

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra analytické chemie

**Vývoj HILIC metodiky pro UHPLC- MS/MS stanovení
pteridinů, porovnání selektivity různých stacionárních fází**

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Lucie Nováková, Ph.D.

Vedoucí katedry: Prof. RNDr. Petr Solich, CSc.

Hradec Králové, 2011

Radka Jánská

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Radka Jánská

Školitel: PharmDr. Lucie Nováková, Ph.D.

Název diplomové práce:

Vývoj HILIC metodiky pro UHPLC- MS/MS stanovení pteridinů, porovnání selektivity různých stacionárních fází

Tato diplomová práce se zabývá vývojem HILIC metodiky určené k identifikaci a stanovení biologicky aktivních látek neopterinu, biopterinu, 7,8-dihydroneopterinu a 7,8-dihydrobiopterinu za použití ultra-účinné kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostním spektrometrem typu trojitého kvadrupolu.

Testovány byly tři chromatografické kolony (BEH Glycan, BEH Amide a BEH HILIC), na kterých bylo zkoušeno několik druhů mobilních fází a jejich vliv na separaci zkoušených látek. Mobilní fáze byla tvořena vodnou složkou (kyselina octová a mravenčí, octan a mravenčan amonný a hydroxid amonný o nízké koncentraci) s acetonitrilem.

Na chromatografické koloně BEH Glycan byly jako nejlepší vyhodnoceny mobilní fáze ve složení 1mM octan amonný o pH= 3,8 s acetonitrilem v poměru 30:70 a 1mM octan amonný o pH= 6,8 s acetonitrilem v poměru 28:72. Chromatografická kolona BEH Amide poskytla nejlepší výsledky při užití dvou mobilních fází ve složení 1mM octan amonný o pH= 4,8 s acetonitrilem v poměru 23:77 a 1mM octan amonný o pH= 6,8 s acetonitrilem v poměru 28:72. Chromatografická kolona BEH HILIC byla vyhodnocena jako nevhodná, protože neumožnila docílit separaci všech pteridinů.

Při zvolených optimálních podmínkách byla změřena opakovatelnost metody, linearita metody a její citlivost. Metody jsou lineární (pro BEH Glycan- $r= 0,9915-0,9999$, pro BEH Amide- $r= 0,9987-0,9999$). Vyšší citlivost vykazuje kolona BEH Amide (LOD se pohyboval u NEO a BIO v rozmezí 0,22- 0,91 nmol/l, u redukovaných forem 113,94- 916,67 nmol/l, LOQ se pohyboval u NEO a BIO v rozmezí 0,74- 3,00 nmol/l, u redukovaných forem 376,00- 3025,00 nmol/l).

KLÍČOVÁ SLOVA:

Neopterin, biopterin, 7,8-dihydroneopterin, 7,8-dihydrobiopterin, HILIC, UHPLC, hmotnostní spektrometrie, BEH Glycan, BEH Amide, BEH HILIC

ABSTRACT

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical Chemistry

Candidate: Radka Jánková

Supervisor: PharmDr. Lucie Nováková, Ph.D.

Title of Doctoral Thesis:

The development of HILIC method for UHPLC-MS/MS determination of pteridins, a comparison of selectivity of various stationary phases

This graduation thesis was dealing with the development of HILIC method for the identification and quantification of biologically active substances neopterin, biopterin, 7,8-dihydroneopterin and 7,8-dihydrobiopterin by ultra-high performance liquid chromatography coupled to the mass spectrometry detector of triple quadrupole type.

Three chromatographic columns (BEH Glycan, BEH Amide and BEH HILIC) were tested. Several mobile phases and their influence on the separation of target analytes were tested. Mobile phase consisted of aqueous component (acetic and formic acid, ammonium formate and acetate and ammonium hydroxide of low concentration) and acetonitrile.

On the chromatographic column BEH Glycan following best mobile phases were evaluated: 1mM ammonium acetate pH= 3.8 with acetonitrile in the ratio 30:70 and 1mM ammonium acetate pH= 6.8 with acetonitrile in the ratio 28:72. Two mobile phases composed of 1mM ammonium acetate pH= 4.8 with acetonitrile in the ratio 23:77 and 1mM ammonium acetate pH= 6.8 with acetonitrile in the ratio 28:72 offered the best results on the chromatographic column BEH Amide. The chromatographic column BEH HILIC was assessed as unsuitable, because it did not allow to achieve the separation of pteridins.

System suitability test, linearity of the method and its sensitivity were measured at the selected optimal conditions. The methods are linear (for the BEH Glycan $r = 0.9915$ to 0.9999 , for the BEH Amide $r = 0.9987$ to 0.9999). The amide column show higher sensitivity (LOD of NEO and BIO was 0.22 to 0.91 nmol/l, LOD of NH₂ and BH₂ was 113.94 to 916.67 nmol/l, LOQ of NEO a BIO was 0.74 to 3.00 nmol/l, LOQ of NH₂ and BH₂ was 376.00 to 3025.00 nmol/l).

KEYWORDS:

Neopterin, biopterin, 7,8-dihydroneopterin, 7,8-dihydrobiopterin, HILIC, UHPLC, mass spectrometry, BEH Glycan, BEH Amide, BEH HILIC

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem a vypracovala jsem ji samostatně. Všechny použité prameny a literatura, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Tato práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové 9.5.2011

.....
Radka Jánská

Zvláštní poděkování patří PharmDr. Lucii Novákové, Ph.D. za odborné a vstřícné vedení mé diplomové práce, za její cenné rady, připomínky a čas, který mi věnovala. Velký dík patří i mým rodičům za poskytnutí zázemí a za podporu při studiu. Děkuji také všem pracovníkům Katedry analytické chemie za poskytnutí laboratoře, za ochotu a vstřícné jednání.

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK	9
1. ÚVOD	11
2. CÍL A POPIS ZADÁNÍ PRÁCE	13
3. TEORETICKÁ ČÁST	15
3.1. Pteriny.....	16
3.1.1. Chemická charakteristika.....	16
3.1.2. Biosyntéza pterinů.....	17
3.1.3. Funkce pterinů.....	18
3.1.4. Metody stanovení pteridinů.....	22
3.2. Chromatografické separační metody.....	23
3.2.1. HPLC- vysokoúčinná kapalinová chromatografie.....	24
3.2.2. UHPLC- ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie.....	24
3.3. HILIC- chromatografie hydrofilních interakcí.....	27
3.3.1. Základní mechanismus separace HILIC.....	27
3.3.2. Mobilní fáze pro HILIC.....	28
3.3.3. Stacionární fáze pro HILIC.....	28
3.4. Hmotnostní spektrometrie.....	29
3.4.1. Způsoby ionizace.....	30
3.4.2. Hmotnostní analyzátory.....	34
3.4.3. Hmotnostní detektory.....	36
3.4.4. Vakuový systém.....	36
3.5. Validace analytických metod.....	37
3.5.1. Test způsobilosti.....	37
3.5.2. Vybrané validační parametry.....	37
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	39
4.1. Materiál a pomůcky.....	40
4.1.1. Chemikálie.....	40
4.1.2. Přístroje a pomůcky.....	40
4.2. Příprava roztoků a vzorků.....	41
4.3. Optimalizace podmínek pro UHPLC-MS/MS.....	41
4.3.1. Optimalizace podmínek pro MS detekci.....	41
4.3.2. Optimalizace podmínek pro UHPLC separaci.....	42
4.4. Opakovatelnost v rámci SST.....	45

4.5. Ověření linearity a citlivosti metody.....	45
5. VÝSLEDKY A DISKUZE.....	46
5.1. Optimalizace podmínek pro MS detekci.....	47
5.1.1. MS sken- zjištění prekurzorových iontů ze spekter.....	47
5.1.2. Optimalizace podmínek v modu SIM.....	49
5.1.3. Sken produktových iontů a optimalizace podmínek v modu SRM....	50
5.2. Optimalizace podmínek pro UHPLC separaci.....	53
5.2.1. Chromatografická kolona ACQUITY UPLC BEH Glycan.....	53
5.2.2. Chromatografická kolona ACQUITY UPLC BEH Amide	59
5.2.3. Chromatografická kolona ACQUITY UPLC BEH HILIC.....	64
5.3. Opakovatelnost v rámci SST.....	68
5.4. Ověření linearity a citlivosti metody.....	69
6. ZÁVĚR.....	74
7. POUŽITÁ LITERATURA.....	77
8. PŘÍLOHA.....	83

SEZNAM ZKRATEK

AcAc	kyselina octová
ACN	acetonitril
AmF	mravenčan amonný
AmAc	octan amonný
APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku
APPI	fotoionizace za atmosférického tlaku
BH2	dihydrobiopterin
BH4	tetrahydrobiopterin
BIO	biopterin
BTEE	bis(triethoxysilyl)ethan
CI	chemická ionizace
DAPCI	desorpční APCI
DESI	desorpce elektrosprejem
E	elektrostatické pole
EI	elektronová ionizace
ESI	ionizace elektrosprejem
FAc	kyselina mravenčí
GC	plynová chromatografie
GTP	guanosintrifosfát
HILIC	chromatografie hydrofilních interakcí
HIV	virus způsobující u člověka ztrátu obranyschopnosti
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
ICR	iontová cyklotronová rezonance
IČ	infračervená oblast
IT	iontová past
LC	kapalinová chromatografie
LDI	ionizace desorpcí laserem
LOD	detekční limit
LOQ	kvantitativní limit
MAG	magnetický analyzátor

MALDI	ionizace desorpcí laserem v přítomnosti matrice
MP	mobilní fáze
MS	hmotnostní spektrometrie
NEO	neopterin
NH ₂	dihydroneopterin
NPLC	chromatografie na normálních fázích
PC	papírová chromatografie
PDI	ionizace plazmovou desorpcí
Q	kvadrupolový analyzátor
r	korelační koeficient
RPLC	chromatografie na reverzních fázích
RSD	relativní směrodatná odchylka
SIM	monitorování vybraného iontu
SFC	superkritická fluidní chromatografie
SRM	monitorování vybrané reakce
SSI	sonosprej
TEOS	tetraethoxysilan
TLC	tenkovrstvá kapalinová chromatografie
TOF	analyzátor doby letu
UHPLC	ultra-účinná kapalinová chromatografie
UV	ultrafialová oblast

1. ÚVOD

Koncentrace neopterinu v tělesných tekutinách napomáhá předvídat vývoj patologického stavu. Byl využit jako ukazatel u zánětlivých stavů a k měření aktivity imunitního systému. Jeho hladina je zvýšena u infekcí, kardiovaskulárních onemocnění, autoimunitních onemocnění, maligních onemocnění a duševních poruch.

7,8-dihydrobiopterin vzniká odbouráváním z 5,6,7,8-tetrahydrobiopterinu (BH₄). Následkem nedostatku BH₄ je hyperfenylalaninémie, jako i nedostatek neurotransmiterů serotoninu, dopaminu, adrenalinu a noradrenalinu.

Pteridiny byly doposud analyzovány pouze pomocí HPLC s fluorescenční detekcí, přičemž některé nově vyvinuté metody jsou stále velmi časově náročné. Navíc fluorescenční detekce při některých analýzách biologických vzorků nevykazuje dostatečnou selektivitu. Větší selektivitu vykazuje MS detekce, která zatím nebyla uplatněna, což dává podnět pro následné zkoumání. Jako výhodné se jeví spojení s metodou HILIC, protože pteridiny jsou polární bazické sloučeniny a právě pro analyzování takových látek je tato metoda vhodná.

2. CÍL A POPIS ZADÁNÍ PRÁCE

Tato diplomová práce se zabývá vývojem HILIC metodiky určené k identifikaci a stanovení biologicky aktivních látek neopterinu, biopterinu, 7,8-dihydroneopterinu a 7,8-dihydrobiopterinu za použití ultra-účinné kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostním spektrometrem typu trojitého kvadrupolu a porovnáváním selektivity různých stacionárních fází z hlediska retence a separace pteridinů.

Nejdříve budou změřením hmotnostních spekter neopterinu, biopterinu, 7,8-dihydroneopterinu a 7,8-dihydrobiopterinu vybrány jejich prekurzorové ionty a následně bude optimalizován parametr MS detekce- cone voltage. Po fragmentaci prekurzorových iontů bude vybrán fragment s dostatečnou intenzitou a dalším měřením zjištěna optimální kolizní energie. Za optimalizovaných podmínek budou testovány tři chromatografické kolony. Detailně bude porovnávána jejich selektivita, vliv na retenci a separaci analyzovaných látek při použití různých mobilních fází. V literatuře je stále nedostatek informací o metodě HILIC a tyto experimenty umožní jejich rozšíření. Následně budou vybrány chromatografické kolony a mobilní fáze (pH, procentuální zastoupení organické a vodné složky, koncentrace vodné složky) poskytující nejlepší výsledky a u nich bude nakonec ověřena opakovatelnost metody, linearita a citlivost.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1. Pteriny

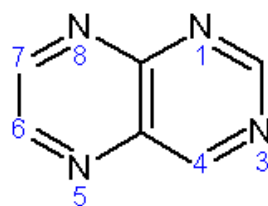
Pteriny byly objeveny v roce 1889, kdy Hopkins izoloval žlutý pigment z křídel lepidoptera [1]. Později skupina těchto pigmentů dostala název pteridiny (pteron= řecky křídlo) [2] a byla zjištěna jejich struktura [3]. U člověka byly pteriny nejprve objeveny v moči. Jedná se především o xanthopterin [4], biopterin [5] a neopterin [6].

Vysoké koncentrace pterinů se nacházejí pouze jako pigmenty u hmyzu, obojživelníků, plazů a ryb [7, 8]. Žlutý leukopterin a červený erythropterin a jsou obsaženy v křídlech motýlů, barvě mloků a mořském planktonu. Oranžový xanthopterin se kromě motýlích křídel vyskytuje i v krabech, hmyzu a lidské moči [9].

3.1.1. Chemická charakteristika

Struktura a rozdělení

Struktura pterinů je odvozena od pyrazino-[2,3-d]-pyrimidinového bicyckického systému zvaného pteridin (Obr. 1). Deriváty pteridinu se dělí podle substituce pyrimidinového cyklu na pteriny (deriváty 2-amino-4-oxo-3,4-dihydropteridinu) a lumaziny (deriváty 2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydropteridinu). Tyto deriváty pteridinu lze podle velikosti substituentů rozdělit na nekonjugované (pteridiny s relativně malými substituenty, jako např. neopterin, biopterin, molybdopterin, onkopterin) a konjugované, které obsahují větší substituenty vázané na pteridinový cyklus (např. kyselina listová, riboflavin, methanopterin [10]).



Obr. 1: Struktura pteridinu

Vlastnosti

Pteridin je žlutá látka (teplota tání 140°C), která se velmi dobře rozpouští ve vodě a ve většině organických rozpouštědel. Naopak, hydroxy a aminopteriny, které jsou asociovány intermolekulárními vodíkovými vazbami, jsou prakticky nerozpustné ve všech rozpouštědlech a mají vysoké teploty tání (kolem 350°C). Tautomerní rovnováha hydroxypterinů je posunutá na stranu oxo tautomeru [11].

Pteriny jsou sloučeniny citlivé na světlo, jeho působením se rozkládají na různé deriváty pteridinu. Vyskytují se ve třech oxidačních formách, v 5,6,7,8-tetrahydro-, 7,8-dihydro nebo v plně oxidované (aromatické) formě. Dihydropteriny rovněž existují v méně stabilní chinoidní struktuře. Redukované formy pterinů se snadno oxidují působením vzdušného kyslíku, zvláště v přítomnosti iontů kovů [12]. Pro redukované formy pterinů jsou charakteristické velmi silné antioxidační účinky a mohou *in vivo* působit jako lapače reaktivních forem kyslíku [13]. Biopterin a neopterin je možné získat z jejich redukovaných forem oxidací jodem [14, 15]. Jen oxidované formy pterinů vykazují silnou modrou fluorescenci. Biopterin a neopterin včetně svých různých oxidačních stavů mají podobná UV spektra [14].

3.1.2. Biosyntéza pterinů

Biosyntéza všech pterinů a pteridinů začíná hydrolytickým štěpením GTP pomocí GTP cyklohydrolas. Počáteční reakční krok biosyntézy většiny pteridinů katalyzuje GTP cyklohydrolasa I, přičemž výjimku tvoří biosyntéza riboflavinu u bakterií a rostlin, které obsahují GTP cyklohydrolasu II [16, 17].

Biosyntéza tetrahydrobiopterinu probíhá ve třech enzymových krocích [18]. Probíhá především v hepatocytech, v lymfocytech a v serotoninergních a dopaminergních synaptosomech.

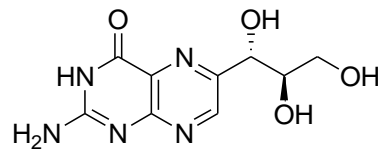
Biosyntéza neopterinu probíhá v monocitech/makrofázích. Pokud T-lymfocyty rozpoznají cizí struktury, začnou tvořit různé mediátory, tzv. lymfokiny, jako je interferon- γ . V dalším kroku vytvořený interferon- γ stimuluje lidské monocity/makrofágy, které tvoří a uvolňují neopterin [19].

Regulace biosyntézy: Biosyntéza BH₄ je regulována různými mechanismy [20], které téměř výhradně ovlivňují první a klíčový enzym, GTP cyklohydrolasu I. Kladný kooperativní efekt má na tento enzym substrát GTP, naopak konečné produkty di- a tetrahydropteriny působí inhibičně [21]. Biosyntéza pteridinů je stimulována prozánětlivými cytokiny a to zvýšenou transkripcí a následnou *de novo* syntézou GTP cyklohydrolasy I [22]. Expresí enzymu je konstituční. Nejúčinnějším stimulem je interferon- γ , velmi silným kostimulátorem je TNF- α , který však stimulační efekt sám o sobě nevykazuje [23]. Inzulín, reserpin [24] a glukokortikoidy [25] stimulují biosyntézu BH₄ rovněž indukcí GTP cyklohydrolasy I. Protizánětlivé cytokiny jako např.

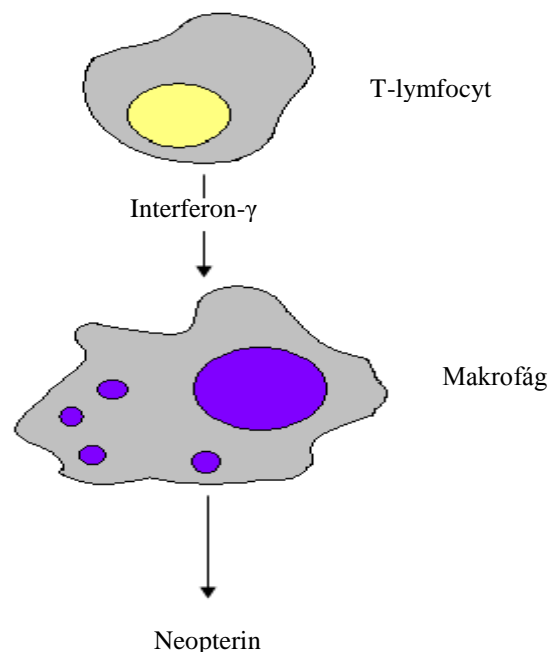
transformující růstový faktor beta [26], interleukiny 4 a 10 [26] působí na indukci inhibičně.

3.1.3. Funkce pterinů

Neopterin (NEO)



Obr. 2: Neopterin

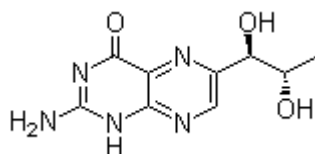


Obr. 3: Aktivace imunitního systému a produkce neopterinu monocyty/makrofágy

Funkce neopterinu (Obr. 2) v organismu není doposud objasněná. Jeho koncentrace v tělesných tekutinách napomáhá předvídat vývoj patologického stavu, který je spojen s aktivací buněčného imunitního systému [27, 28] (Obr. 3). Neopterin byl využit jako ukazatel u zánětlivých stavů a k měření aktivity imunitního systému. Neopterin je zvýšen u infekcí, kardiovaskulárního onemocnění, autoimunitních onemocnění (revmatoidní artritida, systémový lupus a atopické astma), maligních onemocnění, duševních poruch [29-35]. U autistických dětí, v porovnání s kontrolní

skupinou, byly nalezeny významně zvýšené hladiny neopterinu v moči [36]. Neopterin a jeho redukovaná forma se u člověka podílejí na modulaci cytotoxicity reaktivních forem kyslíku a chloru [37-40] a nezávisle na kyslíkových radikálech a NO způsobují apoptózu buněk [41, 42]. Dihydroneopterin má schopnost aktivovat transkripční faktory a indukovat expresi HIV-1 genu [40].

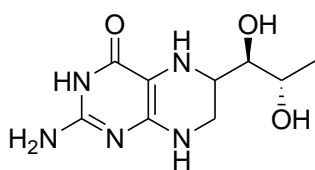
Biopterin (BIO)



Obr. 4: Biopterin

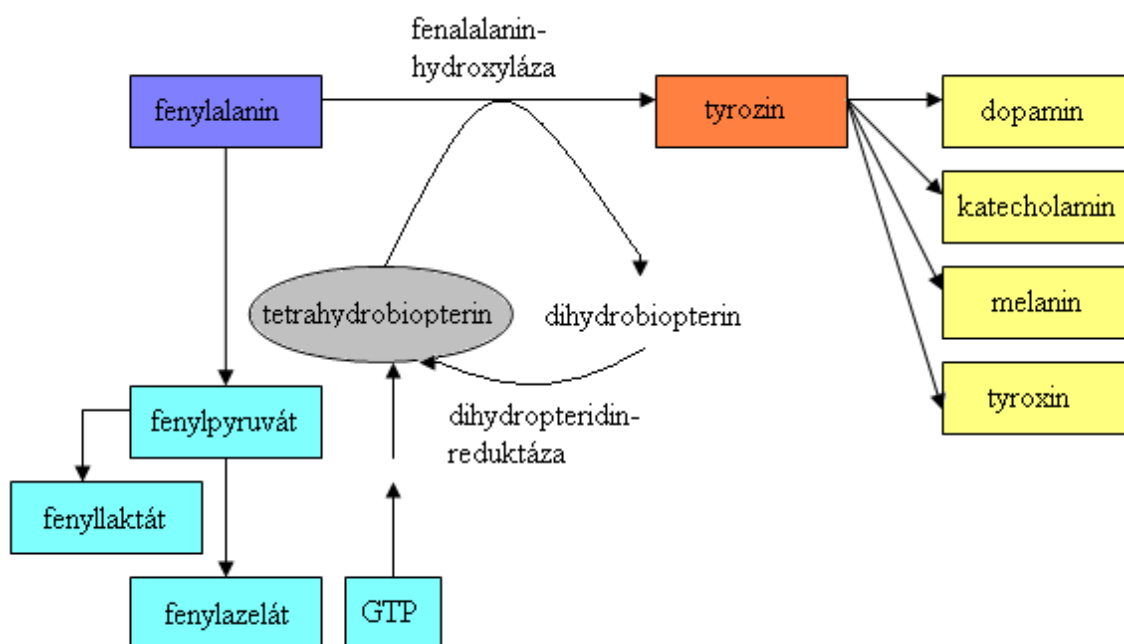
Stanovení poměru neopterin / biopterinu (NEO / BIO) v moči, spolu s ostatními parametry jako je obsah fenylalaninu a tyrosinu, se používají pro stanovení diagnózy hyperfenylalaninemie. Velké množství biopterinu (Obr. 4) je obsaženo v mateřském mléce a to až 90x více než v séru. Tato skutečnost ukazuje na možnost výroby BH4 z mléčných žláz [43].

Tetrahydrobiopterin (BH4)



Obr. 5: Tetrahydrobiopterin

BH4 (Obr. 5) je kofaktor fenylalanin-4-monooxygenazy, tyrozin-3-monooxygenazy, tryptofan-5-monooxygenazy, alkylglykol-ether-monooxygenazy a NO-synthazy. Následkem nedostatku BH4 je hyperfenylalaninemie, jako i nedostatek neurotransmiterů serotoninu, dopaminu, adrenalinu a noradrenalinu [44] (Obr. 6).



Obr. 6: Metabolismus fenylalaninu a tetrahydrobiopterinu [44]

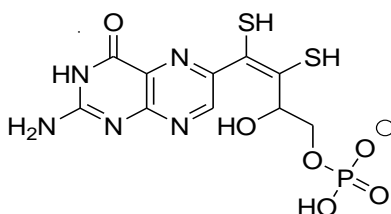
Nedostatek výše zmíněných neurotransmiterů vede k infantilnímu parkinsonismu, který se projevuje hypokinezí, hypomimií, centrální hypotonií, hypertonií končetin, poruchami polykání s hypersalivací, okulogyrální krizí, myoklonií. Bez léčby dochází k výraznému motorickému a mentálnímu opoždění vývoje [44].

Hyperfenylalaninemie je onemocnění vznikající v důsledku poruchy metabolismu aromatických aminokyselin. Tato porucha je podmíněná funkčním omezením enzymu fenylalanin-4-monooxygenazy (PAH, 98%) nebo defekty enzymů biosyntézy (GTP-cyklohydrolaza, 6-pyruvoyl-tetrahydropterinsyntáza) nebo regenerace kofaktoru fenylalanin-4-monooxygenazy, tetrahydrobiopterinu (2%, dihydropterinreduktaza, pterin-carbinolamin-dehydrataza) [44]. Hyperfenylalaninemie, která je způsobená poruchami v metabolismu pterinů, je označována jako maligní hyperfenylalaninemie. I přes mnohdy nevýrazné zvýšení koncentrace fenylalaninu v krvi může vést k závažnému psychomotorickému opoždění dítěte. Tento typ hyperfenylalaninemie není možné léčit sníženým příjmem fenylalaninu ve stravě. Kauzálním lékem je podávání tetrahydrobiopterinu [45].

Omezená dostupnost kofaktoru BH4 byla navržena jako etiologický faktor u neurologických chorob, včetně Alzheimerovy choroby, Parkinsonovy choroby, autismu, schizofrenie, deprese, stejně jako v jiných stavech jako inzulínová rezistence a kardiovaskulární onemocnění [46-51].

BH4 je ve zvýšené míře produkován aktivovanými T- lymfocyty a zvyšuje jejich afinitu k interleukinu-2 a to následně vede k jejich zvýšené proliferaci [52,53]. Dále se BH4 účastní na řízení buněčného cyklu [54] nebo na regulaci melanogeneze [55].

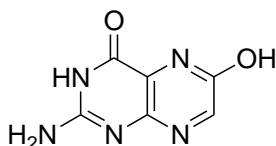
Molybdopterin



Obr. 7: Molybdopterin

Molybdopterin (Obr. 7) je součástí pterinových molybdenových kofaktorů [56]. Pteridinový cyklus se zde nachází v redukované formě a pravděpodobně se účastní v procesech přenosu elektronů [57].

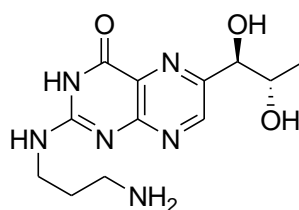
Xanthopterin



Obr. 8: Xanthopterin

Xanthopterin (Obr. 8) ovlivňuje růst a diferenciaci buněk [58-60]. Výzkumem bylo zjištěno, že nitrosvalové a nitrožilní podání xanthopterinu a isoxanthopterinu brání růstu nádorů u zvířat. Xanthopterin podaný ústy zpomaluje tempo rozvoje adenokarcinomu mléčné žlázy u myší, což vedlo k výzkumu účinků isoxanthopterinu a xanthopterinu na buňky lidského nádoru prsní žlázy. Byl prokázán jejich cytotoxický účinek na tyto buňky [61].

Onkopterin



Obr. 9: Onkopterin

V budoucnu by mohla tato sloučenina (Obr. 9) sloužit jako citlivý nádorový marker [62]. U zdravých a onkologicky nemocných jedinců byla prováděna stanovení onkopterinu v moči. U pacientů s některými druhy rakoviny byla koncentrace onkopterinu zvýšena 70-100krát, zatímco koncentrace polyaminů 2-10krát a neopterinu 2-8krát. U nemocných s hematologickými malignitami byla exkrece onkopterinu zvýšená, avšak ne statisticky významně [62-64].

3.1.4. Metody stanovení pteridinů

Pteriny se stanovují nejčastěji v moči, plazmě, séru a mozkomíšním moku, kde je jejich koncentrace řádově 10^{-9} až 10^{-6} mol.dm⁻³. Doposud však není řádně prozkoumáno, jaká je stabilita pterinů v těchto vzorcích, protože většina studií, které se týkají stability, byla prováděna pouze v modelových vzorcích. Kritickým místem je zpracování vzorků před vlastní analýzou [65].

HPLC metody

Stanovení pterinů je možné pomocí reverzně- fázové [14, 66, 67], iontově-párové [68], iontově-výměnné [69] a chirální [70] vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s fluorescenční a/nebo elektrochemickou detekcí. Ke stanovení méně polárních pterinů je vhodné použít chromatografii na reverzní fázi. Ionově-párovou nebo iontově-výměnnou chromatografii je výhodné použít pro separaci pterinů v různém oxidačním stavu, nebo různých tetrahydropterinů, nebo pro separaci mono-, di- a trifosfátů pterinů. Biologický vzorek se většinou aplikuje přímo, pokud ale obsahuje proteiny, je nutné provést deproteinaci [66-68, 71, 72]. Silná fluorescence oxidovaných forem pterinů umožňuje jejich poměrně specifickou a citlivou detekci bez předchozího zkoncentrování [66]. Redukované formy je nejdříve nutno před vlastní analýzou chemicky [14, 66, 73] nebo elektrochemicky oxidovat [66].

Fluorimetrie

Celkový obsah pterinů je možné stanovit fluorimetricky po oxidaci redukovaných forem jodem [74].

Hmotnostní spektrometrie

Detekce pterinů hmotnostní spektrometrií byla využita při jejich stanovení plynovou [24, 75] a kapalinovou chromatografií [76].

Mezi další metody patří:

Bioanalýza

ELISA

3.2. Chromatografické separační metody

Jedná se o vícestupňové separační metody, kde jednotlivé složky vzorku jsou rozdělovány mezi dvě fáze, přičemž jedna z nich je stacionární a druhá je mobilní. Stacionární fázi může být kapalina nebo pevná látka nanesená na tuhý nosič nebo gel. Tato stacionární fáze může být naplněna do kolon, rovnoměrně rozprostřena do vrstvy nebo filmu atd. Mobilní fáze může být plynná, kapalná nebo kapalina v superkritickém stavu. Separace může být založena na adsorpci, rozdělování, výměně iontů atd. nebo může být založena na rozdílech ve fyzikálně-chemických vlastnostech molekul, mezi které patří např. velikost, hmotnost, objem atd. [77].

Chromatografii můžeme rozdělit na [78] :

A) plynová (GC)

- a) adsorpční
- b) rozdělovací

B) superkritická fluidní (SFC)

C) kapalinová (LC)

a) kolonová (HPLC)

- adsorpční- využívá rozdílné adsorpce molekul analytů na povrchu tuhé fáze s aktivními centry.

- rozdělovací - využívá rozdílné rozpustnosti (a tudíž i rozdílné distribuce) molekul analytů mezi dvěma zcela nemísitelnými kapalinami.
- gelová- využívá mechanického dělení molekul analytů v pórech gelu na základě jejich rozdílné velikosti.
- iontově výměnná- využívá rozdílné výměnné adsorpce analytů (iontů) na povrchu iontového měniče.

b) planární (plošná)

- papírová (PC)
- tenkovrstvá (TLC)

3.2.1. HPLC- vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Technika HPLC zaujímá mezi metodami kapalinové chromatografie významné místo. Zkratka HPLC je odvozena od „high performance liquid chromatography“ (vysokoúčinná kapalinová chromatografie). Mobilní fází je v tomto případě kapalina. Stacionární fáze je tvořena buď pevným adsorbentem, nebo filmem příslušné látky, který je zakotvený na povrchu nosiče. Tato separační metoda má mnoho výhodných vlastností. Jedná se o metodu umožňující současně jak kvalitativní, tak i kvantitativní hodnocení separovaných složek směsi, a to s vysokou citlivostí, selektivitou a v relativně krátkém čase. K měření stačí velmi malé množství vzorku a pro velké série vzorků je možno s využitím automatického dávkovače celou metodu plně automatizovat. Z HPLC záznamu je možné získat podrobné informace o identitě, obsahu i čistotě separovaných složek [79, 80].

V rámci rozdělovací HPLC lze zmínit dva systémy. A to tzv. normální systém, kdy je stacionární fáze polárnější než fáze mobilní a tzv. systém reverzní, neboli systém obrácených fází, kdy je stacionární fáze tvořena organickým hydrofobním rozpouštědlem a mobilní fází je rozpouštědlo hydrofilní. Reverzní systém je používán mnohem častěji a je vhodný k dělení méně polárních látek [79, 81].

3.2.2. UHPLC- ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie

UHPLC se v poslední době stala široce používanou technikou v analytických laboratořích všech oborů. Hlavní aplikací této techniky jsou farmaceutické analýzy

(vývoj léčiv, kontrola kvality léčivých přípravků, bioekvivalenční studie), analýza životního prostředí, analýza potravin a mnohé další [83].

S využitím UHPLC lze při současném zachování nebo zvýšení rozlišení a citlivosti dosáhnout 2-21x rychlejší separace. To je dáno použitím malých částic sorbentu. Pro UHPLC částice je charakteristická velikost menší než 2,0 μm , což je optimální velikost pro UHPLC, další zmenšování částic vede pouze ke zvyšování zpětného tlaku a zvýšení účinnosti je již zanedbatelné [83-85].

UHPLC má tedy řadu výhodných vlastností oproti klasické HPLC technice [84]:

- kratší doba analýzy
- snížení nákladů (menší spotřeba HPLC rozpouštědel)
- zvýšení separační účinnosti a rozlišení
- zvýšení citlivosti
- více kvalitativních informací

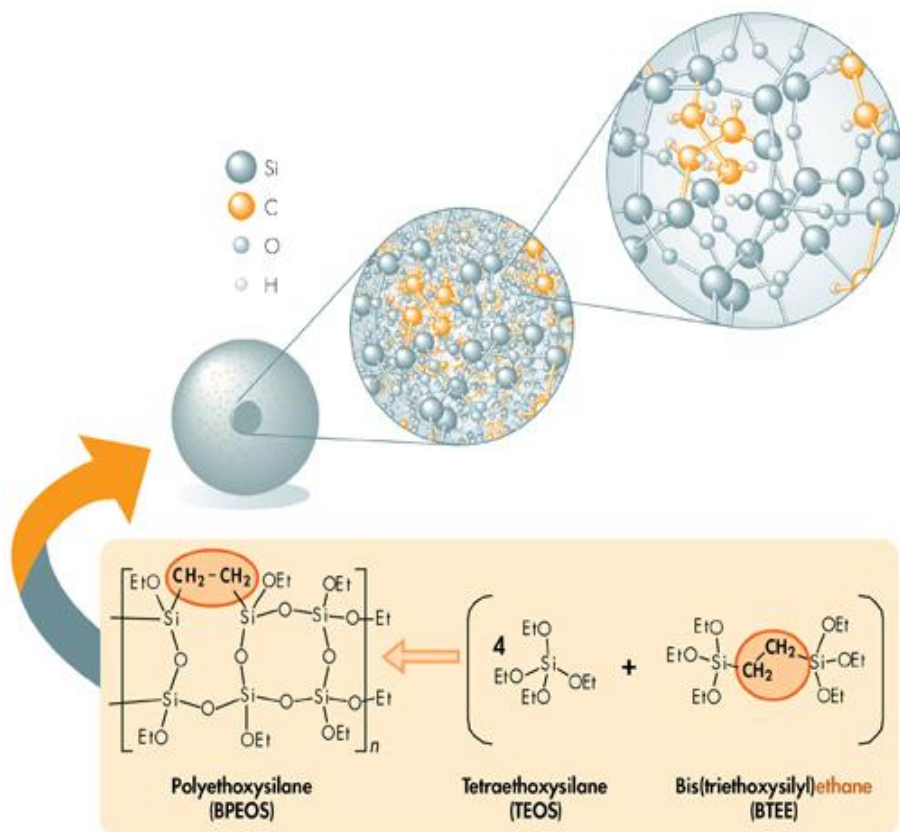
Sorbenty UHPLC

Používané "klasické" HPLC sorbenty jsou v podstatě dvojího typu. Jako nosič se používá buď:

A) anorganický nosič - silikagel nebo

B) organický nosič - polymer

Pro oba dva typy jsou charakteristické určité výhody, ale i nevýhody. Sorbenty, které jsou založené na bázi silikagelu, se vyznačují poměrně vysokou mechanickou odolností, vykazují vysokou účinnost a na těchto sorbentech se dobře dají predikovat retence solutů. Nevýhodou lze spatřovat v limitovaném rozsahu pH mobilní fáze, chemické nestabilitě a chvostování bazických solutů. Sorbenty založené na polymerní fázi mohou pracovat v široké oblasti pH, jsou chemicky stabilní a nedochází na nich k iontovým interakcím. Nevýhodou je však jejich nižší mechanická odolnost, nižší účinnost a špatně předvídatelná retence solutů. O spojení výhodných vlastností obou typů sorbentů a dosažení tak optimálních vlastností sorbentů se pokouší různé hybridní technologie, např. hybridní technologie "Ethylene Bridged Hybrid (BEH) particle technology". K zamezení vlivu volných hydroxylových skupin silikagelu a ke zvýšení jeho mechanické odolnosti je použito tzv. ethylenových můstků [84] (Obr.10).



Obr. 10: Vznik polyethoxysilanu a BEH částice (Ethylene Bridged Hybrid částice) [86]

V rámci mé diplomové práce jsem pro měření využívala Acquity UPLC systém od firmy Waters (Obr. 11).



Obr. 11: Acquity UPLC (UHPLC systém) [87]

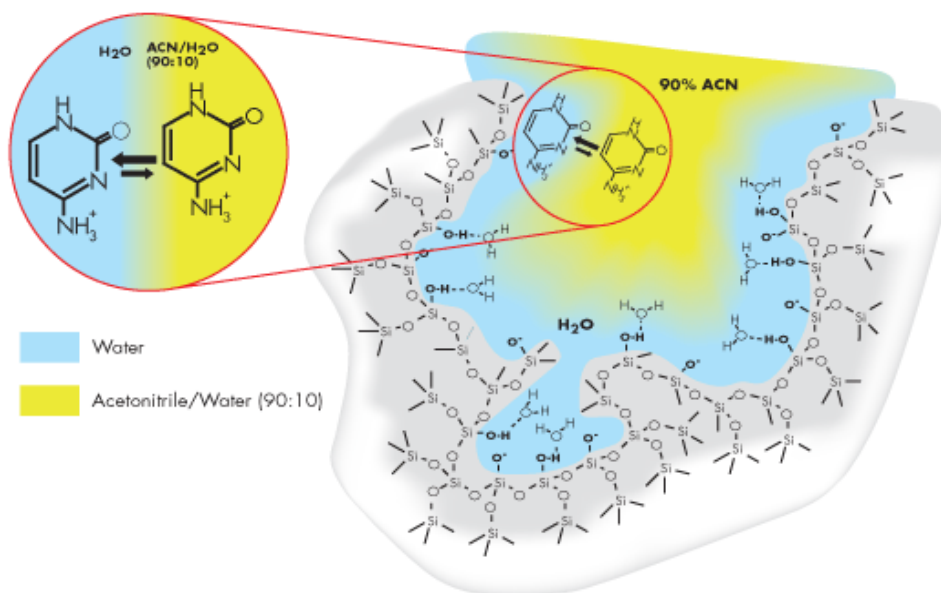
3.3. HILIC- chromatografie hydrofilních interakcí

Termín HILIC vytvořil v roce 1990 Alpert, který vysvětlil jeho principy a některá důležitá použití [88]. HILIC je alternativou ke konvenčním RP-HPLC (obrácená fáze HPLC) nebo NP-HPLC (normální fáze HPLC). [83].

Separace HILIC je zaměřena převážně na polární, ve vodě dobře rozpustné látky. K těmto separacím se využívají polární stacionární fáze a vodné mobilní fáze obsahující vysoký podíl organického rozpouštědla (více jak 60 %), přičemž stacionární fáze musí být více polární než fáze mobilní. Toto uspořádání umožňuje s vysokým rozlišením dělit polární analyty. Nepochybně látky, které nemají afinitu ke stacionární fázi, nejsou zadržovány [89].

3.3.1. Základní mechanismus separace HILIC

V ideálním případě je separace HILIC řízena hydrofilní interakcí mezi polární stacionární fází a solutem (tzv. primární interakce). Během separace se ovšem uplatňují i druhotné interakce (např. elektrostatické interakce aj.). Podmínkou je, aby zadrž solutu byla primárně řízena hydrofilními interakcemi. Aby mohlo k hydrofilní interakci dojít, je pravděpodobně potřeba, aby se na povrchu sorbentu stacionární fáze vytvořila hydratovaná vrstva (obr. 12).



Obr. 12: Princip metody HILIC [89]

Přidáním amonných solí organických kyselin, jako je např. mravenčan nebo octan amonný je možné omezit elektrostatické odpuzování separovaných složek (druhotné

interakce). Výše uvedené platí zejména pro negativně nabitou stacionární fázi na bázi silikagelu. Amonné soli se obvykle používají v milimolárních koncentracích, přičemž kation NH_4^+ je schopný kompenzovat negativní náboj stacionární fáze. Důležitá je volba vhodné amonné soli a to z hlediska její rozpustnosti v mobilní fázi (dosažení požadované iontové síly) s vysokým obsahem organického rozpouštědla. Optimalizovat můžeme i další parametry, např. pro zvýšení ionizace při hmotnostně spektrometrické detekci je možné obohatit mobilní fázi přídatkem organické kyseliny (např. kyseliny mravenčí). Retence může být ovlivněna aciditou mobilní fáze, teplotou a koncentrací použité soli v mobilní fázi [89].

3.3.2. Mobilní fáze pro HILIC

Jako mobilní fáze je teoreticky možné použít všechny vodno-organické fáze, ale upřednostňuje se především acetonitril, který má malou viskozitu. To vede k vysoké účinnosti separace a nízkému tlaku na chromatografické koloně. Obvykle se koncentrace acetonitrilu pohybuje v rozmezí od 50 do 90 %, například pro separaci sacharidů je obsah acetonitrilu 70 % jako optimální. Může být použit také isopropanol, ale mobilní fáze pak mají vyšší viskozitu [90].

3.3.3. Stacionární fáze pro HILIC

Běžně je možné se setkat s polárními chemicky vázanými fázemi na partikulárním nebo monolitickém nosiči. Nejčastěji jde o klasickou silikagelovou stacionární fázi nebo fáze modifikované diolovými ($-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-\text{OH}$), kyanovými ($-\text{CN}$), aminovými ($-\text{NH}_2$), amidovými ($-\text{CONH}_2$) funkčními skupinami. Dále je možné použít silikagel modifikovaný hydrofilními polymery, např. poly(hydroxyethylem) nebo poly(sulfoethylem). Jednou z nejnovějších stacionárních fází pro HILIC je tzv. zwitteriontová stacionární fáze. Jde o chemicky vázané funkční skupiny, které nesou pozitivní a negativní náboj a vyznačují se vysokou polaritou a vysokou afinitou k vodě. Zavedeny byly také sorbenty s chemicky vázanými jednotkami oligosacharidů [89].

3.4. Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je fyzikálně-chemická metoda využívající separace urychlených iontů ve vakuu, a to podle jejich hmotnosti (přesněji podle poměru hmotnosti k náboji), při jejich průchodu magnetickými a elektrickými poli [91, 92].

Tato metoda je schopna analyzovat téměř jakýkoli materiál, ať už anorganický nebo organický. Mezi její přednosti patří vysoká citlivost a selektivita, potřeba minimálního množství vzorku (např. 10^{-12} g), které může mít téměř libovolnou formu (kapalina, tuhá látka, plyn, plazma), možnost pracovat s čistými látkami i s velmi komplikovanými směsmi, jako je např. biologický materiál. Principem analýzy je měření hmotnostních spekter, ze kterých je možné přečíst, často i velmi přesně, struktury měřených látek [92].

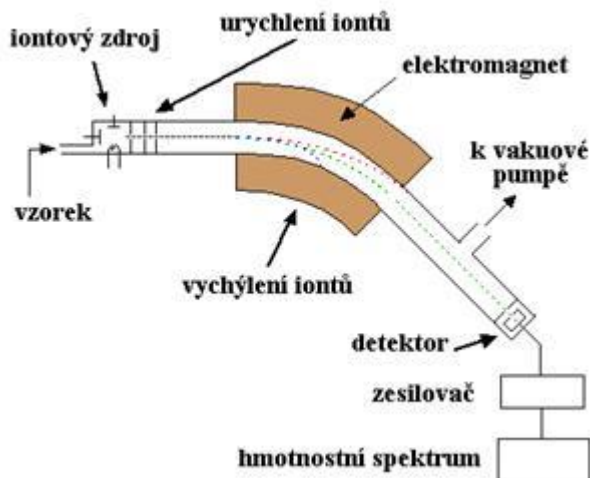
Hmotnostní spektrometrie byla vyvinuta počátkem 20. století a původně byla využívána zvláště ve fyzice a chemii. V současné době patří mezi klíčové analytické metody, a to jak ve výzkumu, tak i v oblasti rutinní analýzy. V průběhu posledních dvaceti let se její využití rozšířilo snad do všech oblastí přírodních věd. S touto metodou se můžeme běžně setkat i přímo, např. během osobních bezpečnostních prohlídek na letištích, nebo zprostředkovaně, kdy je tato metoda použita např. v lékařství (diagnostika nádorových onemocnění a metabolických chorob). Velký význam má pro kriminalisty (identifikace pachatelů, identifikace drog, detekce výbušnin, apod.), je výhradním nástrojem antidopingových kontrol, používá se v geologii a archeologii (datování stáří předmětů), v monitorování kvality životního prostředí, v chemii, ve fyzice, biologii, při kontrole kvality potravin, zemědělských produktů nebo předmětů denní potřeby obecně (kosmetika, apod.). Farmaceutické firmy používají hmotnostní spektrometrii při hledání struktur nových léků [92, 93].

Za vývoj technik hmotnostní spektrometrie byly uděleny celkem čtyři Nobelovy ceny za fyziku nebo chemii [92].

Jednotlivé kroky při analýze pomocí MS [77]:

- ionizace
- separace iontů
- detekce

Tyto kroky realizované při analýze hmotnostním detektorem jsou znázorněny na obr. 13.



Obr. 13: schéma hmotnostního spektrometru [94]

3.4.1. Způsoby ionizace

Z důvodu manipulace s látkami pomocí magnetického nebo elektrického pole, je nezbytné vytvořit z neutrálních molekul ionty. Většinu látek je možné ionizovat pomocí více ionizačních technik. Volba vhodné ionizace je závislá na povaze látky (polarita, rozpustnost, ionizační energie, velikost, u MALDI možnost kokrystalizovat s matricí,) a na volbě separační techniky [95].

Ionizační techniky lze rozdělit podle dvou hledisek:

- A) podle energie ionizace
- B) podle tlaku v iontovém zdroji

A) Ionizační techniky podle energie ionizace [95]:

1) Měkké ionizační techniky

- řadíme sem např. (ESI, APCI, FAB, MALDI, CI, FD, TS,....)
- pro měkké ionizační techniky je charakteristická nízká ionizační energie
- dochází k vytvoření převážně molekulárních iontů nebo iontů molekulárních aduktů
- výtěžnost ionizace a tvorba aduktů velmi závisí na zvolených podmínkách (složky mobilní fáze, matrice, pH, atd.)

- kvantifikace je ve spojení se separačními technikami problematická, bez použití vnitřního standardu téměř nemožná

2) Tvrdé ionizační techniky

- spektra ve větší míře obsahují fragmenty
- dochází k tvorbě maximálně molekulárních iontů
- při zvolené ionizační energii vznikají reprodukovatelná spektra
- tvorba knihoven spekter, na jejichž základě dochází k snadnější identifikaci látek
- v případě EI ionizace je nejpropracovanější teorie fragmentace – to umožňuje řešení struktur látek z EI spekter

B) Ionizační techniky podle tlaku v iontovém zdroji:

- 1) Ionizace za atmosférického tlaku (ESI, APCI, APPI...)
- 2) Ionizace za sníženého tlaku (EI, FAB, MALDI...)

3.4.1.1. Elektronová ionizace (EI)

Vzorek převedený do plynné fáze je ionizován proudem elektronů emitovaných z wolframového nebo rheniového vlákna zahříváného stejnosměrným proudem, jejichž kinetická energie (obvykle 70 eV) je vyšší než ionizační energie analyzovaných molekul. Kromě molekulárního iontu M^+ je možno ve spektru pozorovat i ionty fragmentové, které jsou charakteristické pro strukturu pozorovaných molekul. Tyto fragmenty se tvoří, protože vzniklé ionty mají značný přebytek energie a jen některé z nich jsou stabilní dostatečně dlouhou dobu. Následnými pochody proto dochází k fragmentaci (rozštěpení molekuly na nabitě a nenabitě části) a k přesmykům (přeskládání struktury fragmentovaných částí). Po ionizaci jsou tedy kromě ion-radikálů přítomny také kationty, radikály a neutrální molekuly. Proud elektronů je směřován prostorem iontového zdroje směrem k anodě. Vznikající ionty jsou z prostoru iontového zdroje vytlačovány elektrickým polem pomocné elektrody (repeleru). Tato ionizační technika je hlavně limitována nutností převedení vzorku do plynné fáze a není vhodná pro látky polární, termolabilní nebo vysokomolekulární. EI ionizace je vhodná pro spojení hmotnostní spektrometrie s plynovou chromatografií, v některých případech s kapalinovou chromatografií [77, 94-96].

3.4.1.2. Chemická ionizace (CI)

Primárním zdrojem energie je zde opět proud urychlených elektronů. Energie těchto elektronů je přenášena na analyzovanou látku zprostředkovaně přes reakční medium (methan, propan, voda, vodík, amoniak, vodík/helium, oxid dusnatý a dusičitý nebo kyslík). Toto reakční medium je v ionizační komůrce přítomno pod tlakem 50 – 150 Pa. Jako reakční medium je nejčastěji používán methan. Reakční kationty (CH_5^+ a C_2H_5^+) interagují s molekulou analytu M za vzniku kvazimolekulárního iontu typu $[\text{M} + \text{H}]^+$, $[\text{M} - \text{H}]^-$, nebo popřípadě aduktových iontů, které vznikají mezi vzorkem a použitým plynem. Ve srovnání s EI ionizací je produkováno méně fragmentových iontů. Iontový zdroj pro CI je konstruován prakticky totožně jako EI zdroj. Pro ionizaci termolabilních látek je využívána varianta desorpční chemické ionizace, při které je vzorek nanesený na žhavené kovové vlákno velmi rychle odpařen vlivem Joule-Thomsonova jevu [77, 94].

3.4.1.3. Ionizace desorpcí laserem v přítomnosti matrice (MALDI- matrix-assisted laser desorption ionisation)

Tato metoda se vyvinula se z LDI (ionizace desorpcí laserem). Vzorek je nanášen společně s matricí na kovovou destičku a ionizován zářením pulzního laseru (oblast vlnových délek od UV do IČ, délka trvání pulzu od pikosekund až k nanosekundám), dochází ke kokrytalizaci analytu a matrice. Z tohoto krystalizací vzniklého systému jsou působením laseru uvolňovány ionty i relativně velkých molekul. Převážně vznikají kvazimolekulární ionty analytu s vodíkem. Tvorba iontů je komplikovaná. Dochází ke třem základním typům ionizace a to přenos protonu, interakce s ionty (např. kationizace kovovými ionty) a vytvoření iontu odtržením elektronu. Pro měření je důležité nalézt vhodnou matrici. Používána je látka, která absorbuje energii laseru a následně ionizuje analyt (kyselina α -hydroxyskořicová, kyselina sinapová ...). Zjednodušeně lze říci, že pro hydrofilní polymery je vhodné použít hydrofilní matrice a naopak pro hydrofobní polymery hydrofobní matrice. Tato ionizační technika hraje klíčovou roli při analýze makromolekulárních látek s hmotností až 100 kDa a je používána ve spojení s průletovými hmotnostními analyzátory (TOF) [77, 95, 97].

3.4.1.4. Elektrosprej (ESI)

Ionizace probíhá za atmosférického tlaku. Vzorky v roztoku jsou přiváděny po výstupu z chromatografické kolony do iontového zdroje kovovou kapilárou, na jejíž

konec je vloženo vysoké napětí (3-5 kV). Na výstupu z kapiláry vznikají malé kapičky, které nesou vlivem vysokého gradientu elektrického pole kladný nebo záporný náboj a to podle polarit vloženo napětí. Odpařováním rozpouštědla dochází ke zmenšení kapiček, což vede ke zvýšení hustoty povrchového náboje, až dojde k rozpadu na menší kapičky a nakonec se uvolní jednou a nebo vícenásobně nabité ionty. Průtoková rychlost kapalně fáze, která přichází do elektrospreje se pohybuje v rozmezí několika $\mu\text{l}/\text{min}$ až $1 \text{ ml}/\text{min}$. Tato ionizační technika je vhodná pro analýzu polárních látek a biomolekul do molekulových hmotností až 100 kDa . ESI může být spojena s kapalinovou chromatografií nebo kapilární elektroforézou [77, 98].

3.4.1.5. Chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI)

Uspořádání iontového zdroje je podobné jako u elektrospreje. Na kapiláru však není vloženo napětí, ale u jejího konce je umístěna výbojová jehla (elektroda). Napětí je vloženo právě na tuto výbojovou jehlu, čímž dochází ke vzniku koronárního výboje, kterým jsou ionizovány molekuly mobilní fáze přítomné v plynné fázi ve velkém nadbytku vůči vzorku. Tyto vzniklé ionty následně ionizují molekuly vzorku, podobně jako při klasické chemické ionizaci. Vzniklý aerosol je rychle odpařen v krátké zóně vyhříván na vysokou teplotu (až $600 \text{ }^\circ\text{C}$). Vzniklé ionty jsou většinou jednou nabitě, typu $[\text{M} + \text{H}]^+$, $[\text{M} - \text{H}]^-$ a to podle podmínek ionizace. Může být použita průtoková rychlost kapalně fáze až $2 \text{ ml}/\text{min}$. Tato ionizační technika je proto ideální pro spojení s kapalinovou chromatografií [77, 98].

Další, méně používané ionizační techniky:

- Ionizace nárazem urychlených neutrálních atomů a nebo iontů (FAB-fast atom bombardment, LSIMS-liquid secondary ion mass spectrometry)
- Ionizace elektrickým polem (FI)
- Ionizace desorpce polem (FD)
- Termosprej (TSI)
- Ionizace plazmovou desorpce (PD)
- Fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI)
- Sonosprej (SSI)
- Desorpce elektrosprejem (DESI)
- Desorpce APCI (DAPCI)
- Kombinovaný ESI/APCI zdroj

3.4.2. Hmotnostní analyzátory

Hmotnostní analyzátor je určen k separaci iontů v prostoru nebo čase v plynné fázi a to podle poměru m/z . Využívá při tom principů pohybu nabitých částic v elektrickém nebo magnetickém poli [95].

Hmotnostní analyzátory lze rozdělit do několika skupin [95] :

- A) **Skenující** – postupně propouští ionty různých hmotností (sektor, kvadrupól)
- B) **Zadržující ionty** – zachytí ionty, pak je analyzuje (iontová past, orbitrap, ICR)
- C) **Průletový** – měří čas, který potřebují ionty k překonání dané vzdálenosti (TOF)

3.4.2.1. Magnetický analyzátor (MAG)

Jedná se o nejstarší, avšak z hlediska hmotnostního rozsahu a rozlišení dokonalý disperzní prvek. Po konstrukční stránce se jedná o elektromagnet, mezi jehož pólovými nástavci procházejí ionty. Ionty, které jsou produkovány v iontovém zdroji, jsou urychlovány napětím V a fokusovány na vstup magnetického analyzátoru (magnetická indukce B). V magnetickém poli ionty opisují dráhu o poloměru r . Ionty o rozdílném poměru m/z opisují dráhy o různých poloměrech, dochází k prostorové separaci iontů podle jejich hmotnosti [77, 94-96].

3.4.2.2. Analyzátor doby letu (TOF) = průletový analyzátor

Jedná se o nejjednodušší hmotnostní analyzátor, v principu je tvořen pouze prázdnou trubicí. Ionty vytvořené v iontovém zdroji jsou urychlovány napětím V v rozsahu 10 kV až 20 kV. Následně procházejí analyzátozem, který je tvořený tzv. letovou trubicí o délce 25 cm až 150 cm bez vlivu elektrického a magnetického pole. Doba průletu t iontu trubicí k detektoru je přímo úměrná druhé odmocnině z poměru m/z . Hmotnější ionty se pohybují nižší rychlostí než ionty lehčí a dorazí do detektoru později. Hmotnostní rozsah analyzátoru je teoreticky neomezený, praktické limitace jsou dány typem použitého iontového zdroje (metodou ionizace nebo desorpce). TOF analyzátory jsou využívány zejména při analýze makromolekulárních látek do hmotnosti až několika set kDa. Tyto analyzátory jsou velmi citlivé (pro analýzu jsou postačující množství řádově jednotek pikomolů). Dosažitelné rozlišení a přesnost měření je možno výrazně zvýšit použitím elektrostatického zrcadla (reflektronu). TOF analyzátor je ideální pro pulzní ionizaci (spojení s MALDI) [77, 94, 95].

3.4.2.3. Kvadrupolový analyzátor- filtr (Q)

Tento analyzátor je tvořen čtyřmi paralelními kovovými tyčemi hyperbolického nebo kruhového průřezu. Je uspořádaný symetricky vzhledem k trajektorii procházejících iontů, tyče orientované proti sobě jsou elektricky propojené. Jsou připojeny ke zdrojům stejnosměrného a střídavého napětí. Ionty, které vletnou do prostoru mezi tyčemi, se dostanou do střídavého elektrického pole a začnou oscilovat. Při vhodně zvoleném poměru stejnosměrné a střídavé složky napětí a dané hodnotě těchto napětí projdou kvadrupolem pouze ionty o určitém poměru m/z . Analyzátor se tak chová jako filtr nastavený na určitou hodnotu m/z . Změnou napětí je možné docílit toho, že filtrem projdou postupně ionty v celém rozsahu hodnot m/z . Kvadrupolový filtr dosahuje nižší rozlišovací schopnosti než magnetický analyzátor. Je vhodný pro spojení s plynovou chromatografií a s HPLC. Kombinací kvadrupolových filtrů lze získat přístroje typu tandemových hmotnostních spektrometrů, kde jsou v sérii zařazeny tři kvadrupoly Q_1 , Q_2 a Q_3 (Q_2 slouží jako kolizní cela a není pravým analyzátozem, nejčastěji používaným kolizním plynem je argon).

Kvadrupolové filtry je možné kombinovat s magnetickými analyzátozem nebo elektrostatickými sektory. Tyto přístroje jsou označovány jako **hybridní hmotnostní spektrometry** [77, 94].

3.4.2.4. Iontová past (IT)

Je funkční obdobou kvadrupolových filtrů s trojrozměrným elektrostatickým polem. Jde o pomocné zařízení umožňující účinkem elektrického pole uzavřít ionty v ohraničeném prostoru. Pomocí iontové pasti lze získat spektra iontových produktů několika generací dceřinných iontů. Tento analyzátor se skládá ze vstupní a z výstupní elektrody kruhového průřezu a z prstencové středové elektrody. Krajiní elektrody jsou uzemněny, na středovou elektrodu je vkládáno vysokofrekvenční napětí s proměnnou amplitudou. Ionty se tak pohybují uvnitř pasti po uzavřených kruhových drahách. S rostoucí amplitudou napětí se ionty s rostoucím m/z dostávají na nestabilní trajektorie a opouštějí prostor iontové pasti směrem do detektoru [77, 94].

3.4.2.5. Iontová cyklotronová rezonance (ICR)

Ionty, které jsou vystavené homogennímu magnetickému poli o dostatečně velké intenzitě, se pohybují po uzavřených kruhových drahách. Jejich úhlovým rychlostem je možno přiřadit příslušné hodnoty m/z . Tento jev se nazývá iontová cyklotronová

rezonance. Analyzátoři tvořené supravodivými magnety dosahují extrémně vysoké rozlišovací schopnosti (do 1 000 000 a výše). Pro funkci ICR analyzátorů je nutné velmi nízké vakuum řádu 10^{-7} Pa [77].

3.4.2.6. Orbitrap

Lze nazvat „elektrostatickou pastí“. Princip je podobný iontovému rezonančnímu cyklotronu. Ionty jsou vháněny do axiálně symetrického elektrostatického pole, které je tvořené centrální elektrodou a prstencem, při čemž ionty krouží kolem elektrody. Ionty oscilující podél osy elektrody jsou detekovány – hovoříme o indukční detekci. Výhodou je velmi vysoká přesnost a správnost, velmi vysoké rozlišení, nízké provozní a pořizovací náklady (oproti ICR) a také to, že není potřeba magnet. Tento analyzátor vyžaduje velmi nízké tlaky [95].

3.4.3. Hmotnostní detektory

Slouží k měření zastoupení jednotlivých druhů separovaných iontů prošlých analyzátořem.

Hmotnostní detektory lze rozdělit [94]:

- A) Detektory pro přímá měření** detegují elektrický proud, který vzniká přímým dopadem stanovovaných iontů. Jsou nezbytné pro určení přesného izotopového zastoupení prvků. Obvykle jsou součástí specializovaných zakázkových systémů.
- B) Násobičové detektory** využívají efekt násobení elektronů uvolněných z první konverzní dynody po dopadu iontů. Patří mezi nejčastěji používaný typ detektorů v metodě MS. Poskytují měřitelný signál pro jednotlivé ionty.

3.4.4. Vakuový systém

Vysoké vakuum je důležité z toho důvodu, že ionty musí mít dostatečně dlouhou střední dráhu a nesmí docházet ke kolizním srážkám s neutrálními atomy. Podle typu analyzátoři se liší hodnota vakua, cca 10^{-3} až 10^{-10} Pa. Kromě ionizačních technik, které pracují za atmosférického tlaku (ESI, APCI, APPI), musí pracovat ve vakuu i

iontový zdroj. K získání tak vysokých hodnot vakua je obvykle potřeba dvou nebo i třístupňové čerpání velmi výkonnými vakuovými pumpami.

- 1. stupeň čerpání - rotační pumpy (výkon 80 l/s)
- 2. stupeň čerpání - turbomolekulární nebo difúzní pumpy (výkon 250 l/s) [99]

3.5. Validace analytických metod

Jedná se o proces, kterým se zjišťují nejdůležitější charakteristiky metody. Smyslem validace je doložit, že vytvořená metoda je pro daný účel vhodná. Cílem validace je určit podmínky, za kterých je zkušební postup použitelný, a zajistit tak stejnou spolehlivost při opakovaném použití v jedné nebo i v různých laboratořích [80].

3.5.1. Test způsobilosti (system suitability test)

Test způsobilosti analytického systému je nezbytnou součástí validace analytické metody. U instrumentálních fyzikálně-chemických metod (především separačních) v podstatě není možné přesně definovat všechny podmínky, za kterých má být metoda použita, tak aby poskytovala spolehlivé výsledky. Každé nové použití metody nevyžaduje opakování celé validace, ale jsou definována určitá kritéria, která musí být splněna a která se obecně nazývají test způsobilosti analytického systému. Při splnění požadavků testu způsobilosti se předpokládá, že dříve provedená validace platí [80].

3.5.1.1. Opakovatelnost v rámci SST (repeatability)

Je vyjádřena jako relativní směrodatná odchylka ploch píků [% RSD] pro opakované nástřiky [77].

3.5.2. Vybrané validační parametry

3.5.2.1. Detekční limit (limit of detection, LOD)

Detekční limit vyjadřuje citlivost metody. Jedná se o nejnižší detekovatelnou koncentraci látky, nestanovované kvantitativně. U neinstrumentálních metod se detekční limit hledá experimentálně. U instrumentálních metod může být určen jako koncentrace analyzované látky s poměrem signálu k šumu s hodnotou 3. Nalezený detekční limit se ověří analýzou příslušné koncentrace vzorku [80].

3.5.2.2. Kvantitativní limit (limit of quantitation, LOQ)

Taktéž je parametrem citlivosti metody. Je to nejnižší koncentrace látky, která je stanovitelná s přijatelnou přesností a správností. Relativní směrodatná odchylka je stanovena do 10 %, proto je možné kvantitativní limit vyjádřit jako koncentraci, při jejíž analýze se dosáhne této relativní směrodatné odchylky. Zpravidla to bývá trojnásobek detekčního limitu. Často se vyjadřuje jako koncentrace s poměrem signálu k šumu s hodnotou 10 [80].

3.5.2.3. Linearita (linearity)

Je to schopnost dávat výsledky přímo úměrné koncentraci stanovované látky. Většinou se stanovuje minimálně pět různých koncentrací v rozmezí 50-150 % deklarovaného obsahu [80].

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. Materiál a pomůcky

4.1.1. Chemikálie

- Biopterin, 98%, SIGMA-ALDRICH, Praha, ČR
- Neopterin, 97,5%, SIGMA-ALDRICH, Praha, ČR
- 7,8-dihydrobiopterin, 94%, SIGMA-ALDRICH, Praha, ČR
- 7,8-dihydroneopterin, 97%, SIGMA-ALDRICH, Praha, ČR Česká republika
- Methanol, LC-MS CHROMASOLV, SIGMA-ALDRICH, Praha, ČR
- Acetonitril, LC-MS CHROMASOLV, SIGMA-ALDRICH, Praha, ČR
- Kyselina octová koncentrovaná, 99%, FLUKA, SIGMA-ALDRICH, Praha, ČR
- Hydroxid amonný, 25%, SIGMA-ALDRICH, Praha, ČR
- Octan amonný, 99%, SIGMA-ALDRICH, Praha, ČR
- Ultračistá voda pro UHPLC

4.1.2. Přístroje a pomůcky

- Váhy Sartorius 2004 MP, SARTORIUS, Německo
- Chromatografické kolony:
 - ACQUITY UPLC BEH Amide (1,7 μ m, 2,1 x 100mm), Waters, ČR
 - ACQUITY UPLC BEH Glycan (1,7 μ m, 2,1 x 100mm), Waters, ČR
 - ACQUITY UPLC BEH HILIC (1,7 μ m, 2,1 x 100mm), Waters, ČR
- ACQUITY UPLC Systém, Waters, ČR:
 - Čerpadlo
 - Automatický dávkovač
 - Kolonový termostat
- Quattro Micro, (trojitý kvadrupol), Waters, ČR
- Vakuová pumpa a filtrační zařízení, CHROMSERVIS, ČR
- Ultrazvuková vodní lázeň SONOREX DIGITEC, FISCHER SCIENTIFIC, ČR
- Automatické pipety se špičkami BIOHIT, FISCHER SCIENTIFIC, ČR
- Laboratorní pH metr- HANNA INSTRUMENTS pH 212 Microprocessor pH Meter, FISCHER SCIENTIFIC, ČR
- Magnetická míchačka- IKA RET basic, FISCHER SCIENTIFIC, ČR
- Třepačka- IKA MS 3 basic, CHROMSERVIS, ČR

4.2. Příprava roztoků a vzorků

Jako rozpouštědlo pro přípravu roztoků a vzorků zkoušených látek byla použita ultračistá voda. Redukované formy, dihydrobiopterin a dihydroneopterin, jsou ve vodě při důkladném promíchání na třepačce dobře rozpustné. Rozpustnost biopterinu a neopterinu je ve vodě špatná, proto byly rozpuštěny ve směsi ACN/voda a to v poměru v počátku 50:50 a dále byly ředěny dle složení mobilní fáze. K lepšímu rozpuštění látek byla použita třepačka a ultrazvuková lázeň. Z důvodu nestability byly roztoky redukovaných forem připravovány vždy čerstvé v hnědých vialkách.

4.3. Optimalizace podmínek pro UHPLC-MS/MS

4.3.1. Optimalizace podmínek pro MS detekci

4.3.1.1. MS sken- zjištění prekurzorových iontů ze spekter

Byla proměřena hmotnostní spektra jednotlivých látek. Vybrány byly $[M+H]^+$ ionty, které vykazovaly největší intenzitu.

4.3.1.2. Optimalizace podmínek v modu SIM

Téměř všechny optimalizované parametry MS detektoru v modu SIM byly převzaty z dříve prováděné diplomové práce [100]. Mezi tyto důležité převzaté parametry patří teplota, napětí vkládané na kapiláru, průtok dusíku jako sušícího plynu a nastavení iontové optiky (RF lens a Extraktor).

Převzaté optimalizované podmínky MS detektoru:

- typ ionizace: ESI+
- napětí na kapiláře: 3,0 kV
- extraktor: 2,0 V
- RF Lens: 0,2 V
- desolvační teplota: 375°C
- průtok dusíku: 400 l/hod
- průtok dusíku na vstupním kuželu: 50 l/hod
- teplota ve zdroji: 130°C

Měřením byl zjišťován jeden z nejdůležitějších parametrů a to parametr cone voltage- napětí vkládané na vstupní kužel. Cone voltage určuje typ iontů, které vstupují vstupním kuželem do analyzátoru. Toto napětí je pro každou látku specifické, a proto byly optimální hodnoty tohoto parametru určovány pro každou látku zvlášť.

4.3.1.3. Sken produktových iontů a optimalizace podmínek v modu SRM

Získané prekurzorové ionty byly fragmentovány v MS/MS modu v kolizní cele. Fragmentace byla vyvolána zaváděním kolizního plynu, argonu, do kolizní cely trojitého kvadrupolu. Po fragmentaci byla získaná hmotnostní spektra produktových iontů, na jejichž základě byly vybrány fragmenty s dostatečnou intenzitou. Měřením byla zjištěna optimální kolizní energie dodávaná do kolizní cely.

4.3.2. Optimalizace podmínek pro UHPLC separaci

Cílem práce bylo porovnávání různých stacionárních fází z hlediska retence a separace pteridinů. V rámci této práce byly zkoušeny různé chromatografické kolony a různé mobilní fáze. Bylo optimalizováno složení mobilní fáze a sledován vliv tohoto složení na separaci, tvar píků a čas analýzy zkoumaných látek.

4.3.2.1. Chromatografické kolony

Byly použity tyto chromatografické kolony:

- ACQUITY UPLC BEH Amide (1,7 μ m, 2,1 x 100mm), Waters, ČR
- ACQUITY UPLC BEH Glycan (1,7 μ m, 2,1 x 100mm), Waters, ČR
- ACQUITY UPLC BEH HILIC (1,7 μ m, 2,1 x 100mm), Waters, ČR

4.3.2.2. Mobilní fáze

Bylo zkoušeno několik druhů vodných složek mobilních fází (Tab. 1), jejich poměrné zastoupení v těchto mobilních fázích a vliv na separaci zkoušených látek.

Číslo mobilní fáze	Mobilní fáze	Poměrné zastoupení jednotlivých složek
1	acetonitril : kyselina mravenčí 0,1%	(50:50) až (95:5)
2	acetonitril : kyselina mravenčí 0,01%	(50:50) až (95:5)
3	acetonitril : kyselina mravenčí 0,001%	(50:50) až (95:5)
4	acetonitril : kyselina octová 0,1%	(50:50) až (95:5)
5	acetonitril : kyselina octová 0,01%	(50:50) až (95:5)
6	acetonitril : kyselina octová 0,001%	(50:50) až (95:5)
7	acetonitril : hydroxid amonný 0,1%	(50:50) až (95:5)
8	acetonitril : hydroxid amonný 0,01%	(50:50) až (95:5)
9	acetonitril : 1mM octan amonný pH=3,8	(50:50) až (95:5)
10	acetonitril : 1mM octan amonný pH=4,8	(50:50) až (95:5)
11	acetonitril : 1mM octan amonný pH=6,8	(50:50) až (95:5)
12	acetonitril : 1mM octan amonný pH=9,8	(50:50) až (95:5)
13	acetonitril : 1mM mravenčan amonný pH=3,0	(50:50) až (95:5)

Tab. 1: Přehled zkoušených mobilních fází

Pro měření byl použit Acquity UHPLC systém. Nastaveny byly potřebné parametry. Na čerpadle byla nastavena rychlost průtoku mobilní fáze 0,4 ml/min a poměrné zastoupení vodné složky a acetonitrilu tvořících tuto mobilní fázi. Z důvodu nestability zkoušených látek byla v automatickém dávkovači zvolena teplota 4° C a zároveň nastavena velikost nástřiku 1 µl. Na kolonovém termostatu byla zvolena teplota 30° C. Před každým měřením bylo třeba nechat ustálit teplotu v automatickém dávkovači a kolonovém termostatu a provést potřebné ustálení chromatografické kolony.

Při výběru vodné složky mobilní fáze musela být brána v úvahu MS detekce, která vyžaduje, aby byla mobilní fáze tvořena těkavými složkami. Jako stálou součástí mobilní fáze byl vybrán těkavý acetonitril a k němu vodná složka taktéž těkává a to: kyselina mravenčí, kyselina octová, roztok hydroxidu amonného a roztoky octanu a mravenčanu amonného o nízké koncentraci, aby nedocházelo k potlačení signálu a ztrátě citlivosti. Vzhledem k tomu, že podobné požadavky má i chromatografická technika HILIC (tzn. vysoký podíl organického rozpouštědla v mobilní fázi, přičemž se upřednostňuje především acetonitril s malou viskozitou a přídavek amonné soli organické kyseliny, který omezuje elektrostatické odpuzování separovaných složek), jeví se použití HILIC mobilní fáze jako velice vhodné.

Ráno v den měření byly připravovány vždy čerstvé mobilní fáze.

Příprava vodných složek mobilní fáze:

- 0,1% roztok kyseliny octové
Byl připraven odpipetováním 200 μ l koncentrované kyseliny octové do vody v 200ml odměrné baňce a doplněním vodou po rysku.
- 0,01% roztok kyseliny octové
Byl připraven odpipetováním 20 ml odměrného roztoku 0,1% roztoku kyseliny octové do vody v 200 ml odměrné baňce a doplněním vodou po rysku.
- 0,001% roztok kyseliny octové
Byl připraven odpipetováním 20 ml odměrného roztoku 0,01% roztoku kyseliny octové do vody v 200 ml odměrné baňce a doplněním vodou po rysku.
- 0,1%, 0,01%, 0,001% roztok kyseliny mravenčí
Byly připraveny z koncentrované kyseliny mravenčí a následným ředěním a to stejným postupem jako roztoky kyseliny octové.
- 0,1% roztok hydroxidu amonného
Byl připraven odpipetováním 2 ml 10% hydroxidu amonného do 200 ml odměrné baňky a doplněním objemu vodou po rysku.
- 0,01% roztok hydroxidu amonného
Byl připraven odpipetováním 20 ml 0,1% roztoku hydroxidu amonného do 200 ml odměrné baňky a doplněním objemu vodou po rysku.
- 1mM roztok octanu amonného o pH = 3,8
Nejdříve bylo připraveno 100 ml 10mM roztoku octanu amonného o pH= 3,8 a z něj potom připraveno 200 ml 1mM roztoku octanu amonného. Do asi 75 ml vody ve 100 ml kádince bylo odpipetováno 57 μ l koncentrované kyseliny octové, pomocí roztoku hydroxidu amonného bylo upraveno pH na 3,8, poté byl roztok kvantitativně převeden do 100 ml odměrné baňky a objem doplněn vodou po rysku. Z této odměrné baňky bylo odebráno 20 ml do 200 ml odměrné baňky a objem doplněn po rysku. Nakonec byla zkontrolována hodnota pH.
- 1mM roztok octanu amonného o pH = 4,8
Byl připraven stejným postupem jako 1mM roztok octanu amonného o pH = 3,8, pH roztoku bylo upraveno na 4,8.

- 1mM roztok octanu amonného o pH = 6,8

Nejdříve bylo připraveno 100 ml 10mM roztoku octanu amonného o pH= 6,8 a z něj potom 200 ml 1mM roztoku octanu amonného. Do 100 ml kádinky bylo naváženo 0,07708 g čisté substance octanu amonného, rozpuštění v asi 75 ml vody, pH metrem bylo změřeno pH (většinou bývá kolem 6,8), které bylo v případě nutnosti upraveno roztokem hydroxidu amonného do dosažení pH 6,8. Poté byl roztok kvantitativně převeden do 100 ml odměrné baňky a objem doplněn vodou po rysku. Z této odměrné baňky bylo odebráno 20 ml roztoku do 200 ml odměrné baňky a objem doplněn vodou po rysku. Nakonec byla zkontrolována hodnota pH.

- 1mM roztok octanu amonného o pH = 9,8

Byl připraven stejným postupem jako 1mM roztok octanu amonného o pH = 6,8, pH roztoku bylo upraveno na 9,8.

- 1mM roztok mravenčanu amonného o pH = 3,0

Nejdříve bylo připraveno 100 ml 10mM roztoku mravenčanu amonného o pH = 3,0 a z něj potom 200 ml 1mM roztoku mravenčanu amonného. Do asi 75 ml vody ve 100 ml kádince bylo odpipetováno 38 μ l koncentrované kyseliny mravenčí, pomocí roztoku hydroxidu amonného bylo upraveno pH na hodnotu 3,0. Poté byl roztok kvantitativně převeden do 100 ml odměrné baňky a objem doplněn vodou po rysku. Z této odměrné baňky bylo odebráno 20 ml roztoku do 200 ml odměrné baňky a objem opět doplněn vodou po rysku. Nakonec byla zkontrolována hodnota pH.

4.4. Opakovatelnost v rámci SST

Při zvolených optimálních podmínkách byla změřena opakovatelnost metody. Provádí se sérií deseti po sobě následujících měření, které probíhají za stejných podmínek, na stejném přístroji, v krátkém časovém úseku. Opakovatelnost byla vyjádřena pomocí následujících parametrů: relativní směrodatné odchylky pro retenční časy a plochy píků analyzovaných látek.

4.5. Ověření linearity a citlivosti metody

Na závěr byla ověřena linearita metody proměřením kalibračních křivek analyzovaných látek a citlivost metody.

5. Výsledky a diskuze

5.1. Optimalizace podmínek pro MS detekci

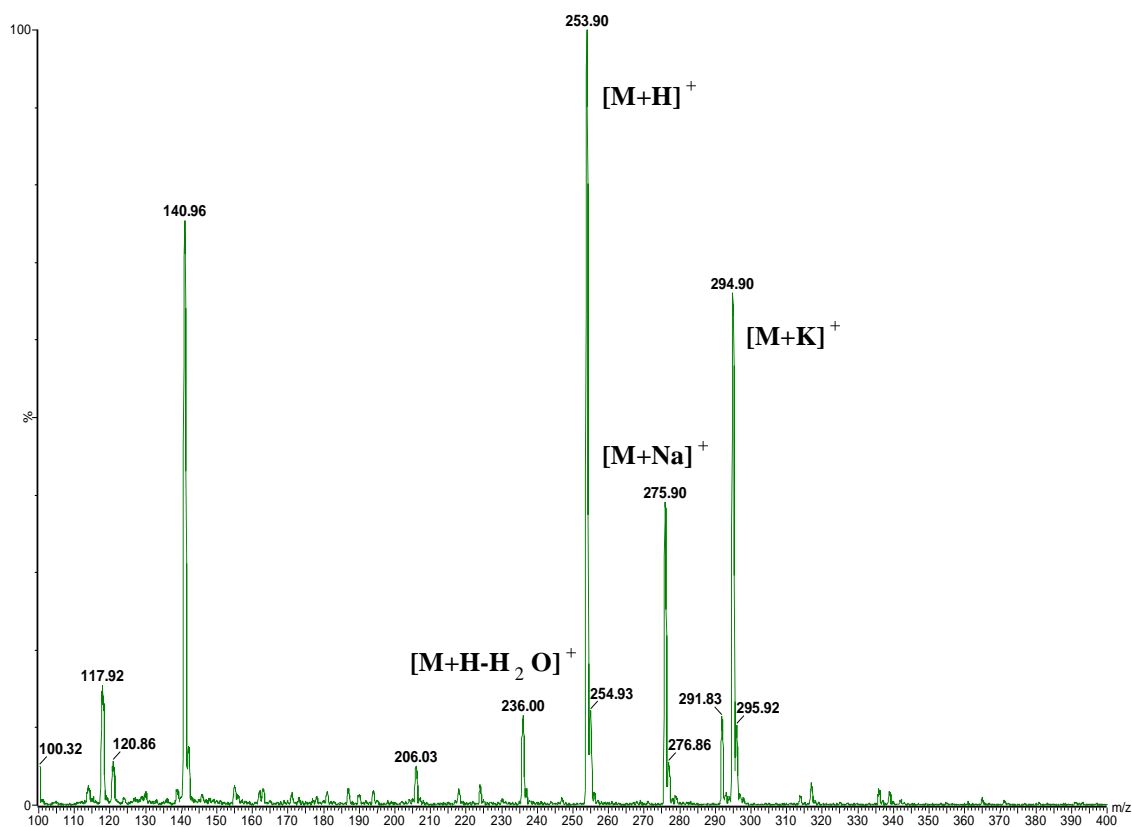
Jako ionizační technika byla použita metoda ESI v pozitivním modu ionizace (kap. 3.4.1.4.) a jako analyzátor trojitý kvadrupol (kap. 3.4.2.3.).

Ionizační technika ESI je pro ionizaci vhodná, protože pteridiny jsou polární látky. Ve své molekule obsahují terciární dusík, díky kterému snadno ionizují v pozitivním modu. Dusík snadno přijímá H^+ za vzniku hlavního iontu $[M + H]^+$, který je v hmotnostním spektru nejintenzivnější a byl vybrán jako prekurzorový iont pro SIM. Kromě iontu $[M + H]^+$ vznikají také adukty se sodíkem $[M + Na]^+$ a s draslíkem $[M + K]^+$. Dalším důležitým iontem ve spektru je protonovaná molekula po ztrátě vody $[M + H - H_2O]^+$.

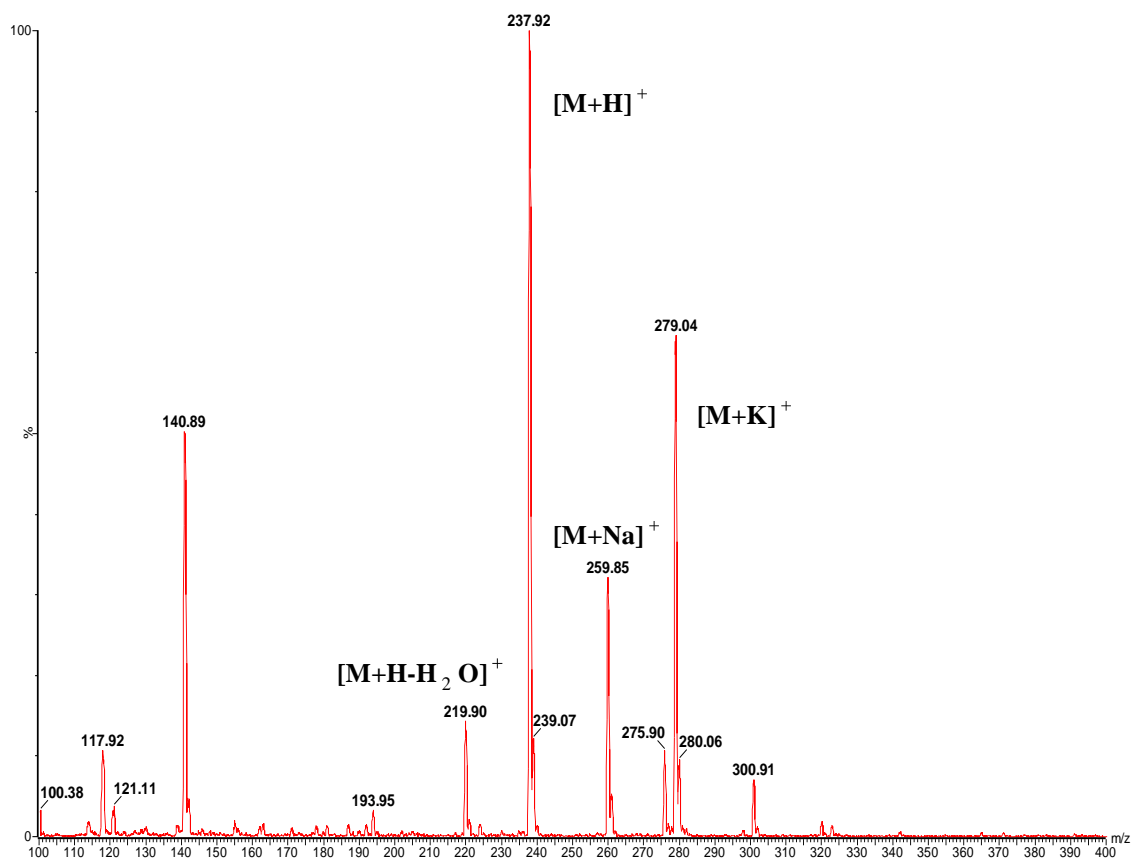
5.1.1. MS sken- zjištění prekurzorových iontů ze spekter

Hmotnostní spektra neopterinu, biopterinu, dihydroneopterinu a dihydrobiopterinu

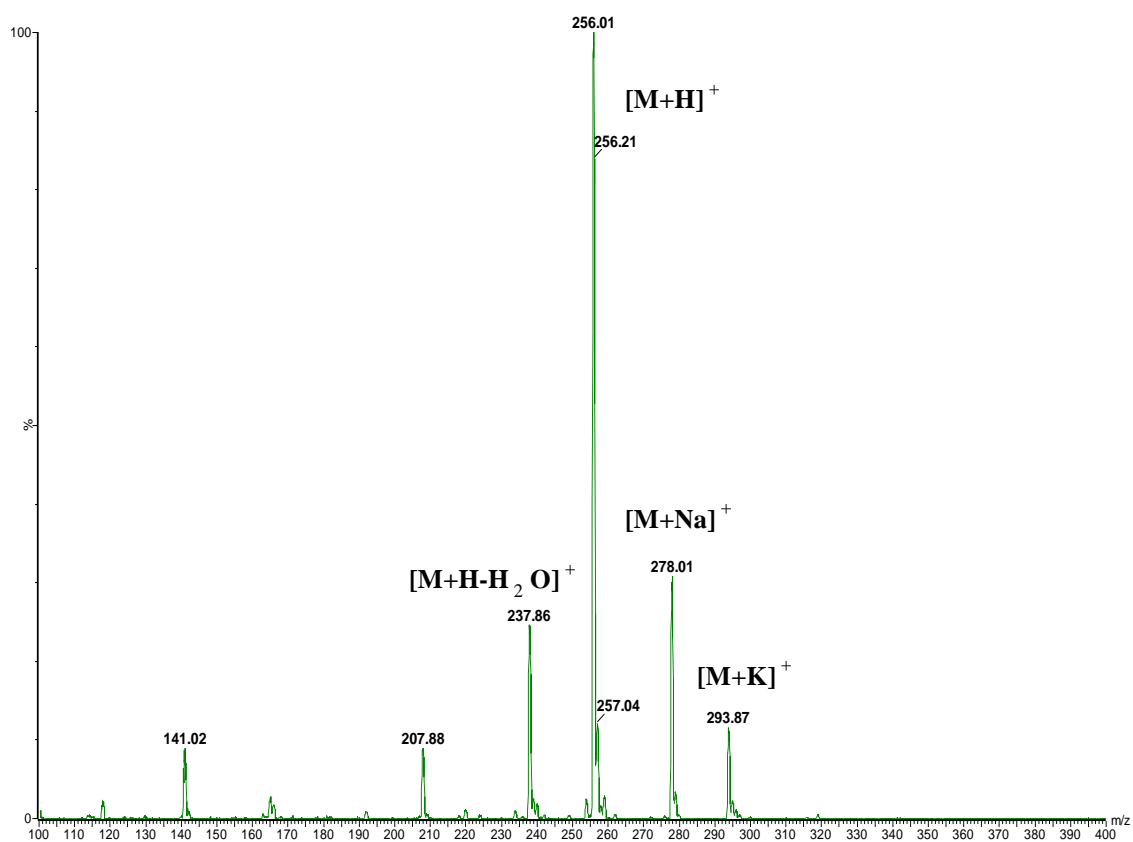
(Obr. 14 až 17)



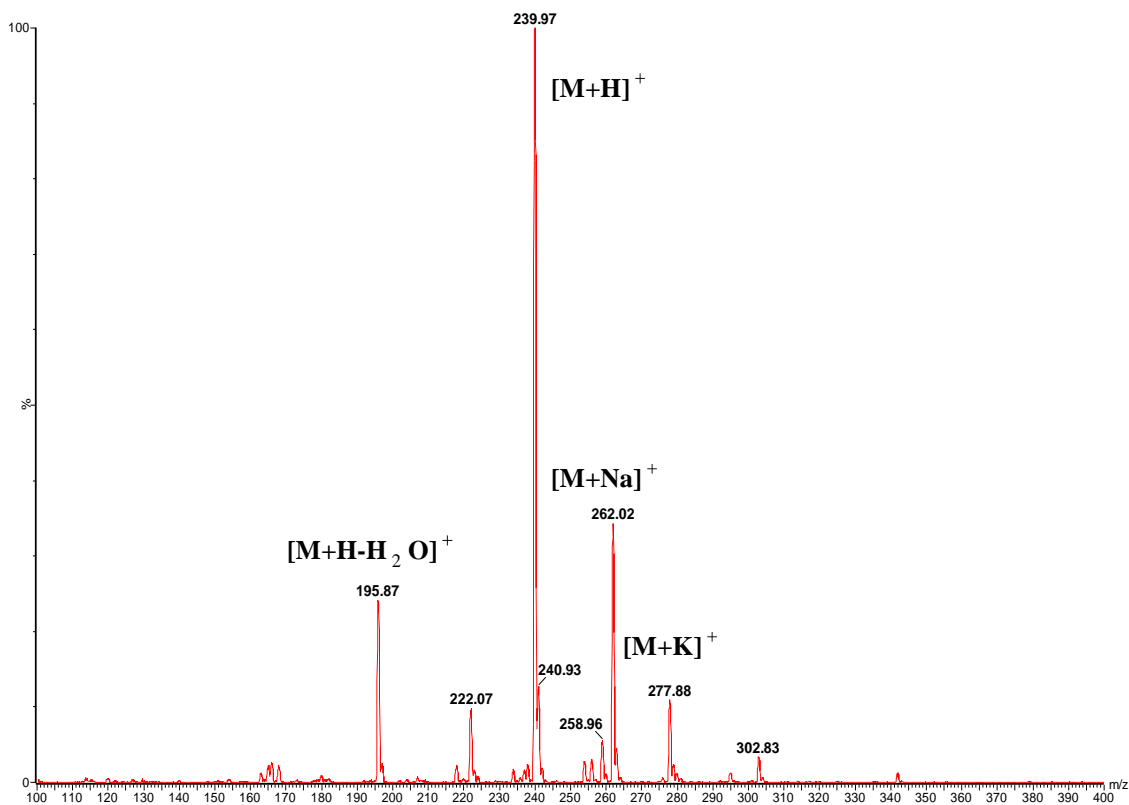
Obr. 14: Hmotnostní spektrum neopterinu, ionizace ESI⁺



Obr. 15: Hmotnostní spektrum biopterinu, ionizace ESI⁺



Obr. 16: Hmotnostní spektrum dihydroneopterinu, ionizace ESI⁺

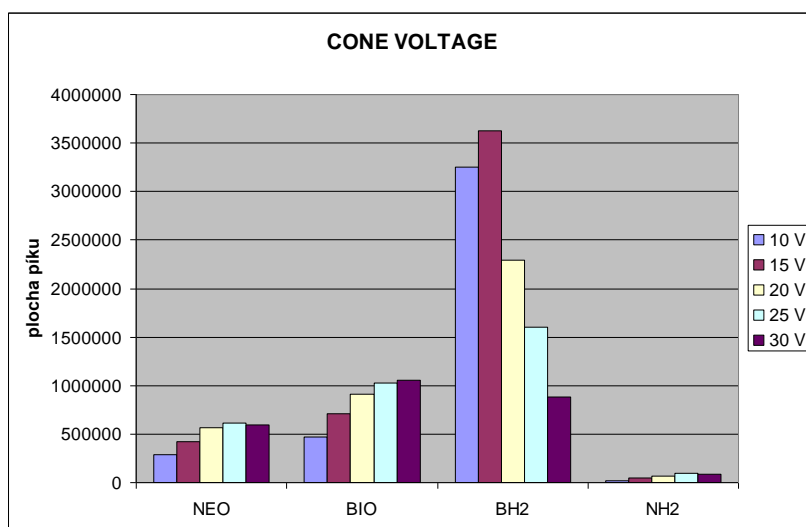


Obr. 17: Hmotnostní spektrum dihydrobiopterinu, ionizace ESI⁺

5.1.2. Optimalizace podmínek v modu SIM

Téměř všechny optimalizované parametry MS detektoru v modu SIM byly převzaty z dříve prováděné diplomové práce [100].

Měřením byla zjišťována optimální hodnota parametru cone voltage (Obr. 18), která je pro každou látku specifická. Toto napětí určuje typ iontů, které vstupují vstupním kuželem do analyzátoru.



Obr. 18: Optimalizace parametru cone voltage

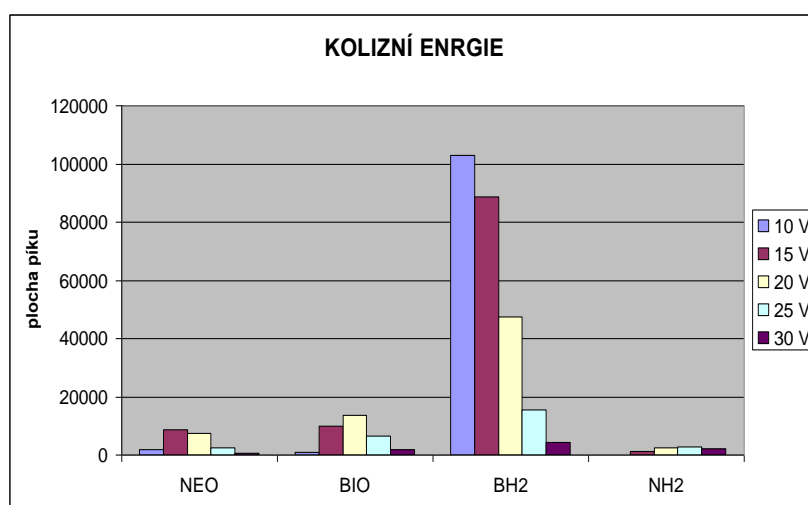
5.1.3. Sken produktových iontů a optimalizace podmínek v modu

SRM

Získané prekurzorové ionty byly v kolizní cele trojitého kvadrupolu vystaveny fragmentaci za vzniku produktových iontů. Po fragmentaci byla získána hmotnostní spektra produktových iontů (Obr. 20 až 23).

Byly vybrány prekurzorové ionty s dostatečnou intenzitou vhodné pro kvantifikaci v modu SRM (Tab. 2)

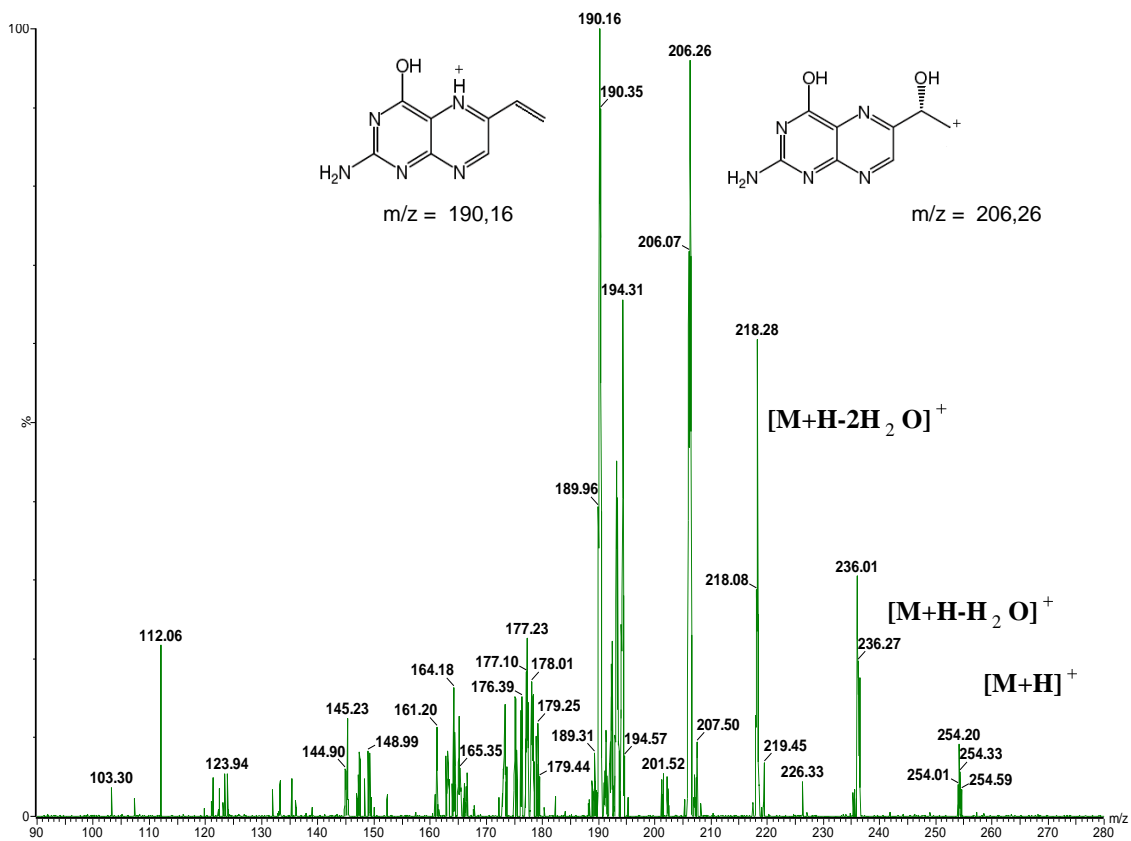
Měřením byla zjištěna optimální hodnota kolizní energie dodávané do kolizní cely, která je pro každou látku specifická (Obr. 19).



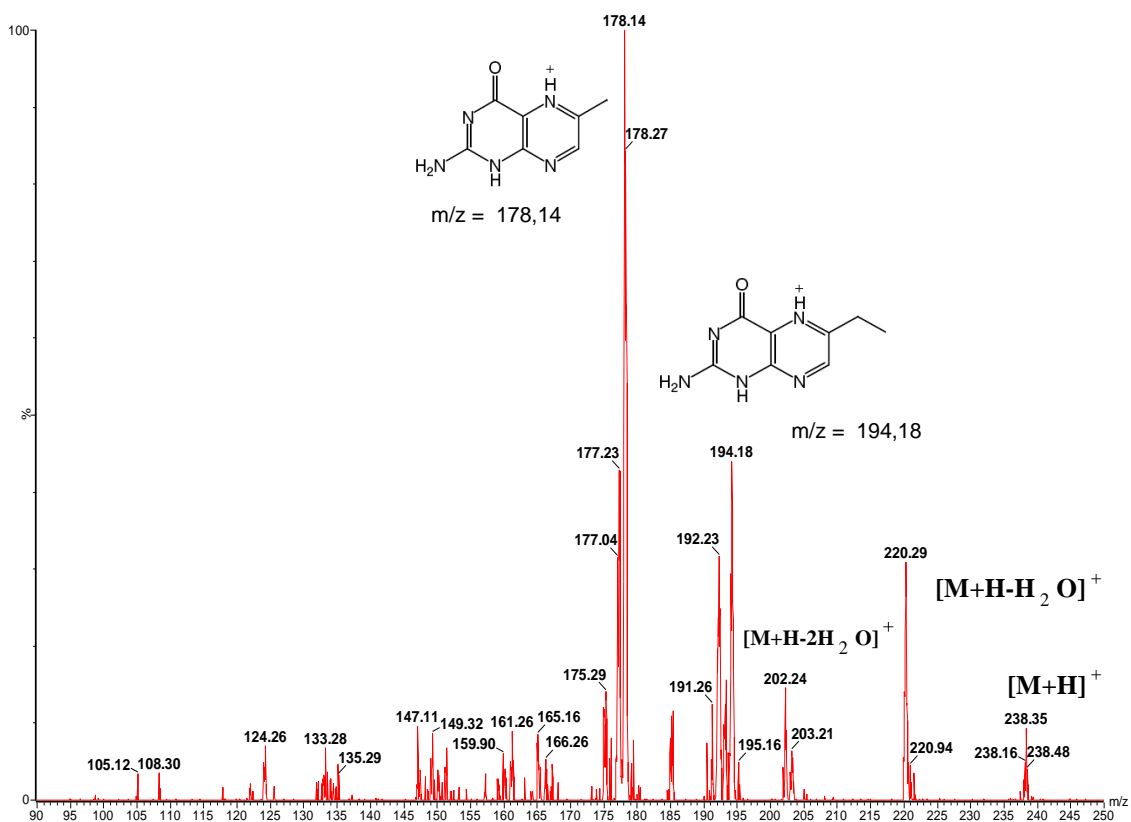
Obr. 19: Optimalizace parametru kolizní energie

	prekurzor	typ	fragment	cone voltage [V]	kolizní energie [V]
NEO	253,7	[M+H] ⁺	206,2	25	15
BIO	237,8	[M+H] ⁺	178,1	30	20
NH2	255,8	[M+H] ⁺	165,1	25	25
BH2	239,8	[M+H] ⁺	165,1	15	10

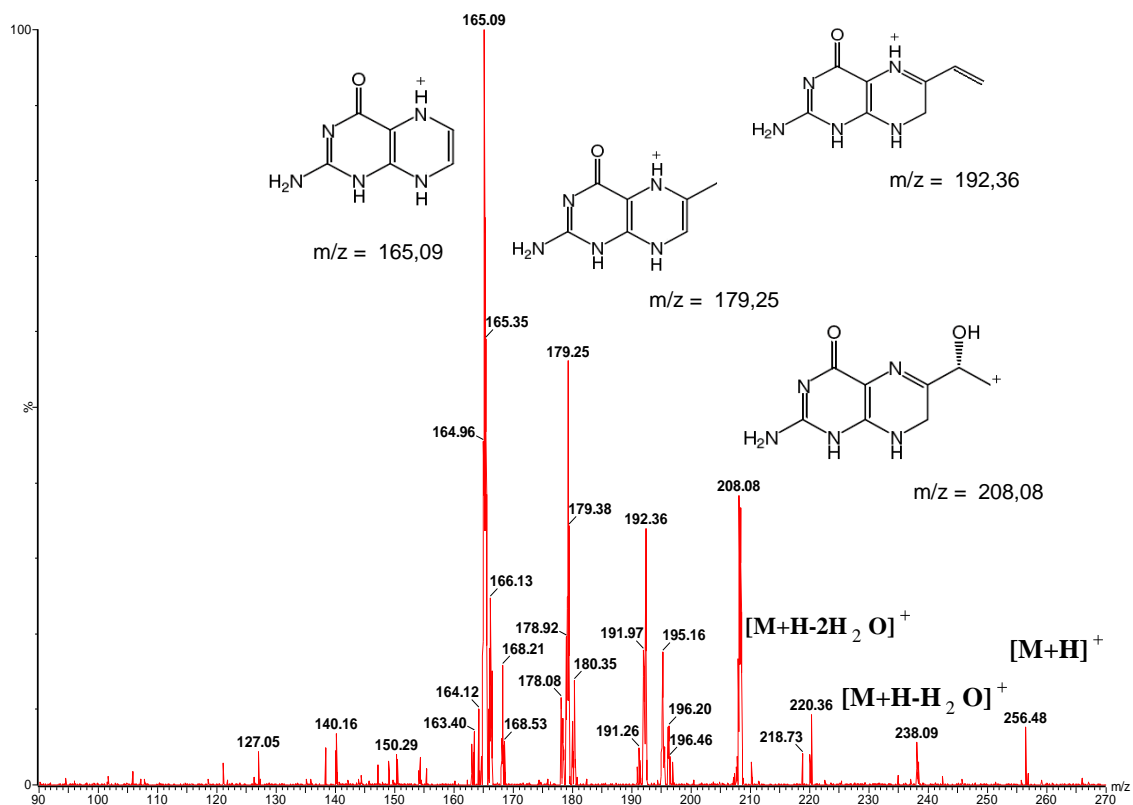
Tab. 2: Prekurzorové a produktové ionty, optimalizované podmínky v modu SIM a SRM



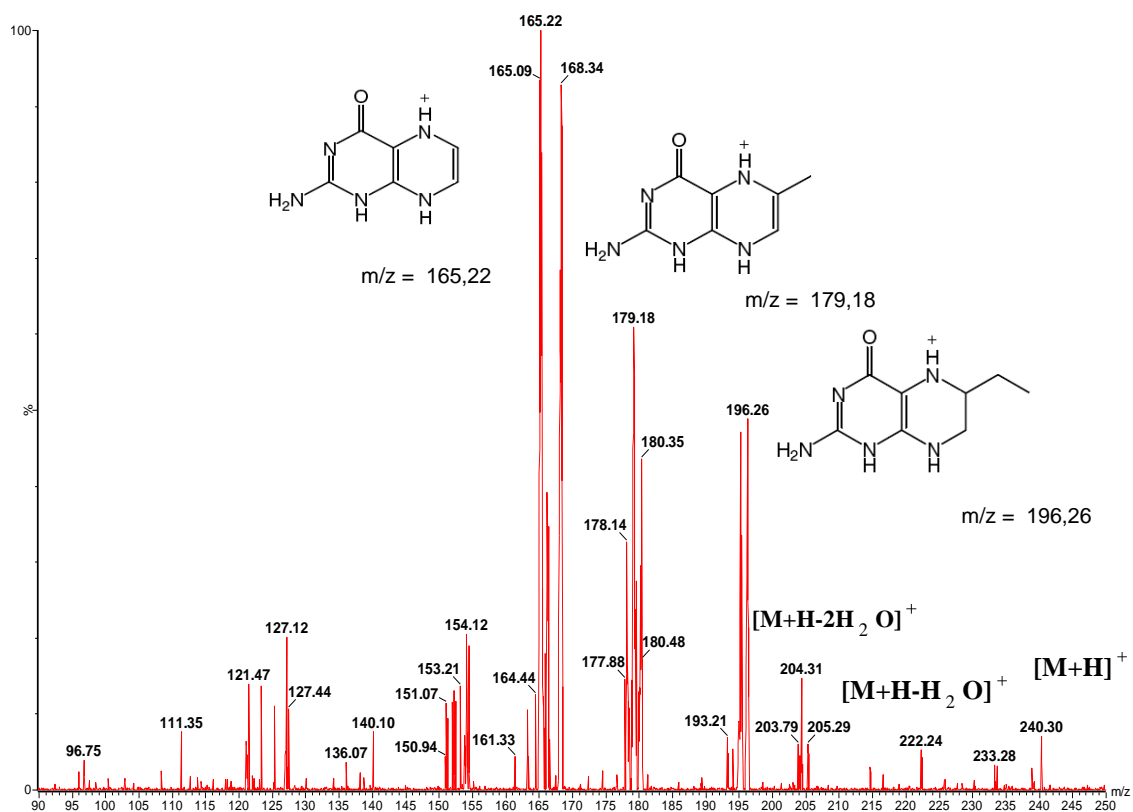
Obr. 20: Hmotnostní spektrum produktových iontů neopterinu, ionizace ESI⁺



Obr. 21: Hmotnostní spektrum produktových iontů biopterinu, ionizace ESI⁺



Obr. 22: Hmotnostní spektrum produktových iontů dihydroneopterinu, ionizace ESI⁺



Obr. 23: Hmotnostní spektrum produktových iontů dihydrobiopterinu, ionizace ESI⁺

5.2. Optimalizace podmínek pro UHPLC separaci

V rámci této práce byly zkušeny různé chromatografické kolony a různé mobilní fáze a jejich vliv na retenci, separaci a tvar píků zkoumaných látek.

5.2.1. Chromatografická kolona ACQUITY UPLC BEH Glycan

První testovanou chromatografickou kolonou byla ACQUITY UPLC BEH Glycan (1,7 μ m, 2,1 x 100mm). Pro zmapování retence byly vybrány látky biopterin a neopterin a 12 druhů vodných složek mobilních fází. Při postupném zkoušení jednotlivých mobilních fází byl sledován vliv těchto mobilních fází na retenční čas, separaci zkoušených látek a tvar píků. Po proměření všech mobilních fází byly vyhodnoceny mobilní fáze, které se pro separaci hodí nejlépe. Vybrané mobilní fáze byly použity k dalším měřením, při kterých byly již kromě biopterinu a neopterinu zkoušeny i jejich redukované formy, dihydrobiopterin a dihydroneopterin. Nakonec bylo vyhodnoceno, která mobilní fáze a v jakém složení, se pro separaci všech čtyř pteridinů hodí nejlépe.

Z uvedených údajů (Tab. 3, 4 a Obr. 24, 25) vyplývá, že při použití 0,1% NH₄OH, 0,01% NH₄OH a 1mM roztoku octanu amonného o pH= 9,8 jako vodné složky mobilní fáze dochází k nízké retenci biopterinu a neopterinu. U neopterinu lze pozorovat nízkou retenci v rozmezí koncentrací od 50% do 20% vodné složky mobilní fáze, u biopterinu dokonce až do koncentrace 15%. U všech těchto tří vodných složek, za předpokladu, že byly použity nízké koncentrace (20%-5%), dochází k mírné separaci biopterinu a neopterinu. Deriváty NH₂ a BH₂ sice byly separované dostatečně, ale tvary píků těchto derivátů byly nevhodné (Obr. 26). Z tohoto důvodu byly výše zmiňované vodné složky vyhodnoceny za nevhodné.

koncentrace	0,1% FAc	0,01% FAc	0,001% FAc	1mM AmAc 9,8	1mM AmAc 4,2	1 mM AmAc 6,8	0,1% AcAc	0,01% AcAc	0,001% AcAc	0,1% NH ₄ OH	0,01% NH ₄ OH	1mM AmF 3,0
10	8,9	8,88	8,83	7,82	9,07	9,32	9,27	9,18	9,2	3,67	5,99	9,51
15	4,02	4,03	4	2,71	4,04	4,11	4,18	4,12	4,09	1,08	1,83	4,29
20	2,425	2,4	2,39	1,02	2,42	2,42	2,5	2,46	2,45	0,58	0,86	2,58
30	1,36	1,36	1,35	0,62	1,35	1,34	1,4	1,37	1,37	0,43	0,68	1,43
40	1,01	1,01	1,01	0,58	1	0,98	1,04	1,02	1,02	0,41	0,42	1,05
50	0,85	0,85	0,85	0,48	0,85	0,83	0,87	0,86	0,86	0,41	0,4	0,88

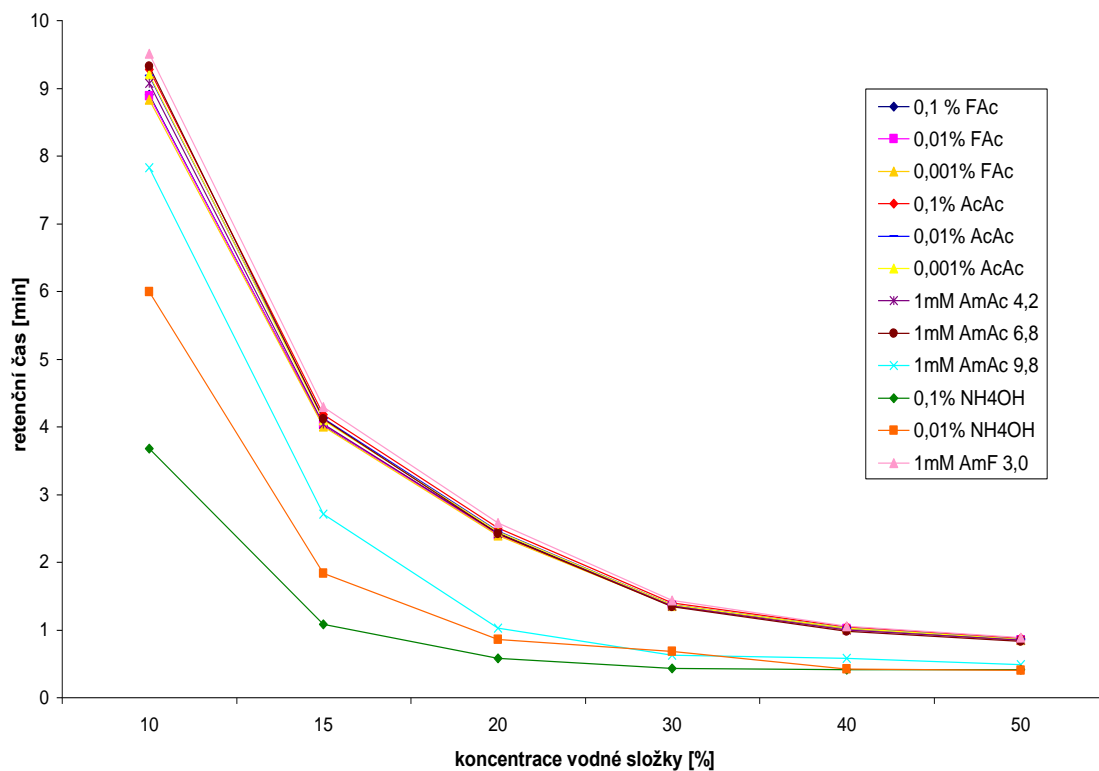
Tab. 3: Retenční časy neopterinu v závislosti na složení mobilní fáze

FAc- kyselina mravenčí, AmAc- octan amonný, AcAc- kyselina octová, AmF- mravenčan amonný

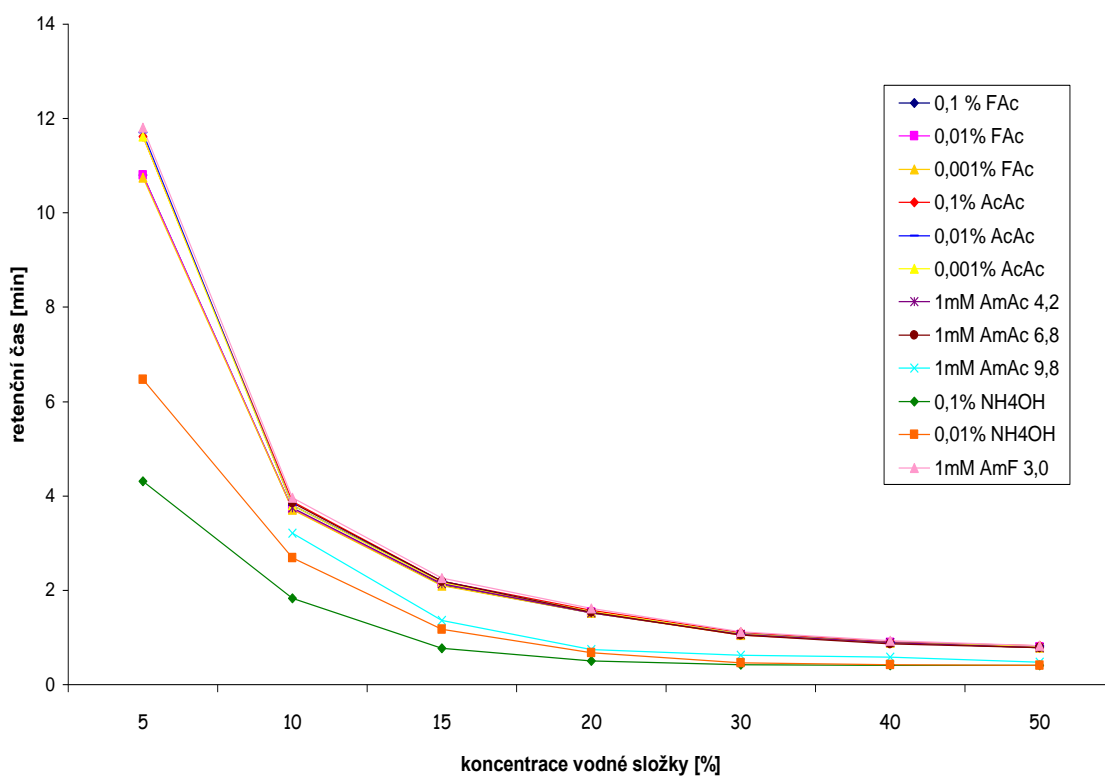
koncentrace	0,1% FAc	0,01% FAc	0,001% FAc	1mM AmAc 9,8	1mM AmAc 4,2	1 mM AmAc 6,8	0,1% AcAc	0,01% AcAc	0,001% AcAc	0,1% NH ₄ OH	0,01% NH ₄ OH	1mM AmF 3,0
5	10,8	10,79	10,74	-	-	-	11,61	11,69	11,61	4,31	6,46	11,8
10	3,715	3,72	3,7	3,21	3,74	3,85	3,87	3,79	3,8	1,83	2,68	3,95
15	2,11	2,13	2,09	1,35	2,13	2,18	2,18	2,18	2,16	0,76	1,16	2,25
20	1,52	1,53	1,51	0,74	1,52	1,53	1,57	1,53	1,54	0,5	0,67	1,61
30	1,06	1,05	1,05	0,62	1,06	1,04	1,1	1,07	1,07	0,41	0,46	1,11
40	0,88	0,88	0,88	0,57	0,88	0,86	0,9	0,89	0,89	0,4	0,41	0,92
50	0,78	0,785	0,78	0,47	0,78	0,78	0,82	0,8	0,8	0,4	0,4	0,82

Tab. 4: Retenční časy biopterinu v závislosti na složení mobilní fáze

FAc- kyselina mravenčí, AmAc- octan amonný, AcAc- kyselina octová, AmF- mravenčan amonný



Obr. 24: Závislost retenčního času neopterinu na koncentraci a typu vodné složky mobilní fáze
 FAc- kyselina mravenčí, AmAc- octan amonný, AcAc- kyselina octová, AmF- mravenčan amonný

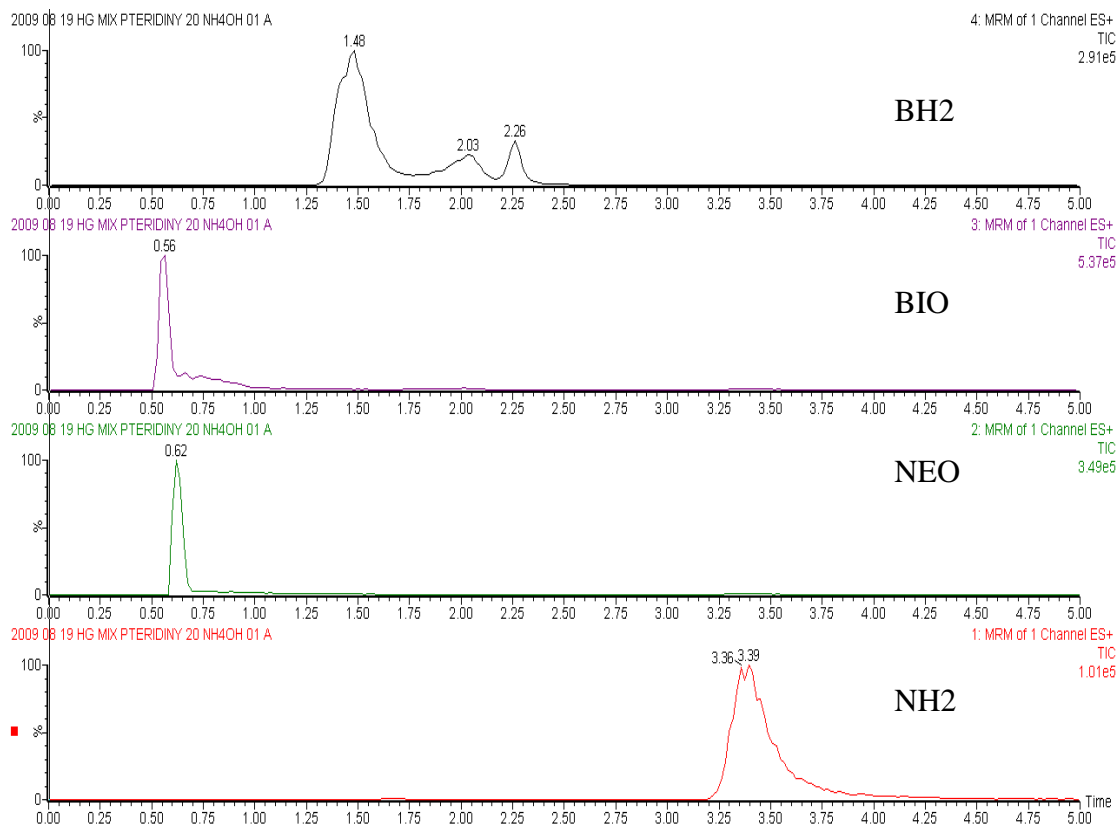


Obr. 25: Závislost retenčního času biopterinu na koncentraci a typu vodné složky mobilní fáze
 FAc- kyselina mravenčí, AmAc- octan amonný, AcAc- kyselina octová, AmF- mravenčan amonný

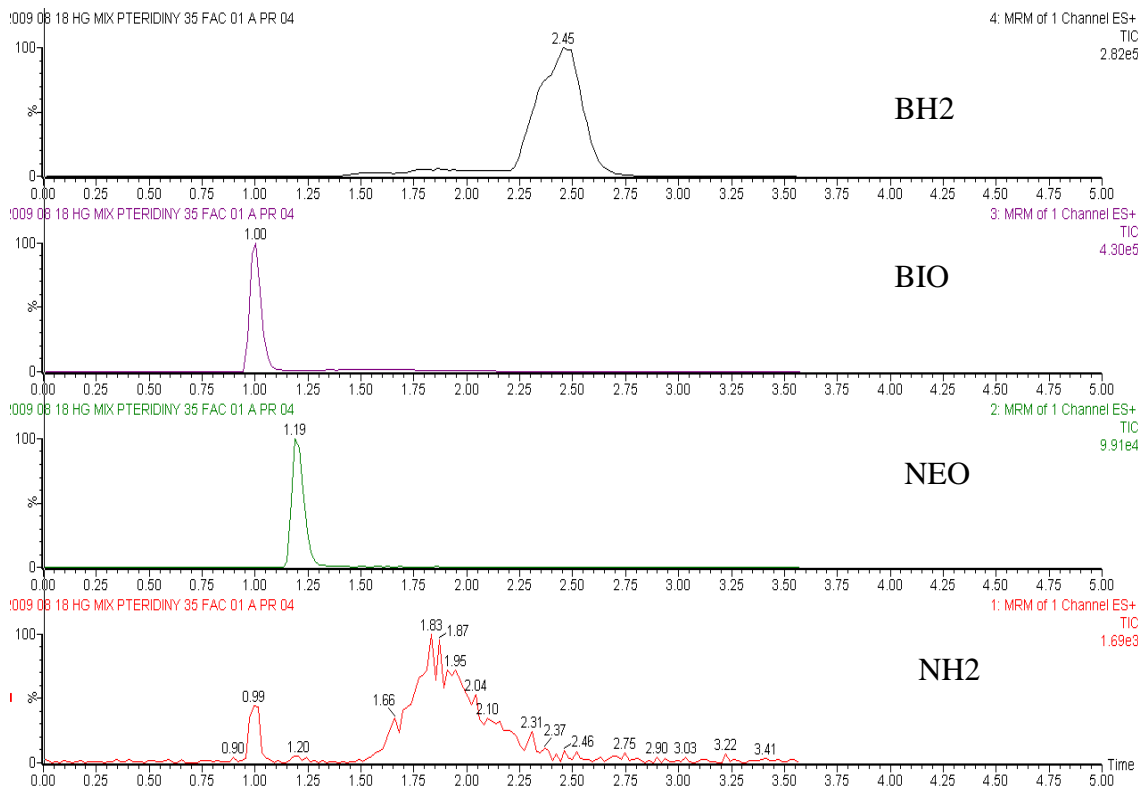
Neuspokojivé výsledky byly získány také při použití 0,1%, 0,01% a 0,001% roztoků kyseliny octové a kyseliny mravenčí. S klesající koncentrací vodných složek mobilních fází sice docházelo k separaci biopterinu, neopterinu i jejich derivátů, nicméně u derivátů byly pozorovány nevhodné tvary píků (Obr. 27).

Použití 1mM roztoku mravenčanu amonného o pH= 3,0 lze hodnotit stejně jako výše zmíněné roztoky kyseliny octové a kyseliny mravenčí. Bylo sice dosaženo separace všech čtyř pteridinů, ale píky derivátů měly opět nevhodný tvar.

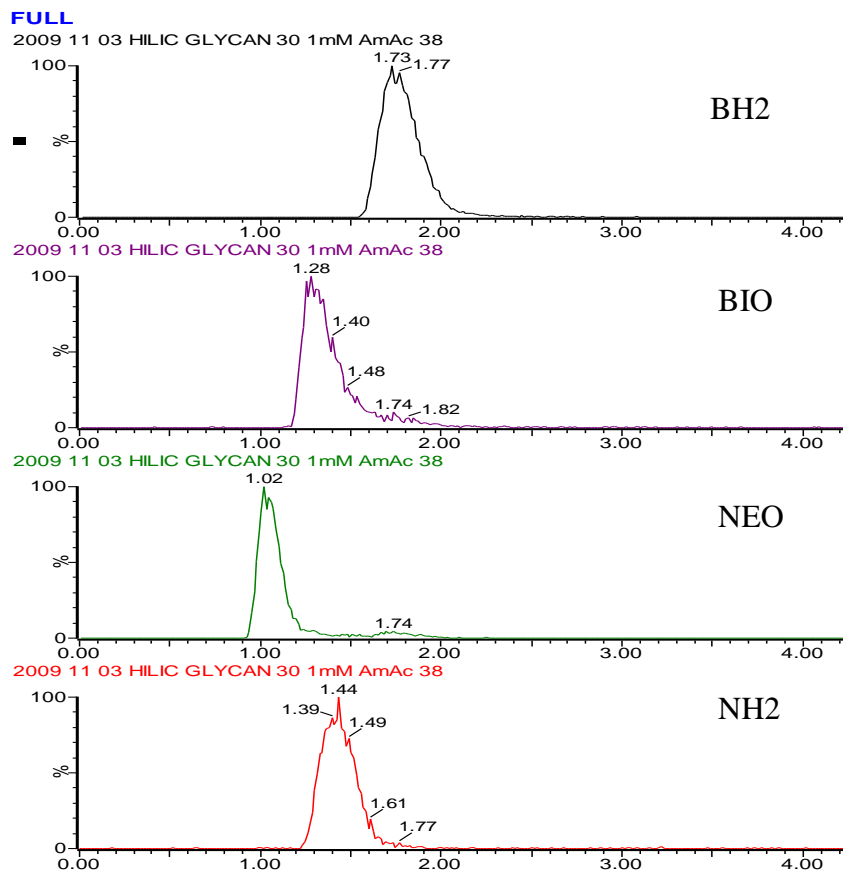
Jako nejlepší byly vyhodnoceny mobilní fáze s vodnými složkami 1mM roztoku octanu amonného o pH= 3,8 a 1mM roztoku octanu amonného o pH= 6,8. V případě 1mM roztoku octanu amonného o pH= 3,8 bylo nejlepší separace a nejkvalitnějších píků dosaženo použitím 30% této vodné složky a 70% acetonitrilu (Obr. 28). Vyšší koncentrace vodné složky vedla k nedostatečné separaci, naopak snižování koncentrace vodné složky se projevilo výraznější separací, ale na úkor kvality píků. U 1mM roztoku octanu amonného o pH= 6,8 byla jako nejlepší vyhodnocena koncentrace 28:72 (28% vodné složky, 72% acetonitrilu, Obr. 29). Snižování nebo zvýšení poměrného zastoupení vodné složky se projevilo stejným způsobem jako u výše zmíněného 1mM roztoku octanu amonného o pH= 3,8. V obou případech nebyla ale účinnost nijak závratná.



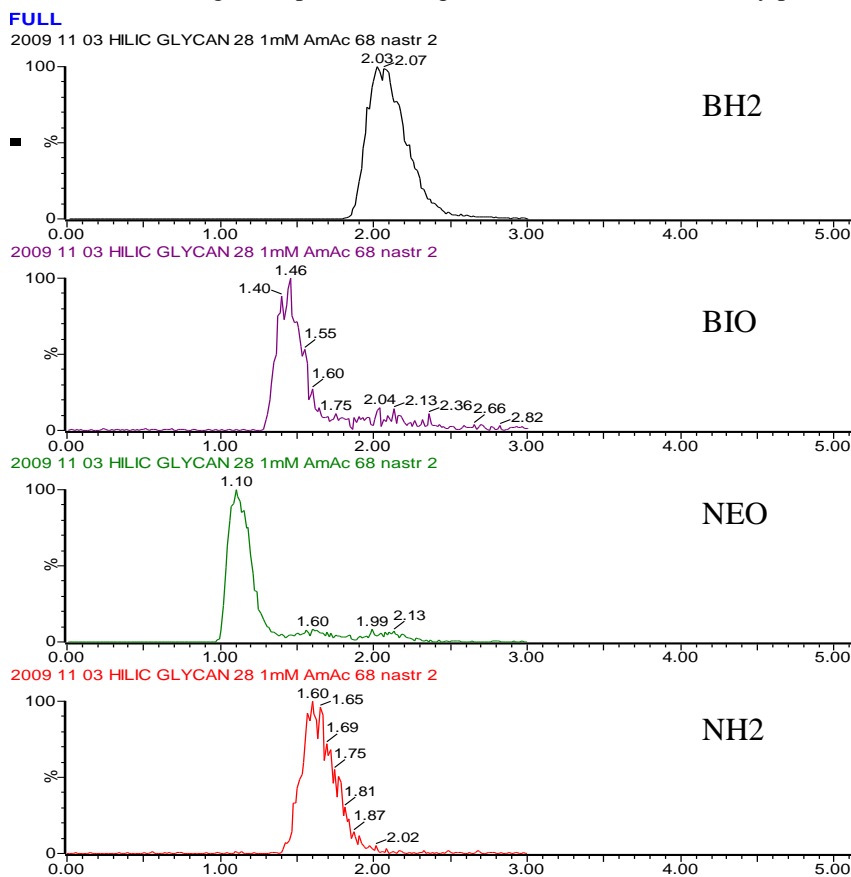
Obr. 26: Chromatogram separace směsi pteridinů– 0,1% NH₄ OH : acetonitril (20 : 80)



Obr. 27: Chromatogram separace směsi pteridinů– 0,1% kyselina octová : acetonitril (35 : 65)



Obr. 28: Chromatogram separace směsi pteridinů– 1mM octan amonný pH= 3,8 : acetonitril (30 : 70)

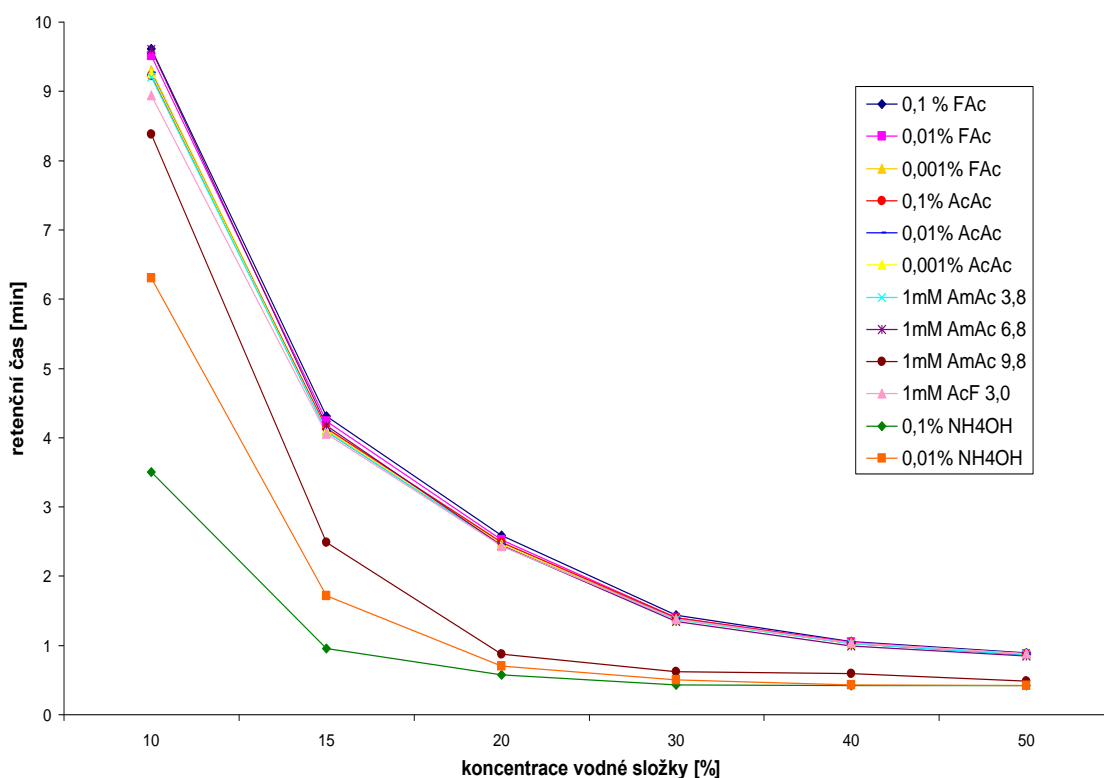


Obr. 29: Chromatogram separace směsi pteridinů– 1mM octan amonný pH= 6,8 : acetonitril (28 : 72)

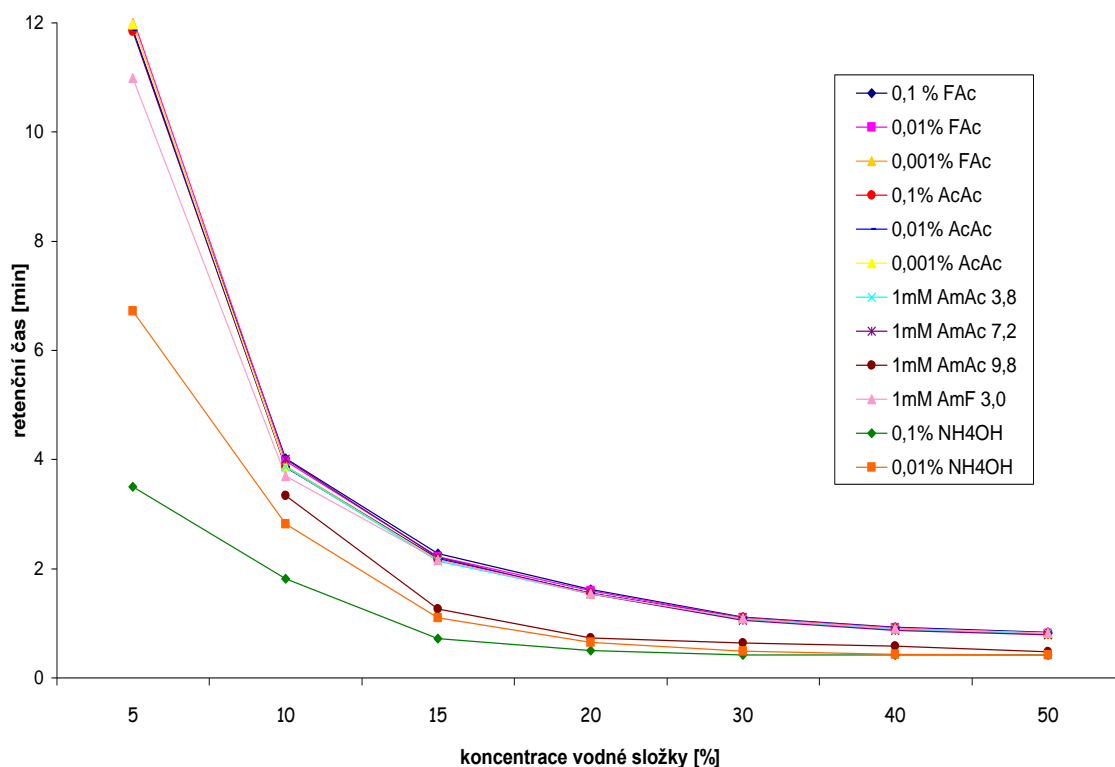
5.2.2. Chromatografická kolona ACQUITY UPLC BEH Amide

Druhou testovanou kolonou byla kolona ACQUITY UPLC BEH Amide (1,7 μ m, 2,1 x 100mm). Pro zmapování retence byly opět vybrány látky neopterin, biopterin a 12 druhů vodných složek mobilních fází. Další měření byla prováděna stejným postupem jako u předešlé kolony. Nakonec byly opět vybrány takové mobilní fáze, při jejichž použití dochází k separaci neopterinu, biopterinu i jejich derivátů.

U níže uvedených tabulek (Tab. 5, 6) a grafů (Obr. 30, 31) je patrný jejich podobný charakter, co se retenčních časů týká, jako u grafů zobrazujících chování neopterinu a biopterinu na glykanové chromatografické koloně. Je to z toho důvodu, že se jedná o chemicky stejné kolony, jen jde o BEH sorbent 1. a 2. generace.



Obr. 30: Závislost retenčního času neopterinu na koncentraci a typu vodné složky mobilní fáze FAc- kyselina mravenčí, AmAc- octan amonný, AcAc- kyselina octová, AmF- mravenčan amonný



Obr. 31: Závislost retenčního času biopterinu na koncentraci a typu vodné složky mobilní fáze
 FAc- kyselina mravenčí, AmAc- octan amonný, AcAc- kyselina octová, AmF- mravenčan amonný

U vodných složek 0,1% NH_4OH , 0,01% NH_4OH a 1mM roztok octanu amonného o $\text{pH}=9,8$ lze opět pozorovat nízkou retenci neopterinu a biopterinu. Při nižších koncentracích vodných složek došlo k separaci, ale tvary píků byly nevyhovující a to jak u neopterinu, biopterinu, tak i u jejich redukovaných forem.

Při použití roztoků kyseliny octové a mravenčí jako vodných složek mobilních fází bylo dosaženo stejných výsledků jako u glykanové kolony (Obr. 32).

Při použití 1mM roztoku octanu amonného o $\text{pH}=3,8$ lze na chromatogramu pozorovat nedostatečnou separaci. Neopterin vykazuje téměř shodný retenční čas jako dihydrobiopterin (Obr. 33). Ani snížení koncentrace vodné složky separaci nezlepšilo, navíc vedlo k rozmytí píků.

Lepší výsledky lze pozorovat při užití 1mM roztoku octanu amonného o $\text{pH}=4,8$. Separovány byly všechny čtyři pteridiny. Nejlepší separace s nejkvalitnějšími píkky bylo dosaženo při složení mobilní fáze 23:77 (vodná složka : acetonitril, Obr. 34).

I v případě amidové kolony se 1mM roztok octanu amonného o $\text{pH}=6,8$ ukázal jako vyhovující složka mobilní fáze. Jako optimální bylo vyhodnoceno složení 28 : 72 (vodná složka : acetonitril, Obr. 35), při kterém došlo k separaci pteridinů při zachování kvality píků.

koncentrace	0,1% FAc	0,01% FAc	0,001% FAc	1mM AmAc 9,8	1mM AmAc 4,2	1 mM AmAc 6,8	0,1% AcAc	0,01% AcAc	0,001% AcAc	0,1% NH ₄ OH	0,01% NH ₄ OH	1mM AmF 3,0
10	9,61	9,51	9,3	8,38	9,2	9,6	9,22	9,27	9,26	3,5	6,3	8,94
15	4,31	4,23	4,12	2,48	4,09	4,17	4,13	4,09	4,1	0,95	1,71	4,05
20	2,58	2,52	2,48	0,87	2,44	2,44	2,48	2,45	2,46	0,57	0,7	2,43
30	1,43	1,4	1,39	0,62	1,37	1,34	1,4	1,38	1,37	0,43	0,5	1,38
40	1,05	1,04	1,02	0,59	1,02	0,99	1,03	1,02	1,02	0,42	0,43	1,03
50	0,89	0,87	0,87	0,48	0,86	0,84	0,87	0,86	0,87	0,42	0,42	0,88

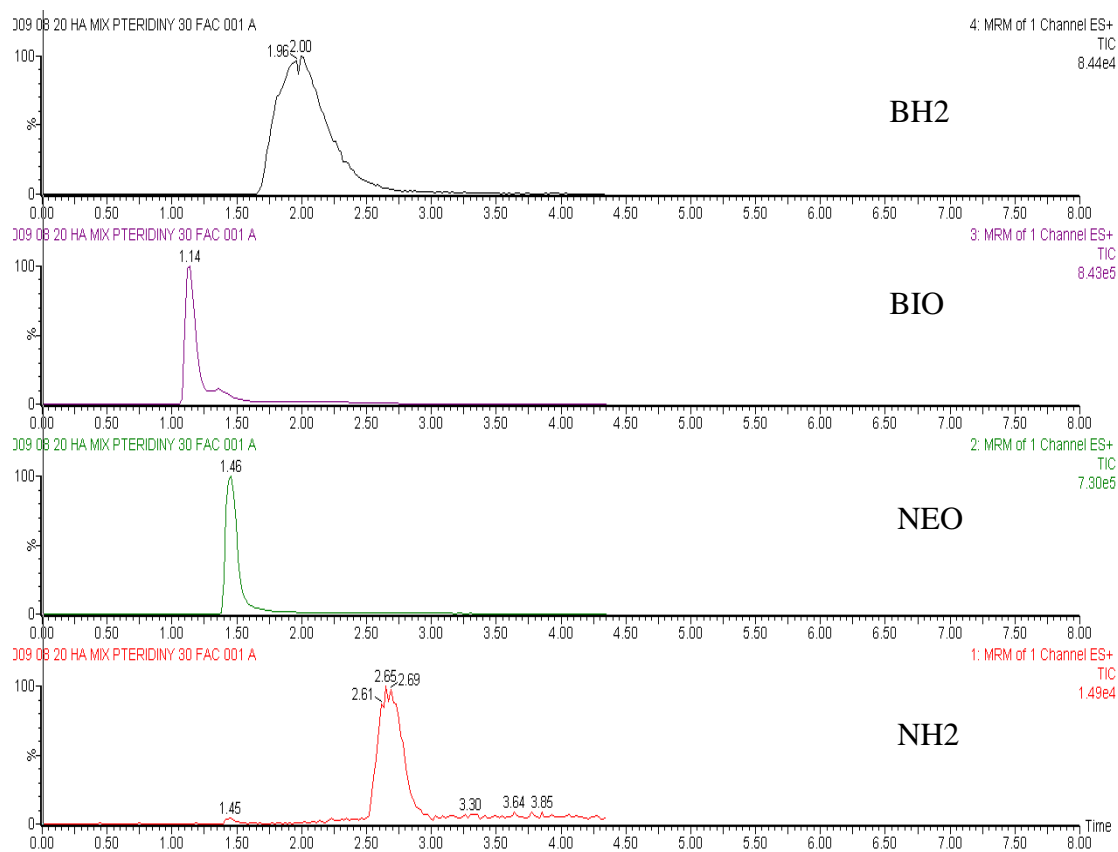
Tab. 5: Retenční časy neopterinu v závislosti na složení mobilní fáze

FAc- kyselina mravenčí, AmAc- octan amonný, AcAc- kyselina octová, AmF- mravenčan amonný

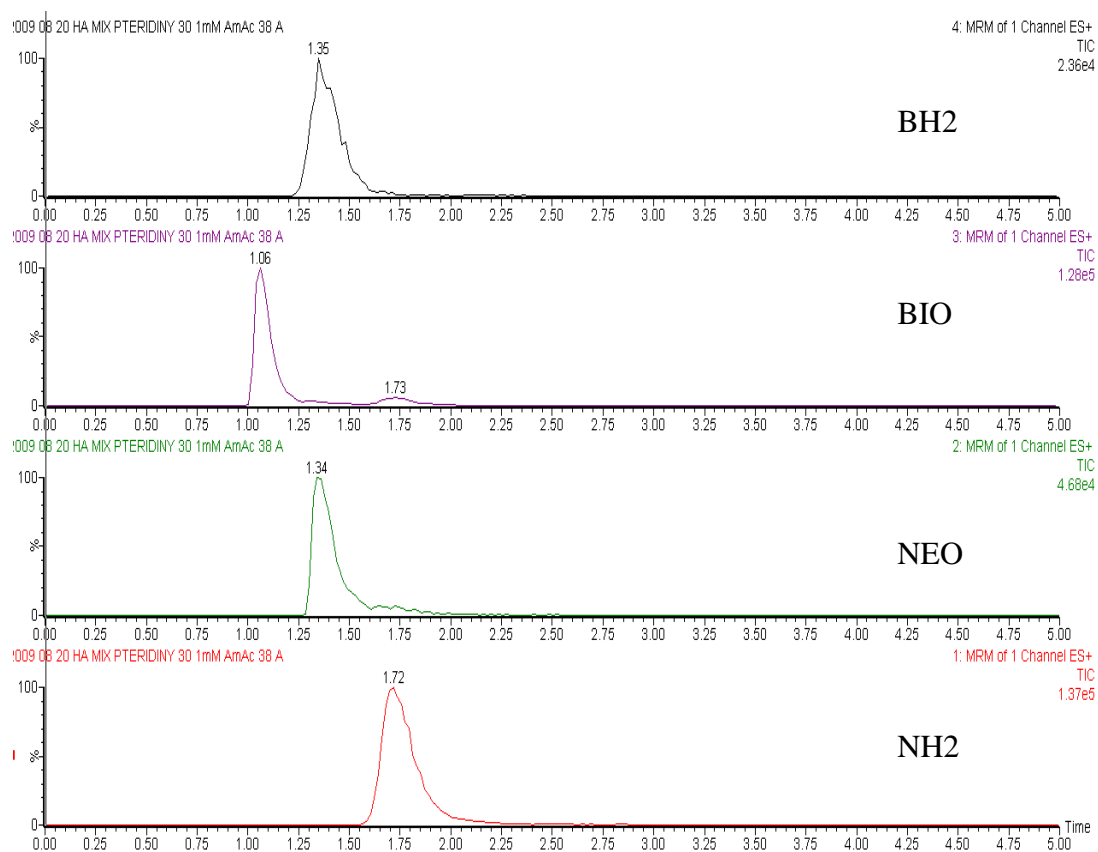
koncentrace	0,1% FAc	0,01% FAc	0,001% FAc	1mM AmAc 9,8	1mM AmAc 4,2	1 mM AmAc 6,8	0,1% AcAc	0,01% AcAc	0,001% AcAc	0,1% NH ₄ OH	0,01% NH ₄ OH	1mM AmF 3,0
5	11,87	12,08	11,99	-	-	-	11,84	11,86	11,97	3,5	6,71	10,98
10	4,01	3,97	3,88	3,33	3,87	4	3,85	3,85	3,86	1,81	2,82	3,69
15	2,27	2,21	2,18	1,26	2,13	2,2	2,17	2,18	2,16	0,71	1,1	2,16
20	1,61	1,59	1,55	0,73	1,54	1,54	1,55	1,55	1,54	0,5	0,65	1,53
30	1,11	1,1	1,08	0,63	1,07	1,05	1,1	1,08	1,07	0,42	0,48	1,09
40	0,92	0,91	0,9	0,58	0,89	0,87	0,9	0,89	0,89	0,41	0,43	0,9
50	0,83	0,81	0,81	0,47	0,81	0,78	0,81	0,81	0,81	0,41	0,41	0,82

Tab. 6: Retenční časy biopterinu v závislosti na složení mobilní fáze

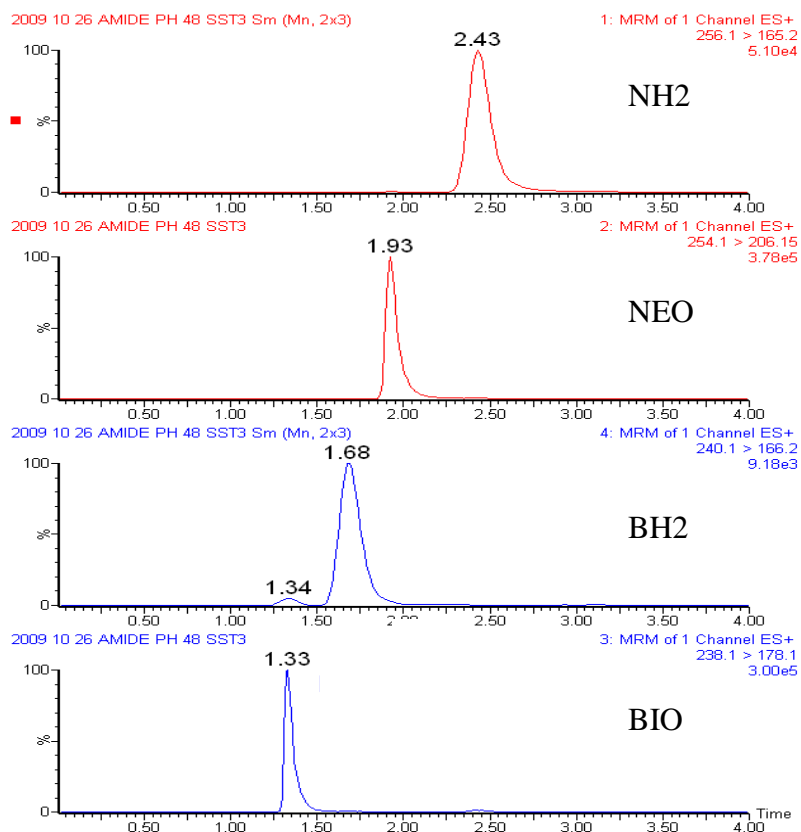
FAc- kyselina mravenčí, AmAc- octan amonný, AcAc- kyselina octová, AmF- mravenčan amonný



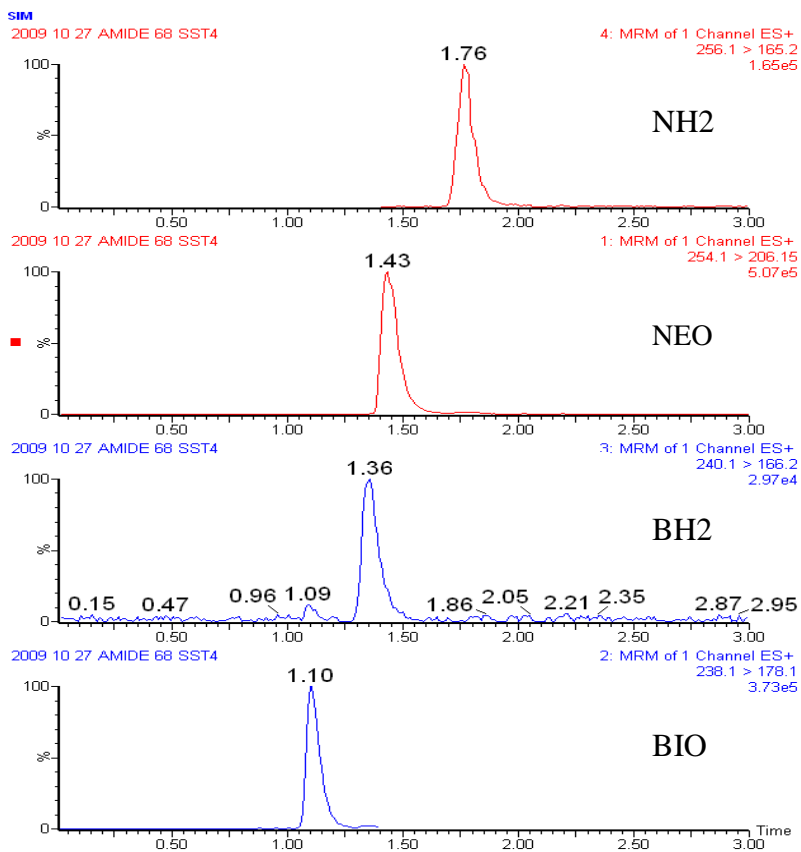
Obr. 32: Chromatogram separace směsi pteridinů– 0,01% kyselina mravenčí : acetonitril (30 : 70)



Obr. 33: Chromatogram separace směsi pteridinů– 1mM octan amonný pH= 3,8 : acetonitril (30 : 70)



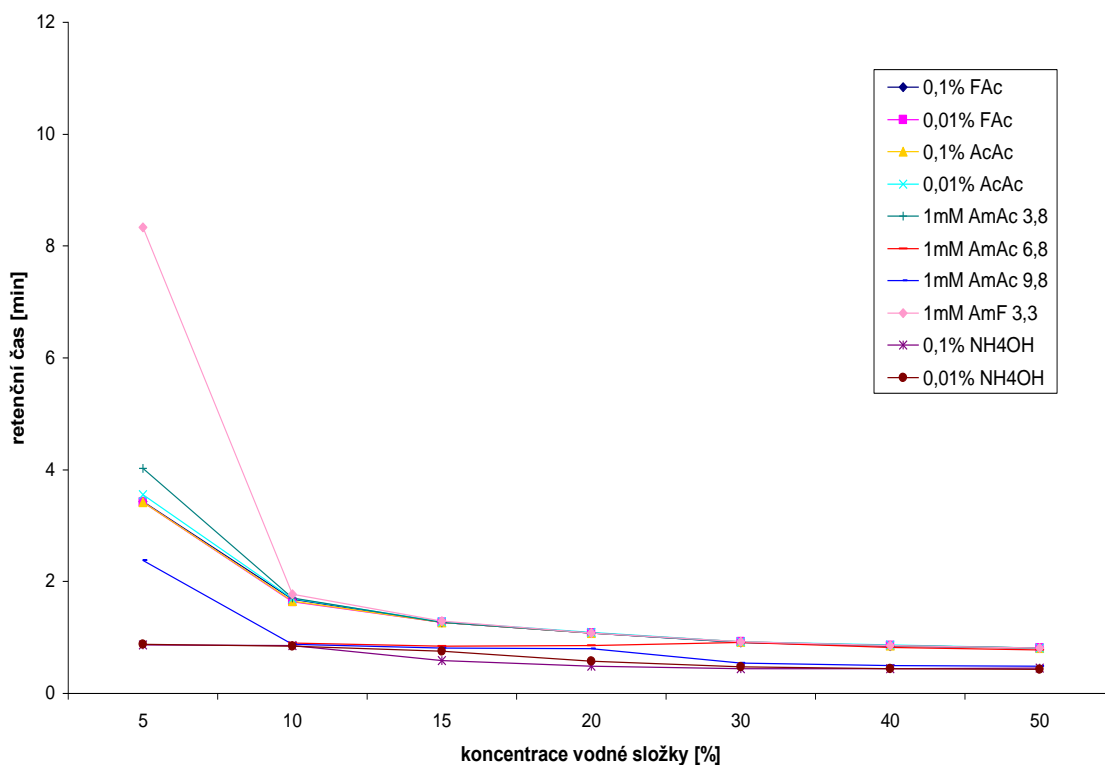
Obr. 34: Chromatogram separace směsi pteridinů– 1mM octan amonný pH= 4,8 : acetonitril (23 : 77)



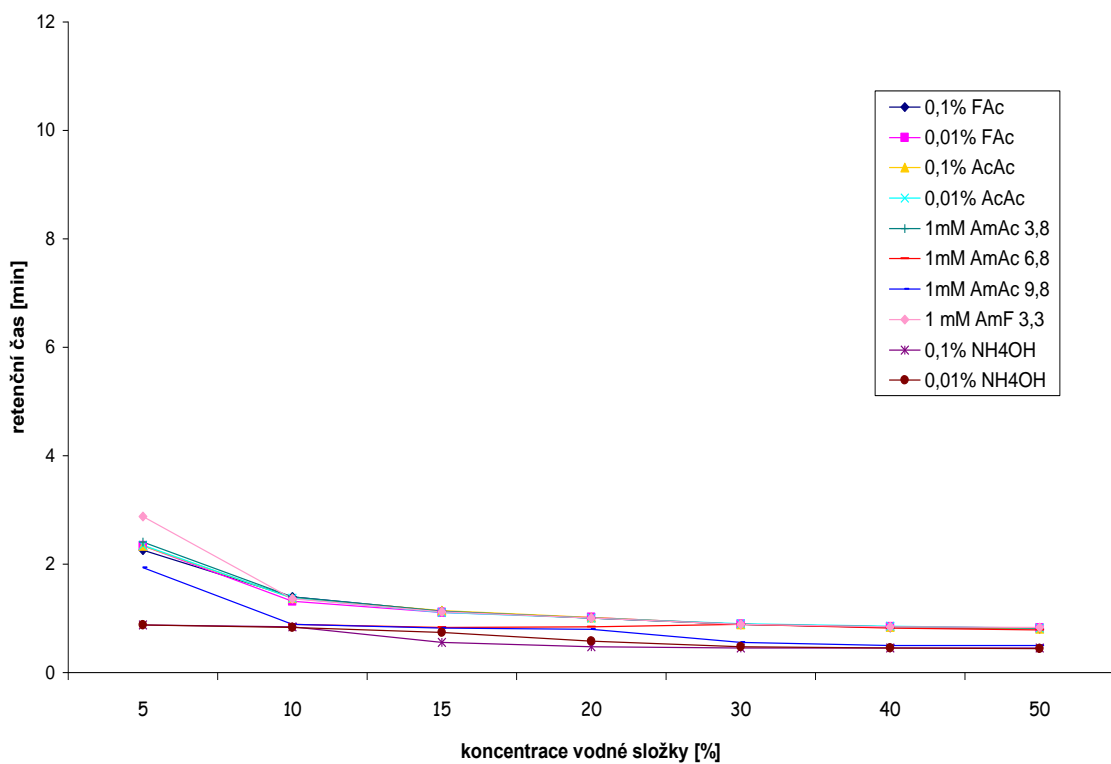
Obr. 35: Chromatogram separace směsi pteridinů– 1mM octan amonný pH= 6,8 : acetonitril (28 : 72)

5.2.3. Chromatografická kolona ACQUITY UPLC BEH HILIC

Jako poslední byla testovaná chromatografická kolona ACQUITY UPLC BEH HILIC (1,7 μ m, 2,1 x 100mm). U níže uvedených tabulek (Tab. 7, 8) a grafů (Obr. 36, 37) si lze všimnout, že dochází jen k velmi nízké retenci neopterinu a biopterinu na koloně BEH HILIC. Tato kolona prokázala výrazně nižší retenci a nedostatečnou selektivitu v porovnání s předchozími kolonami, proto ani nebyly proměřovány všechny vodné složky mobilních fází. Křivky grafů jsou pro oba pteridiny téměř totožné. Při použití jakýchkoliv z testovaných vodných složek mobilních fází lze pozorovat, že neopterin a biopterin mají téměř shodné nízké retenční časy (Obr. 38, 39). Z tohoto důvodu bylo velmi obtížné docílit jejich separace. S klesající koncentrací téměř všech vodných složek mobilních fází byly u NH₂ a BH₂ pozorovány široké a rozmyté píky. Tato kolona byla vyhodnocena jako nevhodná pro separaci pteridinů a další bližší měření se s ní již neprováděla.



Obr. 36: Závislost retenčního času neopterinu na koncentraci a typu vodné složky mobilní fáze FAc- kyselina mravenčí, AmAc- octan amonný, AcAc- kyselina octová, AmF- mravenčan amonný



Obr. 37: Závislost retenčního času biopterinu na koncentraci a typu vodné složky mobilní fáze
 FAc- kyselina mravenčí, AmAc- octan amonný, AcAc- kyselina octová, AmF- mravenčan amonný

koncentrace	0,1% FAc	0,01% FAc	1mM AmAc 9,8	1mM AmAc 4,2	1 mM AmAc 6,8	0,1% AcAc	0,01% AcAc	0,1% NH₄ OH	0,01% NH₄ OH	1mM AmF 3,0
5	3,43	3,41	2,37	4,02	-	3,41	3,55	0,86	0,87	8,33
10	1,68	1,63	0,87	1,7	0,9	1,64	1,69	0,85	0,84	1,77
15	1,27	1,27	0,81	1,26	0,84	1,26	1,28	0,58	0,75	1,29
20	1,08	1,08	0,79	1,08	0,85	1,08	1,09	0,48	0,57	1,08
30	0,91	0,92	0,54	0,91	0,91	0,92	0,92	0,44	0,47	0,92
40	0,84	0,85	0,49	0,85	0,82	0,85	0,86	0,44	0,44	0,85
50	0,81	0,81	0,48	0,81	0,77	0,81	0,81	0,45	0,43	0,81

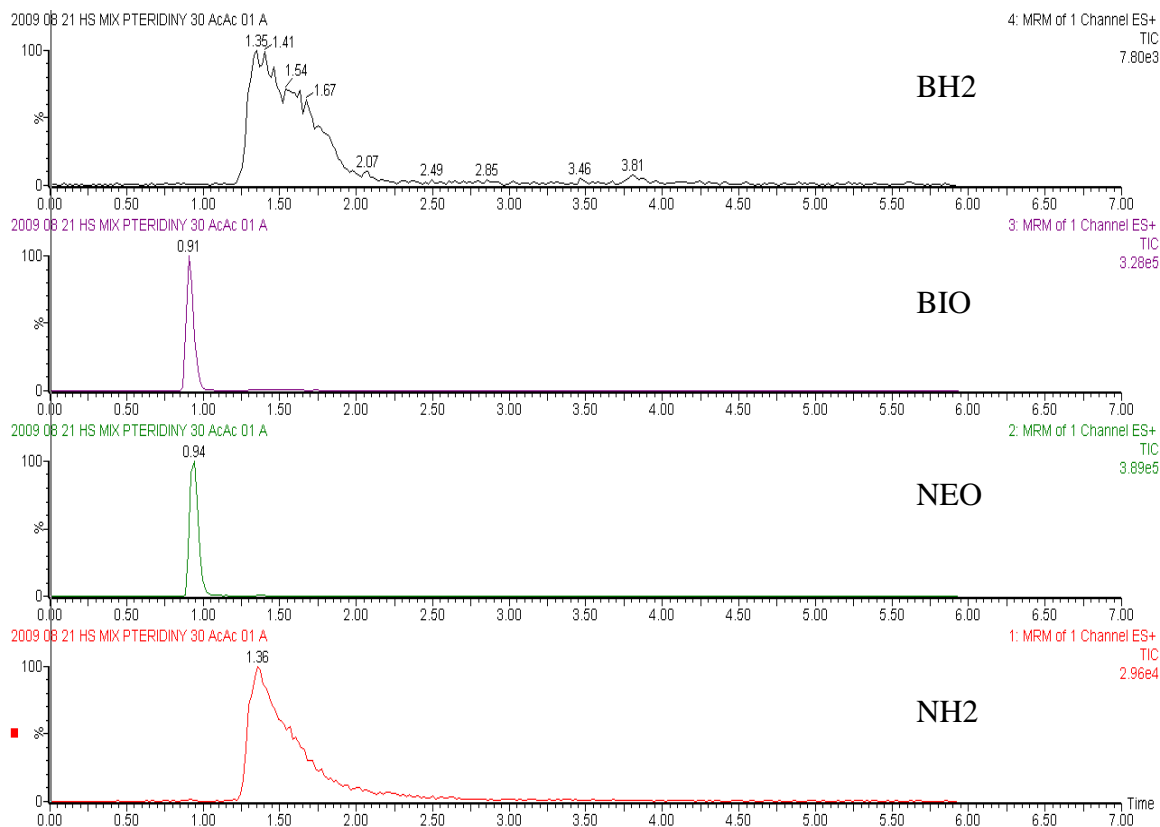
Tab. 7: Retenční časy neopterinu v závislosti na složení mobilní fáze

FAc- kyselina mravenčí, AmAc- octan amonný, AcAc- kyselina octová, AmF- mravenčan amonný

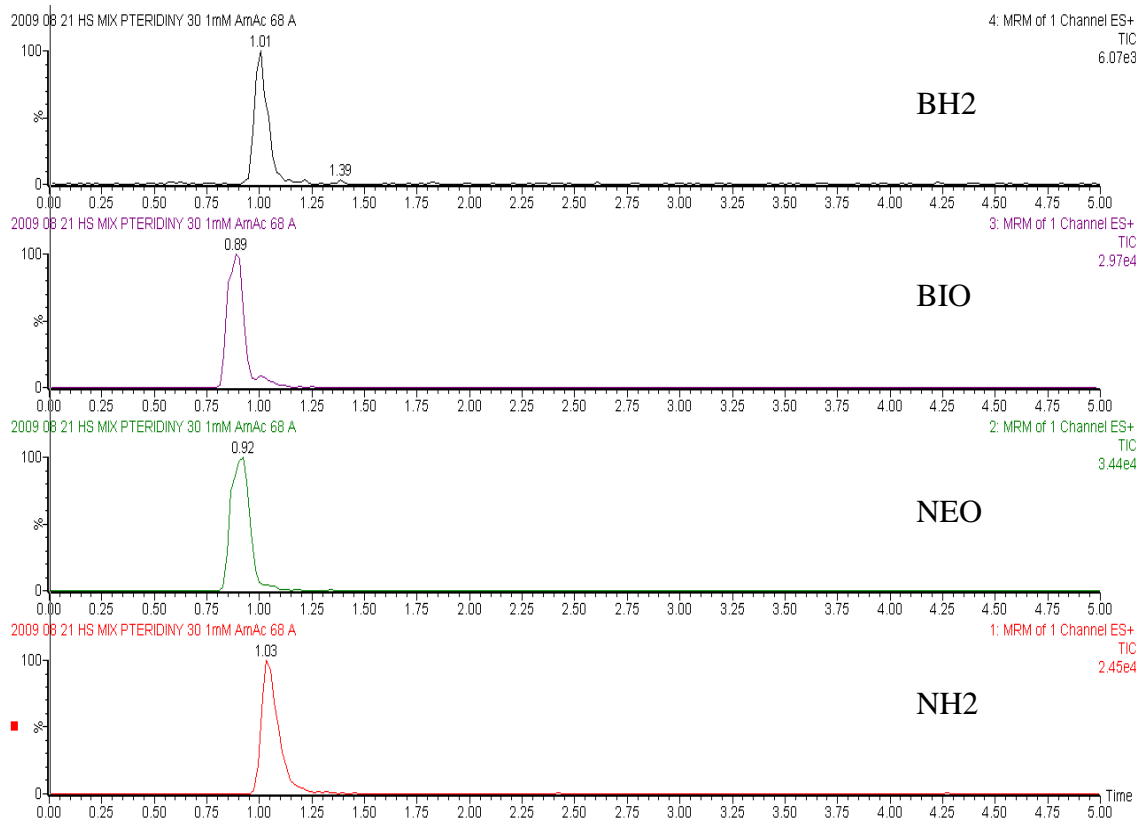
koncentrace	0,1% FAc	0,01% FAc	1mM AmAc 9,8	1mM AmAc 4,2	1 mM AmAc 6,8	0,1% AcAc	0,01% AcAc	0,1% NH₄ OH	0,01% NH₄ OH	1mM AmF 3,0
5	2,25	2,33	1,93	2,4	-	2,33	2,34	0,87	0,87	2,87
10	1,39	1,31	0,88	1,39	0,89	1,37	1,37	0,84	0,83	1,36
15	1,13	1,1	0,82	1,13	0,83	1,14	1,1	0,55	0,73	1,12
20	1	1,01	0,79	1	0,84	1,01	1	0,47	0,57	1
30	0,89	0,89	0,55	0,89	0,89	0,89	0,9	0,45	0,47	0,89
40	0,83	0,84	0,5	0,84	0,82	0,84	0,85	0,45	0,45	0,84
50	0,81	0,82	0,49	0,82	0,78	0,81	0,82	0,45	0,44	0,83

Tab. 8: Retenční časy biopterinu v závislosti na složení mobilní fáze

FAc- kyselina mravenčí, AmAc- octan amonný, AcAc- kyselina octová, AmF- mravenčan amonný



Obr. 38: Chromatogram separace směsi pteridinů– 0,1% kyselina octová : acetonitril (30 : 70)



Obr. 39: Chromatogram separace směsi pteridinů– 1mM octan amonný pH= 6,8 : acetonitril (30 : 70)

5.3. Opakovatelnost v rámci SST

Při zvolených optimálních podmínkách byla změřena opakovatelnost metody na koloně BEH Glycan a BEH Amide v modu SRM, která byla vyjádřena pomocí následujících parametrů: relativních směrodatných odchylek retenčních časů a ploch píků analyzovaných látek (Tab. 9).

BEH Glycan			BEH Amide		
pH=3,8			pH=4,8		
	A [% RSD]	t _R [% RSD]		A [% RSD]	t _R [% RSD]
NEO	4,29	0,84	NEO	1,43	0,00
BIO	2,92	0,85	BIO	1,43	0,00
NH2	4,61	0,80	NH2	5,61	0,20
BH2	1,88	0,93	BH2	4,82	0,17
pH=6,8			pH=6,8		
	A [% RSD]	t _R [% RSD]		A [% RSD]	t _R [% RSD]
NEO	3,37	0,67	NEO	1,98	0,21
BIO	2,63	1,14	BIO	3,00	0,00
NH2	1,29	0,53	NH2	3,84	0,17
BH2	2,58	0,81	BH2	3,58	0,37

Tab. 9: Opakovatelnost na koloně BEH Glycan- 1 mM octan amonný pH= 3,8 a pH= 6,8 a na koloně BEH Amide- 1 mM octan amonný pH= 4,8 a pH= 6,8

- Požadavek na opakovatelnost pro retenční čas byl RSD<1%.
Požadavek splnily všechny analyzované látky na obou kolonách při obou pH kromě BIO na BEH Glycan při použití vodné složky 1mM roztok AmAc pH= 6,8. Lepší výsledky poskytla chromatografická kolona BEH Amide.
- Požadavek na opakovatelnost plochy píků byl RSD<10%.
Požadavek byl splněn. Lepší výsledky NEO a BIO poskytla chromatografická kolona BEH Amide, naopak co se týká NH2 a BH2, bylo lepších výsledků dosaženo na chromatografické koloně BEH Glycan.

5.4. Ověření linearity a citlivosti metody

Na závěr bylo provedeno ověření linearity metody proměřením kalibračních křivek analyzovaných látek a testování její citlivosti (Tab. 10). Pro měření byly použity roztoky o koncentracích pro NEO a BIO v rozmezí 0,1- 5000 nmol/l a pro redukované formy v rozmezí 0,1- 10 000 nmol/l. Citlivost metody byla vyjádřena pomocí dvou parametrů- limitu detekce (LOD) a limitu kvantifikace (LOQ).

BEH Glycan				BEH Amide			
pH=3,8				pH=4,8			
	LOD [nmol/l]	LOQ [nmol/l]	korel.koef.		LOD [nmol/l]	LOQ [nmol/l]	korel.koef.
NEO	1,39	4,60	0,9997	NEO	0,91	3,00	0,9997
BIO	0,48	1,58	0,9997	BIO	0,22	0,74	0,9999
NH2	587,88	1940,00	0,9963	NH2	916,67	3025,00	0,9987
BH2	545,45	1800,00	0,9962	BH2	416,67	1375,00	0,9997
pH=6,8				pH=6,8			
	LOD [nmol/l]	LOQ [nmol/l]	korel.koef.		LOD [nmol/l]	LOQ [nmol/l]	korel.koef.
NEO	0,70	2,30	0,9997	NEO	0,45	1,50	0,9997
BIO	0,24	0,79	0,9999	BIO	0,45	1,48	0,9997
NH2	587,88	1940,00	0,9915	NH2	384,24	1268,00	0,9994
BH2	545,45	1800,00	0,9976	BH2	113,94	376,00	0,9987

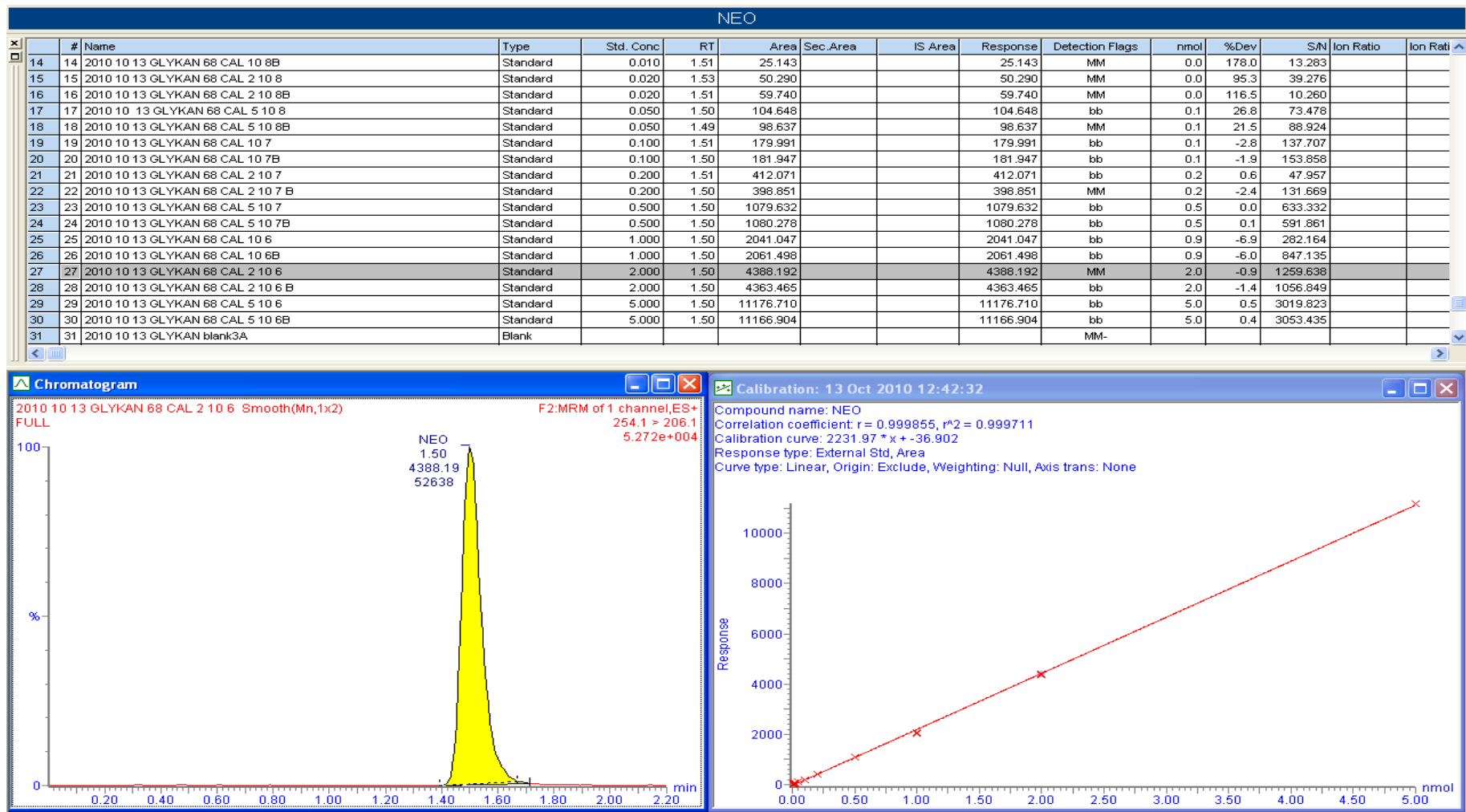
Tab. 10: Ověření linearity a citlivosti metody pro jednotlivé analyzované látky na koloně BEH Glycan- 1mM roztok octan amonný pH= 3,8 a pH= 6,8 a na koloně BEH Amide- 1mM roztok octan amonný pH= 4,8 a pH= 6,8

- **Limity detekce**

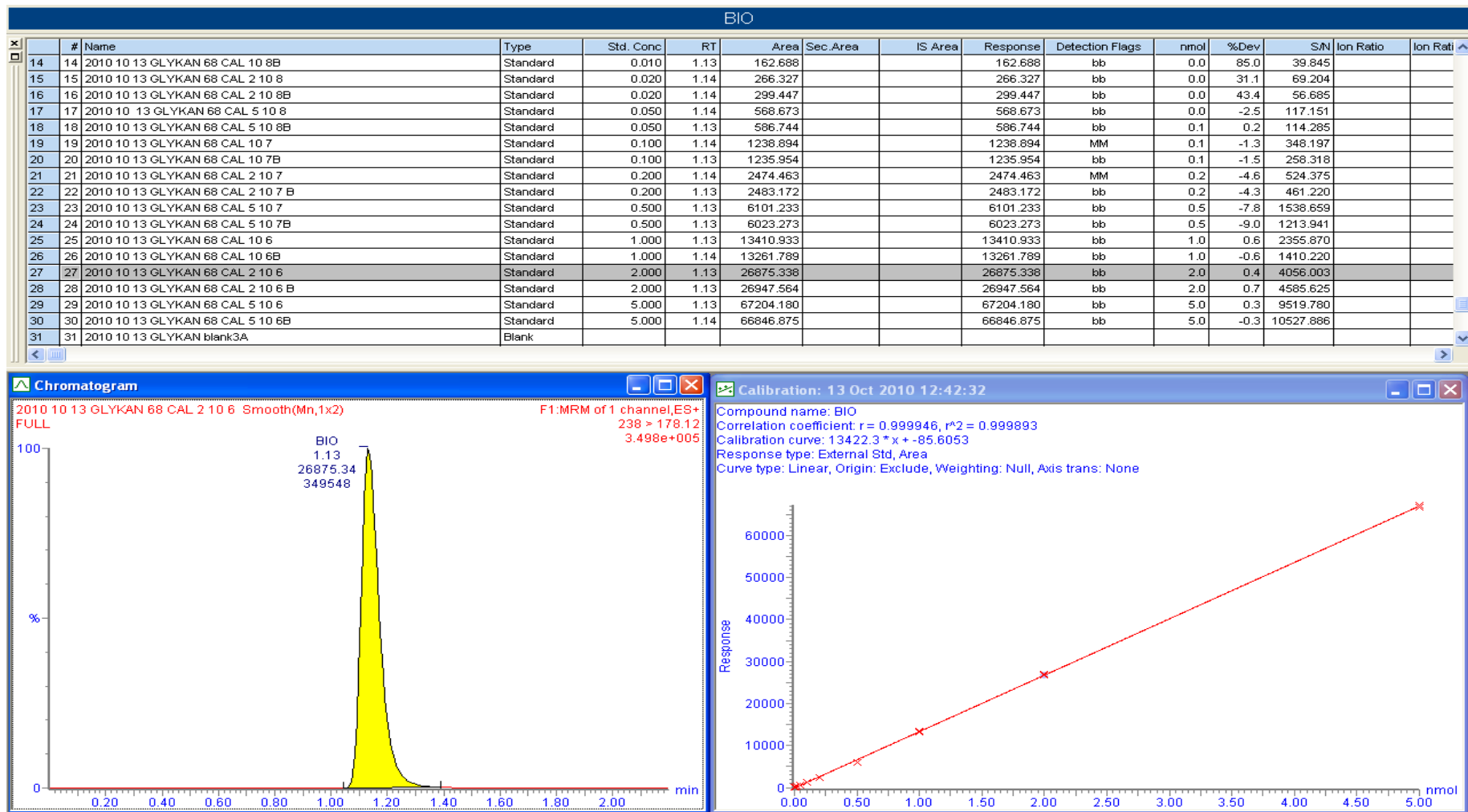
Neopterin a biopterin vykazovaly velmi dobré limity detekce. Při srovnání obou kolon bylo dosaženo lepších výsledků u kolony amidové. Limity detekce derivátů, 7,8-dihydroneopterinu a 7,8-dihydrobiopterinu, byly v porovnání s limity neopterinu a biopterinu horší o tři řády, u obou kolon se pohybovaly v přibližně stejných hodnotách. Vliv pH na citlivost a linearitu byl nepatrný.

- **Linearita metody**

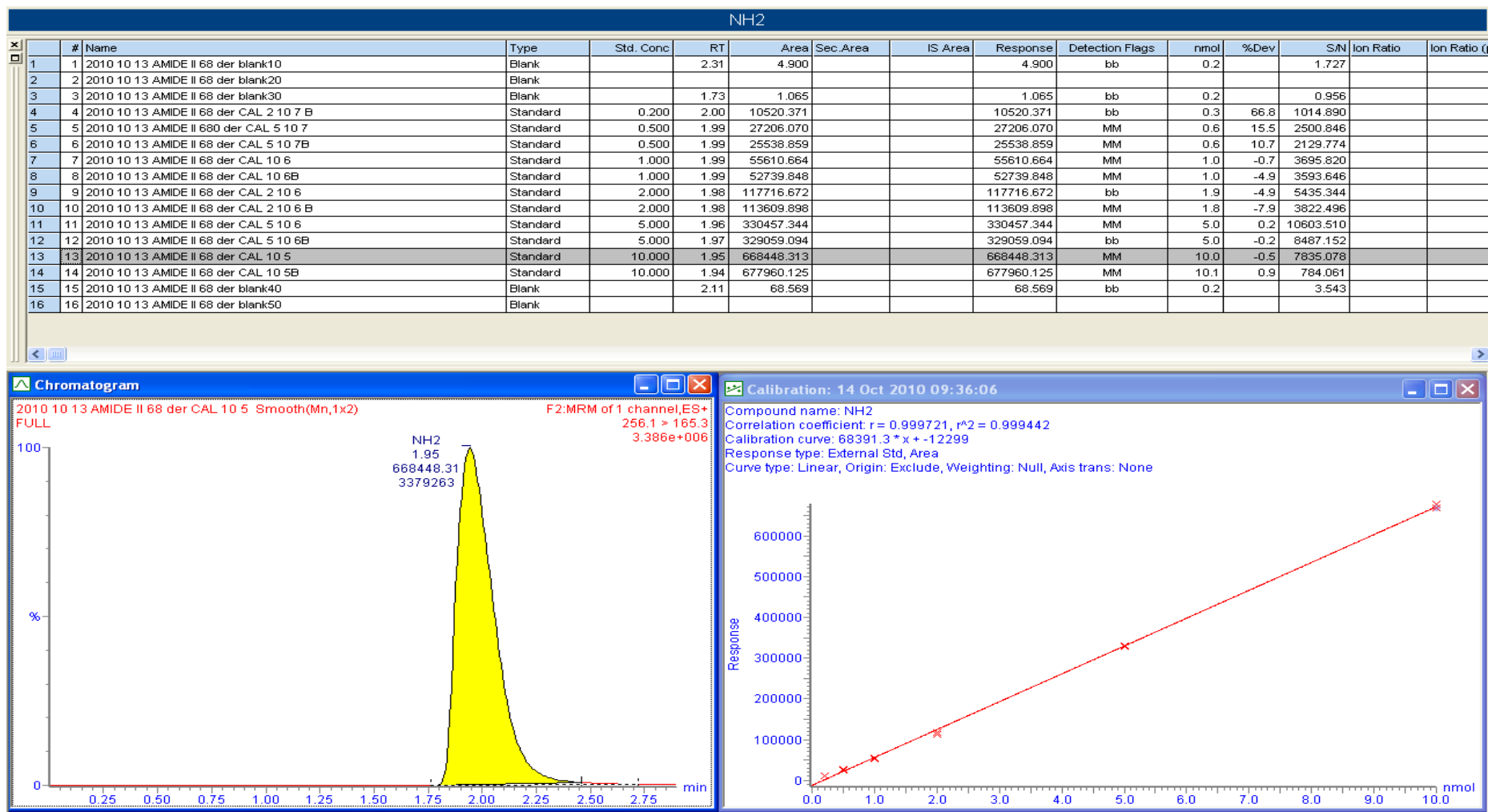
Byla vyjádřena pomocí korelačního faktoru (Obr. 40-43). Metody jsou lineární.



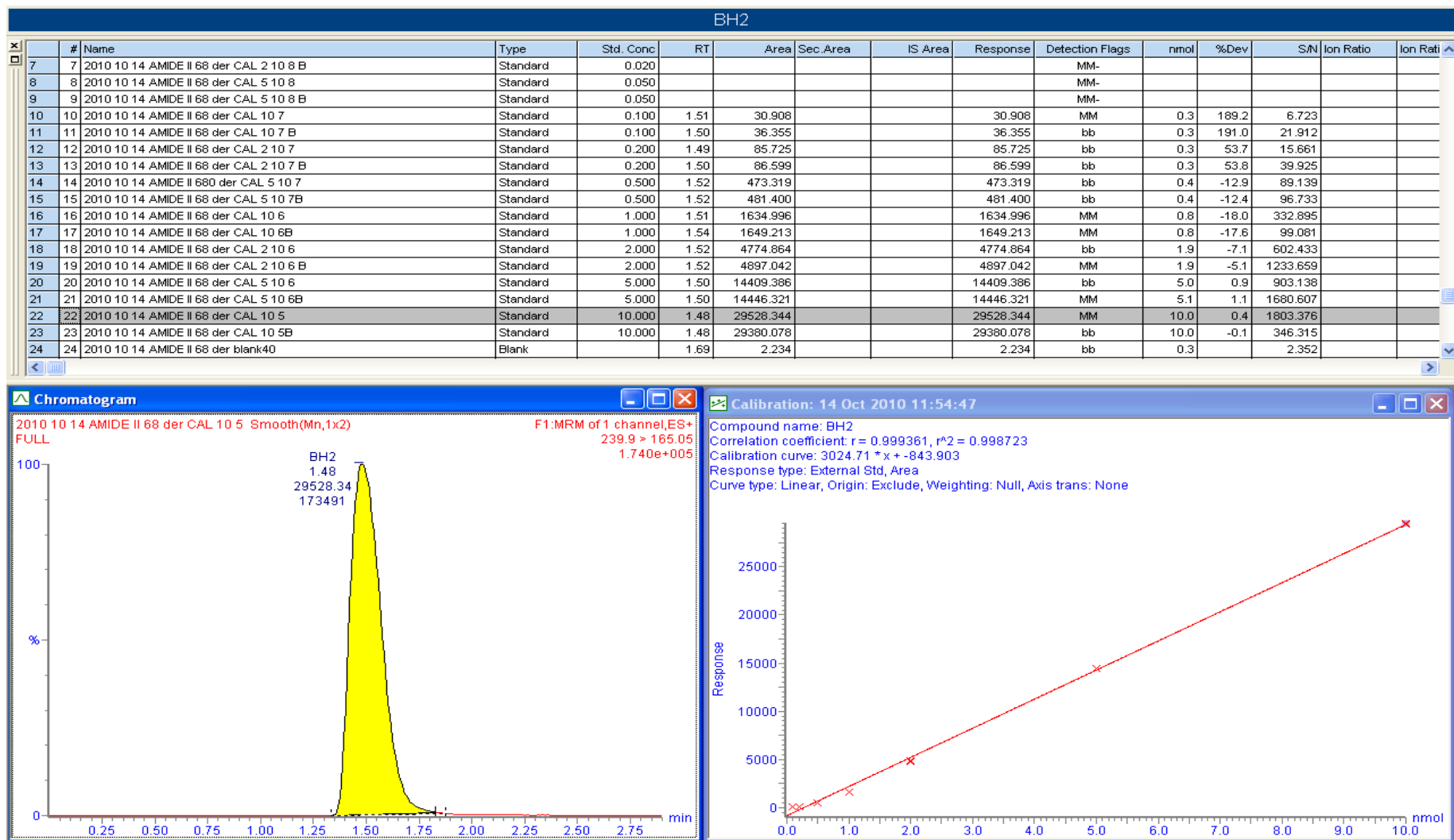
Obr. 40: Linearita metody pro neopterin- BEH Glycan, 1mM octan amonny pH=6,8:acetonitril (28:72), průtok mobilní fáze 0,4 ml/min



Obr. 41: Linearita metody pro biopterin- BEH Glycan, 1mM octan amonny pH=6,8:acetonitril (28:72), průtok mobilní fáze 0,4 ml/min



Obr. 42: Linearita metody pro dihydroneopterin- BEH Amide, 1mM octan amonný pH=6,8:acetonitril (28:72), průtok mobilní fáze 0,4 ml/min



Obr. 43: Linearita metody pro dihydrobiopterin- BEH Amide, 1mM octan amonný pH=6,8:acetonitril (28:72), průtok mobilní fáze 0,4 ml/min

6. ZÁVĚR

1. Byla proměřena hmotnostní spektra neopterinu, biopterinu, 7,8-dihydroneopterinu a 7,8-dihydrobiopterinu. Vybrány byly $[M+H]^+$ ionty, které vykazovaly největší intenzitu.

Byl optimalizován parametr MS detekce- cone voltage:

- cone voltage= NEO (25V), BIO (30V), NH2 (25V), BH2 (15V)

Byla změřena hmotnostní spektra produktových iontů a vybrán nejintenzivnější fragment.

Byl optimalizován parametr MS detekce- kolizní energie:

- kolizní energie= NEO (15V), BIO (20V), NH2 (25V), BH2 (10V)

2. Byly testovány tři chromatografické kolony. Porovnávána byla jejich selektivita, vliv na retenci a separaci analyzovaných látek při použití různých mobilních fází. Následně byly vybrány chromatografické kolony a mobilní fáze poskytující nejlepší výsledky.

Chromatografická kolona BEH Glycan

- mobilní fáze: 1mM roztok AmAc pH= 3,8 : acetonitril (30 : 70)
1mM roztok AmAc pH= 6,8 : acetonitril (28 : 72)

Chromatografická kolona BEH Amide

- mobilní fáze: 1mM roztok AmAc pH= 4,8 : acetonitril (23 : 77)
1mM roztok AmAc pH= 6,8 : acetonitril (28 : 72)

3. Při zvolených optimálních podmínkách byla změřena opakovatelnost metody vyjádřená pomocí relativních směrodatných odchylek retenčních časů a ploch pík analyzovaných látek.
 - požadavek na opakovatelnost pro retenční čas ($RSD < 1\%$) splnily všechny analyzované látky na obou kolonách při obou pH kromě BIO na BEH Glycan při použití vodné složky 1mM roztok AmAc pH= 6,8
 - požadavek na opakovatelnost plochy pík ($RSD < 10\%$) byl splněn u obou kolon při všech podmínkách

4. Byla ověřena linearita metody a stanovena citlivost metody.

- metody jsou lineární (BEH Glycan- $r = 0,9915-0,9999$, BEH Amide- $r = 0,9987-0,9999$)
- vyšší citlivost vykazuje BEH Amide, neopterin a biopterin poskytují lepší odezvu v porovnání s deriváty, LOD se pohyboval u NEO a BIO v rozmezí 0,22-0,91 nmol/l, u redukovaných forem 113,94- 916,67 nmol/l, LOQ se pohyboval u NEO a BIO v rozmezí 0,74- 3,00 nmol/l, u redukovaných forem 376,00- 3025,00 nmol/l

5. Z hlediska separace a kvality píků jednotlivých analyzovaných látek poskytla lepší výsledky chromatografická kolona BEH Amide. Při srovnání obou pH (pH= 4,8 a 6,8) v rámci této kolony bylo lepší separace dosaženo při pH= 4,8, naopak z pohledu citlivosti poskytuje lepší výsledky pH= 6,8.

7. POUŽITÁ LITERATURA

- [1] Hopkins F. G.: Nature 40 (1889) 335.
- [2] Schopf C, Becker E.: Justus Liebigs Ann. Chem. 524 (1936) 49.
- [3] Purrmann R.: Justus Liebigs Ann. Chem. 546 (1940) 98.
- [4] Koschara W.: Hoppe-Seylet' s Z. Physiol. Chem. 240 (1936) 127.
- [5] Paterson E. L., Saltza M. H., Stokstad E. L. R.: J. Am.Chem. Soc. 78 (1956) 5871.
- [6] Sakurai A., Goto M.: J. Biochem. 61 (1967) 142.
- [7] Blakley R. L: The Biochemistry of Folic Acid and Related Pteridines, North-Holland Publ., Amsterdam (1969) 8.
- [8] Forrest H., Van Baalen C: Annu. Rev. Microbiol 24 (1970) 91.
- [9] Čopíková J., Uher M., Lapčík O., Moravcová J., Drašar P.: Chem. Listy 99 (2005) 802.
- [10] White R. H.: Biochemistry 35 (1996) 3447.
- [11] Kováč, J.; Krutošíková, A.; Kada, R.; Chémia heterocyklických zlúčenin, Veda; (1982).
- [12] Armarego W. L. F., Randles D.: Chemistry and Biology of Pteridines Walter de Gruyter, Berlin, New York (1983) 423.
- [13] Shen R.: Arch. Biochem. Biophys. 310 (1994) 60.
- [14] Fukushima T., Kobayashi K., Eto I., Shiota T.: Anal. Biochem. 59 (1978) 71.
- [15] Fukushima T., Nixon J. C: Anal. Biochem. 102 (1980) 176.
- [16] Brown G. M., Williamson J. M.: Adv. Enzymol. 55 (1982) 345.
- [17] Richter G., Ritz H., Katzenmeier G., Volk R., Kohnle A., Lottspeich F., Allendorf D., Bacher A.: J. Bacteriol. 775 (1993) 4045.
- [18] Nichol C. A., Smith G. K. Duch D. S.: Annu. Rev.Biochem. 54 (1985) 729.
- [19] Huber C., Batchelor JR, Fuchs D., et al.: J. Exp. Med. 160 (1984) 310.
- [20] Werner E. R., Werner-Felmayer G., Wachter H., Mayer B.: Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 127 (1995) 97.
- [21] Shen R. S., Alam A., Zhang Y. X.: Biochem. Biophys. Acta 965 (1988) 9.
- [22] Blau N., Joller P., Atares M., Cardera-Garcia J., Niederwieser A.: Clin. Chim. Acta 148 (1985) 47.
- [23] Schoedon G., Troppmair J., Fontana A., Huber C, Curtius C, Niederwieser A.: Eur. J. Biochem. 166 (1987) 303.
- [24] Viveros O.H., Lee C.L., Abou-Donia H.M., Nixon J.C., Nichol CA.: Science 213 (1981) 349.

- [25] Parniak M. A., Pilkington J.: *Biochem. Cell. Biol.* 67 (1989) 293.
- [26] Schoedon G., Schneemann M, Blau N., Edgell C. J. S., Schaffner A.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 196 (1993) 1343.
- [27] Wachter H., Fuchs D., Hausen A., Reibnegger G., Weiss G., Werner G., Werner-Felmayer G.: *Neopterin.Biochemistry-Methods-Clinical Application*, Walter de Gruyter & Co., Berlin (1991) 55.
- [28] Müller M. M., Curtius H. C, Herold M., Huber C. H.: *Clin. Chim. Acta* 207, (1996) 1.
- [29] Werner-Felmayer G., Golderer G., Werner ER.: *Curr Drug Metab.* 3 (2002) 159.
- [30] Altindag ZZ, Sahin G, Inanici F, Hascelik Z.: *Rheumatol Int.* 18 (1998) 107.
- [31] Durukan A.H., Hurmeric V., Akgul E.O., Kilic S., Bayraktar M.Z.: *Ocul Immunol Inflamm.* 15 (2007) 303.
- [32] Mahmoud R.A., El-Gendi H.I., Ahmed H.H.: *Clin Biochem.* 38 (2005) 134.
- [33] Pacileo M, Cirillo P, De Rosa S, et al.: *Monaldi Arch Chest Dis*, 68 (2007) 68.
- [34] Plata-Nazar K, Kozielska E, Luczak G.: *Med Wieku Rozwoj*, 8 (2004) 433.
- [35] Hatzistilianou K.H., Maria Eboriadou, Theodouli Papastavrou, Christina Magnesali, Stella Pappa.: *Arch Med Sci.* 3 (2007) 123.
- [36] Messahel S, Pheasant AE, Pall H, Ahmed-Choudhury J, Sungum-Paliwal RS, Vostanis P.: *Neurosci Lett.* 241 (1998) 17.
- [37] Weiss G., Fuchs D., Hausen A., Reibnegger G., Werner E. R., Werner-Felmayer G., Semenitz E., Dierich M. P., Wachter H.: *FEBS Lett.* 327 (1993) 89.
- [38] Murr C., Fuchs D., Gossler W., Hausen A., Reibnegger G., Werner E. R., Werner-Felmayer G., Esterbauer H., Wachter H.: *FEBS Lett.* 338 (1994) 223.
- [39] Baier-Bitterlich G.,Fuchs D.,Murr C.,Reibnegger G., Werner-Felmayer G., Sgonc R., Bock G., Dierich M. P., Wachter H.: *FEBS Lett.* 364 (1995) 234.
- [40] Mori H., Arai T., Mori K., Suzuki T., Makino K.: *Biochem. Mol. Biol. Int.* 40 (1996) 799.
- [41] Schobersberger W., Hoffmann G., Hobischhagen P., Bock G., Volkl H., Baier-Bitterlich G., Wirleitner B., Wachter H., Fuchs D.: *FEBS Lett.* 397 (1996) 263.
- [42] Baier-Bitterlich G., Fuchs D., Wachter H.: *Biochem. Pharmacol.* 53 (1997) 755.
- [43] A. Espinosa-Mansilla, A. Muñoz de la Peña, F. Cañada-Cañada and A. Mancha de Llanos: *Talanta* 77 (2008) 844.

- [44] Muntau A. C.: *Pediatric*, (2009) 97.
- [45] http://www.udmp.cz/elearning/sborniky_files/biochem.pdf 3.4.2011
- [46] Fiege B., Ballhausen D., Kierat L., et al.: *Mol Genet Metab.*, 81 (2004) 45.
- [47] Kase H., Hashikabe Y., Uchida K., Nakanishi N., Hattori Y.: *J. Hypertens.* 23 (2005) 1375.
- [48] Richardson M.A., Read L.L., Reilly M.A., Clelland J.D., Clelland C.L.: *Neurochem Res.* 32 (2007) 107.
- [49] Tiemeier H., Fekkes D., Hofman A., van Tuijl H.R., Kiliaan A.J., Breteler M.M.: *Psychiatry Res.* 145 (2006) 199.
- [50] Foxtan R.H., Land J.M., Heales S.J.: *Neurochem Res.* 32 (2007) 751.
- [51] Danfors T., von Knorring A.L., Hartvig P., et al.: *J Clin Psychopharmacol.* 25 (2005) 485.
- [52] Ziegler I., Schwulera U.: *J. Cell. Biochem.* 41 (1989) 103.
- [53] Ziegler I., Borchert M., Heaney F., Davis A.P., Boyle H.: *Biochim. Biophys. Acta* 7735 (1992) 330.
- [54] Tanaka K., Kaufman S., Milstien S.: *Proc. Nati. Acad.Sci. U.S.A.* 86 (1989) 5864.
- [55] Wood J. M., Schallreuter-Wood K. U., Lindsey N. J., Callaghan S., Gardner M. L. G.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 206 (1995) 480.
- [56] Rajagopalan K. V., Johnson J. L.: *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 10199.
- [57] Gardlik S., Rajagopalan K. V.: *J. Biol. Chem* 266 (1991) 16627.
- [58] Ziegler I.: *Hoppe Seyler's Z.: Physiol. Chem.* 365 (1984) 667.
- [59] Bakir A.A., Shaykh M., Williams R.H., Ahmed S., Dunea G.: *Amer. J. Nephrol.* 12 (1992) 224.
- [60] Garber S. L., Salmassi J., Arruda J. A., Dunea G.: *Nephron* 69 (1995) 71.
- [61] Jean L. Lord, Ann de Peyster, P.J.E. Quintana and Robert P. Metzger: *Cancer Lett* 222 (2005) 119.
- [62] Tomandl, J.: *Vnitř. Lék.*, 43 (1997) 404.
- [63] Ogiwara, S.; Hidaka, H.; Sugimoto, T.; Teradaira, R.; Fujita, K.; Nagatsu, T.: *J. Biochem.*, 113 (1993) 1.
- [64] Hibiya, M.; Teradaira, R.; Sugimoto, T.; Fujita, K.; Nagatsu, T.; *J. Chromatogr. B*, 672 (1995) 143.
- [65] Hyland K., Howells D. W.: *J. Chromatogr.* 429 (1988) 95.
- [66] Niederwieser A., Staudenmann W., Wetzel E.: *J. Chromatogr.* 290 (1984) 237.

- [67] Tani Y., Ishihara T.: *Life Sci* 46 (1990) 373.
- [68] Blau N., Niederwieser A.: *Anal. Biochem.* 128 (1983) 446.
- [69] Stea B., Halpern R. M., Halpern B. C, Smith R. A.: *J. Chromatogr.* 188 (1983) 363.
- [70] Ziegler T. R., Benfell K., Smith R. J., Young L. S., Brown E., Ferrari-Baliviera E., Lowe D.K., Wilmore D. W.: *J. Parenteral and Enteral Nutrition* 74 (1990) 137.
- [71] Werner E. R., Fuchs D., Hausen A., Reibnegger G., Wachter H.: *Clin. Chem.* 33 (1987) 2028.
- [72] Candito M., Cavenel C, Gugenheim J., Mouiel J., Parisot F., Jacomet Y., Sudaka P., Chambon P.: *J. Chromatogr.* 674 (1993) 164.
- [73] Haavik J., Flatmark T.: *J. Chromatogr.* 257 (1983) 361.
- [74] Trehan S., Noronha J. M.: *J. Clin. Biochem. Nutr.* 14 (1992) 195.
- [75] Lloyd T., Markey S., Weiner N.: *Anal. Biochem.* 42 (1971) 108.
- [76] Davis M. D., Kaufman S., Milstien S.: *Proc. Nati. Acad. Sci. U.S.A.* 88 (1991) 385.
- [77] Český lékopis 2009, GRADA Publishing a.s. (2009).
- [78] <http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html> 3.4.2011
- [79] old.lf3.cuni.cz/chemie/cesky/materialy_B/chromatografie.doc 3.4.2011
- [80] Klimeš J. a kol.: *Kontrola chemických léčiv II* (2004) 79.
- [81] Karlíček R. a kol.: *Analytická chemie pro farmaceuty* (2005) 269.
- [83] Nováková L., Vlčková H.: *Analytica Chimica Acta*, 656 (2009) 8.
- [84] <http://www.hplc.cz/UPLC/index.htm> 3.4.2011
- [85] Tistaert Ch., Dejaegher B. and Heyden Y.: *Analytica Chimica Acta*, 690 (2011) 148.
- [86] Wyndham K.D., O'Gara J.E., Walter T.H., Glose K.H., Lawrence N.L., Alden B.A., Izzo G.S., Hudalla Ch.J., Iraneta P.C.: *Anal.Chem.* 75 (2003) 6781.
- [87] <http://www.waters.com> 3.4.2011
- [88] Alpert, A. J.: *J. Chromatogr.*, 499 (1990) 177.
- [89] Vacek J., Onofrejšová L., Klejdus B., Kubáň V.: *Chem. Listy* 103 (2009) 381.
- [90] http://www.hplc.cz/Teorie/hilic.html#_edn2 3.4.2011
- [91] Kovářová H.: *Chem. Listy* 99 (2005) 886.
- [92] Vidová L., Lemr K., Havlíček V.: *Chem. Listy* 102 (2008) 957.
- [93] Ranc V., Havlíček V., Bednář P., Lemr K.: *Chem. Listy* 101 (2007) 524.

- [94] http://ime.fme.vutbr.cz/files/Studijni%20opory/im/_private/6_ICPMS.htm
3.4.2011
- [95] <http://www.uochb.cz/web/structure/810.html?lang=cz> 3.4.2011
- [96] http://cheminfo.chemi.muni.cz/chem_sekce/predmety/C7300/MS/ms.pdf
3.4.2011
- [97] Mazanec K., Chmelík J.: Chem. Listy 99 (2005) 175.
- [98] Holčapek M., Jandera P.: Chem. Listy 92 (1998) 278.
- [99] http://holcapek.upce.cz/teaching/MS01_Uvod.pdf 3.4.2011
- [100] Ořapka L.: Diplomová práce- UPLC-MS jako nový trend v separačních technikách- aplikace v analýze biologicky aktivních látek, 2008.

8. PŘÍLOHA

Nováková L., Kaufmannová I., Jánská R.: Evaluation of hybrid hydrophilic interaction chromatography stationary phases for ultra-HPLC in analysis of polar pteridines, *J. Sep. Sci.* 33 (2010) 765.