

## PŮVODNÍ A METODICKÉ PRÁCE

### STANOVENÍ ALLOXANU V MOUCE POMOCÍ KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZY VE SPOJENÍ S TANDEMOVOU HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIÍ

JANA HORSKÁ<sup>a</sup>, ALENA OBŠÍVAČOVÁ<sup>b</sup>,  
KATEŘINA VÍTKOVÁ<sup>c</sup>, JANA JURČIKOVÁ<sup>c</sup>,  
VÁCLAV PROCHÁZKA<sup>c,d</sup> a JAN PETR<sup>b</sup>

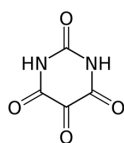
<sup>a</sup> Katedra fyziky, chemie a odborného vzdělávání, Pedagogická fakulta, Masarykova Univerzita, Poříčí 7, 603 00 Brno, <sup>b</sup> Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci, 17. listopadu 12, 771 46 Olomouc, <sup>c</sup> Fakultní nemocnice Ostrava, 17. listopadu 1790, 708 52 Ostrava, <sup>d</sup> Ostravská univerzita, Lékařská fakulta, Syllabova 19, 703 00 Ostrava-Vítkovice  
jan.petr@upol.cz

Došlo 29.1.20, přijato 4.3.20.

Klíčová slova: alloxan, diabetes, hmotnostní spektrometrie, kapilární elektroforéza

#### Úvod

Alloxan, 2,4,5,6-tetraoxypyrimidin (obr. 1), je derivát pyrimidinu, u něhož byl v roce 1943 poprvé popsán diabetogenní účinek<sup>1</sup>. Alloxan se velmi rychle a selektivně akumuluje v beta-buňkách slinivky břišní, kde způsobuje jejich nekrózu a tím zastavuje sekreci inzulínu. Jeho afinita k beta-buňkám je dána jeho strukturální podobností s glukosou. Jedná se o glukosový analog, jehož cytotoxický účinek je spojen s jeho hydrofilitou, schopností vytvářet reaktivní formy kyslíku a reagovat s thiolovou skupinou různých enzymů přítomných v beta-buňkách, zejména pak s nejvíce citlivým enzymem glukokinásou<sup>2,3</sup>. Alloxan tak způsobuje stav odpovídající diabetu mellitu I. typu u lidí<sup>4</sup> a je využíván k vyvolání experimentálního diabetu u laboratorních zvířat, jako jsou králíci, potkani, myši, kočky a psi<sup>5,6</sup>. Dávka potřebná k vyvolání diabetu závisí na druhu



Obr. 1. Strukturální vzorec alloxanu

zvířete, způsobu podání a nutričním stavu<sup>7</sup>. „Alloxanový diabetes“ vykazuje typické známky diabetu jako u lidí: hyperglykémii, výrazný úbytek hmotnosti, glykosurii, polydipsii, polyurii, ketonurii a acidózu<sup>8</sup>. Naopak v mnoha studiích bylo prokázáno, že alloxan je netoxický pro lidský pankreas v důsledku nízkého zastoupení GLUT2 transportéru glukosy v lidských beta-buňkách<sup>9–11</sup>.

Z chemického hlediska je alloxan molekulou s poměrně jednoduchou strukturou. Obsahuje čtyři silné akceptory protonů a dva silné donory protonů, díky nimž může přecházet na různé tautomerní formy, o nichž se předpokládá, že jsou zodpovědné za jeho biologickou aktivitu<sup>12</sup>. Alloxan je nestabilní ve vodném prostředí o pH vyšším než 3,5, kdy se spontánně rozkládá na kyselinu alloxanovou. Richardson a Cannan (cit.<sup>13</sup>) pomocí potenciometrických metod zjistili poločas rozpadu alloxanu okolo 1 min při pH 7,4 a teplotě 30 °C. Tato nestabilita stojí za možnými problémy při vývoji metod pro jeho stanovení.

Jedna z prvních analytických prací se týkala stanovení alloxanu pomocí fluorimetrie v plazmě psi i lidské, stejně tak jako v moči při jeho koncentraci pod 20 µg/100 ml (cit.<sup>14</sup>). V roce 1994 Mrozikiewicz a spol.<sup>15</sup> publikovali předběžnou studii dokumentující zvýšené hladiny alloxanu v krvi u některých dětských pacientů s diabetem I. typu, na základě čehož usuzovali, že může existovat souvislost mezi zvýšenou hladinou alloxanu v organismu a mechanismem rozvoje inzulín-dependentního diabetu také u člověka. Ve své práci spektrofotometricky stanovili koncentrace alloxanu v krvi u zdravých jedinců kolem 2,20 µg ml<sup>-1</sup>, což je všeobecně považováno za hodnotu nedostatečnou pro indukci morfologických změn pankreatu u člověka. Oproti tomu u dětských pacientů s diabetem I. typu byly v některých případech koncentrace alloxanu v krvi až na úrovni 30–40 µg ml<sup>-1</sup>, což dle autorů odpovídá koncentraci alloxanu v krvi u zvířat s experimentálně vyvolaným diabetem, a mohlo by být možnou příčinou morfologických změn pankreatu také u člověka.

Přestože se jednalo o mimořádně zajímavé výsledky s dalekosáhlým potenciálním významem pro studium etiologie diabetu, studie zabývající se stanovením alloxanu pomocí moderních analytických metod se objevují až v posledních letech. Murthy a spol.<sup>16</sup> v roce 2019 použili diferenční pulzní voltametrii pro stanovení alloxanu za použití elektrody modifikované uhlíkovými nanotrubičkami. Papoušek a spol.<sup>17</sup> vyvinuli GC-MS metodu pro stanovení alloxanu a jeho rozkladných produktů. Jako nejzajímavější se nicméně jeví práce z roku 2017, ve které Giaccone a spol.<sup>18</sup> popisují vývoj HPLC-MS metody pro stanovení alloxanu v mouce za použití derivatizace pomocí 1,2-fenylendiaminu. V této práci se podařilo prokázat alloxan ve 24 % analyzovaných vzorků bělené mouky, což je v souladu s hypotézou, že alloxan vzniká při bělení mouky a dostává se tak prostřednictvím potravy do lidského organismu. Vznik alloxanu je připisován účinkům oxidačních činidel, jako jsou oxidy dusíku, chlor nebo oxid

chloričitý na xanthofyly přítomné v mouce<sup>18–20</sup>.

Jak již bylo popsáno, alloxan je velmi polární molekula, proto může být jeho stanovení pomocí klasických chromatografických technik poměrně obtížné. Navíc se v tomto případě může projevat i jeho hydrolyza na alloxanovou kyselinu. Proto bylo našim cílem vyvinout metodu na stanovení alloxanu pomocí kapilární elektroforézy, která je ideálním řešením právě pro analýzu velmi polárních látek. Navíc kvůli nutnosti stanovit alloxan v reálných vzorcích bylo využito spojení kapilární elektroforézy s tandemovou hmotnostní spektrometrií (CE-MS).

## Experimentální část

### Chemikálie

Složky základního elektrolytu (octová kyselina, mravenčí kyselina, kyselina boritá a amoniak), složky promývacích roztoků (methanol, hydroxid sodný), deionizovaná voda a standardy (alloxan, močová kyselina) byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) v čistotě p.a. vyjma methanolu a vody, které byly v čistotě LC-MS.

### Aparatura

Měření bylo prováděno na přístroji pro kapilární elektroforézu Agilent 7100 s hmotnostním spektrometrem Agilent 6460 (Agilent Technologies, Waldbronn, Německo) s trojitým kvadrupólovým analyzátozem a ionizací pomocí elektrospreje. V případě přímého nástřiku do hmotnostního spektrometru byla využita stříkačková mikropumpa New Era Pump System (Farmingdale, NY, USA) pro dopravu vzorku do elektrospreje. Průtok byl nastaven na hodnotu  $3 \mu\text{l min}^{-1}$ . Software MassHunter, verze B.06.00, byl použit pro ovládání přístroje i sběr signálu.

Pro měření byla použita nepokrytá křemenná kapilára s vnitřním průměrem  $50 \mu\text{m}$  a celkovou délkou  $90 \text{ cm}$ . Každý den byla kapilára kondicionována promytím  $0,1 \text{ M NaOH}$  (10 min) a deionizovanou vodou (10 min). Před každým měřením byla kapilára promývána deionizovanou

vodou (2 min) a základním elektrolytem (3 min). Kapilára byla termostátována na teplotu  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ . Základní elektrolyty byly připraveny rozpuštěním vypočteného množství kyseliny v deionizované vodě a pH roztoku bylo upraveno titrací amoniakem. Vzorek byl dávkován 5 s tlakem 100 mbar.

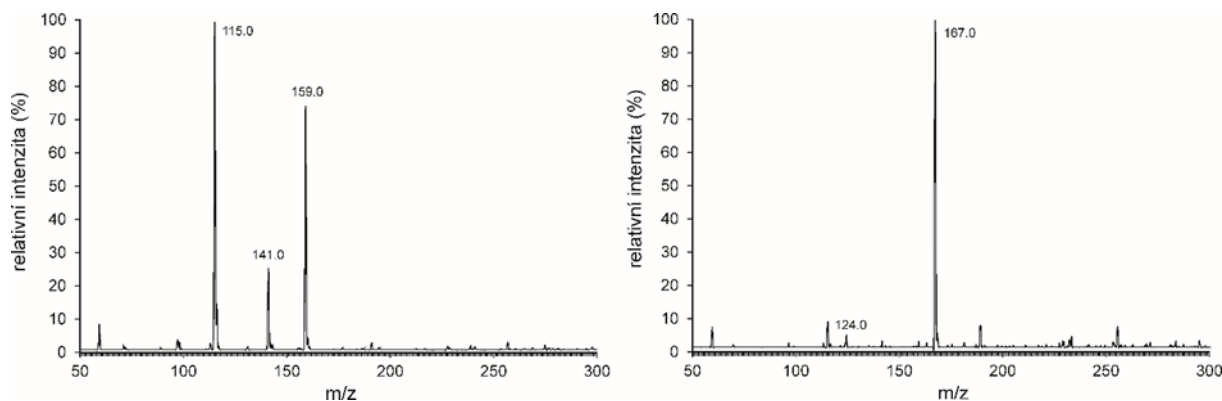
### Analýza mouky

Na analýzu mouky bylo vybráno celkem pět druhů mouky. Mouka z Věrovan a Babiččina volba, obě polohrubé, byly zakoupeny v lokálním supermarketu. Dále byly testovány tři druhy bělené mouky, Pillsbury Best, Gold Medal a Spartan, které byly zakoupeny v běžném supermarketu v USA. K naváženému vzorku mouky (1 g) byl přidán interní standard (močová kyselina, 1 mg), případně alloxan (v případě metody standardního přídatku). Vzorky mouky byly extrahovány v deionizované vodě (10 ml) po dobu 10 min v ultrazvukové lázni, případně kyselým výluhem pomocí  $0,001 \text{ M HCl}$ . Po dekantaci byl supernatant odebrán, přefiltrován přes stříkačkový filtr ( $0,45 \mu\text{m}$  PTFE, Membrane Solutions, zakoupeno od firmy Labicom, Olomouc, ČR) a dávkován přímo do CE-MS.

## Výsledky a diskuse

Jak vyplývá ze struktury, alloxan má kyselý charakter, a proto se bude v zásaditém prostředí chovat jako anion. Pro pilotní charakterizaci migrace alloxanu byl vybrán  $50 \text{ mM}$  borát o pH od 8,0 do 9,0 za použití spektrofotometrické detekce při  $200 \text{ nm}$ . Ve všech prostředích bylo možné alloxan detegovat s efektivní mobilitou  $-31 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . V další části již byla pozornost věnována vývoji metody na stanovení alloxanu pomocí spojení kapilární elektroforézy s tandemovou hmotnostní spektrometrií za použití ionizace elektrosprejem. Jako interní standard byla vybrána močová kyselina díky své strukturální podobnosti.

Nejprve byla studována hmotnostní spektra (MS spektra) alloxanu a močové kyseliny, kdy bylo použito přímého dávkování každé z látek o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4}$



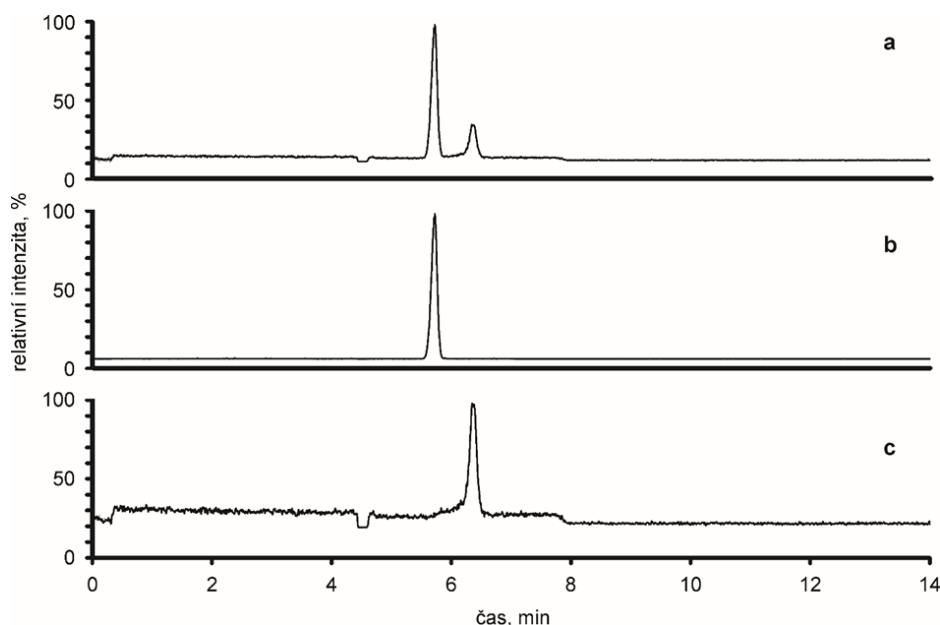
Obr. 2. MS spektra alloxanu (vlevo) a močové kyseliny (vpravo)

mol l<sup>-1</sup> do hmotnostního spektrometru pomocí lineární pumpy (průtok 10 μl min<sup>-1</sup>). Byly optimalizovány podmínky ionizace, aby bylo dosaženo co nejvyšší odezvy detektoru. Jako optimální podmínky byly zvoleny: sprejovací napětí -4 kV, tlak nebulizačního plynu 15 psi (103 421 Pa), průtok nebulizačního plynu 10 l min<sup>-1</sup>, teplota nebulizačního plynu 200 °C, napětí na fragmentoru 135 V (pro močovou kyselinu), 80 V (pro alloxan). V MS spektru močové kyseliny je patrný molekulový ion [M-H]<sup>-</sup> o *m/z* 167 (obr. 2). Naopak v MS spektru alloxanu (obr. 2) je kromě molekulového iontu [M-H]<sup>-</sup> o *m/z* 141 patrný ještě ion o *m/z* 159 a 115, což odpovídá alloxanové kyselině („adukt alloxanu s vodou“) [M-H+H<sub>2</sub>O]<sup>-</sup> a její dekarboxylované formě [M-H+H<sub>2</sub>O-CO<sub>2</sub>]<sup>-</sup> ( $\Delta m/z$  44 představuje logickou ztrátu CO<sub>2</sub>).

Detekce alloxanové kyseliny je poměrně překvapivá, přestože hydrolyza alloxanu je v literatuře popsána jako relativně rychlý proces. Nicméně zároveň je v literatuře popsáno, že alloxanová kyselina na rozdíl od alloxanu nevyvolává „experimentální diabetes“. Díky těmto skutečnostem byl proveden experiment, kdy byl smíchán alloxan s vodou a do 20 sekund byla sledován MS spektra a jejich vývoj v čase. Již na prvních MS spektrech bylo patrné zastoupení jak iontu alloxanu o *m/z* 141, tak iontů alloxanové kyseliny o *m/z* 159 a 115. Neméně zajímavé bylo, že toto zastoupení se nezměnilo ani za 48 hodin stání vzorku. Ionty o daných *m/z* byly detegovány i v případě, že byl pevný alloxan (tetrahydrát) rozpuštěn v methanolu nebo ethanolu. Tato skutečnost nás vedla k hypotéze, že buď je rovnováha mezi alloxanem a alloxanovou kyselinou (dle některých autorů hydrolyza) natolik rychlá, že ji není mož-

né postřehnout touto metodou, nebo se jedná o proces, ke kterému dochází přímo v iontovém zdroji. Tyto hypotézy jsou nyní ověřovány. Nicméně získané informace jsou dostatečné pro návrh přechodů pro monitorování reakcí (SRM) v tandemové hmotnostní spektrometrii. Pro stanovení močové kyseliny byl zvolen přechod *m/z* 167 → *m/z* 124 dle literatury<sup>21</sup>. Pro alloxan byl zvolen přechod *m/z* 159 → *m/z* 115, který poskytuje nejvyšší intenzity.

Dále byly optimalizovány podmínky CE-MS analýzy. Nejprve bylo optimalizováno složení pufru a jeho pH i s ohledem na nutnost použití těkavých pufrů v případě spojení CE-MS. Byly testovány pufrы 50 mM acetát amonný, 50 mM formiát amonný a 50 mM borát amonný, všechny v rozmezí pH 8,0–10,0. Hmotnostní spektrometr byl nastaven stejně jako v případě přímého dávkování analytu (viz výše). Jako pomocná kapalina byla využita směs vody a methanolu 1:1 (v/v) o průtoku 10 μl min<sup>-1</sup>. V případě borátového pufru byla pozorována menší účinnost ionizace díky přítomnosti netěkavého borátu. Jako optimální pufr byl vybrán 50 mM acetát amonný o pH 9,5, který poskytoval rychlou analýzu s nejvyšší odezvou alloxanu. Dále byl studován vliv složení pomocné kapaliny a její průtok. Byly testovány směsi voda – methanol 10:1, 1:1 a 1:10 (v/v) a jako nejlepší byla vybrána směs 1:1 (v/v), protože poskytovala nejvyšší odezvu. Nejvyšší signál alloxanu byl pozorován při průtoku této kapaliny 10 μl min<sup>-1</sup>. Při těchto podmínkách byly optimalizovány podmínky MS, zejména sprejovací napětí (optimum -4 kV), teplota nebulizačního plynu (optimum 200 °C) a napětí na fragmentoru (optimum 135 V pro močovou kyselinu a 80 V pro alloxan). Takto optimalizovaná metoda pak byla použita pro analý-



Obr. 3. CE-MS analýza alloxanu a močové kyseliny; a) Separace při monitorování celkového iontového proudu („TIC“), b) Separace při monitorování přechodu *m/z* 167 → *m/z* 124 („SRM“) odpovídající močové kyselině, c) Separace při monitorování přechodu *m/z* 159 → *m/z* 115 odpovídající alloxanu

zu CE-MS alloxanu v módu monitorování reakcí (viz obr. 3).

Z obr. 3 je patrné, že vyvinutá metoda umožňuje stanovit alloxan přímo bez nutnosti derivatizace do cca 8 min. Tato metoda byla pak využita pro analýzu vzorků mouky. Mez detekce alloxanu byla určena  $9,6 \mu\text{g g}^{-1}$  mouky. V žádném z výluhů mouky nebyl touto metodou alloxan detegován.

## Závěr

Byla vyvinuta rychlá metoda na stanovení alloxanu pomocí CE-MS bez nutnosti derivatizace. Touto metodou bylo analyzováno 5 vzorků mouky včetně bělené mouky. V žádném z těchto vzorků nebyl alloxan detegován. Nicméně vyvinutá metoda je obecně využitelná jak pro kontrolu kvality potravin, tak pro analýzu biologických vzorků.

*Tato práce vznikla za podpory projektu FN Ostrava (MZ ČR – RVO – FNOs/2015).*

## LITERATURA

- Dunn J. S., Sheehan H. L., McLetchie N. G. B.: *Lancet* 244, 484 (1943).
- Walde S. S., Dohle C., Schott-Ohly P., Gleichmann H.: *Life Sci.* 71, 1681 (2002).
- Lenzen S.: *Diabetologia* 51, 216 (2008).
- Dunn J. S., McLetchie N. G. B.: *Lancet* 245, 384 (1943).
- Szkudelski T.: *Physiol. Res.* 50, 536 (2001).
- Goldner M. G., Gomori G.: *Endocrinology* 35, 241 (1944).
- Rohilla A., Shahjad A.: *Int. J. Res. Pharm. Biomed. Sci.* 3, 819 (2012).
- Lenzen S., Panten U.: *Diabetologia* 31, 337 (1988).
- Eizirik D. L., Pipeleers D. G., Ling Z., Welsh N., Hellerstrom C., Andersson A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 9253 (1994).
- Lenzen S.: *Diabetologia* 51, 216 (2008).
- Tyrberg B., Andersson A., Borg L. A. H.: *Gen. Compar. Endocrinol.* 122, 238 (2001).
- Bolton W.: *Acta Crystallogr.* 17, 147 (1964).
- Richardson G. M., Cannan R. K.: *J. Biochem.* 23, 68 (1929).
- Archibald R. M.: *J. Biol. Chem.* 158, 347 (1945).
- Mrozikiewicz A., Kielczewska-Mrozikiewicz D., Lowicki Z., Chmara E., Korzeniowska K., Mrozikiewicz P. M.: *Acta Diabetol.* 31, 236 (1994).
- Murthy A. P., Duraimurugan K., Sridhar J., Madhavan J.: *Electrochim. Acta* 317, 182 (2019).
- Papoušek R., Borovcová L., Táborský J., Skopalová J., Barták P.: *Advances in Chromatography and Electrophoresis & Chiranal 2016*. Book of Abstracts, (Maier V., ed.), str. 133–134. Olomouc, June 6–9, 2016.
- Giaccone V., Cammilleri G., Di Stefano V., Pitzonzo R., Vella A., Pulvirenti A., Lo Dico G. M., Ferrantelli V., Macaluso A.: *J. Cereal. Sci.* 77, 120 (2017).
- Fukayama M. Y., Tan H., Wheeler W. B., Wei C. I.: *Environ. Health Perspect.* 69, 267 (1986).
- Raghavamenon A., Dupard-Julien C. L., Kandlakunta B., Uppu R. M.: *Toxicol. Mech. Methods* 19, 498 (2009).
- Kim K. M., Henderson G. N., Ouyang X., Frye R. F., Sautin Y. Y., Feig D. I., Johnson R. J.: *J. Chromatogr. B* 877, 2032 (2009).

**J. Horská<sup>a</sup>, A. Obšivačová<sup>b</sup>, K. Vítková<sup>c</sup>, J. Jurčíková<sup>c</sup>, V. Procházka<sup>c,d</sup>, and J. Petr<sup>b</sup>**  
*(<sup>a</sup>Department of Physics, Chemistry and Vocational Education, Masaryk University, Brno; <sup>b</sup>Department of Analytical Chemistry, Palacky University, Olomouc; <sup>c</sup>University Hospital Ostrava, Czech Republic; <sup>d</sup>University of Ostrava, Faculty of Medicine, Ostrava, Czech Republic):* **Determination of Alloxan in Flour by Capillary Electrophoresis with Tandem Mass Spectrometry**

We have developed a fast and efficient method for the determination of alloxan in flour samples by capillary electrophoresis with tandem mass spectrometry without derivatization step. Mass spectra of alloxan were studied in detail providing characteristic signals at  $m/z$  159, 141 and 115. The separation lasted 8 min under the optimum conditions using 50 mM ammonium acetate pH 9.5 as the background electrolyte and uric acid as the internal standard. Five flour samples including bleached flour from the USA were analyzed and alloxan was not detected in any of these samples.

**Keywords:** alloxan, diabetes, mass spectrometry, capillary electrophoresis

### Acknowledgements

*This work was supported by the project FN Ostrava (MH CZ - DRO - FNOs/2015).*