z regresních rovnic, získaných pro závislost výšky píku na koncentraci (viz obr. 14).

Tab. 4: Výsledky lineární regrese pro závislost plochy píku na koncentraci analytů, měřených ve směsi, hodnoty koeficientu determinace (R^2) a limity detekce (LOD) a kvantifikace (LOQ)

látká	směrnice [a.u.·min·ml·μg ⁻¹]	úsek [a.u.·min]	R^2	LOD [μg·ml ⁻¹]	LOQ [μg·ml ⁻¹]
L-sepiapterin	13081	-311,5	0,9946	0,0004	0,0013
pterin	17258	-781,5	0,9960	0,0284	0,0293
isoxanthopterin	4867	204,0	0,9877	0,0016	0,0054
L-biopterin	31960	1087,4	0,9931	0,0003	0,0009
xanthoterin	8182,2	-625,7	0,9975	0,0476	0,0564
leukopterin	1910,5	-135,8	0,9978	0,0600	0,0750
erythropteirn	3104	117,7	0,9991	0,0138	0,0294
D-neopterin	7110,3	-137,3	0,9980	0,0024	0,0081
PT6	13227	19,9	0,9980	0,0017	0,0057

3.3 Měření reálných vzorků

Bylo provedeno měření tří reálných vzorků, jejichž příprava je popsána v kapitole 2.4. Postup měření všech tří reálných vzorků byl stejný a vypadal následujícím způsobem. Nejprve do vialky s inzertem bylo odpipetováno 190 μl vzorku a vzorek byl změřen za optimalizovaných HPLC-MS/MS podmínek v MRM módu. Na základě jednotlivých hmotnostních přechodů, určených pro studované deriváty, byly v reálném vzorku identifikovány jednotlivé deriváty. Získané plochy pak byly dosazeny do příslušných regresních rovnic a byla zjištěna koncentrace jednotlivých pterinů, přítomných ve vzorcích. Následně byl k 140 μl vzorku přidán standardní přírůstek o objemu 10 μl o koncentraci všech derivátů 5 $\mu\text{g/ml}$ a byly opět změřeny plochy píků a dosazeny do rovnice (1), uvedené v kapitole 1.5.4. Získané výsledky pro jednotlivé vzorky jsou uvedeny v tabulkách 5, 6 a 7 v prvním, respektive druhém sloupci. Pro některé deriváty ležela koncentrace, zjištěná pomocí kalibrační přímky, již mimo lineární oblast (byla příliš vysoká), proto byl původní vzorek 20x zředěn a zředěný vzorek byl změřen. Plochy byly opět dosazeny do kalibračních rovnic a nalezená koncentrace, se zohledněným zředěním, je uvedena v tabulkách 5, 6 a 7 ve třetím sloupci. Zředěný vzorek byl následně také změřen stejnou metodou standardního přírůstku, plochy dosazeny do kalibračních rovnic a nalezená koncentrace, se zohledněným zředěním, je uvedena v tabulkách 5, 6 a 7 ve třetím sloupci. Koncentrace vypočtená metodou standardního přírůstku se zohledněným zředěním, je uvedena ve čtvrtém sloupci. Z tabulek 5,6 a 7 je vidět, že v případě, že koncentrace původního vzorku nebyla již v lineárním rozsahu, byly ve většině případů nalezeny metodou standardního přírůstku, aplikovaného na 20x zředěný roztok, vyšší koncentrace, než byly určeny z kalibrace neředěného vzorku. Také je vidět, že v rámci dvojice kalibrace – standardní přírůstek došlo až na výjimky k poměrně dobré shodě ve vypočítaných koncentracích.

Pro výpočet obsahu jednotlivých derivátů, přepočteného na 1 g biologického vzorku (ještěřčí kůže) byly vzaty hodnoty koncentrací, vypočtené ze standardního přírůstku (vyznačené tučně), který by měl být v případě složitější matrice přesnější. Vypočítané hodnoty jsou uvedeny v tabulce 8.

Tabulka 5: Koncentrace derivátů pterinu c [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$], nalezené ve vzorku č. 2693

nalezený analyt	kalibrace	standardní přídavek	kalibrace	standardní přídavek
pterin	0,07	0,11	-	-
isoxanthopterin	1,70	-	1,15	2,15
biopterin	0,10	0,35	-	-
xanthopterin	0,07	0,14	-	-
leukopterin	3,55	-	4,45	6,85
Pt6	0,63	-	0,65	1,65

Tabulka 6: Koncentrace derivátů pterinu c [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$], nalezené ve vzorku č. 2844

nalezený analyt	kalibrace	standardní přídavek	kalibrace	standardní přídavek
L-sepiapterin	0,04	0,05	-	-
pterin	1,05		1,20	0,91
isoxanthopterin	8,4		12,4	8,5
L-biopterin	0,33	0,42	-	-
xanthopterin	0,23	0,34	-	
leukopterin	22,0		26,3	12,2
D-neopterin	0,02	0,01	-	-
PT6	2,05		2,17	3,90

Tabulka 7: Koncentrace derivátů pterinu c [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$], nalezené ve vzorku č. 2851

nalezený analyt	kalibrace	standardní přídavek	kalibrace	standardní přídavek
L-sepiapterin	0,01	0,01		
pterin	0,24	0,22	-	-
isoxanthopterin	4,65	-	7,50	5,10
L-biopterin	0,32	0,35	-	-
xanthopterin	0,18		0,95	0,15
leukopterin	11,8	-	18,9	10,3
D-neopterin	0,01	0,04		
PT6	0,70	-	1,45	1,20

Tabulka 8: Obsah jednotlivých derivátů pterinu vztážený na 1 g vzorku, vyjádřený v [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$]

nalezený analyt	číslo vzorku		
	2844	2851	2693
L-sepiapterin	0,52	0,27	-
pterin	9,5	5,9	3,5
isoxanthopterin	89	138	68
L-biopterin	4,4	9,5	11
xanthopterin	3,6	3,5	4,4
leukopterin	121	277	217
D-neopterin	0,10	1,1	-
PT6	40	32	52

Závěr

V této práci byly pomocí analytické metody HPLC – MS/MS optimalizovány podmínky měření pro identifikaci a kvantifikaci tří pterinů, a to L-sepiapterinu, pterinu a pterin-6-karboxylové kyseliny. Pro tyto účely byla použita kolona ZIC-HILIC a mobilní fáze ACN/CH₃COONH₄ o objemovém poměru 85/15 (v/v). Analyty byly detekovány pomocí hmotnostního detektoru s trojitým kvadrupólem. Pro pterin byl zvolen hmotnostní přechod 164,1 → 119,1, hodnota optimálního fragmentačního napětí 100 V a optimální kolizní energie 20 V. Pro pterin-6-karboxylovou kyselinu byl zvolen hmotnostní přechod 208,1 → 162,1, optimální hodnota fragmentačního napětí 100 V a optimální hodnota kolizní energie 15 V. Pro L-sepiapterin byly zvolené dva hmotnostní přechody. První hmotnostní přechod byl 238,2 → 165,1 při optimální kolizní energii 20 V a druhý 238,2 → 192,1 při optimální kolizní energii 15 V. Pro oba dva hmotnostní přechody byly zvolené stejné optimální fragmentační napětí o hodnotě 120 V. Byly proměřeny kalibrační závislosti pro všech devět sledovaných derivátů. Nově vyvinutá metoda byla následně aplikována pro identifikaci a kvantifikaci pterinových derivátů ve třech vzorcích kůže z ocasu ještěrky *Podarcis muralis*.

Ve vzorku 2693 byly detekovány L-biopterin, pterin-6-karboxylová kyselina, leukopterin, isoxanthopterin, xanthopterin a pterin. Ve vzorcích 2844 a 2851 byly pak nalezené D-neopterin, L-sepiapterin, L-biopterin, pterin-6-karboxylová kyselina, leukopterin, isoxanthopterin, xanthopterin, pterin.

Seznam literatury

- [1] P. Kozlík, J. Krajiček, A. Exnerová, P. Štys, M. Bursová, R. Čabala, Z. Bosáková, “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, 2013.
- [2] W. Pfeleiderer, “Recent Developments in the Chemistry of Pteridines,” *Angew. Chemie Int. Ed. English*, vol. 3, no. 2, pp. 114–132, 1964.
- [3] Heinz Rembold, W. L. Gyure, “Biochemistry of the Pteridines ” *Angew. Chemie Int. Ed. English*, vol. 11, no. 12, 1972.
- [4] J. Tomandl, “Pteriny,” *Chem. List.*, vol. 697, no. 92, pp. 689–697, 1998.
- [5] E. Oliveros, M. L. Dántola, M. Vignoni, A. H. Thomas, 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, 2011.
- [6] A. Martínez, A. Barbosa, “Are pterins able to modulate oxidative stress?,” *Theor. Chem. Acc.*, vol. 127, no. 5, pp. 485–492, 2010.
- [7] P. Basu, S. J. N. Burgmayer, “Pterin chemistry and its relationship to the molybdenum cofactor,” *Coord. Chem. Rev*, vol. 255, no. 9-10, pp. 1016–1038, 2011.
- [8] G. Shamim, S. K. Ranjan, D. M. Pandey, R. Ramani, “Biochemistry and biosynthesis of insect pigments,” *Eur. J. Entomol.*, vol. 111, no. 2, pp. 149–164, 2014.
- [9] C. Carducci, S. Santagata, J. Friedman, E. Pasquini, C. Carducci, M. Tolve, A. Angeloni, V. Leuzzi, “Urine sepiapterin excretion as a new diagnostic marker for sepiapterin reductase deficiency,” *Mol. Genet. Metab.*, vol. 115, no. 4, pp. 157–160, 2015.
- [10] B. Thöny, G. Auerbach, N. Blau, “Tetrahydrobiopterin biosynthesis, regeneration and functions,” *Biochem. J.*, vol. 347 Pt 1, pp. 1–16, 2000.
- [11] P. Gospodinka, G. Pavlina, E. Slavov, G. Sandeva, S. Stanilova, “Serum neopterin in workers exposed to inorganic dust containing free crystalline silicon dioxide,” *Cent. Eur. J. Med.*, vol. 4, no. 1, pp. 104–109, 2009.

- [12] A. Juzeniene, M. Grigalavicius, L. W. Ma, M. Juraleviciute, “Folic acid and its photoproducts, 6-formylpterin and pterin-6-carboxylic acid, as generators of reactive oxygen species in skin cells during UVA exposure,” *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, vol. 155, pp. 116–121, 2016.
- [13] J. Krajíček, P. Kozlík, A. Exnerová, P. Štys, M. Bursová, R. Čabala, Z. Bosáková, “Capillary electrophoresis of pterin derivatives responsible for the warning coloration of Heteroptera,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1336, pp. 94–100, 2014.
- [14] X. Xiong, 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 2016.
- [15] P. Kośliński, P. Jarzemski, M. J. Markuszewski, 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, 2014.
- [16] C. Burton, H. Shi, Y. Ma, “Development of a high-performance liquid chromatography - Tandem mass spectrometry urinary pterinomics workflow,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 927, pp. 72–81, 2016.
- [17] P. Jandera, P. Janás, “Recent advances in stationary phases and understanding of retention in hydrophilic interaction chromatography. A review,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 967, pp. 12–32, 2017.
- [18] V. Ranade, *Practical High-Performance Liquid Chromatography, Fourth Edition*, vol. 13, no. 1. 2006.
- [19] D. Sýkora, E. Tesařová, M. Vosmanská, M. Zvolánková, “Moderní stacionární fáze pro RP - HPLC,” *Chem. List.*, vol. 101, p. 190–199, 2007.
- [20] L. Nováková, M. Douša a kol., *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I*, 1st ed. Praha: Europrint a.s., 2013.
- [21] L. Nováková, M. Douša a kol., *Moderní separace HPLC v teorii a praxi II*, 1st ed. Praha, 2013.

- [22] D. Friedecký, K. Lemr, “Úvod Do Hmotnostní Spektrometrie,” *Klin. Biochem. a Metab.*, vol. 20, no. 3, pp. 152–157, 2012.