

ANALÝZA NUKLEOTIDOV V BIOLOGICKOM MATERIÁLI

TIBOR BÉRES^a a PETR TARKOWSKI^{a,b}

^a Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum, Centrální laboratoře a podpora výzkumu, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci, Šlechtitelů 27, 783 71 Olomouc, ^b Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum, Oddělení genetických zdrojů zelenin, léčivých rostlin a speciálních plodin, Výzkumný ústav rostlinné výroby, v. v. i., Šlechtitelů 29, 783 71 Olomouc
tiber.beres@upol.cz

Došlo 22.9.15, přijaté 26.11.15.

Rukopis byl zařazen k tisku v rámci placené služby urychleného publikování .

Klíčové slová: nukleotidy, extrakcia pevnou fázou, kvapalinová chromatografia, hmotnostná spektrometria, kapilárna elektroforéza

Obsah

1. Úvod
2. Příprava vzoriek
3. Koncová analýza
 - 3.1. Nepriame stanovenie nukleotidov
 - 3.2. Stanovenie intaktných nukleotidov
 - 3.2.1. Chromatografické metódy
 - 3.2.2. Elektromigračné metódy
4. Záver

1. Úvod

Purínové a pyrimidínové nukleotidy sú základnými stavebnými kameňmi nukleových kyselín. Replikácia genómu a transkripcia genetickej informácie do RNA však nie je zďaleka ich jediným poslaním v organizmoch. Význam jednotlivých nukleotidov je kľúčový pri fundamentálnych procesoch, akými sú energetický metabolizmus (ATP, GTP), syntéza glykogénu v živočíšnych bunkách či tvorba rastlinnej bunkovej steny (UDP-glukóza). Cyklické nukleotidy (cAMP, cGMP) sú súčasťou signálnych dráh na vnútrobunkovej aj medzibunkovej úrovni¹. Okrem endogénnych nukleotidov si pozornosť nepochybne zaslúžia analógy nukleobáz, nukleozidov a nukleotidov slúžiace v liečbe nádorových a vírusových chorôb. Mechanizmus účinku je častokrát založený na ich interakcii s enzýmovým aparátom zapojeným do biosyntézy endogénnych pyrimidínových a purínových nukleotidov². Tieto analógy sú podávané vo forme proliečiv a po vstupe do

bunky konvertované (fosforylované) na aktívnu formu – nukleotidy. Zvláštnou skupinou, ktorá premostňuje živočíšnu a rastlinnú ríšu, sú cytokinínové nukleotidy, ktoré sú vo vyšších rastlinách prekurzormi aktívnych hormónov so širokým spektrom fyziologických účinkov. Zároveň sa vyznačujú výraznou cytotoxickou aktivitou voči niektorým ľudským nádorovým líniam³.

Hladiny endogénnych nukleotidov sú ovplyvnené interakciou metabolitov analógov s enzýmami zapojenými do ich biosyntézy a metabolizmu. V ideálnom prípade by analytická metóda mala byť schopná poskytnúť informácie súčasne o koncentráciách oboch skupín. Pochopiteľne, najviac metodických prác venovaných analýze nukleotidov pochádza z oblasti medicíny. Koncentrácie endogénnych nukleotidov, ako aj ich analógov sa stanovujú v biologickom materiáli rozmanitého pôvodu. Zo živočíšnych (ľudských) buniek a tkanív je to najmä celková krv, erytrocyty, periférne krvné mononukleárne bunky, mozgovomiešny mok alebo kultivované bunky². Analýza nukleotidov v rastlinných pletivách je menej častá. Medzi najčastejšie študované modely patrí arábkovka thalova (*Arabidopsis thaliana* L.)^{4,5} či ryža siata (*Oryza sativa* L.)⁶. Cytokinínové nukleotidy boli v 70. rokoch 20. storočia identifikované v suspenzných bunkových kultúrach tabaku virgínskeho (*Nicotiana tabacum* L.), javora horského (*Acer pseudoplatanus* L.)⁷ a v kultúre žaburinky menšej (*Lemna minor* L.)⁸. V roku 2006 boli cytokinínové nukleotidy stanovené v kokosovom mlieku, ktoré predstavuje tekutý endosperm plodov kokosovníka obyčajného (*Cocos nucifera* L.)⁹. V literatúre nájdeme aj práce venované analýze nukleotidov v mikroorganizmoch, konkrétne v baktériách *Escherichia coli*^{10,11} a *Paracoccus denitrificans*¹² či v plesni *Penicillium simplicissimum*¹³.

Analýza nukleotidov je dôležitá najmä v klinickej praxi. Farmakologicky významné štruktúrne analógy sú cieleňé na enzýmy zapojené do biosyntézy a metabolizmu endogénnych nukleotidov. Používajú sa v liečbe onkologických a vírusových ochorení². Ďalšími významnými aplikáciami sú screening dedičných metabolických porúch¹⁴ a tiež sledovanie energetického statusu buniek, či už natívnych alebo kultivovaných *in vitro*. Z metodického pohľadu vyžaduje analýza nukleotidov prípravu vzorku, ktorá zahŕňa izoláciu a purifikáciu, a v neposlednom rade, dostatočne citlivú a selektívnu koncovú analytickú metódu na ich identifikáciu a kvantifikáciu. Autori tohoto referátu si kladú za cieľ predostrieť škálu metód používaných pri analýze nukleotidov a priblížiť čitateľom jej jednotlivé kroky.

2. Príprava vzoriek

Prvým krokom prípravy vzoriek je extrakcia nukleotidov z buniek (živočíšnych, rastlinných alebo bakteriál-

nych), prípadne tkaniva (či pletiva v prípade rastlinného materiálu). Vhodne zvolené extrakčné činidlo rozpustí analyty a zároveň zastavuje enzýmovú aktivitu, ktorá by mohla (zvlášť v prípade nukleotidov náchylných na hydrolyzu fosfátových skupín) viesť k izolácii artefaktov a tým skresliť pomer jednotlivých mono-, di- a trifosfátov¹⁵. Napriek výbornej rozpustnosti nukleotidov vo vode, niektorí autori používajú na ich extrakciu organické rozpúšťadlá ako metanol, acetonitril príp. ich vodné roztoky, niekedy aj okyslené kyselinou mravčou^{10,16}. Medzi výhody použitia organických rozpúšťadiel patrí rozrušenie bunkových membrán (vodné roztoky organických rozpúšťadiel sú hypotonické), efektívna denaturácia proteínov, a tiež možnosť jednoduchšej prekoncentrácie analytov odparením¹⁷. Otázna je extrakčná účinnosť s ohľadom na nízku rozpustnosť nukleotidov (obzvlášť di- a trifosfátov) v organických rozpúšťadlách. Vodné roztoky kyselín chloristej a trichlóroctovej sú hojne využívané pri extrakcii nukleotidov z buniek či tkanív rôzneho pôvodu. Návratnosť nukleotidov je vysoká najmä vďaka schopnosti uvedených kyselín deproteinovať vzorky a rozpustiť polárne a iónové zlúčeniny. Problémom ostáva prítomnosť kyselín vo vzorkách; môžu interferovať pri následnej LC-UV príp. LC-MS analýze. Z tohoto dôvodu (a tiež z dôvodu zamedzenia prípadnej kyslej hydrolyzy fosfátových skupín nukleotidov) je potrebné kyseliny chloristú, či trichlóroctovú odstrániť pred koncovou analýzou. Prídavok zásady (najčastejšie KOH, K₂HPO₄ príp. K₂CO₃) do vzoriek s kyselinou chloristou, spôsobí vyzrážanie chloristanu a zároveň neutralizuje roztok^{18,19}. Kyselina trichlóroctová sa dá vytrepať do etyléru alebo *tert*-butylmetyleteru extrakciou kvapalina-kvapalina^{14,20}. Voľba vhodného extrakčného činidla je kľúčová z pohľadu návratnosti analytov a do veľkej miery závisí od matrice. V publikáciách býva často jej optimalizácii venovaná samostatná kapitola^{10,21}. Extrakcia pevnou fázou (solid phase extraction; SPE) je dnes už zavedenou purifikačnou metódou. Uplatnenie nachádza najmä pri analýze látok v biologickom materiáli, ktorý predstavuje zložitú maticu. Cieľom SPE je koncentrovať analyty vo vzorkách a súčasne odstrániť látky, ktoré by mohli interferovať s koncovou analýzou¹⁵. Táto metóda nie je síce pre analýzu nukleotidov úplne typická, napriek tomu však môžeme nájsť niekoľko prác, v ktorých bola úspešne aplikovaná. SPE s kyanopropylou pevnou fázou bola použitá na zachytenie zvyškov kyseliny trichlóroctovej po extrakcii kvapalina-kvapalina. Keďže nukleotidy sa na túto fázu neviažu, ostali vo frakcii, ktorá kolónkou pretečie (tzv. flow-through)²⁰. Grafitová pevná fáza bola využitá pri purifikácii extraktov z listov arábkovky thalovej (*Arabidopsis thaliana* L.)⁵. UDP-glukóza a ďalšie cukorné konjugáty uridíndifosfátu boli týmto spôsobom izolované s vysokou návratnosťou 80 až 90 %. Na princípe aniónovej výmeny bolo založené čistenie extraktov z buniek ľudského folikulárneho lymfómu²³. Návratnosť endogénneho cytidinrifosfátu (CTP), deoxycytidinrifosfátu (dCTP) a trifosforylovaného metabolitu cytarabínu (cytotoxický analóg deoxycytidínu) sa pohybovala v rozpätí 60 až

75 %. Pri stanovení endogénnych nukleotidov v mozgovomiešnom moku je potrebné kvôli nízkej hladine nukleotidov minimalizovať ich degradáciu, zároveň je ale nutné vzorky dokonale deproteinovať pred HPLC analýzou²⁴. Prijateľným riešením sa ukázala byť SPE s polymérnym sorbentom. Negatívne nabité nukleotidy sú zachytené hydrofóbnymi interakciami vďaka použitiu ión-párového činidla – etanolamínu. Celková návratnosť analytov bola 86,7 % a viac. Zaujímavým prístupom on-line čistenia a prekoncentrácie je afinitná chromatografia s imobilizovanými iónmi kovov²⁵. Tá bola prvým krokom dvojrozszernej HPLC separácie. Po adsorpcii nukleotidov na sorbent obsahujúci železité ióny (Fe³⁺) bola pomocou vodného roztoku čpavku docielená ich elúcia a nasledovala separácia v druhom rozmere. Táto prebiehala na princípe iónpárovej chromatografie, ktorá je ale nevýhodná z pohľadu životnosti kolóny a kontaminácie iónového zdroja. Uvedená metodická práca je pilotná, a preto neprekvapuje, že analýze boli podrobené len štandardné roztoky nukleotidov a aplikácia na biologický materiál nie je jej súčasťou. Po extrakcii a dostatočnej purifikácii vzoriek, podstupujú nukleotidy koncovú analýzu, počas ktorej sú identifikované a kvantifikované.

3. Koncová analýza

Z dôvodu podobnosti fyzikálno-chemických vlastností nukleotidov sa pred ich detekciou používajú separačné metódy, ktoré môžeme rozdeliť na chromatografické a elektromigračné. V ideálnom prípade majú jednotlivé nukleotidy špecifický retenčný prípadne migračný čas a nedochádza ani k ich interferencii s látkami obsiahnutými v matici. Separatívne metódy tak uľahčujú identifikáciu a kvantifikáciu nukleotidov. Aj napriek širokému spektru dostupných separačných metód je analýza nukleotidov pomerne náročná. Kľúčovým problémom je prítomnosť jednej, či viacerých fosfátových skupín v molekule nukleotidu. Kyselina fosforečná je stredne silná trojsýtna anorganická kyselina a hodnota jej prvej disociačnej konštanty pK_{a1} je 2,16. Znamená to, že nukleotid nesie záporný náboj už pri relatívne nízkych hodnotách pH. Ten sa ešte zintenzívni v neutrálnej oblasti, keďže hodnota druhej disociačnej konštanty kyseliny fosforečnej je pK_{a2} = 7,21. Celkový negatívny náboj sa znásobuje v prípade di- resp. trifosforylovaných nukleotidov a spôsobuje nielen zníženie potrebnej retencie pri chromatografickej separácii na kolóne s reverznou fázou, ale aj zvýšenie nežiadúcich interakcií s kovovými súčasťami LC-MS systému. K tým patria ventily, dávkovacie ihly, kovové kapiláry, vrátane kapiláry, ktorou vstupujú analyty do iónového zdroja MS detektora, a tiež samotná chromatografická kolóna²⁶.

Väzba analytov na kovové ióny, prípadne silanolové skupiny sa netýka výhradne nukleotidov, ale fosforylovaných zlúčenín všeobecne. Prejavuje sa zníženou citlivosťou detekcie a zhoršenou účinnosťou separácie (rozšírením chromatografických pík). Keďže uvedený problém je známy už niekoľko rokov a analýza fosforylovaných zlúčenín nestráca na dôležitosť, analytici vyvíjajú stratégie,

ako neželané interakcie obmedziť. Prvým spôsobom je deaktivácia chromatografického systému kyselinou fosforečnou²⁷. Druhým spôsobom je prídanie komplexotvorného činidla (chelátoru) do vzoriek^{28–30}. Treťou možnosťou, ako minimalizovať adsorpciu fosforylovaných zlúčenín, je použitie zásaditej mobilnej fázy^{28,31,32}. Čo sa týka obmedzenia interakcie fosfátových skupín so silanolovými skupinami, pokrytie dimetyldichlór-silánom sa ukázalo byť čiastočne účinným³³.

Systematickým skúmaním a podrobným rozborom jednotlivých častí LC-MS systému boli identifikovaní hlavní pôvodcovia tzv. chvostovania pík²⁶. Vďaka veľkému povrchu sú nimi predovšetkým telo kolóny a frity uzatvárajúce stacionárnu fázu v kolóne. Keďže uvedené súčasti sú kvôli cenovej dostupnosti a mechanickej odolnosti vyrábané prevažne z nerezovej ocele, v tejto štúdii boli nahradené sklom (bola ním vystlaná dutina oceľovej kolóny) a polyetylénom (frity). Zmeny v použitých materiáloch viedli k značnému zlepšeniu separácie z pohľadu účinnosti a symetrie chromatografických pík ako aj citlivosti detekcie. Pomer signál/šum sa zvýšil 90- (zámena oceľovej frity za polyetylénovú) až 170-násobne (zámena oceľového tela kolóny za oceľ vystlanú sklom) v prípade flavín adenoín dinukleotidu (FAD). Táto práca je originálna v prístupe k problému. Snaží sa v prvom rade o odstránenie jeho príčiny a nie len o zmiernenie dôsledkov. Ostáva veriť, že navrhnuté riešenie bude úspešne prenesené do praxe a analytici sa dočkajú komerčne dostupnej kolóny vhodnej na separáciu nukleotidov (ale tiež oligonukleotidov, fosfopeptidov, fosfolipidov, fosforylovaných cukrov atď.) bez príspevku sekundárnych interakcií.

3.1. Nepriame stanovenie nukleotidov

Jedna z možností, ako sa problému nabitých fosfátových skupín vyhnúť, vedie cestou enzymatickej alebo chemickej hydrolyzy. Týmto spôsobom je nukleotid konvertovaný na nukleozid prípadne až na nukleobázu. S enzymatickou konverziou sa môžeme stretnúť pri analýze rastlinných hormónov – cytokinínov, ktoré tvoria N6 substituované puríny³⁴. Jednou z frakcií pri ich analýze sú práve mono-, di- a trifosforylované cytokinínové nukleotidy. Inkubácia nukleotidovej frakcie s alkalickou fosfatázou speje ku vzniku cytokinínových ribozidov. Výhodou tohto prístupu je nenáročná separácia jednotlivých ribozidov na reverznej fáze. Vďaka svojej hydrofobicite sú ribozidy eluované ďaleko za intaktnými nukleotidmi, čím sa jednak znižuje šanca na ich vzájomnú koelúciu a interferenciu s matricou, zároveň sa zvyšuje citlivosť MS detekcie, keďže so zvyšujúcim sa obsahom organickej fázy v eluáte pri gradientovej elúcii rastie odozva hmotnostného spektrometra s ionizáciou elektrosprejom³⁵. Nevýhodou tohto prístupu ale ostáva nedostatočná informácia o hladine jednotlivých mono-, di- a trifosforylovaných cytokinínových nukleotidov. O niečo presnejší je prístup zavedený v analýze intracelulárnych metabolitov antiretrovirových ribavirinu, zidovudínu, lamovudínu a stavudínu^{36–38}. HPLC analýze predchádza frakcionácia nukleotidov po-

mocou aniónovo výmennej SPE a k defosforylácii oddelených mono-, di- a trifosforylovaných metabolitov dochádza v príslušných frakciách. Podrobnosti analýzy metabolitov inhibitorov reverznej transkriptázy nájdeme v súhrnnom článku³⁹. Neenzymatická kyslá hydrolyza v prostredí kyseliny chloristej za zvýšenej teploty a prídavku ditiotritolu, ktorý bráni oxidácii tiolových skupín, je jedným z krokov prípravy vzoriek na analýzu tiopurínových nukleotidov v erytrocytoch a v celkovej krvi⁴⁰. Sú to metabolity známeho cytostatika 6-merkaptopurínu. Výstupom z tejto analýzy je ale opäť len informácia o sume nukleotidov, nie však o jednotlivých mono-, di- či trifosfátoch.

3.2. Stanovenie intaktných nukleotidov

3.2.1. Chromatografické metódy

Stanovenie intaktných nukleotidov poskytuje informáciu o počte fosfátových skupín, je však sprevádzané komplikáciami. Chromatografia na reverznej fáze je najrozšírenejšou technikou v oblasti kvapalinovej chromatografie⁴¹. Nukleotidy sú ale príliš polárne a nemajú dostatočnú retenciu. Zároveň je efektívnosť ionizácie elektrosprejom výrazne nižšia v porovnaní s účinnosťou ionizácie ribozidov a nukleobáz, čo ústi do nižšej citlivosti detekcie^{42,43}. Derivatizácia anhydridmi kyselín propiónovej a benzoovej vedie k vzniku príslušných esterov cytokinínových nukleotidov a tiež ATP, ADP a AMP. Tento prístup prináša nielen zvýšenie retencie, ale aj zníženie detekčného limitu⁴. Na druhej strane, esterifikácia prebieha v nevodnom prostredí a tým pádom je návratnosť nukleotidov s ohľadom na ich rozpustnosť otázná. Zmierniť záporný náboj fosfátov je možné pridaním iónpárového činidla do mobilnej fázy. Horváth a spol. vysvetľujú retenciu iónového páru ako kombináciu troch javov: 1. Iónové páry vznikajú interakciou iónu a opačne nabitého protiiónu, ktorý je viazaný na stacionárnu fázu; 2. K formovaniu iónového páru dochádza v mobilnej fáze; 3. Interakcia iónového páru so stacionárnou fázou⁴⁴. V prípade nukleotidov sa ako iónpárové činidlá uplatňujú alkylamíny. Kvarterné amóniové soli sú použiteľné v prípade UV detekcie; MS detekcia však vyžaduje prchavé iónpárové činidlá. Veľkou nevýhodou tohoto typu chromatografie je postupná degradácia chromatografickej kolóny. Kvartérna amóniová soľ bola použitá napr. pri analýze endogénnych nukleotidov v kultivovanej plesni *Penicillium simplicissimum*¹³ a MS kompatibilné prchavé alkylamíny v prípade metabolomickej analýzy extraktov baktérie *Escherichia coli*⁴⁵. Po určitom počte analýz dochádza k posunu retenčných časov analytov a strate separačnej účinnosti. Pri stanovení fosforylovaných metabolitov gemcitabínu v ľudských mononukleárných bunkách sa uvádza, že počet analýz, ktorý je možné za daných podmienok (mobilná fáza, stacionárna fáza) dosiahnuť bez straty reprodukovateľnosti, je približne 300 (cit.⁴⁶). Iónpárové činidlá sú navyše známe tým, že znižujú účinnosť ionizácie a kontaminujú iónový zdroj hmotnostného spektrometra¹⁷. Porovnanie dosiahnutých detekčných limitov dvoch metód využívajúcich iónpárovú chromatografiu, líšiacich sa detekciou (tandemová MS⁴⁵

resp. UV detekcia⁴⁶), vyznieva v prospech tandemovej MS, rozdiel je približne 7- (ADP) až 18-násobný (ATP).

Ďalšou technikou vhodnou na separáciu nukleotidov je iónovo- (konkrétne aniónovo-) výmenná chromatografia. Podstatou separácie sú rôzne silné elektrostatické interakcie medzi opačne nabitými iónmi stacionárnej fázy a analytov. Prítomnosť neprchavých solí v mobilných fázach bránila spojeniu MS detekcie s iónovo výmennou chromatografiou, ktorá má v analýze nukleotidov dlhú tradíciu¹⁷. Do oblasti LC-MS analýzy nukleotidov bol tento prístup zavedený stanovením metabolitov cytotoxického analógu deoxycitidínu⁴⁷. Kompletná separácia mono-, di- a trifosforylovaného metabolitu bola uskutočnená za menej ako 2 minúty. Ďalším pozitívom tejto metódy, ktoré stojí za zmienku, je fakt, že v porovnaní s iónpárovou chromatografiou je plne MS kompatibilná. Do mobilných fáz bola pridaná prchavá soľ (octan amónny) a elúcia bola docielená gradientom pH. Podobný prístup bol zvolený pri analýze metabolitov cytostatík gemcitabínu resp. cladribínu v ľudských periférnych krvných mononukleárných bunkách resp. v línii odvodenej z buniek psieho obličkového epitelu^{48,49}. V najnovšej práci ohľadom separácie endogénnych nukleotidov na aniónovo výmennej kolóne sa udáva hodnota pomeru signálu k šumu 700 pre koncentráciu 25 ng ml⁻¹ (49 nM) pre ATP (cit.⁵⁰). Maximálna citlivosť pre ATP nebola cieľom publikácie, keďže tento kľúčový energetický metabolit je abundančný, napriek tomu však môžeme konštatovať výrazne citlivejšiu detekciu ako v prípade iónpárovej separácie, kde sa ako limit detekcie pre ATP uvádza koncentrácia 58,9 nM (cit.⁴⁵).

Porózna grafitová kolóna bola v posledných rokoch niekoľkokrát úspešne použitá na separáciu nukleotidov. Pilotnou, v LC-MS analýze nukleotidov, je metóda na separáciu šesťnástich nukleozidov a nukleotidov v MS kompatibilných podmienkach⁴³. Keďže ide o priekopnícku prácu, je z veľkej časti zameraná na optimalizáciu podmienok separácie a analýzu reálnych vzoriek v nej nenájdeme. Separácia nukleotidov na grafitovej kolóne bola použitá aj pri stanovení monofosforylovaného metabolitu cytotatika cytarabínu⁵¹ a rozšírená pre potreby monitorovania trifosforylovaného metabolitu²³. Energetický status kultivovaných buniek hepatocelulárneho karcinómu (Hep G2) bol hodnotený po stanovení pomeru hladín ATP, ADP a AMP. Tieto boli separované na grafitovej kolóne, v alkalickom puffri, za obdobných podmienok, aké sa používajú pri chromatografii na reverznej fáze⁵². Dosiahnutá citlivosť tandemovej MS detekcie (LOD pre ATP 150 nM; pre ADP 180 nM a pre AMP 66 nM) je porovnateľná s metódou, ktorá na separáciu využíva iónpárovú chromatografiu⁴⁵. Chromatografia na poréznej grafitovej kolóne sa javí byť atraktívnu alternatívou analýzy nukleotidov z niekoľkých dôvodov. Vďaka chemickej odolnosti tejto stacionárnej fázy, poskytuje grafitová kolóna veľký priestor k optimalizácii mobilných fáz v celom rozsahu hodnôt pH (0–14). Nespornou výhodou je aj možnosť retencie nabitých nukleotidov bez použitia iónpárových činidiel⁵³. Na druhej strane, retenčný mechanizmus je komplexný, zahŕňa je π - π interakcie a disperzné sily, a dodnes nie je cel-

kom objasnený^{54,55}. Podstatou hydrofilnej interakčnej kvapalinovej chromatografie (hydrophilic interaction liquid chromatography; HILIC) je rozdeľovanie analytu medzi vodu čiastočne viazanú na stacionárnu fázu a prevažne organickú mobilnú fázu⁵⁶. Je vhodná na separáciu polárnych látok, vrátane nukleotidov. Aplikácie HILIC chromatografie v spojení s MS detekciou sa v súvislosti s nukleotidmi objavujú najmä pri štúdiu rastlinného a mikrobiálneho metabolómu^{11,57–59}, ale v literatúre nájdeme aj metódu na stanovenie intracelulárnych metabolitov antivirotika 2-C-metyl cytidínu v pečenej tkanive potkanov⁶⁰. Markantný rozdiel v citlivosti tandemovej MS detekcie ATP, ADP a AMP medzi analýzou v kyslom a v zásaditom prostredí je popísaný v práci z oblasti mikrobiálnej metabolomiky⁵⁹. Autor na základe uvedeného konštatuje tendenciu fosforylovaných zlúčenín k negatívnej ionizácii (deprotonizácii), ktorá je ešte podporená alkalickým pH. Medzi výhody HILIC chromatografie patrí nesporné MS kompatibilita, ale hlavne ortogonalita k chromatografii na reverznej fáze pri zrovnateľnej selektivitě. O obľúbenosti HILIC medzi analytickými chemikmi svedčí aj stúpajúci počet publikácií⁶¹.

3.2.2. Elektromigračné metódy

Nabité molekuly migrujú v jednosmernom elektrickom poli k opačne nabitým elektródam. Uvedený jav sa nazýva elektroforéza a spolu s elektroosmózou (pohyb molekúl vody v kremennej alebo sklenenej kapiláre k záporne nabitým elektródam po vložení napätia) tvoria hybnú silu elektromigračných separačných metód. Záporný náboj nukleotidov je pri chromatografickej separácii často vnímaný ako problém. Pri separácii elektromigračnými metódami je naopak žiadaný, keďže k oddeleniu analytov dochádza na základe rozdielnej elektroforetickej pohyblivosti, vyplývajúcej z rôznych pomerov veľkosti a náboja iónu⁶². Usporiadanie elektroforézy môže byť plošné alebo kapilárne. Oproti plošnému usporiadaniu, ktoré je vhodné najmä na rozdelenie makromolekúl (vrátane DNA a RNA), k separácii kapilárnu elektroforézou dochádza v tenkej kremennej kapiláre naplnenej základným elektrolytom. Výhodou elektroforézy v tomto usporiadaní je lepší odvod tepla a tým pádom je možné vložiť vyššie separačné napätie, čo vedie k vyššej separačnej účinnosti a kratšej analýze⁶². Konkrétna technika kapilárnej elektroforézy najčastejšie využívaná v analýze nukleotidov je kapilárna zónová elektroforéza (capillary zone electrophoresis; CZE). Pokiaľ je v základnom elektrolyte prítomný detergent, hovoríme o micelárnej elektrokinetickej chromatografii (micellar electrokinetic chromatography; MEKC). Táto technika bola pôvodne vyvinutá na separáciu nenabitých molekúl, no niekedy je úspešne použitá aj pri separácii nukleotidov s cieľom dosiahnuť vyššiu účinnosť separácie príp. zvýšiť selektivitu voči nukleotidom vzhľadom na prítomnosť interferentov z matrice¹⁴. Typickým detektorom v kapilárnej elektroforéze je UV detektor, príp. detektor s diódovým poľom. Jeho citlivosť je dostačujúca napr. na analýzu endogénnych nukleotidov a ich prípadných intermediátov v ľudských erytrocytoch¹⁴. Autori tejto metódy využili

katiónový detergent CTAB (cetyltrimetylammonium bromid) a obrátili smer elektroosmotického toku. Výsledkom bola nielen vysoká účinnosť separácie umožňujúca analýzu 21 nukleotidov a deoxynukleotidov, ale aj minimálny vplyv matrice. Metóda bola aplikovaná na odhaľovanie vrodenných dedičných metabolických porúch. Hladiny endogénnych adenínových nukleotidov a koenzýmov v rôznych fázach dýchacieho reťazca boli stanovené v gramnegatívnych pôdných baktériách *Paracoccus denitrificans*¹². Na rozdiel od predchádzajúcej práce, autori na zlepšenie rozlíšenia jednotlivých nukleotidov použili β -cyklodextrín – cyklický sacharid, ktorý na základe rôznej silnej interakcie s analytmi s podobným pomerom veľkosti a náboja udeľuje rôzne elektroforetické pohyblivosti. Spojenie kapilárnej elektroforézy s hmotnostnou spektrometriou je experimentálne náročné a v súčasnej dobe len zriedkavo využívané na rutinnú analýzu nukleotidov. Výnimkou je práca z oblasti rastlinnej metabolomiky⁶. 88 primárnych metabolitov bolo rozdelených podľa fyzikálno-chemických vlastností do štyroch skupín. Nukleotidy boli stanovené v extraktoch z listov ryže siatej v skupine spolu s koenzýmami. Rozpätie detekčných limitov uvádzané pre túto skupinu látok je 0,4 až 6,7 μM a v porovnaní s chromatografickými metódami spojenými s MS detekciou je citlivosť o niečo nižšia^{45,50,52,59}. Z dôvodu abundancie endogénnych nukleotidov v organizmoch to ale nepredstavuje problém. Táto práca má v súčasnosti vyše 160 citácií a mohla by snáď (spolu s úspešnými prácami z iných oblastí využívajúcich CE-MS analýzu) motivovať konštruktívnych iónových zdrojov hmotnostných spektrometrov k novým technickým riešeniam umožňujúcim robustné a užívateľsky prívetivé spojenie CE s hmotnostnou detekciou. Medzi výhody, ktoré prináša kapilárna elektroforéza, je minimálna spotreba vzoriek, pufrów a vysoká účinnosť separácie⁹. Výber vhodnej separačnej techniky musí zohľadniť typ vzoriek, počet a koncentrácie stanovovaných nukleotidov.

4. Záver

Množstvo publikácií venovaných analýze nukleotidov v rôznych odvetviach biologických vied naprieč rastlinnou, živočíšnou a mikrobiálnou ríšou podčiarkuje ich význam v procesoch prebiehajúcich v organizmoch. Metodické práce, zamerané na fundamentálne aspekty analýzy, rovnako ako aplikačné, tvoria dôležitý nástroj v rukách lekárov, analytických chemikov a biológov. Prítomnosť negatívne nabitých fosfátových skupín v molekule nukleotidov do značnej miery sťažuje ich stanovenie kvapalinovou chromatografiou s MS detekciou. Za najvýznamnejší progres v tejto oblasti za uplynulých niekoľko dekád môžeme považovať trend smerujúci k stanoveniu intaktných nukleotidov (bez predchošej derivatizácie či štiepenia fosfátových skupín) v plne MS kompatibilných podmienkach. Za túto možnosť vďačíme dostupnosti chromatografických kolón (najmä aniónovo výmennej, poróznej grafitovej a HILIC) vhodných na separáciu nukleotidov.

Táto práca vznikla za podpory projektu č. LO1204 Udržitelný rozvoj výzkumu Centrum regionu Haná z Národného programu udržitelnosti I, MŠMT.

LITERATÚRA

1. Berg J. M., Tymoczko J. L., Stryer L.: *Biochemistry*. W. H. Freeman, New York 2002.
2. Cohen S., Jordheim L.P., Megherbi M., Dumontet C., Guittou J.: *J. Chromatogr. B* 878, 1912 (2010).
3. Voller J., Zatloukal M., Lenobel R., Doležal K., Béres T., Kryštof V., Spíchal L., Niemann P., Džubák P., Hajduch M., Strnad M.: *Phytochemistry* 71, 1350 (2010).
4. Nordström A., Tarkowski P., Tarkowska D., Doležal K., Åstot C., Sandberg G., Moritz T.: *Anal. Chem.* 76, 2869 (2004).
5. Behmüller R., Forstenlehner I. C., Tenhaken R., Huber C. G.: *Anal. Bioanal. Chem.* 406, 3229 (2014).
6. Sato S., Soga T., Nishioka T., Tomita M.: *Plant J.* 40, 151 (2004).
7. Laloue M., Terrine C., Gawer M.: *FEBS Lett.* 46, 45 (1974).
8. Bezemer-Sybrandy S. M., Veldstra H.: *Physiol. Plant.* 24, 1 (1971).
9. Ge L. Y., Yong J. W. H., Tan S. N., Yang X. H., Ong E. S.: *J. Chromatogr. A* 1133, 322 (2006).
10. Kimball E., Rabinowitz J. D.: *Anal. Biochem.* 358, 273 (2006).
11. Bajad S. U., Lu W. Y., Kimball E. H., Yuan J., Peterson C., Rabinowitz J. D.: *J. Chromatogr. A* 1125, 76 (2006).
12. Musilová J., Sedláček V., Kučera I., Glatz Z.: *J. Sep. Sci.* 32, 2416 (2009).
13. Ganzera M., Vrabl P., Wörle E., Burgstaller W., Stuppler H.: *Anal. Biochem.* 359, 132 (2006).
14. Friedecký D., Tomková J., Maier V., Janošťáková A., Procházka M., Adam T.: *Electrophoresis* 28, 373 (2007).
15. Tarkowski P., Doležal K., Strnad M.: *Chem. Listy* 98, 834 (2004).
16. Cordell R. L., Hill S. J., Ortori C. A., Barrett D. A.: *J. Chromatogr. B* 871, 115 (2008).
17. Jansen R. S., Rosing H., Schellens J. H. M., Beijnen J. H.: *Mass Spectrom. Rev.* 30, 321 (2011).
18. Cichna M., Raab A., Daxecker H., Griesmacher A., Müller M. M., Markl R.: *J. Chromatogr. B* 787, 381 (2003).
19. Coolen E. J. C. M., Arts I. C. W., Swennen E. L. R., Bast A., Cohen Stuart M. A., Dagnelie P. C.: *J. Chromatogr. B* 864, 43 (2008).
20. Yeung P., Ding L., Casley W. L.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 47, 377 (2008).
21. Hoyerová K., Gaudinová A., Malbeck J., Dobrev P. I., Kocábek T., Šolcová B., Trávníčková A., Kamínek M.: *Phytochemistry* 67, 1151 (2006).
22. Klawitter J., Schmitz V., Klawitter J., Leibfritz D., Christians U.: *Anal. Biochem.* 365, 230 (2007).

23. Crauste C., Lefebvre I., Hovaneissian M., Puy J. Y., Roy B., Peyrottes S., Cohen S., Guitton J., Dumontet C., Périgaud C.: *J. Chromatogr. B* 877, 1417 (2009).
24. Czarnecka J., Cieślak M., Komoszyński M.: *J. Chromatogr. B* 822, 85 (2005).
25. Tuytten R., Lemiére F., Van Dongen W., Slegers H., Newton R. P., Esmans E. L.: *J. Chromatogr. B* 809, 189 (2004).
26. Sakamaki H., Uchida T., Lim L. W., Takeuchi T.: *J. Chromatogr. A* 1381, 125 (2015).
27. Wakamatsu A., Morimoto K., Shimizu M., Kudoh S.: *J. Sep. Sci.* 28, 1823 (2005).
28. Asakawa Y., Tokida N., Ozawa C., Ishiba M., Tagaya O., Asakawa N.: *J. Chromatogr. A* 1198, 80 (2008).
29. Winter D., Seidler J., Ziv Y., Shiloh Y., Lehmann W. D.: *J. Proteome Res.* 8, 418 (2009).
30. Siegel D., Permentier H., Bischoff R.: *J. Chromatogr. A* 1294, 87 (2013).
31. Tuytten R., Lemiére F., Witters E., Van Dongen W., Slegers H., Newton R. P., Van Onckelen H., Esmans E. L.: *J. Chromatogr. A* 1104, 209 (2006).
32. Béres T., Zatloukal M., Voller J., Niemann P., Gahsche M. C., Tarkowski P., Novák O., Hanuš J., Strnad M., Doležal K.: *Anal. Bioanal. Chem.* 398, 2071 (2010).
33. De Vijlder T., Boschmans J., Witters E., Lemiére F.: *Int. J. Mass Spectrom.* 304, 83 (2011).
34. Novák O., Tarkowski P., Tarkowská D., Doležal K., Lenobel R., Strnad M.: *Anal. Chim. Acta* 480, 207 (2003).
35. Cech N. B., Enke C. G.: *Mass Spectrom. Rev.* 20, 362 (2001).
36. Solas C., Li Y. F., Xie M. Y., Sommadossi J. P., Zhou X. J.: *Antimicrob. Agents Chemother.* 42, 2989 (1998).
37. Moore J. D., Valette G., Darque A., Zhou X. J., Sommadossi J. P.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 11, 1134 (2000).
38. Meléndez M., Rosario O., Zayas B., Rodríguez J. F.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 49, 1233 (2009).
39. Lai J. P., Wang J., Cai Z. W.: *J. Chromatogr. B* 868, 1 (2008).
40. Dervieux T., Bouliou R.: *Clin. Chem.* 44, 551 (1998).
41. Sýkora D., Tesařová E., Vosmanská M., Zvolánková M.: *Chem. Listy* 101, 190 (2007).
42. Novák O., Hauserová E., Amaraková P., Doležal K., Strnad M.: *Phytochemistry* 69, 2214 (2008).
43. Xing J. S., Apedo A., Tymiak A., Zhao N.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 18, 1599 (2004).
44. Horvath C., Melander W., Molnar I., Molnar P.: *Anal. Chem.* 49, 2295 (1977).
45. Luo B., Groenke K., Takors R., Wandrey C., Oldiges M.: *J. Chromatogr. A* 1147, 153 (2007).
46. Losa R., Sierra M. I., Gión M. O., Esteban E., Buesa J. M.: *J. Chromatogr. B* 840, 44 (2006).
47. Shi G., Wu J.T., Li Y., Geleziunas R., Gallagher K., Emm T., Olah T., Unger S.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 16, 1092 (2002).
48. Veltkamp S. A., Hillebrand M. J. X., Rosing H., Jansen R. S., Wickremsinhe E. R., Perkins E. J., Schellens J. H. M., Beijnen J. H.: *J. Mass Spectrom.* 41, 1633 (2006).
49. Jansen R. S., Rosing H., de Wolf C. J. F., Beijnen J. H.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 21, 4049 (2007).
50. Thomas D., Herold N., Keppler O. T., Geisslinger G., Ferreiros N.: *Anal. Bioanal. Chem.* 407, 3693 (2015).
51. Gouy M. H., Fabre H., Blanchin M. D., Peyrottes S., Périgaud C., Lefebvre I.: *Anal. Chim. Acta* 566, 178 (2006).
52. Wang J., Lin T., Lai J. P., Cai Z. W., Yang M. S.: *J. Chromatogr. B* 877, 2019 (2009).
53. Jansen R. S., Rosing H., Schellens J. H. M., Beijnen J. H.: *J. Chromatogr. A* 1216, 3168 (2009).
54. Hanai T.: *J. Chromatogr. A* 989, 183 (2003).
55. West C., Elfakir C., Lafosse M.: *J. Chromatogr. A* 1217, 3201 (2010).
56. Nováková L., Havlíková L., Vlčková H.: *TrAC, Trends Anal. Chem.* 63, 55 (2014).
57. Tolstikov V. V., Fiehn O.: *Anal. Biochem.* 301, 298 (2002).
58. van der Werf M. J., Overkamp K. M., Muilwijk B., Coulter L., Hankemeier T.: *Anal. Biochem.* 370, 17 (2007).
59. Teleki A., Sánchez-Kopper A., Takors R.: *Anal. Biochem.* 475, 4 (2015).
60. Pucci V., Giuliano C., Zhang R. A., Koeplinger K. A., Leone J. F., Monteagudo E., Bonelli F.: *J. Sep. Sci.* 32, 1275 (2009).
61. Buszewski B., Noga S.: *Anal. Bioanal. Chem.* 402, 231 (2012).
62. Baker D. R.: *Capillary electrophoresis*. J. Wiley, New York 1995.

T. Béres^a and P. Tarkowski^{a,b} (^aCentre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, Central Laboratories and Research Support, Faculty of Science, Palacký University, Olomouc, ^bCentre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, Department of Genetic Resources for Vegetables, Medicinal and Special Plants, Crop Research Institute, Olomouc): **Analysis of Nucleotides in Biological Material**

Nucleotides are essential constituents of all living organisms. Monitoring of their levels could provide valuable information about the energy status of native and/or cultivated cells. Moreover, the enzymes involved in nucleotide metabolism are often the targets of antiviral, anticancer and immunosuppressive drugs. This review brings an overview of methods used for analysis of endogenous nucleotides and their synthetic analogs in biological material of various origin. Advantages, disadvantages as well as the principles of the respective methods are briefly discussed.