

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Analytická chemie



Martina Černá

STANOVENÍ ADENOSINTRIFOSFÁTU
A ADENOSINDIFOSFÁTU V REÁLNÝCH VZORCÍCH

Determination of adenosine triphosphate and adenosine diphosphate
in the real samples

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: prof. RNDr. Pavel Coufal, Ph.D.

Praha 2013

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

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

V Praze dne 13. května 2013

Martina Černá

Abstrakt

Úkolem tohoto diplomového projektu bylo nalézt vhodné podmínky pro stanovení dvou běžných nukleotidů adenosindifosfátu a adenosintrifosfátu pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie a provést jejich analýzu v reálných vzorcích citrusových plodů a extraktů z rostlin. Dalším cílem bylo zjistit limity detekce a stanovení obou nukleotidů při těchto optimalizovaných podmínkách měření a pomocí těchto limitů porovnat citlivost používaných detektorů.

K zjištění zkoumaných nukleotidů byly využity instrumentace HPLC-UV, kapilární HPLC-DAD a HPLC-MS. Pomocí HPLC s UV detekcí a kapilární HPLC s detektorem diodového pole byly proměřeny kalibrační závislosti směsi analytů a určeny limity detekce a stanovení adenosindifosfátu a adenosintrifosfátu. K rozdělení analytů až na základní linii pomocí HPLC-UV a kapilární HPLC-DAD došlo za podmínek iontově párové chromatografie. Vhodnou kolonou byla kolona C₁₈. Mobilní fáze obsahovala fosfátový pufr, acetonitril a tetrabutylamonium bisulfát jako iontově párové činidlo. Dělení probíhalo při gradientové eluci. U LC-MS byly zjišťovány podmínky analýzy ADP a ATP. Při vysokoúčinné kapalinové chromatografii s hmotnostní detekcí bylo dosaženo rozdělení analytů na koloně C₁₈, fenyl-hexylové koloně a koloně Zic HILIC. Mobilní fáze protékající kolonou C₁₈ obsahovala 99:1 (v/v) acetonitril/mravenčan amonný o pH = 6,7. Vhodnou mobilní fází k fenyl-hexylové koloně byl 95:5 (v/v) acetonitril/mravenčan amonný (pH = 6,7). Kolonou Zic HILIC protékala směs 70:30 (v/v) acetonitril/octan amonný o pH = 5,35.

Nalezli jsme podmínky HPLC, při kterých lze analyzovat ADP a ATP v reálných vzorcích. Dále jsme posoudili citlivost jednotlivých detektorů a srovnali ji s literaturou. Pomocí optimalizované metody se zjistilo, že nalezené LOD a LOQ jsou srovnatelné nebo nepatrně vyšší než uvádí literatura, zabývající se velmi podobnými metodami pro stanovení ADP a ATP. Citlivost UV detektoru a detektoru diodového pole dosahují podobných hodnot, zatímco citlivost hmotnostního spektrometru se jeví ve srovnání s nimi jako vyšší.

Abstract

The aim of the diploma thesis was to find optimal conditions of high pressure liquid chromatography for the detection and quantification of two common nucleotides, namely adenosine diphosphate and adenosine triphosphate, as well as to perform an analysis of these in real life samples of citrus fruits and plant extracts. Further aim of the project was to

determine the limits of detection and quantification of adenosine diphosphate and adenosine triphosphate under the optimized conditions and using these to compare the sensitivity of given detectors.

To achieve this HPLC-UV, capillary HPLC-DAD and HPLC-MS apparatus were used. With the help of HPLC with UV detection and capillary HPLC with diode array detector, the calibration curves of the mixture of analytes were measured and the limits of detection as well as quantification of adenosine diphosphate and adenosine triphosphate were determined. Separation of the analytes up to the base line using HPLC-UV and capillary HPLC-DAD was achieved under the conditions of ion pairing chromatography. Column C₁₈ was chosen as an appropriate column. The mobile phase included phosphate buffer, acetonitrile and tetrabutylammonium bisulphate as an ion pairing reagent. The separation was performed with gradient elution. Conditions for analysis using LC-MS were determined. Using high pressure liquid chromatography with mass spectrometry, separation of analytes was achieved using column C₁₈, phenyl-hexyl column and Zic HILIC column. The mobile phase flowing through column C₁₈ included 99:1 (v/v) acetonitrile/ammonium formate with pH of 6.7. An appropriate mobile phase for the phenyl-hexyl column was acetonitrile 95:5 (v/v) acetonitrile/ammonium formate (pH 6.7). Flowing through the Zic HILIC column was a 70:30 (v/v) mixture of acetonitrile/ammonium acetate with pH of 5.35.

We were able to determine conditions of the HPLC for ADP and ATP analysis in real life samples. The sensitivity amongst given detectors was compared and correlated to those published in literature. The LOD and LOQ of analytes found are comparable, in some cases slightly higher than stated in literature on similar methods of detection of ADP and ATP. The sensitivity of mass spectrometer seems to be higher than that of the UV detector and the diode array detector. The last two reach similar sensitivity values.

Práce na tomto projektu byla finančně podporována výzkumným záměrem MSM 0021620857 ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky.

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli prof. RNDr. Pavlu Coufalovi, Ph.D. za odborné a trpělivé vedení a poskytnuté rady. Dále bych ráda poděkovala své rodině a blízkým za podporu, a to především mámě a Martinovi.

Předmětová hesla: analytická chemie, separační metody

Klíčová slova: vysokoučinná kapalinová chromatografie, detekce v ultrafialové oblasti, detektor diodového pole, hmotnostní spektrometrie, nukleotidy

Subject words: analytical chemistry, separation methods

Key words: high pressure liquid chromatography, detection in the ultraviolet area, diod array detector, mass spectrometry, nucleotides

Obsah

Seznam zkratek.....	9
<u>1. Teorie</u>.....	10
1.1 Analyty	10
1.1.1 Vlastnosti.....	10
1.1.2 Vznik a spotřeba adenosindifosfátu a adenosintrifosfátu.....	12
1.2 Vysokoučinná kapalinová chromatografie	14
1.2.1 Úvod.....	14
1.2.2 Kolony.....	16
1.2.3 Detektory.....	19
1.2.3.1 Spektrofotometrické detektory.....	20
1.2.3.2 Jiné detektory pro HPLC.....	21
1.3 Kapilární vysokoučinná kapalinová chromatografie	22
1.4 Iontově párová chromatografie	23
1.5 Hmotnostní spektrometrie	25
1.5.1 Úvod.....	25
1.5.2 Instrumentace hmotnostního spektrometru.....	27
1.5.3 LC-MS.....	30
1.6 Stanovení adenosindifosfátu a adenosintrifosfátu metodami HPLC	30
1.7 Stanovení ADP a ATP jinými technikami než HPLC	32
1.8 Kvantifikace	32
<u>2. Cíl práce</u>.....	33
<u>3. Experimentální část</u>.....	33
3.1 Vzorčky a chemikálie	33
3.2 Extrakce z rostlin	34
3.3 Přístroje	35
3.4 Optimální podmínky analýzy	35
3.5 Příprava mobilní fáze s iontově párovým činidlem	36

<u>4. Výsledky a diskuze</u>	37
4.1 UV spektra ADP a ATP	37
4.2 Vysokoučinná kapalinová chromatografie s UV detektorem	38
4.2.1 Analýza adenosindifosfátu a adenosintrifosfátu pomocí metody HPLC-UV..	38
4.2.2 Limit detekce a limit stanovení ADP a ATP metodou HPLC-UV.....	42
4.3 Kapilární HPLC s detektorem diodového pole	44
4.3.1 Analýza ADP a ATP metodou kapilární HPLC-DAD.....	44
4.3.2 Limit detekce a stanovení analytů pomocí kapilární HPLC-DAD.....	47
4.4 Porovnání výsledků získaných metodami HPLC-UV a kapilární HPLC-DAD včetně srovnání s literaturou	48
4.5 Reálné vzorky	50
4.5.1 Citrusové plody.....	51
4.5.2 Extrakty z rostlin.....	52
4.6 Hmotnostní spektrometrie	60
4.6.1. Přímý nástřik do MS.....	61
4.6.2 LC-MS.....	63
4.6.2.1 Kolona C ₁₈	63
4.6.2.2 Fenyl-hexyl kolona.....	67
4.6.2.3 Zic HILIC kolona.....	70
<u>5. Závěr</u>	72
<u>6. Literatura</u>	73

Seznam zkratek

AMP	adenosinmonofosfát
ADP	adenosindifosfát
APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku
atm	atmosféra, jednotka tlaku (1 atm = 101 325 Pa)
ATP	adenosintrifosfát
C ₁₈	oktadecylová stacionární fáze
C ₈	oktylová stacionární fáze
DAD	detektor diodového pole
ESI	elektrosprej
GC	plynová chromatografie
HILIC	hydrofilní interakce
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
LC	kapalinová chromatografie
LC-MS	kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní detekcí
LOD	limit detekce
LOQ	limit stanovení
m/z	poměr molekulové hmotnosti a nábojového čísla
Mr	relativní molekulová hmotnost
MS	hmotnostní spektrometrie
NP	chromatografie s normálními fázemi
pK _A	logaritmický tvar disociační konstanty
RP	chromatografie s obrácenými fázemi
TBAS	tetrabutylamonium bisulfát, tetrabutylamonium hydrogensíran
TiO ₂	oxid titaničitý
UV (detektor)	ultrafialová oblast (detektor pracující v ultrafialové oblasti)

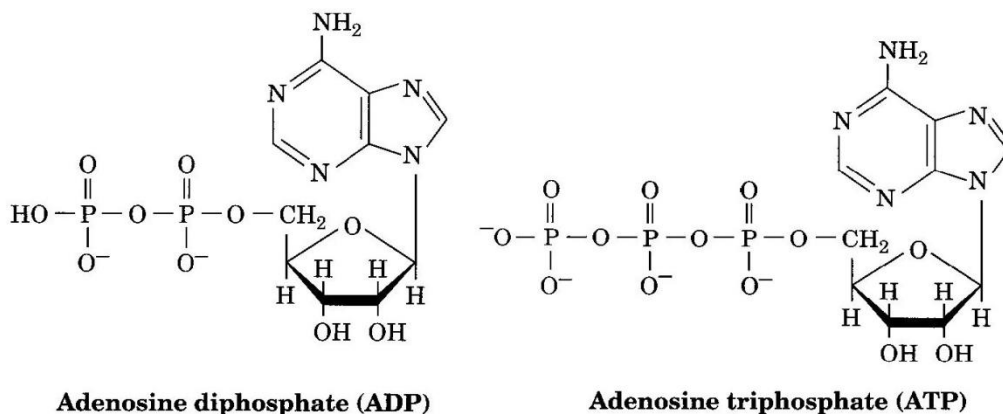
1. Teorie

1.1 Analyty

1.1.1 Vlastnosti

Adenosindifosfát (ADP) a adenosintrifosfát (ATP) jsou nukleotidy (tj. fosforečné estery nukleosidů, anhydridy kyseliny fosforečné neboli adenosinfosfáty) [1]. ADP a ATP jsou sloučeniny, které obsahují heterocyklickou bázi, cukr a dvě až tři fosfátové skupiny [2,3]. Jejich struktura je uvedena na **obrázku 1**. Nukleotidy a jejich deriváty jsou všudypřítomné biologické látky, které se účastní většiny biochemických procesů [4]. ATP je činidlo v metabolismu nepostradatelné, protože obsahuje fosforečnanovou anhydridovou vazbu, která je zdrojem chemické energie [1,3,5]. Kromě energie poskytují adenosinové nukleotidy i fosfáty a substráty pro různé biochemické procesy [4,5,6,7]. ATP se reakcí v buňce účastní jako komplex ATP-Mg^{2+} [3,6]. Při kvantitativních analýzách musíme počítat s komplexy kovů, protože fosfátové sloučeniny váží dvojnásobné a jednonásobné kationty [5].

Vysokoenergetické fosfáty jsou vzhledem k přítomnosti několika fosfátových skupin velmi polární [8]. Nukleotidy mají kyselé vlastnosti [5]. ATP je relativně stálá sloučenina, ale při pH nižším než 3 je nestabilní. ATP obsahuje čtyři vodíky, které mohou disociovat. ADP a ATP se vyskytují v různých ionizačních formách a mohou podstupovat vícenásobnou ionizaci. Mnohonásobné ionizace ztěžují určení rovnovážné konstanty pro hydrolyzu ATP. Při teplotě 25 °C je logaritmický tvar disociační konstanty (pK_A) pro ADP 6,44 a pro ATP 6,53 [10]. Vzhledem k nízkému pK_A mají nukleotidy také nízký izoelektrický bod [11]. Adenosindifosfát má relativní molekulovou hmotnost 427 a adenosintrifosfát 507. Průměrná koncentrace ATP v buňkách je asi $1 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ [5,6]. V savčích buňkách se jedná o nejvíce zastoupený nukleotid. Konjugované dvojnásobné vazby heterocyklických bází purinů a pyrimidinů



Obrázek 1 Struktura analytů (převzato z [4]).

jsou příčinou toho, že nukleotidy absorbují ultrafialové světlo. K identifikaci nukleotidů se využívá toho, že jejich spektra jsou závislá na pH. Při pH 7 absorbují všechny běžné nukleotidy světlo o vlnové délce 260 nm.

ATP je zahrnut v buněčném energetickém metabolismu [3,10,12]. Tento nukleotid přenáší energii mezi reakcemi a funguje tedy jako energetické oběživo [6,8]. Další funkcí je skladování energie v organismech [5]. Uvolnění energie se děje při hydrolýze fosforečnanové vazby [3,4].



ATP slouží více jako okamžitý donor volné energie v biologických systémech než jako dlouhodobá úschova energie [3,5]. ATP je obvykle spotřebováno do 1 minuty od svého vzniku [3]. Adenosin a jeho metabolity tedy reprezentují energetický stav živých buněk [2,3]. Energetický stav buněk je vyjádřen energetickým nábojem, který je definován následovně [12,13]:

$$[\text{c}(\text{ATP}) + \frac{1}{2} \text{c}(\text{ADP})] / [\text{c}(\text{ATP}) + \text{c}(\text{ADP}) + \text{c}(\text{AMP})] \quad (3)$$

Jde o lineární míru množství metabolické energie, uložené v adeninových nukleotidech a odráží rovnováhu buněčné energie [12]. Energetický náboj je v rozmezí 0 (vše ve formě AMP) do 1 (vše ve formě ATP) [3]. Důležitou roli hraje i v metabolické regulaci.

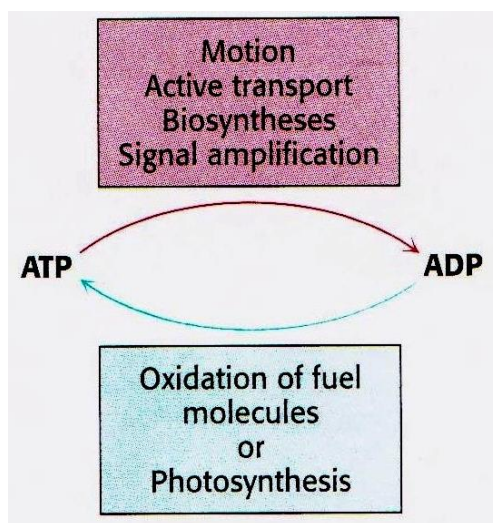
Hodnocení hladiny vysokoenergetických fosfátů je významným nástrojem k zjištění biochemického mechanismu buněčného zranění [8]. Stanovování nukleotidů v buňkách může poskytnout cenné informace pro pochopení účinku různých mechanismů v organismech a pro vývoj léčiv [9]. Fosforylované adenosiny jsou stavební kameny DNA a RNA [4,6,10]. Nukleotidy fungují také jako koenzymy v biochemických reakcích a jako prekurzory v RNA syntézách [14,15,16]. ATP také umožňuje průběh řady nevýhodných reakcí [6]. Nukleotidy se vyskytují jak ve zvířecích buňkách, tak v rostlinných tkáních [17]. Lidské tělo získává ATP z jídla přes citrátový cyklus [3]. Stanovování adenosinfosfátů v jídle a tkáních je velmi významné pro zjištění energetického stavu buňky [15,18,19].

1.1.2 Vznik a spotřeba adenosindifosfátu a adenosintrifosfátu

Metabolismus se dělí na katabolismus a anabolismus [4,6]. Katabolismus neboli degradace znamená, že živiny a buněčné složky se rozkládají za vzniku energie. ADP zachycuje podstatnou část volné energie při katabolických procesech ve formě vysokoenergetického fosfátu. V katabolických dějích předává vznikající ATP svoji energii procesům, které ji ve svém průběhu spotřebovávají. Při anabolismu neboli biosyntéze se naopak za spotřeby energie biomolekuly skládají z jednodušších složek. Energie, která je nutná pro anabolismus, je získávána v katabolickém procesu ve formě ATP. Tyto anabolické a katabolické procesy jsou propojeny pomocí zprostředkování univerzální energetické „měny“ ATP [4,11]. Cyklus ADP/ATP je základním mechanismem energetické výměny v biologickém systému a propojuje procesy, při kterých fosfát vzniká, s procesy, které naopak fosfát spotřebovávají (**obrázek 2**) [3,6]. Tato průběžná spotřeba a regenerace ATP se děje velmi rychle, a proto organismy vystačí s malou zásobou ATP/ADP. Ve většině buněk se vyskytuje enzym adenylkinasa, který katalyzuje vzájemnou přeměnu mezi ATP, AMP a ADP.



Průměrný dospělý člověk vážící 70 kg spotřebuje asi 65 kg ATP denně [5]. To představuje téměř celou jeho váhu. Naštěstí máme pro tyto nukleotidy velmi efektivní recyklační systém pro tyto nukleotidy. Energie uvolněná z jídla je přechodně uložena ve formě ATP. Při spotřebě energie z ATP se uvolňuje ADP a fosfát a naše tělo tyto látky poté recykluje zpět do ATP. Obvykle člověk vážící 70 kg má tedy v těle asi 50 gramů ATP/ADP. Nicméně každá molekula ATP v našem těle musí být recyklována asi 1300krát za den.



Obrázek 2 Cyklus ADP/ATP (převzato z [3]).

Produkce a využívání ADP a ATP souvisí s několika metabolickými pochody. Ke vzniku ATP dochází při fotosyntéze, oxidativní fosforylaci, v respiračním řetězci, citrátovém cyklu či glykolýze [4,6]. Naopak spotřeba ATP, při které se uvolňuje energie hydrolýzou, se děje při oxidaci mastných kyselin, glukoneogenezi a kontrakci svalů [3,4]. Mechanismy, které spotřebovávají ATP, mohou probíhat jen při kontinuální dodávce ATP z ADP.

Oxidativní fosforylace je kvantitativně nejvýznamnější zdroj fosfátů v aerobních organismech [6]. Tento proces probíhá v mitochondriích a jeho hlavní funkcí je produkce ATP z ADP. Rychlost fosforylace je řízena hladinou ADP a nutnou podmínkou je dostatek kyslíku. Tento proces je energeticky nevýhodný, a proto musí být poháněn [5]. Za převážnou část tvorby ATP je odpovědný respirační řetězec [3,6]. Rychlost mitochondriální respirace je regulována koncentrací ADP. Oxidace a fosforylace jsou těsně spřaženy, to znamená, že oxidace nemůže v respiračním řetězci bez fosforylace ADP probíhat. Volná energie, která není zachycena ve formě fosfátové jednotky, je uvolněna ve formě tepla. Toto teplo zajišťuje, že celý respirační systém je exergonický a vzdálený od rovnováhy a tedy je umožněn jednosměrný průběh a produkce ATP. U teplokrevných zvířat přispívá také k udržení jejich tělesné teploty. Při fotosyntéze dochází ke vzniku ATP z ADP a Pi. Při citrátovém cyklu vzniká 12 molekul ATP na každou otáčku cyklu. Při glykolýze vznikají dva fosfáty z jedné molekuly glukosy při tvorbě laktátu. Glykolýza může poskytovat ATP i v nepřítomnosti kyslíku. Energie získaná při glykolýze je malá.

Na oxidaci každé molekuly mastné kyseliny se vynaloží 2 vysokoenergetické fosfáty [6]. Oxidace mastných kyselin se děje v mitochondriích. K podpoře glukoneogeneze se ATP dodává z procesu oxidace mastných kyselin. Hydrolýza ATP vede ke kontrakci svalů, tedy pohybu. Svalová kontrakce je cyklické připojování a odpoutávání globulárních hlaviček myosinu na F-aktinovém filamentu. Připojení vede ke změně v aktomyosinové interakci tak, že aktinová a myozinová filamenta kloužou po sobě. Energie je nepřímo poskytována z ATP, které je produkováno glykolýzou, oxidativní fosforylací nebo reakcí vzniku ATP ze 2 molekul ADP, rovnice (4). AMP vzniká během rozpadu ADP při svalové práci. Množství ATP ve svalu poskytuje energii pro kontrakci jen na velmi krátkou dobu, a proto je nutné hladinu ATP neustále doplňovat. Pokud sval nepracuje, tak je v něm asi $4 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ATP a $0,013 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ADP [3].

1.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

1.2.1 Úvod

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) je všestranná technika pro separace neutrálních, iontových a polárních vzorků o různých molekulových hmotnostech [20]. Jde o jednu z nejčastěji užívaných separačních technik [21,22]. HPLC slouží k analýze kapalných vzorků nebo pevných vzorků, rozpuštěných ve vhodném rozpouštědle [23]. Povaha vzorku rozhoduje o typu a podmínkách HPLC analýzy [21]. Pro neutrální vzorky je vhodná kapalinová chromatografie s normálními a reverzními fázemi. Iontové sloučeniny, jako je například ADP a ATP, lze separovat pomocí chromatografie s reverzními fázemi, iontově výměnnou chromatografií nebo iontově párovou chromatografií. HPLC se využívá v mnoha oblastech, například ve farmacii, forenzních vědách či klinických a průmyslových oblastech [24].

Tlak při HPLC je tak velký, že nelze vstříknout vzorky přímo do toku mobilní fáze, jak je tomu například u plynové chromatografie [23]. Místo toho se používá dávkovací smyčka o velikosti 0,5 μ l - 2 ml. V dávkovací poloze je smyčka mimo mobilní fázi a na přístupu vzduchu. Pro vstříknutí vzorku do dávkovací smyčky se používá stříkačka, která má objem několikrát větší než má smyčka. Nadbytek vzorku odteče do odpadu. Po nadávkování vzorku se otočí dávkovací smyčkou do vstřikovací pozice. V této pozici je mobilní fáze vedena přímo přes dávkovací smyčku, a tím dochází k vymytí dávkovacího ventilu. Během HPLC je vzorek veden přes chromatografickou kolonu se stacionární fází, kterou protéká kapalná mobilní fáze [6, 53]. Mobilní fáze je pumpována z rezervoárů pomocí pump [23]. Většina HPLC systémů používá reciproké pumpy. Tato pumpa se skládá z pístu, který zajišťuje pohyb mobilní fáze vpřed i vzad, a který zajišťuje konstantní průtok až několik mililitrů za minutu. Zároveň zajišťuje dostatečný tlak k tomu, aby mobilní fáze prošla chromatografickou kolonou. Pohyb vpřed a vzad této pumpy vede k pulznímu toku, který přispívá k šumu v chromatogramu. K zamezení tomuto jevu se na výstupu z pumpy umísťuje tlumič pulzů. Dělicí ventil roztoků kontroluje složení mobilní fáze a mění ho při gradientové eluci. Retenční čas analytů zobrazuje detektor [8].

Retence analytů je komplexním procesem, který zahrnuje interakci solutu s mobilní i stacionární fází a jeho vysvětlení není zcela jasné [20,23]. Vhodných podmínek separace lze dosáhnout výběrem stacionární fáze a složením mobilní fáze. Pořadí, v jakém se eluují roztoky z HPLC, je dáno jejich polaritou. Retence sloučenin stoupá s jejich rostoucí hydrofobicitou [21]. pH mobilní fáze ovlivňuje iontové sloučeniny, protože dochází k jejich ionizaci, a tím se mění jejich hydrofobita. S rostoucím pH se tedy zadržování kyselin

sníží, u bází je tomu naopak. Disociace molekul má rovněž velký vliv na zadržování solutů, protože nabitě analyty jsou více hydrofilní, a tedy se eluují dříve než jejich neutrální formy [24]. Retence analytů také závisí na délce řetězce, přičemž s rostoucí délkou řetězce zadržování analytů roste [21,24]. Pro reprodukovatelnou separaci je třeba kolonu termostatovat, protože na separaci má vliv i teplota. Vzrůstající teplota vede ke kratším retenčním časům [20,25].

Nejprve probíhaly analýzy na takzvané chromatografii s normálními fázemi (NP). Tato metoda zahrnuje hydrofilní stacionární fázi a nepolární mobilní fázi [23,24]. Mobilní fáze představuje směs organických rozpouštědel, například diethylether, dichlormethan a další. Při separaci v normální fázi stráví méně času v polární stacionární fázi nejméně polární analyt, který se jako první eluuje z kolony. Stěžejním pokrokem v HPLC však bylo vytvoření hydrofobního povrchu stacionární fáze, a tedy možnost použití polární mobilní fáze [20]. Tento typ chromatografie se nazývá chromatografie s reverzními fázemi (RP). RP patří dnes k nejoblíbenějším separačním technikám v kapalinové chromatografii (LC) a tvoří zhruba 2/3 všech separací. U RP se do mobilní fáze obvykle přidává acetonitril nebo methanol s vodnými pufrů [24]. Chromatografie s reverzními fázemi se nejčastěji používá pro separace polárních látek, které jsou nerozpustné v organických rozpouštědlech nebo se silně váží na anorganické adsorbenty při NP [20]. U chromatografie s reverzními fázemi se jako první eluuje nejvíce polární analyt [23,24]. Snížení polaritě vody, tj. přidavek organického rozpouštědla do vodné směsi, vede ke snížení retence v chromatografii s reverzními fázemi, zatímco u chromatografie s normálními fázemi je tomu naopak.

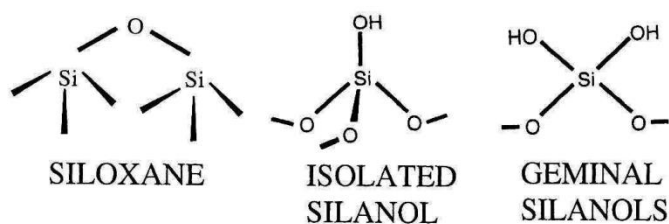
Vhodné rozpouštědlo v mobilní fázi by mělo mít nízkou viskozitu, aby byl na kolonu vytvářen nižší tlak [20]. Dále by mělo být kompatibilní s detekčním systémem, dostupné v dostatečné čistotě a nemělo by být příliš drahé. Pokud je to možné, mělo by být málo hořlavé a toxické. Vhodné rozpouštědlo by také mělo být schopné rozpustit vzorek, aniž by došlo k chemické reakci, která by ovlivnila stanovení. Methanol se jako rozpouštědlo používá častěji než acetonitril. Většina běžných rozpouštědel je dostupná v HPLC čistotě (HPLC grade), to znamená, že jsou z nich odstraněny kontaminanty a látky absorbující v ultrafialové (UV) oblasti. Nečistoty v rozpouštědle vedou k většímu šumu základní linie. Kompatibilita rozpouštědla s UV detekcí je vyjádřena tzv. absorpční hranou. To je vlnová délka, při které je absorbance rozpouštědla proti vzduchu (prázdná kyveta) jednotková. Mobilní fáze se musí před použitím zbavit rozpustných plynů a malých částic [23]. Bublínky v mobilní fázi mohou ucpat detektorové okénko. Pro odplynění se používají nejčastěji vakuové pumpy nebo probublávání inertním plynem, jako je například helium,

keré má v mobilní fázi malou rozpustnost. Částice, které by mohly kolonu ucpat, se odstraňují filtrací. Filtraci i odplynění lze provádět před vlastní analýzou nebo přímo na přístroji HPLC. Izokratická eluce znamená, že se složení mobilní fáze během analýzy vůbec nemění. Je ovšem obtížné najít mobilní fázi, ve které by se eluovaly všechny analyty. Řešením je postupná změna složení mobilní fáze v čase. Tomuto procesu se říká gradientová eluce. Při změnách gradientu dochází k rychlé rovnováze stacionární fáze se změnami mobilní fáze [20].

V kapalinové chromatografii je první rovnováhou rozdělení analytu mezi stacionární a mobilní fázi [20]. Všechny ostatní rovnováhy, které se dějí v mobilní nebo stacionární fázi, se nazývají sekundárními rovnováhami. Mezi sekundární chemické rovnováhy patří ionizace, vznik iontových párů nebo vznik komplexů kovů. Iontové sloučeniny mohou být separovány pomocí iontově párové chromatografie. Při této metodě se do mobilní fáze přidává iontově párové činidlo s opačným nábojem než má analyt. Slabé kyseliny a báze mohou být separovány pomocí kontroly pH a s využitím sekundární chemické rovnováhy v mobilní fázi. Tento typ chromatografie se nazývá iontově potlačovací chromatografie. Ionty kovů mohou být separovány díky vzniku neutrálních komplexů s vhodnými ligandy, které se přidávají do mobilní fáze v komplexometrické chromatografii. Při micelární chromatografii se do mobilní fáze přidávají povrchově aktivní látky (micely). Tyto micely slouží ke změně celkové distribuční konstanty solutů mezi mobilní a stacionární fázi. Metoda hydrofilní interakce (HILIC) využívá v mobilní fázi vodné pufrů a klesající gradient jejich iontové síly. Takto mohou být separovány biopolymery s minimálním narušením jejich konformační struktury. HILIC metoda je také vhodná pro separaci malých polárních molekul [26]. Chemicky vázané fáze se také často používají pro přípravu stacionárních fází s nepohyblivými enantiomerními selektivními skupinami [20]. Tento typ kolon se pak zapojuje do separace racemátů při chirálních chromatografiích. Selektivitu metody obvykle zlepšuje přidání látek do mobilní fáze.

1.2.2 Kolony

Analytické kolony jsou obvykle vyráběny z nerezové oceli o vnitřním průměru 2,1-4,6 mm [23]. Délka kolon se pohybuje v rozmezí 30-300 mm. Účinnost je 40-60 tisíc teoretických pater. Stabilita kolony je velmi závislá na pH mobilní fáze, druhu pufru a typu organického modifikátoru v mobilní fázi [21]. Mezi nejčastější typy náplní kolon patří anorganické ionty (silikagel), porézní organické polymery, porézní grafit, celulóza a různé

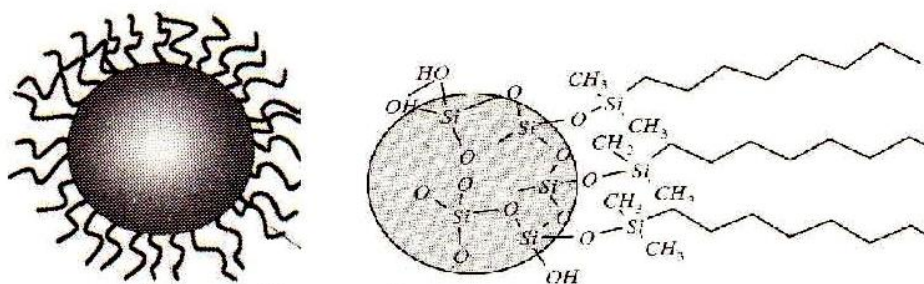


Obrázek 3 Funkční skupiny silikagelu (převzato z [20]).

polysacharidy [20,21]. Silikagel patří mezi nejvýhodnější náplně kolon pro separaci polárních látek. Při použití vodných mobilních fází i pro všechna organická rozpouštědla jsou vhodné silikagelové kolony. Stejně tak lze tento druh kolon použít i pro gradientovou eluci. Pro separaci malých molekul a inertních makromolekul jsou vhodné porézní anorganické oxidy, polymery a grafit. Lze je využít také pro separaci biomolekul při zachování jejich biologické aktivity nebo lze tyto látky separovat pomocí neporézních materiálů.

Částice silikagelu jsou mechanicky odolné a lze je snadno připravit v různých velikostech a tvarech [20,23]. V HPLC je velikost částic velmi důležitá [21]. Pro separaci malých molekul se používají nejčastěji částice o velikosti 3-10 μm [20,23]. Tato velikost je kompromisem mezi účinností kolony, její stabilitou a separačním časem [20,21]. Menší částice jsou vhodné hlavně pro rychlejší analýzy. Větší částice se více využívají pro preparativní LC. Pro nízkotlaké systémy se používají stále větší částice. Pro analýzy biopolymerů je vhodný porézní silikagel s póry o velikosti větší než 30 nm. Povrch silikagelu se skládá ze sítě jednoduchých silanolových skupin, silanediolových skupin, silanolů s vodíkovou vazbou, vnitřních silanolových skupin, siloxanových můstků a kruhů (**obrázek 3**). Výhodou kolon na bázi silikagelu je jejich velká mechanická odolnost i při vysokém tlaku a vysoká účinnost. Nevýhodou je uvolňování jejich povrchu hydrolyzou Si-O-Si, který drží silikagel pohromadě [21,23]. Tato ztráta se děje při velké teplotě, nízkém či vysokém pH nebo velkém množství vodní fáze v mobilní fázi. Vhodné rozmezí pH pro silikagel je 2-8 [10,23]. Úbytku povrchu lze zabránit také ochranou silanolů dalšími funkčními skupinami (např. isobutylem) [21]. Dalším problémem je kyselý povrch kolony uvnitř, který brání analýzám bazických sloučenin.

Pro zvýšení selektivity porézních částic silikagelu se na jejich povrch váží různé funkční skupiny [20]. Tomuto typu kolon se říká kolony s chemicky vázanými fázemi (**obrázek 4**) [20, 24]. Chemicky vázané fáze se používají ve všech separačních módech a dnes mají významné místo v moderní kolonové technologii. Tyto kolony vznikají



Obrázek 4 Chemicky vázané fáze na silikagelu (převzato z [24]).

reakcí organosilanolového činidla s povrchem silanolových skupin za vzniku siloxanových vazeb [20,23]. Příkladem organosilanolového činidla je $\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{RCl}$, kde R je alkyl nebo substituovaná alkylová skupina. Pokud je R polární funkční skupina, potom bude stacionární fáze polární. Mezi polární stacionární fáze patří například kolony s kyanoskupinou, diolovou skupinou nebo aminoskupinou [23,24]. Nejpoužívanější nepolární stacionární fáze je ta, kde R je n-oktyl (C_8) nebo n-oktadecyl (C_{18}). Nejběžnější kolonou je C_{18} [8,20,27]. Delší alkylové řetězce (C_{18}) v koloně jsou více stabilní než řetězce kratší (C_8) [21]. Výhodou kolon s chemicky vázanými fázemi je, že u nich nedochází k nežádoucím reakcím mezi rozpouštědlem a nezreagovanými skupinami $-\text{SiOH}$ [23]. Jejich hlavní nevýhodou je jejich nízká stabilita v extrémním pH mobilní fáze a přítomnost přístupných silanolových skupin po navázání, které nevede k optimálnímu tvaru píku [20]. Tyto kolony nejsou vhodné pro bazické analyty. Zmíněné nevýhody však mohou být vyřešeny použitím moderních kolon a vhodným výběrem experimentálních podmínek.

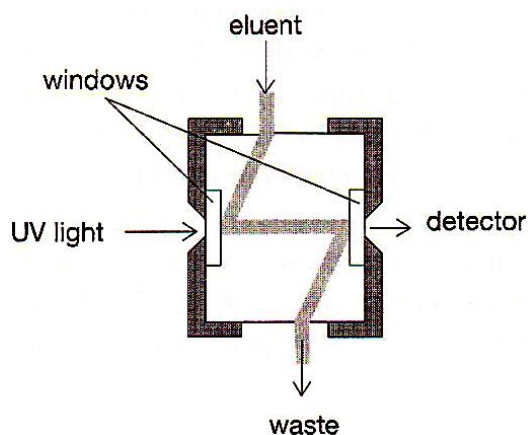
Vzhledem k nevýhodám silikagelu se objevila snaha nalézt nové materiály, které by bylo možné použít jako stacionární fáze v kapalinové chromatografii [20,24]. Jedná se například o oxid hlinitý, oxid zirkoničitý nebo oxid titaničitý. Tyto látky jsou mechanicky odolné a více hydrolyticky stabilní než silikagel. Pro některé aplikace je použít lze, ale při jejich použití zůstává celá řada nevýhod, a proto se dnes i nadále dává přednost silikagelu. Čistá grafitová kolona dosahuje dobrých výsledků v zadržování polárních sloučenin, například nukleotidů [2,17,28]. Tato kolona funguje na principu reverzních fází a je vhodná pro hmotnostní detekci (MS), protože sůl z mobilní fáze nekontaminuje iontový zdroj. Při použití této kolony není nutné přidávat do mobilní fáze iontově párové činidlo pro zadržení analytů na stacionární fázi. Oproti iontově párové chromatografii navíc není nutné používat pufrы, které jsou z MS obtížně odstranitelné, a které navíc mohou vést k tvorbě dalších látek. Tato kolona dovoluje použít mobilní fázi v rozmezí pH 0-14. Bylo publikováno, že adenosinové fosfáty lze separovat také na kolonách s oxidem titaničitým (TiO_2) [10]. TiO_2 překonávají tradiční silikagelové kolony v několika ohledech. Povrch oxidu titaničitého

především nabízí lepší kolonovou stabilitu a také rovněž může odolat nepříznivému vlivu pH i v rozmezí 1-14 a teplotě nad 150 °C. Byly vyrobeny i otevřené tubulární mikrokolony s vnitřním průměrem 1-50 μm a délkou přibližně 1 m [23]. Předpokládá se, že by tyto kolony, které neobsahují stacionární fázi, mohly dosahovat účinnosti kolem 1 milionu teoretických pater. Problém vývoje těchto kolon spočívá v tom, že je obtížné připravit kolonu o vnitřním průměru menším než je 10 μm .

Zkracování životnosti analytických kolon je způsobeno především irreverzibilním navázáním rozpouštědel na stacionární fázi [23]. To způsobí snížení výkonu kolony vzhledem ke klesající dostupnosti stacionární fáze. Dalším problémem je, že může dojít k neprůchodnosti kolony materiálem vstříknutým společně se vzorkem. Z těchto důvodů se používají předkolony, které chrání vlastní analytickou kolonu před kontaminací. Předkolonka je umístěna ještě před analytickou kolonu a obsahuje stejnou stacionární fázi, jakou má analytická kolona, ale je výrazně kratší a levnější. Obvyklá délka je 7,5 mm a cena je jen jedna desetina ceny analytické kolony. Počítá se s tím, že předkolony se musí vzhledem k jejich nízké životnosti často vyměňovat.

1.2.3 Detektory

Většina detektorů v HPLC se dnes používá pro více metod [23]. Detektory musí být dostatečně citlivé, aby mohly detekovat i analyty o malé koncentraci [20]. Citlivost měření může zvýšit derivatizace analytů [24]. Dále by měl mít každý detektor malý objem pro zabránění mimokolonovým příspěvkům [20]. Současně však je třeba mít co nejdelší detekční optickou dráhu, aby vzrostla detekovatelnost vzorku. Mezi těmito dvěma požadavky je proto



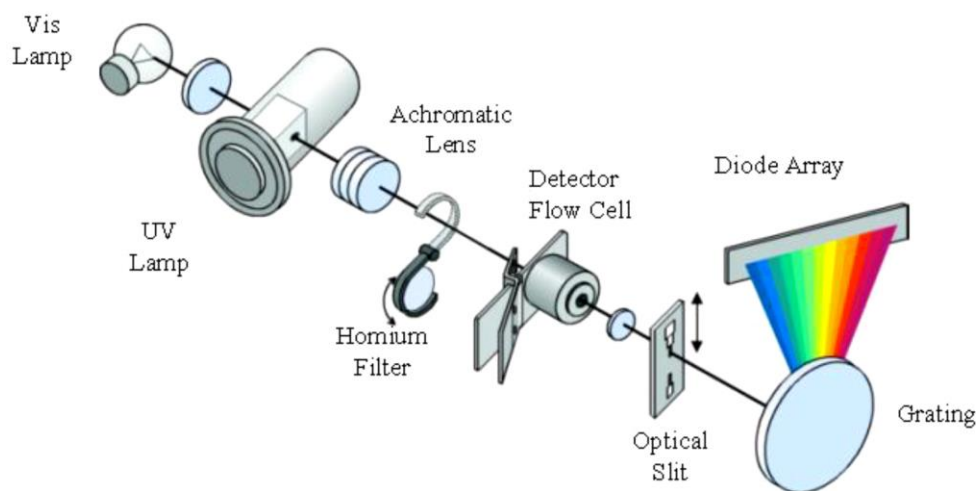
Obrázek 5 Průtoková cela UV detektoru (převzato z [24]).

nutné nalézt kompromis. Z těchto důvodů mají detekční cely tvar H či Z nebo tvar špičatý (**obrázek 5**). Detektory by také měly umět dát rychlou odpověď, protože někdy je nutné měřit rychle se měnící koncentraci analytu. Mezi nejčastější typy patří UV detektor, fluorescenční a chemiluminiscenční detektor. Nejčastěji se používá UV detektor, nejcitlivějším detektorem je však hmotnostní spektrometr [20,29].

1.2.3.1 Spektrofotometrické detektory

Mezi nejběžnější detektory patří detektory spektrofotometrické [23,30]. Jejich principem je měření absorpce monochromatického světla, které je přímo úměrné koncentraci analytu dle Lambert-Beerova zákona [21,30]. Odpověď detektoru závisí na tom, jak silně absorbuje vzorek světlo při příslušné vlnové délce a zda může mobilní fáze při této vlnové délce dosahovat absorpčního maxima [20]. Zdrojem světla bývá deuteriová lampa, která umožňuje snímat signál v rozmezí 190-400 nm [21,24]. UV detektor lze považovat za univerzální, protože většina organických sloučenin absorbuje světlo v ultrafialové oblasti [20]. UV detekce dovoluje používat netěkavé soli o velké koncentraci, jde však o detekční techniku málo citlivou [28]. Výsledný chromatogram je křivka závislosti absorpance na elučním čase [23]. Pro svou citlivost, reprodukovatelnost a snadnou manipulaci se tyto detektory používají ke kvantitativní analýze kovů, léků, tělních tekutin a potravin [24].

Variantou UV detektoru je detektor diodového pole (DAD) [21]. DAD obsahuje mřížku s diodami, takže je možné snímat světlo při několika vlnových délkách současně (**obrázek 6**) [21,30]. Register zpracuje signál z každé fotodiody a spojí světelnou intenzitu z každého záznamu z jednotlivých diod [20]. Skupina diod slouží ke zlepšení



Obrázek 6 Detektor diodového pole (převzato z [67]).

poměru signálu/šumu. Tento čtecí proces se neustále opakuje. Celá spektra jsou zaznamenávána kontinuálně v mikrosekundových intervalech a záznamy jsou ukládány [23,24]. Přístroje dávají trojdimenzionální chromatogram, který ukazuje absorbanci jako funkci vlnové délky a času. Pro zjištění vhodné vlnové délky měření je nutné proměřit celé spektrum standardu analytu a vybrat tu vlnovou délku, při které lze pozorovat absorpční maximum [21]. DAD se používá v průtokových systémech například v HPLC či kapilární elektroforéze především proto, že umí rychle zaznamenávat změny signálu [24].

1.2.3.2 Jiné detektory pro HPLC

Pokud daný analyt není UV aktivní nebo absorbuje jen velmi málo, je nutné použít jiné než UV detektory [21]. Jednou z možností je fluorescenční detektor, který měří fluorescenci analytů při dané excitační a emisní vlnové délce [21,30]. Tento detektor je velmi citlivý a selektivní a je tedy vhodný pro měření stopových analýz a pro komplexní matrice vzorků. Nevýhodou je, že ne všechny vzorky mohou fluoreskovat [23,30]. Z tohoto důvodu je nutné často analyty derivatizovat [8]. Výsledný chromatogram je závislost intenzity fluorescence jako funkce času [23]. Mezi další detekční techniky u HPLC patří i velmi citlivá hmotnostní spektrometrie (viz kapitola 1.5) či luciferázová analýza, která se využívá pro stanovení ATP [21,32]. Pro izolaci a stanovení nukleotidů lze rovněž použít například radiometrickou detekci [9,33].

Příkladem detektoru vysokoúčinné kapalinové chromatografie může být i refraktometrický detektor, který měří změny indexů lomu sloučenin v mobilní fázi oproti samotné mobilní fázi [20,21]. Tento detektor lze použít pro velké množství analytů, ale obvykle je málo citlivý a má omezený lineární dynamický rozsah, protože signál závisí na rozdílu měření [20,23]. Pracuje pouze za malých změn teplot nebo složení mobilní fáze. Další nevýhodou těchto detektorů je, že je nelze kromě situací, kdy obě složky mobilní fáze mají úplně shodný refraktometrický index, použít při gradientové eluci. Dalším detektorem je detektor rozptylu světla [30]. Ten zaznamenává rozptyl světla na částicích analytu, které vznikají po zmlžení eluentu a následném odpaření rozpouštědla. Jeho hlavní výhodou je citlivost, které je schopen dosáhnout.

Mezi další možnosti detekce u HPLC patří elektrochemický detektor [21,22]. Elektrochemické detektory jsou například ampérometrický, voltametrický, coulometrický detektor či konduktometr [23]. Elektrochemická detekce má potencionální využití především v metabolických analýzách [31]. Tyto detektory analyzují pouze redoxně aktivní molekuly

ve vzorku. Toho lze využít při sledování sloučenin, které jsou přímo relevantní k biochemické transformaci v těle jako výsledek metabolismu léků. Hlavní výhodou elektrochemické detekce je její citlivost a vysoká účinnost [30,31].

Pro detekci analytů s nízkou odpovědí detektoru se používá jako alternativa k derivatizaci metoda nepřímé detekce [20]. Využití nachází hlavně v iontové výměnné chromatografii a iontové párové chromatografii s absorpční, ampérometrickou či fluorimetrickou detekcí. Detekované ionty způsobí, že dojde k jejich výměně za ionty z mobilní fáze a dojde tedy k poklesu signálu detektoru oproti stabilní odpovědi detektoru na samotnou mobilní fázi. Ionty, které byly separovány iontovou chromatografií, mají limity detekce u nepřímé UV detekce srovnatelné s detekcí konduktometrickou.

1.3 Kapilární vysokoúčinná kapalinová chromatografie

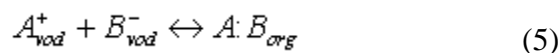
Kapilární HPLC používá kolony s menším průměrem. Miniaturizace kolon může vést ke zlepšení citlivosti měření a většímu počtu detekovaných sloučenin s nízkými limity detekce [8,34]. S klesajícím vnitřním průměrem kolony a velikostí částic roste jejich chromatografické rozlišení [31]. Je výhodné použít kolonu s malým průměrem, protože pak vystačíme s malým množstvím rozpouštědel a iontové párových činidel při zachování velké separační síly [7,9,34]. Pro miniaturizované metabolické analýzy bylo dosud provedeno málo studií [34,35]. Důvodem je, že se zabývají především analýzami rostlin, mikrobů a tělních tekutin, tedy analýzou vzorků v relativně velkém objemu, u kterých není vyžadována velká citlivost stanovení. Předpokládá se, že s růstem možností využití metabolomiky bude třeba analyzovat i látky o malém objemu dostatečně citlivou metodou. Kapilární HPLC je vhodná pro spojení s ESI-MS [9,30]. Pokud však při kapilární HPLC nadávkujeme velké množství vzorku, můžeme tím negativně ovlivnit tvar píku.

Mikrokolony mají vnitřní průměr 50-200 μm a délka dosahuje až k několika metrům, zatímco částice mají velikost 3-5 μm [23]. Dosahují účinnosti 250 tisíc teoretických pater a dobré citlivosti detekce [23,30]. Mikrokolony jsou robustní, dochází k reprodukovatelné separaci a dosahují dlouhé životnosti. Problémem jsou vyšší nároky na minimalizaci mrtvých objemů a příliš nízký průtok pro některé druhy detekce (např. pro APCI-MS). Používají méně rozpouštědel a vzhledem k tomu, že vzorek je rozpuštěný v menším objemu, poskytuje v detektoru větší signál. Vysoké citlivosti detekce dosahují také kapilární kolony (300 μm , 5 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$). Spotřebují malé množství vzorku i rozpouštědel [61]. Tyto kolony lze

poměrně snadno připojit k HPLC systému. Kladou však vysoké nároky na minimalizaci mrtvých objemů a vyžadují speciální čerpadla pro malé průtoky mobilní fáze [30].

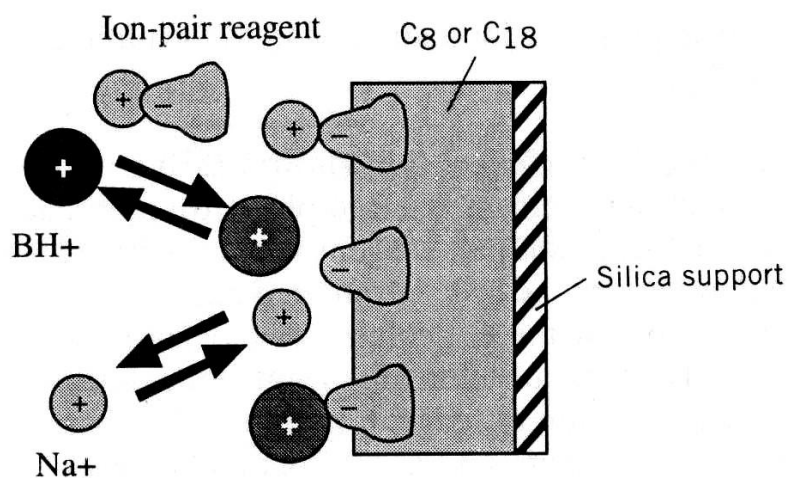
1.4 Iontově párová chromatografie

Jedna z nejefektivnějších metod HPLC pro separaci nukleotidů je iontově párová chromatografie [36]. Jde o chromatografii, která používá hydrofobní stacionární fázi a mobilní fázi s přidavkem iontově párového činidla [37]. Iontově párové činidlo reguluje zadržování iontových sloučenin a téměř neovlivňuje retenci neutrálních sloučenin [20,38]. Během této metody dochází v mobilní fázi ke vzniku iontového páru (**obrázek 7**). Tyto iontové páry jsou neutrální, tedy méně polární než samotné ionty, a proto se lépe zadržují na reverzní fázi [8,39,24]. Vznik iontového páru znázorňuje rovnice [38]:



Při vzniku asociátů se uplatňují coulombické interakce způsobující vznik vícečetné interakce, kterou lze obtížně interpretovat [20]. Retence látek s opačným nábojem než má protiiont se zvyšuje, zatímco u látek se stejným nábojem jako má protiiont dochází ke snížení retence [38].

Iontově párová chromatografie se používá pro separaci iontových sloučenin a ionizovatelných látek a pro směsi neutrálních látek a iontů [17,37,40]. Tento druh chromatografie ovlivňuje selektivitu separovaných iontů a zlepšuje separaci iontů. Tímto způsobem dochází ke vzniku lepšího tvaru píku a zvýšení rozlišení [27,41,42]. Dříve se k separaci iontů používala metoda iontové suprese pomocí pH [38]. Jejím principem byla



Obrázek 7 Retence v iontově párové chromatografii (převzato z [20]).

úprava pH mobilní fáze na takovou hodnotu, aby analyt byl v neutrální formě. Nevýhodou této metody je, že se pH upravuje na poměrně extrémní hodnoty a vzorek navíc může obsahovat více než jednu ionizovatelnou sloučeninu.

Za hlavní výhodu iontově párové chromatografie se považuje to, že není nutné mít žádné speciální stacionární fáze nebo příslušenství [20]. Mezi další výhody této metody patří také jednoduchá příprava mobilní fáze, velký výběr iontově párových činidel, možnost separovat současně ionty i neutrální látky a značné zvýšení účinnosti kolony [38]. Selektivitu lze ovlivňovat jen změnami složení mobilní fáze [38,20]. Pro současnou separaci neutrálních i iontových sloučenin se obvykle zvolí mobilní fáze o složení, které poskytuje dobré výsledky pro analýzu neutrálních látek. Poté se přidá do mobilní fáze iontově párové činidlo a pufr k nastavení podmínek separace iontových sloučenin. Přídavek činidla má obvykle na separaci neutrálních sloučenin zanedbatelný vliv. Pokud přidáme do mobilní fáze oba druhy iontově párových činidel, lze takto současně separovat kationty a anionty [60]. Nevýhodou tohoto typu chromatografie je pomalé ustavování rovnováhy na koloně [38,41]. K dalším nevýhodám patří nemožnost pracovat s elektrosprejem (ESI) jako zdrojem ionizace MS, protože dochází k iontovému potlačení [13,41]. Toto potlačení snižuje robustnost a reprodukovatelnost metody. Zdroj hmotnostního spektrometru může také kontaminovat velká koncentrace iontově párového činidla [8,43].

Pro separaci kationtů se používají jako iontově párová činidla silné organické kyseliny a pH mobilní fáze je 3-4 [38]. Příkladem takového iontově párového činidla jsou sodné soli alkylsulfonových kyselin [38,60]. Pro dělení aniontů se využívají jako iontově párová činidla kvartérní amoniové soli a pH mobilní fáze je o velikosti 7-8 [37,41,44]. Dříve se tato činidla používala pro separaci často, ale vzhledem k těkavosti a nemožnosti jejich použití pro hmotnostní detekci se dnes tolik nevyužívají [37,21]. Příkladem iontově párových činidel je dále tetrabutylamonium hydrogensulfát, tetrabutylamonium bromid, tetrabutylamonium hydroxid a nebo těkavý dimethylhexylamin [19,39,45]. Těkavá iontově párová činidla jsou pro MS detekci vhodná [8,17]. Patří mezi ně například tributylamin, triethylamin či tripentylamin [2,22,46]. Dalším zástupcem je dimethylhexylamin [2,8,9]. Tato látka se užívá pro hmotnostní detekci, kde je iontovým zdrojem elektrospreje. Dihexylamonium acetát je iontově párové činidlo, které se snadno rozpouští v hydrofilní mobilní fázi [43]. Těkavý hexylamin je třeba měřit v negativním módu, protože interferuje při měření v pozitivním módu elektrospreje [13]. Netěkavá iontově párová činidla, jako jsou tetrabutylamoniové sole, nejsou pro MS vhodné vzhledem k možnosti vysrážení v iontovém zdroji [29].

Je mnoho faktorů, které ovlivňují retenci a selektivitu iontově párové chromatografie [20]. Nejdůležitějšími jsou typ a koncentrace iontově párového činidla [7,16,39]. Koncentrace protiiontů bývá okolo 5-10 mmol·dm⁻³ [38,20]. Platí, že k silnějšímu zadržování dochází s rostoucí koncentrací iontově párového činidla [9,25,37]. S rostoucí koncentrací iontově párového činidla se ale také snižuje detekční citlivost hmotnostního spektrometru, a to zejména při práci v negativním módu. Dalšími významnými parametry iontově párových činidel jsou pH a iontová síla mobilní fáze, druh a koncentrace pufru v mobilní fázi [38,20]. pH mobilní fáze se volí tak, aby analyt i iontově párové činidlo byly zcela ionizované. Při neutrálním pH jsou kyselé skupiny analytů a aminoskupiny iontově párového činidla nabitě a to pomáhá k vytvoření iontového páru [37]. Obvyklá koncentrace pufrů v mobilní fázi je 0,5-20 mmol·dm⁻³ [20]. Vzrůst koncentrace organického rozpouštědla snižuje retenci analytu, protože vzroste iontová síla mobilní fáze. Mezi často používané složky mobilní fáze patří fosfátové pufrы, které mají široký pH rozsah. Výběr stacionární fáze ovlivňuje účinnost a sorpci iontově párového činidla. Vliv těchto parametrů není obvykle lineární, a proto nelze formulovat obecná pravidla pro tento typ chromatografie.

K detekci iontů, které lze obtížně detekovat pro jejich interakci s chromatografickým systémem, se používá mechanismus nepřímé detekce [20]. U iontově párové chromatografie je tento druh detekce obtížný, protože se zde detekují negativní i pozitivní analyty. Detekovatelný iont se přidává do mobilní fáze o stejné koncentraci, jako má vzorek. Tím se před doputováním vzorku na kolonu, dosáhne rovnováhy ve stacionární fázi. Koncentrace detekovatelného iontu, který opouští kolonu, je konstantní a poskytuje fixní odpověď detektoru. Po nadávkování vzorku do systému dojde ke zvýšení signálu vzhledem k porušení rovnováhy na koloně s detekovatelným iontem. V chromatogramu se objevují negativní i pozitivní píky. Pro každý analyt by se měl objevit jeden pík a případně systémové píky dle druhu rozpouštědla, které závisí na počtu aditiv přidávaných do mobilní fáze.

1.5 Hmotnostní spektrometrie

1.5.1 Úvod

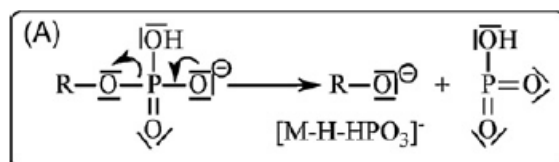
Prvním předpokladem pro konstrukci hmotnostního spektrometru byl objev zakřivení dráhy letu nabitě částice v magnetickém poli [47]. Tohoto objevu bylo dosaženo v roce 1898 ve Vídni. Za zakladatele MS je považován Thompson, kterému se podařilo v roce 1913 rozdělit izotopy ²⁰Ne a ²²Ne. V roce 1973 se McLafferty pokusil poprvé spojit HPLC s MS a

až v roce 1984 zavedl Fenn ionizaci pomocí elektrospreje. V současné době se techniky MS velmi rozvíjejí a nově je lze využít například v analýze biomolekul [24].

Hmotnostní spektrometrie je fyzikálně chemická metoda určování hmotnosti atomů, molekul či jejich částí po převedení na ionty [24,48]. Vzniklé ionty se rozlišují podle poměru m/z (tj. hmotnost/nábojové číslo) [30,47]. Metoda hmotnostní spektrometrie je vysoce citlivá, selektivní a zároveň univerzální [8,31]. Jedná se také o destruktivní metodu, která spotřebovává minimální množství vzorku [47]. Analýzy s hmotnostní detekcí probíhají s obvyklými rozpouštědly, která se používají při chromatografii s reverzními fázemi, ovšem s použitím těkavých látek (např. octanem amonným) [24]. Vysrážení soli z mobilní fáze ve zdroji elektrospreje vede k celé řadě problémů [2,29]. Z toho vyplývá snaha se mu vyhnout použitím modifikátoru nebo pufru v mobilní fázi o nízké koncentraci. Mezi výhody hmotnostní spektrometrie patří to, že jde o vysokorozlišovací techniku, kterou lze spojit i se separačními metodami (zejména s kapalinovou a plynovou chromatografií) [48,24]. V dnešní době vytlačuje MS klasickou UV detekci vzhledem ke své velmi dobré citlivosti [17].

Hmotnostní detektor může analyzovat látky v pozitivním či negativním módu. Fosforylované metabolity, jako je například ADP a ATP, jsou anionty a jejich detekce v pozitivním módu je omezena vznikem aduktu [33]. Negativní mód se používá zřídka, protože je málo citlivý k běžným matricím vzorku. Pokud je analyt čistý, není nutné plýtvat rozpouštědly a lze ho nastříknout přímo do hmotnostního spektrometru [29]. Jde o rychlou metodu, kde dochází k vysokoúčinné analýze s typickými časy analýzy 1-3 min a více než 1000 analýzami za den [31]. Dodávka roztoků je zajištěna samostatnými pumpami nebo pumpami z připojeného HPLC.

Hmotnostní spektrum vyjadřuje závislost odezvy detektoru na m/z analytu. Ve většině případů je náboj u m/z roven 1 (u ionizace elektrosprejem to nemusí platit) [47]. Odezva detektoru je úměrná intenzitě iontového proudu [48,24]. Intenzita signálu závisí na koncentraci analytu a jeho ionizaci [22]. Účinnost ionizace nesouvisí jen s analytem, ale i s ostatními složkami matrice. Spektra jsou většinou převáděna do normalizovaného tvaru [47,48]. To znamená, že nejintenzivnějšímu píku ve spektru je přiřazena hodnota 100% intenzity a na svislou osu v hmotnostním spektru se pak vynáší relativní intenzita iontového proudu v procentech. Spektrum se většinou zobrazuje v čárové (tzv. centroidové) formě tak, že reálný pík je nahrazen úsečkou a poloha na ose x odpovídá jeho maximu a výška relativní intenzitě. Molekulární ion je takový, který má ve spektru největší hmotnost. Tento ion má nepárový elektron a jeho relativní zastoupení musí odpovídat postulované struktuře. Ostatní píky jsou píky fragmentů a vznikají roztržením jedné nebo několika vazeb



Obrázek 8 Návrh mechanismu vzniku negativní ztráty a fragmentačního iontu pro alkylfosfát (převzato z [29]).

v molekule. Míra fragmentace závisí na přebytku energie, kterou molekula obsahuje. Návrh fragmentace alkylfosfátu je znázorněn na **obrázku 8**. Kromě běžných iontů se ve spektru mohou vyskytovat i adukty například $[\text{M}+\text{Na}]^+$, $[\text{M}+\text{K}]^+$.

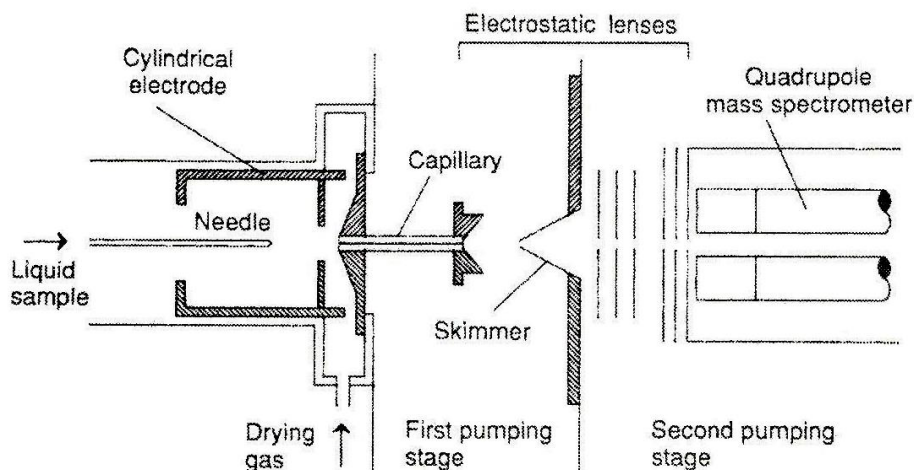
Hmotnostní spektrometrie umožňuje provádět analýzu kvantitativní i kvalitativní [30,24]. Interpretace spekter slouží k určení relativní molekulové hmotnosti látek a dalších strukturních informací [23,47,48]. Kvalitativní analýza se provádí porovnáním spekter a m/z [24]. V praxi se využívá především pro stopovou analýzu organických látek či zjištění struktury látek [48,24]. Metoda hmotnostní spektrometrie se často používá v metabolických analýzách a pro charakterizaci látek vč. nukleotidů z důvodu její velké citlivosti oproti jiným detekčním technikám [9,40].

1.5.2 Instrumentace hmotnostního spektrometru

Základ hmotnostního spektrometru tvoří iontový zdroj, kde dochází k převedení analytu do formy iontů [47,48]. V prostoru iontového zdroje dochází k fragmentačním reakcím, při nichž se porušují chemické vazby vzniklého iontu. U tvrdých ionizačních technik se dodaná energie využívá k rozsáhlé fragmentaci primárně vzniklého iontu. Měkké ionizační techniky používají k ionizaci jen malý přebytek energie a pravděpodobnost ionizace je proto nízká. Mezi měkké techniky se řadí ionizace elektrosprejem (ESI) a chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI). Měkkými ionizačními technikami vznikají protonované molekuly $[\text{M}+\text{H}]^+$ nebo deprotonované molekuly $[\text{M}-\text{H}]^-$ [29,47]. Tyto techniky jsou také citlivé, selektivní a robustní [24]. Další částí spektrometru je analyzátor, který slouží jako disperzní prvek a umožňuje rozdělit v čase směs iontů o různých hmotnostech [47,48]. Separace iontů v analyzátoru probíhá za vysokého vakua. V hmotnostní spektrometrii je vakuum nezbytné proto, aby ionty měly dostatečně dlouhou střední dráhu a aby se zabránilo kolizním srážkám s neutrálními atomy. Mezi málo rozlišovací analyzátory patří například kvadrupól, který má jednotkové rozlišení [29]. Detektor na konci přístroje poskytuje signál, který je úměrný počtu dopadajících iontů [48]. Tento signál je posléze převeden do počítače a počítačovým programem je zpracován do

formy hmotnostních spekter. U MS se používá dvojitá detekce, často se MS spojuje ještě s UV detekcí nebo fluorescenčním detektorem [29].

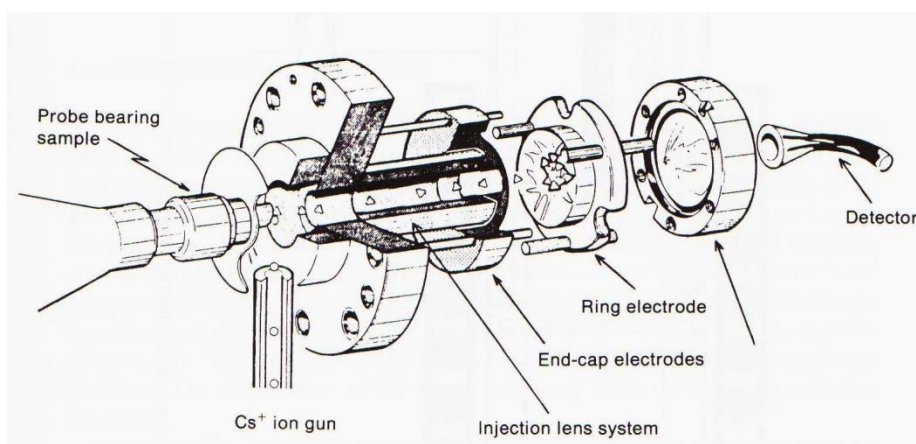
Pro ionizaci se zpravidla používají měkké techniky, ale záleží vždy na druhu analytu [31,47]. Vůbec nejměkčí technika u MS je elektrosprej, který se v současnosti používá nejvíce (**obrázek 9**) [31,29]. Ionizace probíhá u elektrospreje v důsledku vysokého napětí [24]. Rozdíl napětí o velikosti asi 3 kV se vkládá mezi jehlu, kterou je vstříkován roztok, a elektrodu. Rychlým odsušením mikrokapelek spreje dochází k převodu iontů z kapalně fáze přímo do vakua [48]. Při dostatečně rychlém odsušení mikrokapelek stačí povrchový náboj kapiček k převodu analytu na ionty a není nutné dodávat další energii. ESI pracuje při průtoku jednotek $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ [31,49]. Tyto techniky se hodí hlavně pro spojení s kapalinovou chromatografií, protože tam neustále protéká mobilní fáze [48]. Citlivost hmotnostní detekce s elektrosprejem se stoupajícím množstvím vody v mobilní fázi klesá [2]. Větší množství organických rozpouštědel v mobilní fázi a větší průtok mobilní fáze poskytuje lepší tvar píku, než tomu bylo u klasické chromatografie s reverzními fázemi. Obecně je citlivost elektrospreje velká, protože odezva signálu závisí na koncentraci [9]. Tento typ ionizace se hodí pro kvantitativní analýzu [9]. Elektrosprej se obvykle používá pro stanovení polárních látek o relativní molekulové hmotnosti (M_r) až 100 000 a lze ho například využít pro stanovení nukleotidů [2,31]. Při chemické ionizaci za atmosférického tlaku (APCI) dochází ke vzniku iontů při 1 atm [50,24]. Na výbojovou elektrodu je vloženo vysoké napětí a vzniká koronární výboj [49]. Tímto výbojem jsou ionizovány molekuly mobilní fáze. K ionizaci mobilní fáze dochází při ústí kapiláry, která vede do prostoru vyhřívaného na 300-400 °C. Ionizovanými molekulami mobilní fáze jsou pak následně ionizovány molekuly analytu. Protiproud sušícího plynu dusíku slouží k rozbití případných



Obrázek 9 Schéma elektrospreje (převzato z [50]).

nekovalentních klastrů a asociátů. Při použití chemické ionizace za atmosférického tlaku se pracuje při vyšších průtocích než je tomu u ESI a signál dosahuje nižší intenzity [31,49]. Pro chromatografii na normálních fázích je obecně výhodnější používat APCI než ESI [29]. APCI slouží jen pro analyty o maximální relativní molekulové hmotnosti 1000. Tato metoda se využívá hlavně pro stanovení méně polárních sloučenin a nepolárních metabolitů nebo pro zvýšení citlivosti [29,50]. Nejčastější využití APCI je v životním prostředí při stanovování pesticidů nebo ve farmaceutickém průmyslu.

Mezi časté analyzátoři patří kvadrupól a iontová past. Kvadrupólem jsou čtyři kovové tyče kruhového nebo hyperbolického průřezu, které jsou připojeny ke stejnosměrnému nebo střídavému napětí [48]. Ionty vstoupí mezi tyče a v poli se střídavým elektrickým napětím začnou oscilovat. Analyzátořem projdou jen ionty o určitém m/z , ostatní se zachytí na tyčích. Změnou napětí vkládaného na tyče lze zajistit, že analyzátořem postupně projdou všechny ionty [47,48]. Tento typ analyzátoři poskytuje nejvyšší kvantitativní citlivost a reprodukovatelnost [26]. Iontová past je zařízení, které umožňuje uzavřít ionty v ohraničeném prostoru (**obrázek 10**) [48]. Skládá se ze vstupní a výstupní elektrody kruhového průřezu a prstencové středové elektrody, na kterou je přivedeno napětí. Ionty, které se dostanou dovnitř pasti, jsou nuceny se pohybovat po uzavřených kruhových drahách. S rostoucí amplitudou vkládaného napětí se ionty s rostoucí m/z dostávají na nestabilní trajektorii, opouštějí past a směřují k detektoru. Principem iontové pasti je opakované selektivní vypuzení iontů podle jejich m/z z iontové pasti na detektor [47]. Tuto techniku lze použít u vícedimenzionálních technik. Použití těkavých alkylaminů může způsobit interferenci v iontové pasti [37].



Obrázek 10 Iontová past (převzato z [66]).

1.5.3 LC-MS

Spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí (LC-MS) je velmi výhodné, protože poskytuje lepší identifikaci a stanovení metabolitů [26,31]. V současné době se uskutečnil velký pokrok v oblasti hmotnostní detekce, a proto významně stoupá zájem o spojení LC-MS [23]. Dnes se jako ionizační technika pro spojení LC-MS používá hlavně elektrosprej a chemická ionizace za atmosférického tlaku [29,50]. Spojení HPLC a MS je technicky obtížnější než je tomu u plynové chromatografie (GC), protože HPLC na rozdíl od MS pracuje za vysokého tlaku [23,30]. Pro zajištění spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí se používají speciální sondy pro zavádění vzorků, a to podle použité ionizační techniky [47]. Mezi výhody kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí patří možnost používat běžná rozpouštědla jako je voda nebo methanol [13]. Další výhodou je to, že netěkavé polární sloučeniny mohou být analyzovány bez toho, aniž by se musely derivatizovat. LC-MS také výrazně nepřispívá k rozšiřování chromatografické zóny [30]. Určitým nedostatkem této metody, která se teprve začíná rozvíjet, jsou relativně široké možnosti aplikace [31]. Toto omezení zahrnuje převod kapaliny při vysokém tlaku do nízkotlakého prostoru, kde je vakuum, a také analýzu termálně labilních sloučenin při vysoké teplotě.

Metoda LC-MS je vhodná pro polární i nepolární analyty či pro ionizovatelné a iontové látky [30]. Je nevýhodná pro velmi nepolární látky, nízkomolekulární polární látky a látky zcela nerozpustné. Použití pH gradientu místo gradientu soli vede k lepší detekovatelnosti látek pomocí MS [17]. U LC-MS nelze využít knihovnu spekter jako u GC, protože množství metabolitů je tak veliké, že není možné mít pro každý analyt spektrum v knihovně [31]. LC-MS se využívá hlavně pro analýzy, u kterých nevíme s jistotou, co hledáme nebo pro kvantifikaci sloučenin se známými fragmenty [40]. Dnes je LC-MS běžnou metodou, která se používá ve farmaceutické kvalitativní a kvantitativní analýze pro stanovení potencionálních léků a jejich metabolitů [31]. LC-MS je vhodná alternativa ke stopovým analýzám nukleosidů a nukleotidů [9].

1.6 Stanovení adenosindifosfátu a adenosintrifosfátu metodami HPLC

Nejčastěji používanou separační technikou pro stanovení adenosinfosfátů je vysokoúčinná kapalinová chromatografie, tj. HPLC [15]. Mezi metody HPLC, kterými byly stanovovány nukleotidy, patří zejména kapalinová chromatografie s reverzními fázemi, iontově výměnná chromatografie, iontově párová chromatografie a HILIC či afinitní

chromatografie [7,11,46]. Tradičně se pro separaci nukleotidů z komplexní matrice používala iontově výměnná chromatografie na pryskyřici [10,16,28]. Tato metoda má však nižší účinnost než separace při chromatografii s reverzní fází [41]. Iontově výměnná chromatografie a iontově párová chromatografie nejsou vždy kompatibilní s MS detekcí, protože se zde pro eluci nukleotidů v mobilní fázi používá velká koncentrace soli [17,28]. Chromatografie na vodné normální fázi podobně jako HILIC je nová metoda, při níž se používá fosfátový pufr s acetonitrilem v mobilní fázi a kapilární kolony na bázi oxidu titaničitého [10]. Tato metoda slouží jako vhodná alternativa k chromatografii s normálními fázemi a používá se k separaci polárních hydrofilních substituentů. Oproti klasické chromatografii s normálními fázemi má tento typ chromatografie výhodu v tom, že mobilní fáze s acetonitrilem a vodou zlepšuje rozpustnost polárních sloučenin oproti hexanové mobilní fázi, která se běžně používá u chromatografie s normálními fázemi. Další výhodou je, že složení mobilní fáze umožní hmotnostní detekci s dobrou citlivostí. Oproti chromatografii s reverzními fázemi funguje voda v mobilní fázi jako nejsilnější eluční činidlo.

Vzhledem ke své polaritě nejsou nukleotidy při RP-HPLC dobře zadržovány [39,42,51]. Bylo by žádoucí nalézt podmínky, které zlepší zadržení nukleotidů a také metodu, která by dokázala tyto velmi strukturně podobné sloučeniny odlišit [22,42]. Chemická podobnost, nestabilita, vysoká polarita, náboj a různá koncentrace v určitých situacích však analýzu těchto látek znesnadňuje [16]. Stanovení nukleotidů je mimo jiné náročné proto, že jsou v biologických vzorcích přítomné v malých koncentracích [42]. To vyžaduje speciální přípravu vzorků a použití velice citlivé a specifické metody [28,42]. ATP lze stanovovat i nepřímým stanovením množství kreatinkinasy, která přímo ovlivňuje hladinu ATP [8].

Stanovení koncentrace ADP a ATP slouží k pochopení energetického stavu buněk v organismu [7,42]. Zkoumání adenosindifosfátu a adenosintrifosfátu bylo prováděno i z důvodu ověření čerstvosti různých druhů rybiho masa [27,52]. Stanovení buněčného ATP se používá také jako ukazatel stanovení buněčné životaschopnosti [2]. Benzo[a]pyren může způsobovat smrt buněk v důsledku nekrózy nebo apoptózy. Rozdílná příčina smrti buňky závisí na množství dodané energie. Velká koncentrace ATP může způsobit smrt buňky apoptózou. Snížená dostupnost ATP nebo jeho neadekvátní množství pravděpodobně způsobuje smrt buňky nekrózou. Pro zjištění, zda příčinou smrti buněk je apoptóza nebo nekróza, však nestačí znát pouze množství ATP, ale je nutné znát i vztah mezi energetickým stavem buňky a stavem mrtvé buňky. Výsledky studie [2] pomohou k pochopení vlivu

benzo[a]pyrenu, který se vyskytuje např. v cigaretovém kouři nebo z výfuku aut, na energetický metabolismus.

1.7 Stanovení ADP a ATP jinými technikami než HPLC

Pro separaci nukleotidů sice někteří autoři používali kapilární elektroforézu, ale obecně se pro separaci těchto látek používají techniky chromatografické [17]. Kapilární elektroforéza je ekvivalentní ke kapalinové chromatografii, pokud jde o separace a citlivosti, ale není pro rutinní analýzy biologických vzorků tak robustní [22,41,46]. Využit lze rovněž enzymovou analýzu, bioluminiscenci, ^{31}P nukleární magnetickou rezonanci (NMR) nebo tenkovrstvou chromatografii [19,32]. Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí není vhodná pro málo těkavé a tepelně nestabilní látky jako jsou fosfátové sloučeniny [33,40]. Vysokoúčinné a rychlé analýzy, jako jsou například nukleární magnetická rezonance či přímé vstříkávání do hmotnostního spektrometru, se více využívají pro mnohokrát opakované analýzy než chromatografické techniky [31]. Hlavní výhodou NMR oproti HPLC je kapacita detekce a kvantifikované sekvenční změny [8]. NMR poskytuje celkovou informaci jako LC-MS a ukazuje se, že rozdílné kombinované techniky jsou pro analýzy výhodné [31]. Kombinace UV, MS a NMR lze použít pro strukturní analýzu rostlinných metabolitů. V budoucnu se uvažuje o spojení HPLC-NMR, které při zachování velmi dobré citlivosti slibuje zajistit přesnější identifikaci analytů.

1.8 Kvantifikace

Kvantitativní analýza u kapalinové chromatografie je snazší než u plynové, protože vzhledem k přítomnosti dávkovací smyčky dochází ke vstříknutí přesného objemu vzorku [23]. Kvantitativního měření se dosahuje měřením vnějšího standardu či kalibrační křivky. Limit detekce (LOD) je nejmenší detekovatelné množství analytu a je to nejmenší koncentrace, která může být věrohodně detekovatelná [21]. LOD se obvykle počítá jako poměr signál/šum minimálně 3:1. Limit kvantifikace (LOQ) je alespoň takové množství analytu, která může být věrohodně kvantifikována se specifickou mírou přesnosti a správnosti. Poměr signál/šum má být 10:1. LOQ je nejmenší koncentrace analytu, které dává odpověď a může být kvantifikováno. Obecně platí, že se zvyšujícím se množstvím nástřiku se snižuje LOD [9].

2. Cíl práce

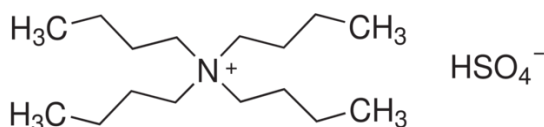
Cílem předkládané práce bylo nalézt vhodné podmínky vysokoúčinné kapalinové chromatografie pro stanovení dvou běžných nukleotidů adenosindifosfátu a adenosintrifosfátu. Dalším záměrem bylo analyzovat reálné vzorky citrusových plodů a extraktů z rostlin zjištěnou optimalizovanou metodou. Třetím cílem bylo zjistit limity detekce a stanovení analytů a tyto limity srovnat s hodnotami uváděnými v literatuře při použití podobných experimentálních podmínek. Zjištěné limity detekce a stanovení také sloužily k porovnání citlivosti testovaných detekčních technik.

3. Experimentální část

3.1 Vzorky a chemikálie

K analýze byly použity vzorky ATP a ADP (sodné soli nukleotidů z bakteriálního zdroje, čistota 97 %, Sigma Aldrich). Vzorek adenosindifosfátu byl bílý a měl pevnou „gumovitou“ strukturu. Adenosintrifosfát byla za laboratorních podmínek bílá krystalická látka. Oba nukleotidy byly dobře rozpustné ve vodě. ADP a ATP byly dlouhodobě skladovány v mrazničce. Nové roztoky vzorků byly připravovány denně čerstvé, aby nedocházelo k rozkladu analytů. Pevné ATP a ADP byly rozpuštěny ve vodě (koncentrace analytů byla $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$). Roztoky vzorků o nižších molárních koncentracích byly připraveny přesným ředěním mobilní fáze (80:20 (v/v) fáze A/fáze B).

Reálné vzorky mandarinky byly z odrůdy Nadorcott, zatímco pomeranč byl odrůda Navelate. Oba dva druhy ovoce pocházely ze Španělska. Reálné vzorky se získaly jako oranžová šťáva z odšťavňovače. Extrakty rostlin byly získány z Katedry biochemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze. Rostlinné extrakty byly zakalené zelené roztoky. Extrakty byly z rostliny *Nicotiana tabacum L.*, kultivar *CV Petit Havana SRI*. Vzorky rostlin byly extrakt HCl (I), extrakt HClO₄ (II), 1. extrakt NaOH (III), 2. extrakt NaOH (IV) a extrakt TRIS-acetát EDTA (V). Reálné vzorky citrusových plodů i rostlinných



Obrázek 11 Struktura iontově párového činidla, tetrabutylamonia hydrogensíranu (převzato z [65]).

extraktů byly centrifugovány po dobu 10 minut při 10 000 G. Následně byl vzorek roztoku nad peletou odebrán. U citrusových plodů byl vzorek ještě před vlastní analýzou přefiltrován přes Büchnerovu nálevku. U rostlinných extraktů byly vzorky v malém objemu, a proto byla zkoušena filtrace přes stříkačkový filtr. Tato filtrace nebyla úspěšná, protože se filtr zanášel. Z tohoto důvodu byl k analýze užit roztok vzorku bez přefiltrování.

Další použité chemikálie byly acetonitril HPLC-grade (Sigma Aldrich) a miliQ deionizovaná voda. Iontově párovým činidlem byl tetrabutylamonium hydrogensíran, tj. TBAS ($\pm 99,0$ % tetrabutylammonium bisulfate for IPC, Sigma Aldrich). Jeho struktura je uvedena na **obrázku 11**. Mobilní fáze dále obsahovala kyselinu fosforečnou (85% ortho-phosphoric acid p.a., Lachner) a hydroxid draselný p.a. (Lachema). Octan amonný a mravenčan amonný byly připraveny z CH_3COOH (99,7 %, A.C.S. reagent Sigma Aldrich), HCOOH (96 %, A.C.S. reagent Sigma Aldrich) a NH_4OH (25 %, Lachner).

3.2 Extrakce z rostlin

Postup k získání extraktů rostlin vycházel z literatury [53] a [54]. U extraktů I-IV se nejprve ve třecí misce zhomogenizovalo vždy 0,5 g rostlin tabáku a inaktivační činidlo. Jako kyselá činidla byly použity 1 M HClO_4 a 0,1 M HCl , zatímco zásadité činidlo bylo 0,1 M NaOH . Kyselých inaktivačních činidel se k rostlinám přidávalo vždy 1,5 ml a zásaditých 1 ml. Z důvodů odstranění fenolů, které by mohly rušit stanovení, byl do směsi dodán i polyvinylpyrrolidon. Dále se směs centrifugovala po dobu 15 minut při 16 600 G a při teplotě 4 °C. Poté se roztoky neutralizovaly. Pro neutralizaci kyseliny chloristé se do roztoku přidal 5 M K_2CO_3 . Neutralizace kyseliny chlorovodíkové probíhala působením 0,1 M NaOH a u hydroxidu sodného byla naopak použita 0,1 M HCl . Množství neutralizačních činidel se určovalo dle měření pH pomocí univerzálního indikátorového papírku. Po neutralizaci roztoků se do směsi přidával znovu polyvinylpyrrolidon a směs se opět centrifugovala za stejných podmínek jako v předchozím případě. U extraktu EDTA (V) se k rostlině tabáku přidalo 50 mM Tris-HCl (pH = 7,5) a 0,1 mM EDTA. Následně se do směsi dodal 0,1% (v/v) Triton X-100 a 10% (v/v) glycerol. Homogenát byl filtrován přes 2 vrstvy nylonové látky a byl centrifugován při 27 000 G po dobu 15 minut.

3.3 Přístroje

K analýzám jsme použili přístroj kapilární HPLC od firmy Agilent Technologies 1200 series (Waldbronn, SRN). Detektorem byl zvolen detektor diodového pole, a to od firmy Agilent ze stejné série. Výsledky byly zpracovány programem ChemStation (Agilent Technologies, Waldbronn, SRN). Přístroj HPLC pocházel od firmy Ecom (Praha, Česká republika). UV detektorem byl typ LCD 2084. Pumpa se nazývala Gradient pump Beta Ecom. Degaser nesl označení DG 3014. Dávkovací smyčka měla velikost 10 μ l. Výsledky byly zpracovávány počítačovým programem Clarity (DataApex, Česká republika).

Měření na hmotnostních spektrometrech byla prováděna ve firmě Zentiva, společnost skupiny Sanofi (U Kabelovny 130, Praha 10). Analýzy probíhaly s iontovou pastí LTQ-Orbitrap, model XL od firmy ThermoFisher Scientific (Waltham, MA, USA). Jako detektor byl použit detektor diodového pole Finnigan Surveyor PDA Plus detektor. Autosampler byl CTC analytics HTS Pal. Pumpa byla označena jako Flux instrument Rheos Allegro. Přístroje používaly počítačový program ThermoFisher Scientific XCalibur qual Browser (Waltham, MA, USA). LC-MS byl dodán firmou ThermoFisher Scientific (Waltham, MA, USA).

3.4 Optimální podmínky analýzy

Hledání vhodných experimentálních podmínek stanovení ADP a ATP vycházelo z literatury [55]. Separace adenosindifosfátu a adenosintrifosfátu na přístroji kapilární vysokoučinné chromatografie bylo dosaženo na koloně C₁₈ (150 x 0,5 mm, 5 μ m, Zorbax SB-C₁₈, Agilent). Mobilní fáze se sestávala z tetrabutylamonium bisulfátového pufru (tj. fáze A) a acetonitrilového pufru (tj. fáze B). Fáze A se skládala z 5,7 mmol·dm⁻³ tetrabutylamonium bisulfátu (TBAS) a 30,5 mmol·dm⁻³ KH₂PO₄ (pH = 5,8). Fáze B se skládala z 2:1 = acetonitril:fáze A. Dělení probíhalo při gradientové eluci (gradient je

Tabulka 1 Eluční gradient mobilní fáze v objemových procentech. Použitá kolona C₁₈ (Zorbax SB-C₁₈ Agilent, 5 μ m, 150 x 0,5 mm).

čas (min)	množství fáze A (obj. %)	množství fáze B (obj. %)
0,0	90	10
3,0	60	40
7,2	60	40
7,5	90	10
12,0	90	10

v **tabulce 1**). Průtok mobilní fáze byl $10 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$. Do systému bylo vždy dávkováno 500 nl vzorku pomocí autosampleru. Teplota kolony nebyla sledována. Analýzy byly prováděny u ADP o koncentraci $2,3 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ až $187 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Studované ATP mělo hodnotu koncentrace $2,0 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ až $158 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Signál byl měřen při vlnových délkách 210, 220, 254 a 260 nm. Celé spektrum vlnových délek bylo měřeno v rozsahu 210-400 nm.

Analýza ADP a ATP na klasickém HPLC chromatografu probíhala na koloně C₁₈ (RP-18e, LichroCart 125-4, Lichrospher 100, 5 μm , Merck). Mobilní fáze se sestávala z tetrabutylamonium bisulfátového pufru (tj. fáze A) a acetonitrilového pufru (tj. fáze B). Fáze A se skládala z $5,7 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ tetrabutylamonium bisulfátu (TBAS) a $30,5 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ KH₂PO₄ (pH = 5,8). Fáze B se skládala z 2:1 = acetonitril:fáze A. Dělení probíhalo při gradientové eluci, přičemž gradient je uveden v **tabulce 1**. Průtok mobilní fáze byl zajištěn na hodnotě $0,5 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Do systému se pomocí dávkovací smyčky dávkovalo 10 μl vzorku. UV detektor měřil signál při 260 nm.

Stanovení analytů pomocí LC-MS bylo prováděno za následujících podmínek. Nejprve se použila kolona C₁₈ (Kinetex, 2,6 μm , 150 x 4,6 mm, Phenomenex). Mobilní fází byla v tomto případě 99:1 (v/v) acetonitril/mravenčan amonný (pH = 6,7). Analýza probíhala při izokratické eluci. Průtok mobilní fáze byl 0,4 nebo 0,6 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Do systému bylo pomocí autosampleru dávkováno 2 nebo 5 μl vzorku. Další kolonou, která vedla k separaci analytů, byla fenyl-hexylová kolona (Luna, 5 μm , 250 x 4,6 mm, Phenomenex). Mobilní fáze se v tomto případě skládala z 95:5 (v/v) acetonitril/mravenčan amonný (pH = 6,7) a opět analýza probíhala při izokratické eluci. Průtok mobilní fáze byl zajištěn na hodnotě $0,6 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Autosampler nadávkoval vždy 2 μl vzorku. Poslední kolonou, při které bylo dosaženo separace adenosindifosfátu a adenosintrifosfátu, byla kolona Zic HILIC (150 x 4,6 mm; 3,5 μm , Peek HPLC column, Merck). Mobilní fáze měla konstantní složení a sestávala ze 70:30 (v/v) acetonitril/octan amonný (100 mM, pH = 5,35). Systémem protékala mobilní fáze o průtoku $0,7 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Dávkování 5 μl vzorku bylo zajištěno autosamplrem.

3.5 Příprava mobilní fáze s iontově párovým činidlem

Mobilní fáze se skládala z tetrabutylamonium bisulfátového pufru (tj. TBAS pufr) a acetonitrilového pufru (tj. ACN pufru). pH TBAS pufru bylo 5,8 a obsahoval $5,7 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ tetrabutylamonium bisulfát a $30,5 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ fosforečnan draselný. Základem pro přípravu fosforečnanu draselného byla kyselina fosforečná a 2M hydroxid draselný. Jeho příprava probíhala tak, že se nejprve vypočetlo množství kyseliny fosforečné (hustota = $1,71 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$),

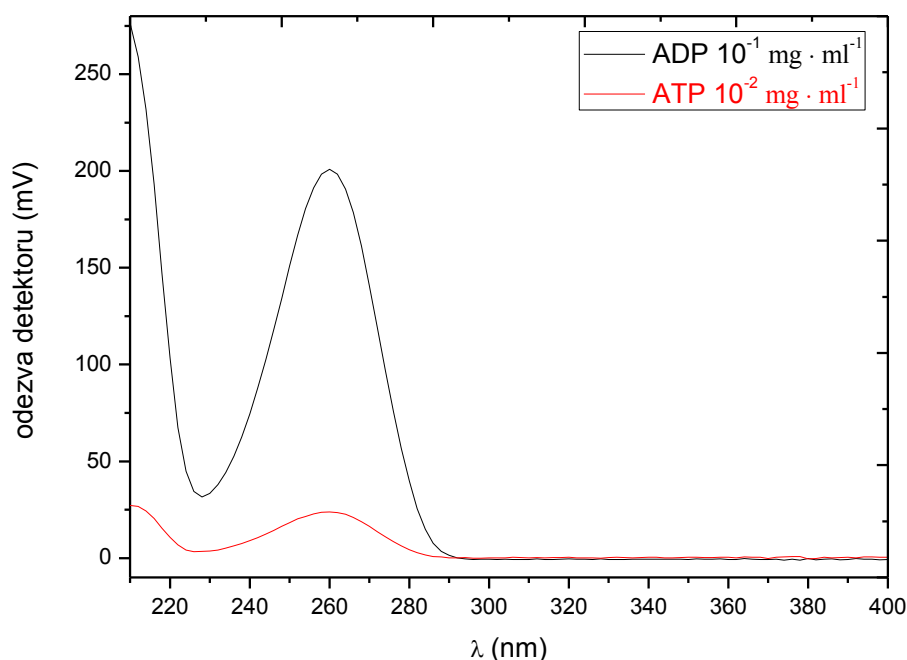
které se přidalo asi do 580 ml miliQ deionizované vody (tj. 1,049 ml) a následně byl roztok titrován hydroxidem draselným až do dosažení hodnoty pH 5,8. Dále se do roztoku jako iontově párové činidlo přidával tetrabutylamonium bisulfát. Tento přírůstek snížil pH, a proto se znovu roztok titroval KOH až do hodnoty pH = 5,8. Nakonec byl celý roztok doplněn miliQ deionizovanou vodou do 600 ml. Měření pH probíhalo pomocí pH-metru. ACN pufr obsahoval acetonitril a tetrabutylamonium bisulfátový pufr v poměru 2:1 (v/v). Mobilní fáze byla uchovávána v ledničce a každý týden byla připravena čerstvá, aby se zabránilo jejímu stárnutí.

4. Výsledky a diskuze

4.1 UV spektra ADP a ATP

Adenosindifosfát a adenosintrifosfát jsou aktivní v ultrafialové oblasti, a tudíž je lze detekovat UV detekcí [56]. Nejprve byla proměřena spektra obou analytů v rozmezí 210-400 nm pomocí kapilární vysokoúčinné kapalinové chromatografie (**obrázek 12**). Z absorpčního maxima byla získána vlnová délka, při které jsou analýzy nejcitlivější. Pro oba dva analyty byla tato vlnová délka určena na hodnotu 260 nm. Experimentálně bylo také zjištěno, že při měření o vlnové délce 254 nm bylo dosaženo velmi podobných výsledků. Měření detektorem s diodovým polem bylo prováděno při vlnových délkách 210, 220, 254 a 260 nm, ale uvažovány byly pouze výsledky získané detektorem diodového pole při 254 a 260 nm. UV detektor snímal signál vždy při 260 nm.

Pro UV detekci se při analýzách ADP a ATP uvádí v literatuře vlnová délka o hodnotě 254 nm [19,56,57]. Další autoři stanovovali ADP a ATP při vlnové délce 257 nm nebo při 260 nm [15,58,59]. Oba analyty však byly stanovovány i při nižších vlnových délkách, například při 210, 214 a 220 nm [8,10,42]. Pro stanovení ADP a ATP a detekci pomocí DAD se pracovalo při 265 nm [61].

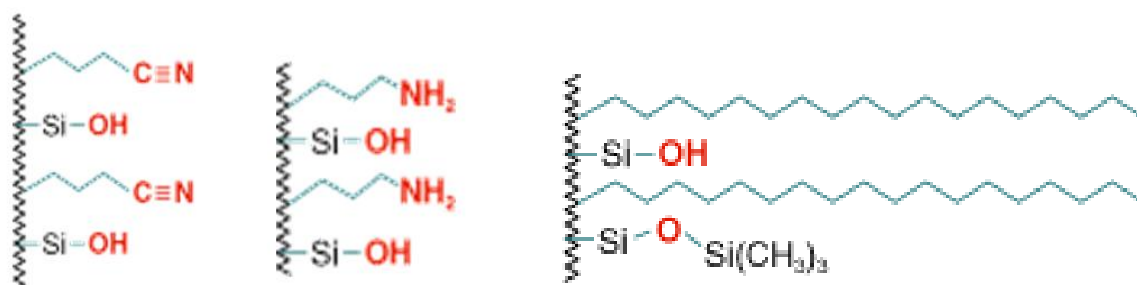


Obrázek 12 Spektrum ADP a ATP. Měřeno na kapilární HPLC s detektorem diodového pole v rozmezí 210-400 nm. Kolona C_{18} (150 x 0,5 mm, 5 μ m, Zorbax SB- C_{18} , Agilent). Mobilní fáze se sestávala z tetrabutylamonium bisulfátového pufru (tj. fáze A) a acetonitrilového pufru (tj. fáze B). Fáze A se skládala z 5,7 mmol·dm⁻³ tetrabutylamonium bisulfátu (TBAS) a 30,5 mmol·dm⁻³ KH₂PO₄ (pH = 5,8). Fáze B se skládala z 2:1 = acetonitril:fáze A. Dělení probíhalo při gradientové eluci (0,0 min 90 % fáze A; 3,0 min 60 % fáze A; 7,2 min 60 % fáze A; 7,5 min 90 % fáze A; 12,0 min 90 % fáze A). Průtok mobilní fáze byl 10 μ l·min⁻¹. Do systému bylo vždy dávkováno 500 nl vzorku pomocí autosampleru. Teplota kolony nebyla sledována. Měření spektra bylo prováděno pro ADP o koncentraci $1 \cdot 10^{-1}$ mg·ml⁻¹, tj. 234 μ mol·dm⁻³ a pro ATP o velikosti koncentrace $1 \cdot 10^{-2}$ mg·ml⁻¹, tedy 19,7 μ mol·dm⁻³.

4.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s UV detektorem

4.2.1 Analýza adenosindifosfátu a adenosintrifosfátu pomocí metody HPLC-UV

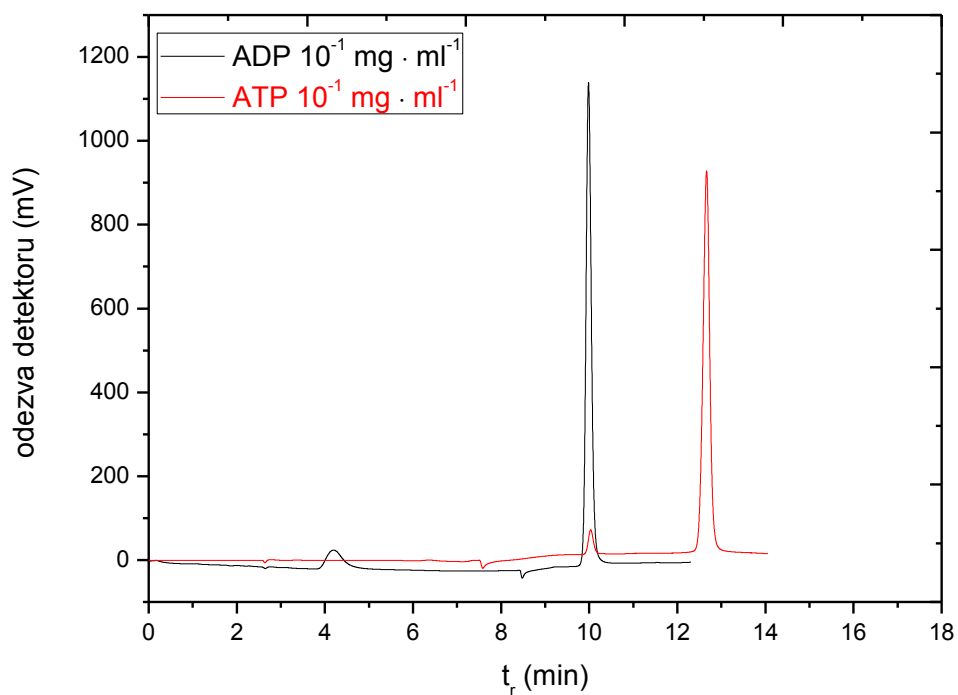
Pro stanovení nukleotidů se nejprve použila kyanopropylová kolona, jejíž struktura je uvedena na **obrázku 13**. Na této koloně byly jako mobilní fáze vyzkoušeny směsi acetonitrilu nebo methanolu s vodou v různém poměru. Dále byly testovány octanové sole o kyselém až neutrálním pH v poměru s acetonitrilem. Nakonec se použila mobilní fáze, která sestávala z methanolu a fosforečnanového pufru o pH 7,45. Všechny sole měly koncentraci 10 mM. Žádné z těchto experimentálních podmínek však nevedly k separaci ADP a ATP. To bylo důvodem pro vyzkoušení aminopropylové kolony. Její struktura je na **obrázku 13**. Mobilní fáze o složení acetonitril s vodou ani acetonitril s octanovými solemi o koncentraci 10 mM a pH ve všech třech oblastech acidity/bazicity neposkytovaly odpovídající výsledky. Od chromatografie s reverzními fázemi se tedy přešlo k iontově párové chromatografii. Pro



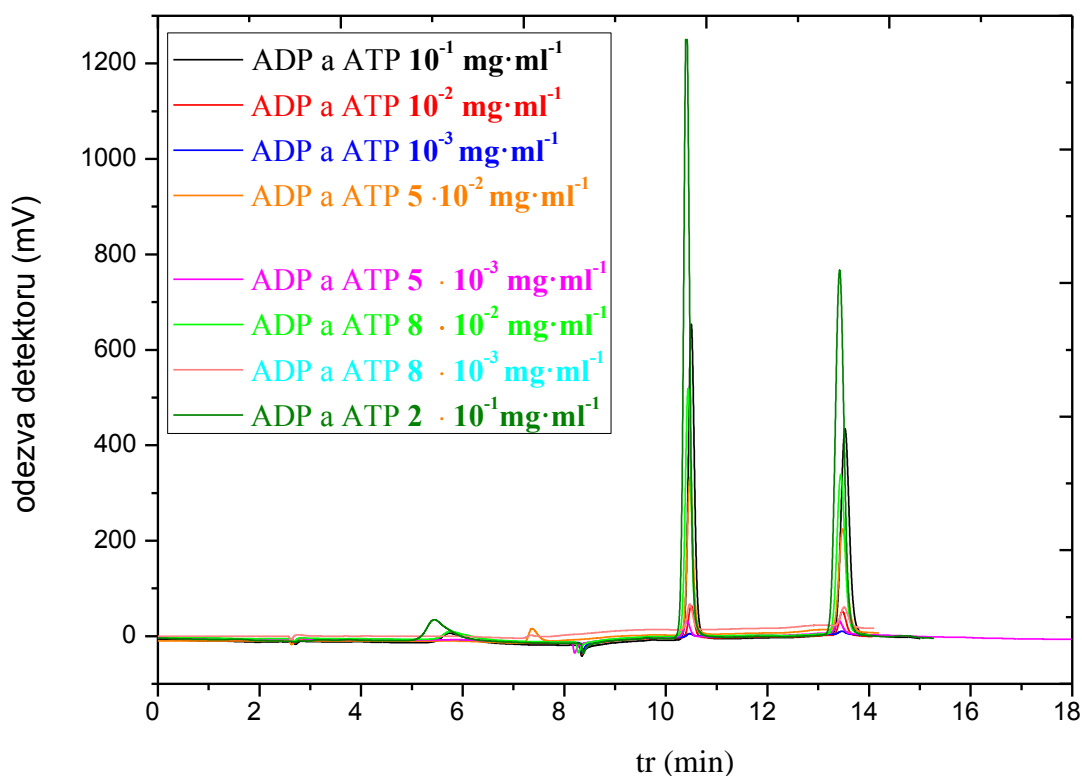
Obrázek 13 Struktura povrchu kyanopropylové, aminopropylové kolony a kolony C₁₈ (převzato z [64]).

určení vhodných experimentálních podmínek se vycházelo z článku [55]. Pro stanovení analytů se vyzkoušela kolona C₁₈ (**obrázek 13**). Mobilní fáze se skládala z tetrabutylamonium bisulfátového pufru (tj. fáze A) a acetonitrilového pufru (tj. fáze B). Fáze A obsahovala 5,7 mmol·dm⁻³ tetrabutylamonium bisulfát (TBAS) jako iontově párové činidlo a 30,5 mmol·dm⁻³ KH₂PO₄ (pH = 5,8). Fáze B sestávala z 2:1 = acetonitril:fáze A. Dělení probíhalo při gradientové eluci uvedené v **tabulce 1** (tj. 0,0 min 90 % fáze A; 3,0 min 60 % fáze A; 7,2 min 60 % fáze A; 7,5 min 90 % fáze A; 12,0 min 90 % fáze A). Průtok mobilní fáze byl zajištěn na hodnotě 0,5 ml·min⁻¹. Do systému bylo vždy dávkováno 10 μl vzorku pomocí dávkovací smyčky. Teplota kolony sledována nebyla. K dosažení co nejcitlivějšího měření byl signál UV detektorem snímán při 260 nm. Chromatogram odpovídající analýze obou nukleotidů je uveden na **obrázku 14**.

Kalibrační závislost směsí analytů a jejich separace je uvedena na **obrázku 15**. Dělení probíhalo za stejných podmínek, jako tomu bylo u analýz jednotlivých nukleotidů. V chromatogramu byla zjištěna přímá úměra mezi koncentrací analytů a výškou jejich píků. Přepočty koncentrací analytů ve směsi jsou uvedeny v **tabulce 2**.



Obrázek 14 Analýza adenosindifosfátu a adenosintrifosfátu. Měřeno HPLC-UV při 260 nm. Použitá kolona C₁₈ (RP-18e, LichroCart 125-4, Lichrospher 100, 125 mm, 5 μm, Merck). Mobilní fáze se sestávala z tetrabutylamonium bisulfátového pufru (tj. fáze A) a acetonitrilového pufru (tj. fáze B). Fáze A se skládala z 5,7 mmol·dm⁻³ tetrabutylamonium bisulfátu (TBAS) a 30,5 mmol·dm⁻³ KH₂PO₄ (pH = 5,8). Fáze B se skládala z 2:1 = acetonitril:fáze A. Dělení probíhalo při gradientové eluci (0,0 min 90 % fáze A; 3,0 min 60 % fáze A; 7,2 min 60 % fáze A; 7,5 min 90 % fáze A; 12,0 min 90 % fáze A). Průtok mobilní fáze byl 0,5 ml·min⁻¹. Dávkovaný objem byl 10 μl. Teplota kolony nebyla sledována. Koncentrace ADP byla 1 · 10⁻¹ mg·ml⁻¹, to odpovídá 234 μmol·dm⁻³. Koncentrace adenosintrifosfátu byla 1 · 10⁻¹ mg·ml⁻¹, tedy 197 μmol·dm⁻³.



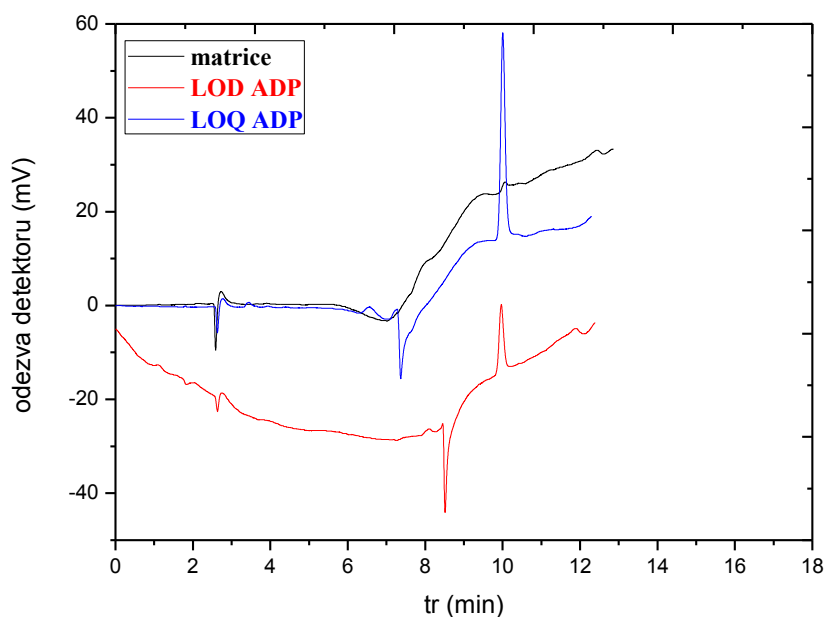
Obrázek 15 Kalibrační závislost směsi ADP a ATP o různých koncentracích. Měřeno HPLC-UV při 260 nm. Použitá kolona C_{18} (RP-18e, LichroCart 125-4, Lichrospher 100, 125 mm, 5 μm , Merck). Mobilní fáze se sestávala z tetrabutylamonium bisulfátového pufru (tj. fáze A) a acetonitrilového pufru (tj. fáze B). Fáze A se skládala z 5,7 $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ tetrabutylamonium bisulfátu (TBAS) a 30,5 $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ KH_2PO_4 (pH = 5,8). Fáze B se skládala z 2:1 = acetonitril:fáze A. Dělení probíhalo při gradientové eluci (0,0 min 90 % fáze A; 3,0 min 60 % fáze A; 7,2 min 60 % fáze A; 7,5 min 90 % fáze A; 12,0 min 90 % fáze A). Průtok mobilní fáze byl 0,5 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Dávkovaný objem byl 10 μl . Teplota kolony nebyla sledována. Koncentrace analytů se pohybovala v rozmezí $1 \cdot 10^{-3}$ - $2 \cdot 10^{-1} \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, tj. pro ADP 2,34-468 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ a pro ATP 1,97-395 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$.

Tabulka 2 Přepočty koncentrací analytů ve směsi.

koncentrace analytů ve směsi ($\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$)	c_{ADP} ve směsi ($\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$)	c_{ATP} ve směsi ($\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$)
$2,0 \cdot 10^{-1}$	468	395
$1,0 \cdot 10^{-1}$	234	197
$8,0 \cdot 10^{-2}$	187	158
$5,0 \cdot 10^{-2}$	117	98,6
$1,0 \cdot 10^{-2}$	23,4	19,7
$8,0 \cdot 10^{-3}$	18,7	15,8
$5,0 \cdot 10^{-3}$	11,7	9,86
$1,0 \cdot 10^{-3}$	2,34	1,97

4.2.2. Limit detekce a limit stanovení ADP a ATP metodou HPLC-UV

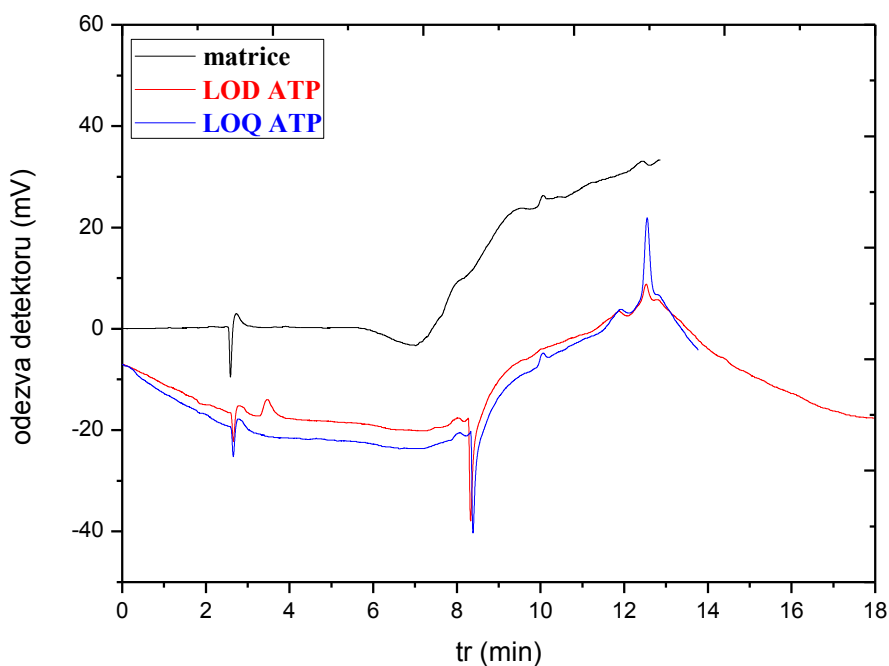
Limit detekce (LOD) je definován jako signál/šum větší než 3:1. Limit stanovení (LOQ) lze určit z poměru signál/šum větší než 10:1. Tímto přístupem byly získány limity detekce a stanovení analytů za použití nalezených optimálních podmínek (viz **tabulka 3**). Na **obrázku 16** je znázorněn chromatogram ADP o koncentracích odpovídajících LOD a LOQ. Chromatogram obsahující adenosintrifosfát o koncentracích, které přísluší jeho limitu detekce a stanovení, je na **obrázku 17**.



Obrázek 16 Limity detekce a stanovení adenosindifosfátu. Měřeno HPLC-UV při 260 nm. Použitá kolona C₁₈ (RP-18e, LichroCart 125-4, Lichrospher 100, 125 mm, 5 μm, Merck). Mobilní fáze se sestávala z tetrabutylamonium bisulfátového pufru (tj. fáze A) a acetonitrilového pufru (tj. fáze B). Fáze A se skládala z 5,7 mmol·dm⁻³ tetrabutylamonium bisulfátu (TBAS) a 30,5 mmol·dm⁻³ KH₂PO₄ (pH = 5,8). Fáze B se skládala z 2:1 = acetonitril:fáze A. Dělení probíhalo při gradientové eluci (0,0 min 90 % fáze A; 3,0 min 60 % fáze A; 7,2 min 60 % fáze A; 7,5 min 90 % fáze A; 12,0 min 90 % fáze A). Průtok mobilní fáze byl 0,5 ml·min⁻¹. Dávkový objem byl 10 μl. Teplota kolony nebyla sledována. Koncentrace, která odpovídá LOD adenosindifosfátu, je 1,5 · 10⁻³ mg·ml⁻¹, tj. 3,5 μmol·dm⁻³. Limit stanovení stejné látky je 4,0 · 10⁻³ mg·ml⁻¹, tj. 9,4 μmol·dm⁻³.

Tabulka 3 Limity detekce a stanovení ADP a ATP. Měřeno HPLC-UV při 260 nm. Použitá kolona C₁₈ (RP-18e, LichroCart 125-4, Lichrospher 100, 150 mm, 5 μm, Merck). Mobilní fáze se sestávala z tetrabutylamonium bisulfátového pufru (tj. fáze A) a acetonitrilového pufru (tj. fáze B). Fáze A se skládala z 5,7 mmol·dm⁻³ tetrabutylamonium bisulfátu (TBAS) a 30,5 mmol·dm⁻³ KH₂PO₄ (pH = 5,8). Fáze B se skládala z 2:1 = acetonitril:fáze A. Dělení probíhalo při gradientové eluci (0,0 min 90 % fáze A; 3,0 min 60 % fáze A; 7,2 min 60 % fáze A; 7,5 min 90 % fáze A; 12,0 min 90 % fáze A). Průtok mobilní fáze byl 0,5 ml·min⁻¹. Dávkovaný objem byl 10 μl. Teplota kolony nebyla sledována.

analyt	limity	mg·ml ⁻¹	μmol·dm ⁻³
ADP	LOD	$1,5 \cdot 10^{-3}$	3,5
	LOQ	$4,0 \cdot 10^{-3}$	9,4
ATP	LOD	$4,0 \cdot 10^{-4}$	0,8
	LOQ	$1,5 \cdot 10^{-3}$	3,0

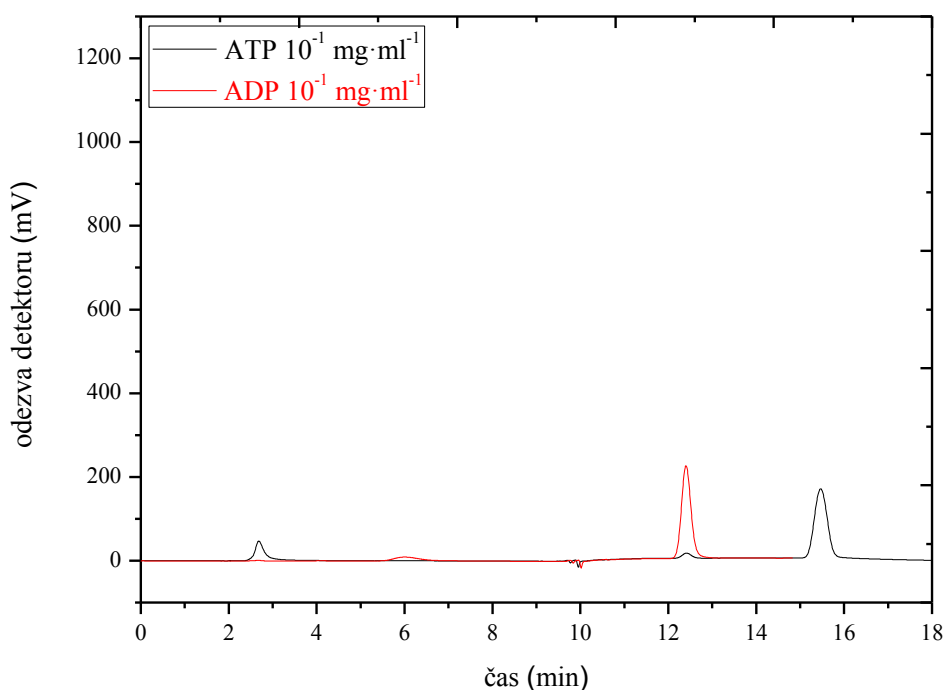


Obrázek 17 LOD a LOQ adenosintrifosfátu. Měřeno HPLC-UV při 260 nm. Použitá kolona C₁₈ (RP-18e, LichroCart 125-4, Lichrospher 100, 125 mm, 5 μm, Merck). Mobilní fáze se sestávala z tetrabutylamonium bisulfátového pufru (tj. fáze A) a acetonitrilového pufru (tj. fáze B). Fáze A se skládala z 5,7 mmol·dm⁻³ tetrabutylamonium bisulfátu (TBAS) a 30,5 mmol·dm⁻³ KH₂PO₄ (pH = 5,8). Fáze B se skládala z 2:1 = acetonitril:fáze A. Dělení probíhalo při gradientové eluci (0,0 min 90 % fáze A; 3,0 min 60 % fáze A; 7,2 min 60 % fáze A; 7,5 min 90 % fáze A; 12,0 min 90 % fáze A). Průtok mobilní fáze byl 0,5 ml·min⁻¹. Dávkovaný objem byl 10 μl. Teplota kolony nebyla sledována. LOD adenosintrifosfátu odpovídá $4,0 \cdot 10^{-4}$ mg·ml⁻¹, tj. 0,8 μmol·dm⁻³. Limit stanovení ATP je $1,5 \cdot 10^{-3}$ mg·ml⁻¹, tj. 3,0 μmol·dm⁻³.

4.3 Kapilární HPLC s detektorem diodového pole

4.3.1 Analýza ADP a ATP metodou kapilární HPLC-DAD

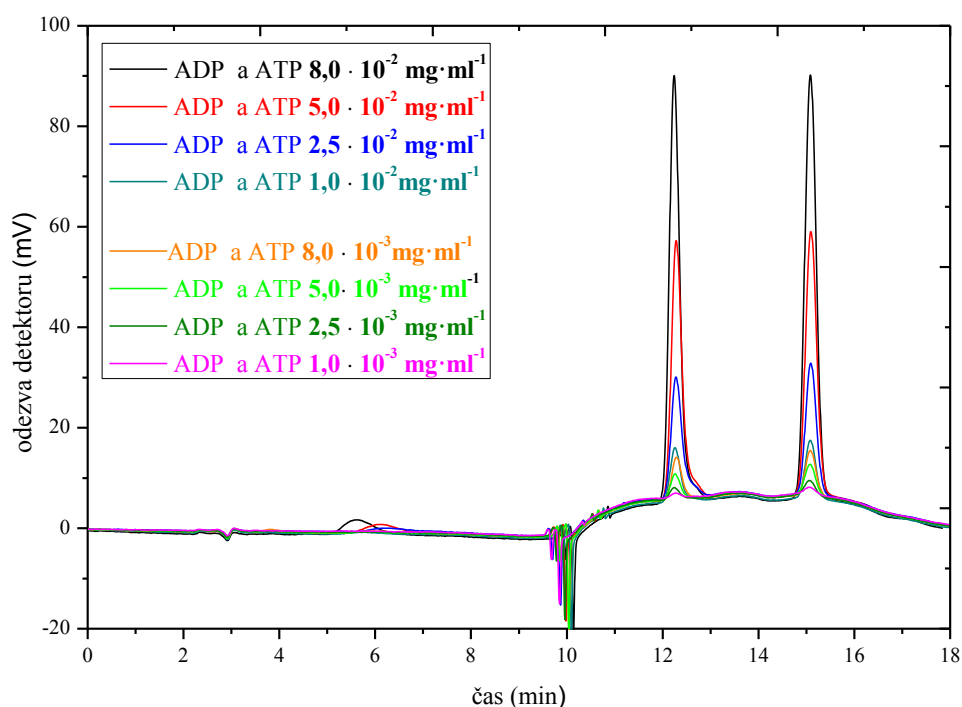
Analýza byla prováděna na koloně C₁₈. Ke stanovení zkoumaných nukleotidů byla nejprve zkoušena mobilní fáze o složení 80:20 (v/v) acetonitril/voda. Poté se do obou složek mobilní fáze přidalo 0,1 hmotnostního procenta kyseliny mravenčí. Tato okyselená mobilní fáze byla vyzkoušena k měření ADP a ATP v poměru 80:20 (v/v) acetonitril s 0,1 hm.% HCOOH/voda s 0,1 hm.% HCOOH; 60:40 (v/v) acetonitril s 0,1 hm.% HCOOH/voda s 0,1 hm.% HCOOH a 40:60 (v/v) acetonitril s 0,1 hm.% HCOOH/voda s 0,1 hm.% HCOOH. Separace analytů však při použití těchto mobilních fází nebyla úspěšná. Pro stanovení ADP a ATP se tedy dále vycházelo z podmínek uvedených v literatuře [55]. Mobilní fáze se sestávala z tetrabutylamonium bisulfátového pufru (tj. fáze A) a acetonitrilového pufru (tj. fáze B). Fáze A se skládala z 5,7 mmol·dm⁻³ tetrabutylamonium bisulfátu (TBAS) a 30,5 mmol·dm⁻³ KH₂PO₄ (pH = 5,8). Fáze B se skládala z 2:1 = acetonitril:fáze A. Nejprve byla zkoušena



Obrázek 18 Analýza adenosindifosfátu a adenosintrifosfátu. Měřeno na kapilárním HPLC s DAD detektorem, signál snímán při 254 nm. Kolona C₁₈ (150 x 0,5 mm, 5 μm, Zorbax SB-C₁₈, Agilent). Mobilní fáze se sestávala z tetrabutylamonium bisulfátového pufru (tj. fáze A) a acetonitrilového pufru (tj. fáze B). Fáze A se skládala z 5,7 mmol·dm⁻³ tetrabutylamonium bisulfátu (TBAS) a 30,5 mmol·dm⁻³ KH₂PO₄ (pH = 5,8). Fáze B se skládala z 2:1 = acetonitril:fáze A. Dělení probíhalo při gradientové eluci (0,0 min 90 % fáze A; 3,0 min 60 % fáze A; 7,2 min 60 % fáze A; 7,5 min 90 % fáze A; 12,0 min 90 % fáze A). Průtok mobilní fáze byl 10 μl·min⁻¹. Do systému bylo vždy dávkováno 500 nl vzorku pomocí autosampleru. Teplota kolony nebyla sledována. Měření bylo prováděno pro ADP o koncentraci 1 · 10⁻¹ mg·ml⁻¹, tj. 234 μmol·dm⁻³ a pro ATP o velikosti koncentrace 1 · 10⁻¹ mg·ml⁻¹, což odpovídá 197 μmol·dm⁻³.

izokratická eluce mobilní fáze o složení 80:20 (v/v) fáze A/fáze B. K uspokojivým výsledkům ale tyto podmínky nevedly, a proto se přistoupilo k zavedení elučního gradientu. Vzhledem k tomu, že byla použita třikrát delší kolona oproti článku [55], bylo nutné k dosažení odpovídajících výsledků časy v gradientu třikrát prodloužit. Získaný chromatogram analýzy adenosindifosfátu a adenosintrifosfátu je uveden na **obrázku 18**.

Separace směsí analytů a proměření jejich kalibračních závislostí bylo provedeno za stejných podmínek jako analýzy jednotlivých nukleotidů. Jejich chromatogram je znázorněn na **obrázku 19**. Z chromatogramu vyplývá, že s rostoucí koncentrací roste i výška píku. Přepočet koncentrací analytů ve směsi je uveden v **tabulce 4**.



Obrázek 19 Kalibrační závislost směsí adenosindifosfátu a adenosintrifosfátu. Měřeno na kapilárním HPLC s DAD detektorem, který snímal signál při 254 nm. Použitá kolona C₁₈ (Zorbax SB-C₁₈ Agilent, 5 μm, 150 x 0,5 mm). Mobilní fáze se sestávala z tetrabutylamonium bisulfátového pufru (tj. fáze A) a acetonitrilového pufru (fáze B). Fáze A se skládala z 5,7 mmol·dm⁻³ tetrabutylamonium bisulfátu (TBAS) a 30,5 mmol·dm⁻³ KH₂PO₄ (pH = 5,8). Fáze B se skládala 2:1 = acetonitril:fáze A. Dělení probíhalo při gradientové eluci (0,0 min 90 % fáze A; 3,0 min 60 % fáze A; 7,2 min 60 % fáze A; 7,5 min 90 % fáze A; 12,0 min 90 % fáze A). Průtok mobilní fáze byl 10 μl·min⁻¹. Dávkovaný objem byl 500 nl. Teplota kolony nebyla sledována. Koncentrace analytů byla v rozmezí 1 · 10⁻³ - 8 · 10⁻² mg·ml⁻¹, tedy 2,34-187 μmol·dm⁻³ pro ADP a 1,97-158 μmol·dm⁻³ pro ATP.

Tabulka 4 Přepočty koncentrací analytů ve směsi.

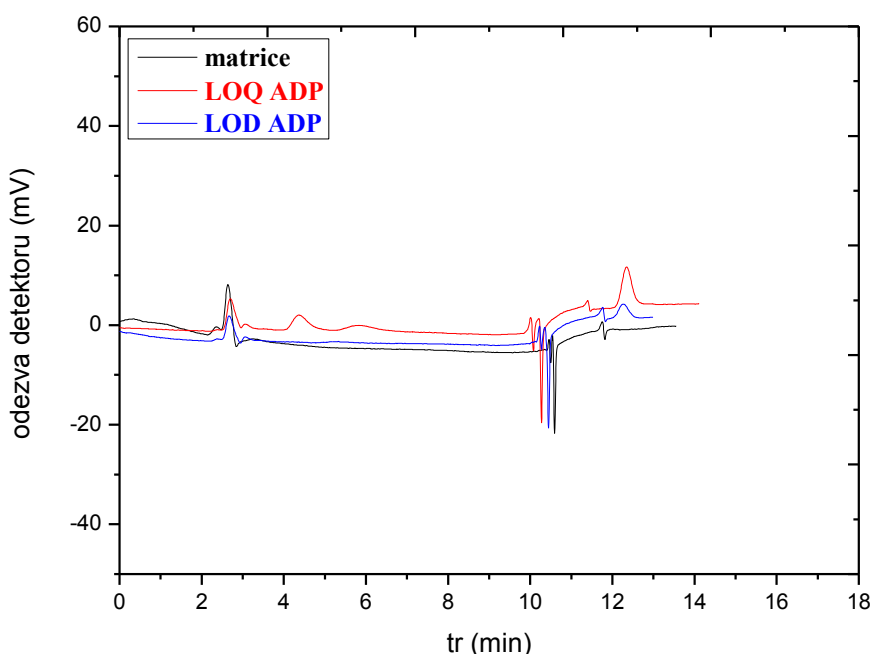
koncentrace analytů ve směsi (mg·ml⁻¹)	c_{ADP} ve směsi (μmol·dm⁻³)	c_{ATP} ve směsi (μmol·dm⁻³)
8,0 · 10⁻²	187	157
5,0 · 10⁻²	117	98,6
2,5 · 10⁻²	58,6	49,3
1,0 · 10⁻²	23,4	19,7
8,0 · 10⁻³	18,7	15,8
5,0 · 10⁻³	11,7	9,86
2,5 · 10⁻³	5,86	4,93
1,0 · 10⁻³	2,34	1,97

Tabulka 5 Limity detekce a limity stanovení ADP a ATP. Měřeno na kapilárním HPLC s DAD detektorem, který snímal signál při 260 nm. Použitá kolona byla C₁₈ (Zorbax SB-C₁₈ Agilent, 5 μm, 150 x 0,5 mm). Mobilní fáze se sestávala z tetrabutylamonium bisulfátového pufru (fáze A) a acetonitrilového pufru (fáze B). Fáze A se skládala z 5,7 mmol·dm⁻³ tetrabutylamonium bisulfátu (TBAS) a 30,5 mmol·dm⁻³ KH₂PO₄ (pH = 5,8). Fáze B se skládala 2:1 = acetonitril:fáze A. Dělení probíhalo při gradientové eluci (0,0 min 90 % fáze A; 3,0 min 60 % fáze A; 7,2 min 60 % fáze A; 7,5 min 90 % fáze A; 12,0 min 90 % fáze A). Průtok mobilní fáze byl 10 μl·min⁻¹. Dávkovaný objem byl 500 nl. Teplota kolony nebyla sledována.

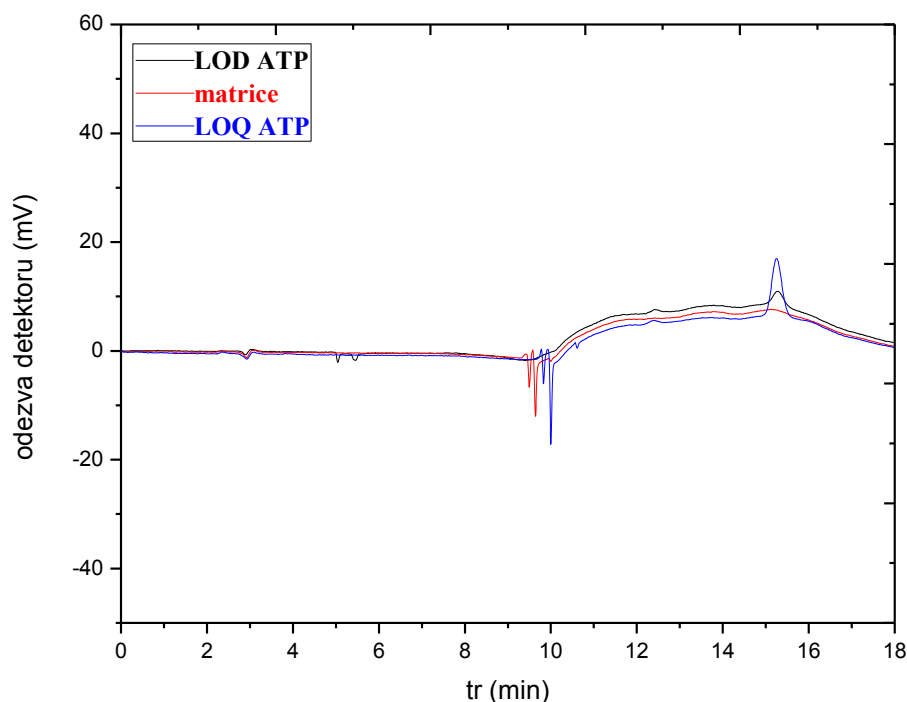
analyt	Limity	mg·ml⁻¹	μmol·dm⁻³
ADP	LOD	6,0 · 10 ⁻⁴	1,4
	LOQ	3,0 · 10 ⁻³	7,0
ATP	LOD	1,0 · 10 ⁻³	2,0
	LOQ	5,0 · 10 ⁻³	9,9

4.2.2 Limity detekce a stanovení analytů pomocí kapilární HPLC-DAD

Stanovení limitů detekce a limitů stanovení pro ADP a ATP byly prováděny tak, že se nejprve zjistil šum, tedy velikost signálu pro matrici, ve které byly rozpuštěny analyty. Tento šum byl následně znásoben třikrát pro zjištění limitu detekce a desetkrát pro určení limitu stanovení. Limity detekce a stanovení byly určeny experimentálně vyhledáním signálu koncentrace analytů, který by dosahoval alespoň tohoto znásobeného signálu šumu. LOD a LOQ stanovovaných nukleotidů jsou uvedeny v **tabulce 5**. Na **obrázcích 20** a **21** jsou zaznamenány chromatogramy, ve kterých jsou uvedeny limity LOD a LOQ adenosindifosfátu a adenosintrifosfátu.



Obrázek 20 Limity detekce a limity stanovení adenosindifosfátu. Měřeno na kapilárním HPLC s DAD detektorem, který snímal signál při 260 nm. Použitá kolona byla C₁₈ (Zorbax SB-C₁₈ Agilent, 5 μm, 150 x 0,5 mm). Mobilní fáze se sestávala z tetrabutylamonium bisulfátového pufru (fáze A) a acetonitrilového pufru (fáze B). Fáze A se skládala z 5,7 mmol·dm⁻³ tetrabutylamonium bisulfátu (TBAS) a 30,5 mmol·dm⁻³ KH₂PO₄ (pH = 5,8). Fáze B se skládala 2:1 = acetonitril:fáze A. Dělení probíhalo při gradientové eluci (0,0 min 90 % fáze A; 3,0 min 60 % fáze A; 7,2 min 60 % fáze A; 7,5 min 90 % fáze A; 12,0 min 90 % fáze A). Průtok mobilní fáze byl 10 μl·min⁻¹. Dávkovaný objem byl 500 nl. Teplota kolony nebyla sledována. LOD adenosindifosfátu je 6,0 · 10⁻⁴ mg·ml⁻¹, tj. 1,4 μmol·dm⁻³. Limit stanovení stejné látky je 3,0 · 10⁻³ mg·ml⁻¹, tj. 7,0 μmol·dm⁻³.



Obrázek 21 Limity detekce (LOD) a limity stanovení (LOQ) adenosintrifosfátu. Měřeno na kapilárním HPLC s DAD detektorem, který snímal signál při 260 nm. Použitá kolona byla C₁₈ (Zorbax SB-C₁₈ Agilent, 5 μm, 150 x 0,5 mm). Mobilní fáze se sestávala z tetrabutylamonium bisulfátového pufru (fáze A) a acetonitrilového pufru (fáze B). Fáze A se skládala z 5,7 mmol·dm⁻³ tetrabutylamonium bisulfátu (TBAS) a 30,5 mmol·dm⁻³ KH₂PO₄ (pH = 5,8). Fáze B se skládala 2:1 = acetonitril:fáze A. Dělení probíhalo při gradientové eluci (0,0 min 90 % fáze A; 3,0 min 60 % fáze A; 7,2 min 60 % fáze A; 7,5 min 90 % fáze A; 12,0 min 90 % fáze A). Průtok mobilní fáze byl 10 μl·min⁻¹. Dávkovaný objem byl 500 nl. Teplota kolony nebyla sledována. Koncentrace, která odpovídá LOD adenosintrifosfátu je 1,0 · 10⁻³ mg·ml⁻¹, tj. 2,0 μmol·dm⁻³. Limit stanovení stejné látky je 5,0 · 10⁻³ mg·ml⁻¹, tj. 9,9 μmol·dm⁻³.

4.4 Porovnání výsledků získaných metodami HPLC-UV a kapilární HPLC-DAD včetně srovnání s literaturou

Retenční časy obou metod poskytují velmi podobné hodnoty do 15 minut od začátku analýzy (viz **tabulka 6**). Při určování limitů detekce a limitů stanovení analytů, získaných metodami HPLC-UV a kapilární HPLC s detektorem diodového pole, byl signál zaznamenáván vždy při 260 nm. Z porovnání výsledných limitů detekce a stanovení ADP a ATP uvedených v **tabulce 7** vyplývá, že obě metody poskytují LOD a LOQ řádově v jednotkách μmol·dm⁻³ koncentrace. Obě metody nabízejí velmi podobné limity detekce a stanovení adenosindifosfátu a adenosintrifosfátu, dosahují tedy srovnatelné citlivosti měření.

Buchholz a kol. uvádějí limity detekce u stanovení ADP a ATP metodou HPLC-UV o velikosti 0,63 mmol·dm⁻³ [37]. Další autoři stanovili limit detekce podobnou metodou pro ADP jako 0,1 mg·l⁻¹ (tj. 0,23 μmol·dm⁻³) a LOD pro ATP byl určen na hodnotu 0,11 mg·l⁻¹ (tj. 0,22 μmol·dm⁻³) [55]. Tito autoři také dosáhli limitu stanovení pro ADP o velikosti 0,32 mg·l⁻¹ (tj. 0,75 μmol·dm⁻³) a limitu stanovení pro ATP jako 0,29 mg·l⁻¹

($0,57 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$). Obdobných výsledků bylo dosaženo i ve studii Coolena a kol., kteří zjistili LOD pro ADP jako $0,072 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ a LOD pro ATP jako $0,049 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ [18]. Stejný vědecký tým dosáhl limitu stanovení pro adenosindifosfát při hodnotě koncentrace o velikosti $0,239 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ a LOQ adenosintrifosfátu byl určen jako $0,162 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Metodou iontově párové chromatografie s detekcí v ultrafialové oblasti byl získán limit detekce s hodnotou $0,5 \text{ ng/kolona}$ pro ADP a pro ATP $0,7 \text{ ng/kolona}$, zatímco limit kvantifikace byl pro ADP $1,2 \text{ ng/kolona}$ a pro ATP $1,6 \text{ ng/kolona}$ [42]. Při porovnání s literaturou jsou námi zjištěné limity detekce a stanovení nepatrně vyšší nebo srovnatelné s LOD a LOQ získanými obdobnými metodami.

Tabulka 6 Retenční časy adenosindifosfátu a adenosintrifosfátu. Měření HPLC-UV při 260 nm. Použitá kolona C_{18} (RP-18e, LichroCart 125-4, Lichrospher 100, 125 mm, 5 μm , Merck). Průtok mobilní fáze byl $0,5 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Dávkovaný objem byl 10 μl . Měření na kapilárním HPLC s DAD detektorem, který snímal signál při 260 nm. Použitá kolona byla C_{18} (Zorbax SB- C_{18} Agilent, 5 μm , 150 x 0,5 mm). Průtok mobilní fáze byl $10 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$. Dávkovaný objem byl 500 nl. Při měření na obou přístrojích sestávala mobilní fáze z tetrabutylamonium bisulfátového pufru (fáze A) a acetonitrilového pufru (fáze B). Fáze A se skládala z $5,7 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ tetrabutylamonium bisulfátu (TBAS) a $30,5 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ KH_2PO_4 (pH = 5,8). Fáze B se skládala 2:1 = acetonitril:fáze A. Dělení probíhalo při gradientové eluci (0,0 min 90 % fáze A; 3,0 min 60 % fáze A; 7,2 min 60 % fáze A; 7,5 min 90 % fáze A; 12,0 min 90 % fáze A). Teplota kolon nebyla sledována.

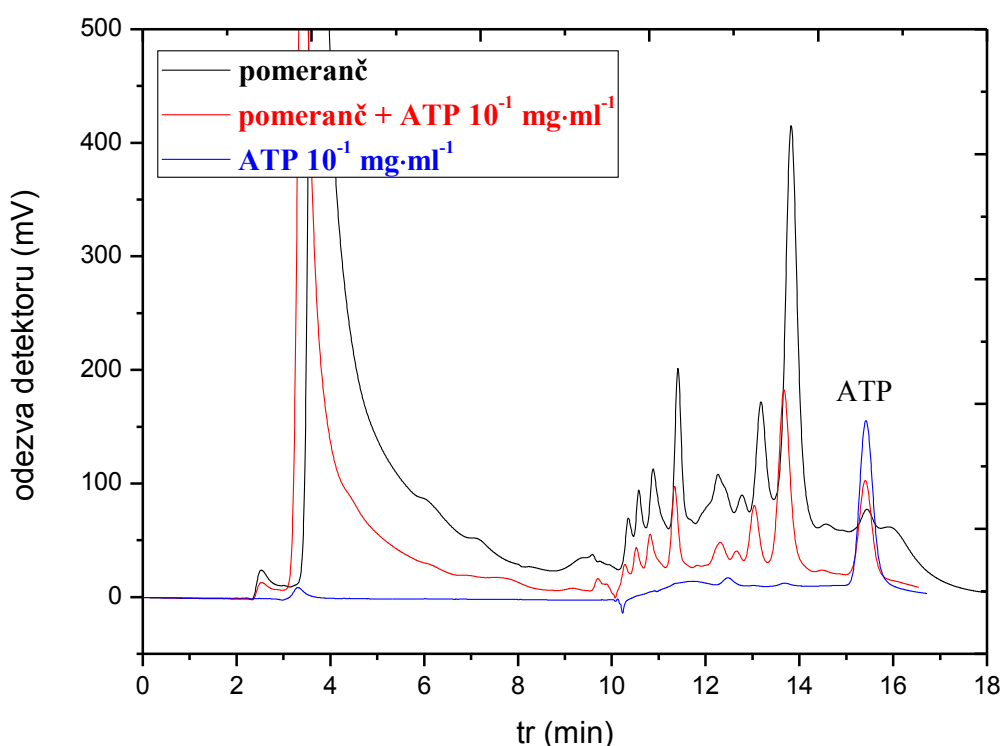
Metoda	ADP min	ATP min
HPLC-UV	10,0	13,0
kapilární HPLC-DAD	12,5	15,5

Tabulka 7 Limity detekce a limity stanovení adenosindifosfátu a adenosintrifosfátu. Měření HPLC-UV při 260 nm. Použitá kolona C_{18} (RP-18e, LichroCart 125-4, Lichrospher 100, 125 mm, 5 μm , Merck). Průtok mobilní fáze byl $0,5 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Dávkovaný objem byl 10 μl . Měření na kapilárním HPLC s DAD detektorem, který snímal signál při 260 nm. Použitá kolona byla C_{18} (Zorbax SB- C_{18} Agilent, 5 μm , 150 x 0,5 mm). Průtok mobilní fáze byl $10 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$. Dávkovaný objem byl 500 nl. Při měření na obou přístrojích sestávala mobilní fáze z tetrabutylamonium bisulfátového pufru (fáze A) a acetonitrilového pufru (fáze B). Fáze A se skládala z $5,7 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ tetrabutylamonium bisulfátu (TBAS) a $30,5 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ KH_2PO_4 (pH = 5,8). Fáze B se skládala 2:1 = acetonitril:fáze A. Dělení probíhalo při gradientové eluci (0,0 min 90 % fáze A; 3,0 min 60 % fáze A; 7,2 min 60 % fáze A; 7,5 min 90 % fáze A; 12,0 min 90 % fáze A). Teplota kolon nebyla sledována.

Metoda	limity	ADP $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$	ATP $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$
HPLC-UV	LOD	3,5	0,8
	LOQ	9,4	3,0
kapilární HPLC-DAD	LOD	1,4	2,0
	LOQ	7,0	9,9

4.5 Reálné vzorky

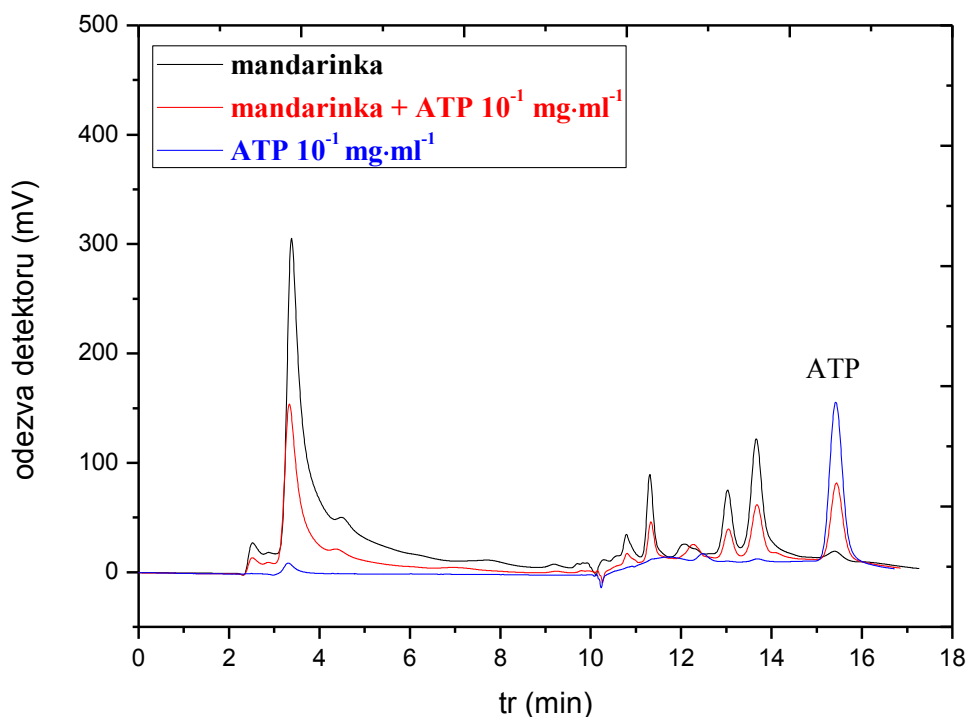
Nalezené podmínky stanovení ADP a ATP byly úspěšně použity pro analýzu reálných vzorků, mezi něž patřily citrusové plody a extrakty rostlin. Všechny reálné vzorky byly měřeny přístrojem kapilárním HPLC s detektorem diodového pole při 260 nm. Pro identifikaci analytů ve vzorku byly chromatogramy reálných vzorků porovnány s chromatogramy standardů ADP a ATP získaných za stejných experimentálních podmínek. Vždy byly také analyzovány reálné vzorky a posléze reálné vzorky s přidavkem jednotlivých standardů analytů. Porovnáním těchto dvou chromatogramů se ověřilo, že uvažovaný pík odpovídá hledanému analytu ve vzorku. Odhadnuté koncentrace nukleotidů v reálných vzorcích se pohybovaly na hranici limitu detekce a limitu stanovení analytů. Z tohoto důvodu nebyly koncentrace ADP a ATP v reálných vzorcích určovány z kalibračních křivek, které končí u limitu stanovení, ale byly odhadovány z ploch píků při známých plochách píků standardů ADP a ATP.



Obrázek 22 Analýza reálného vzorku pomeranče, vč. přidavku standardu ATP. Měřeno na kapilárním HPLC s DAD detektorem, který snímal signál při 260 nm. Použitá kolona byla C₁₈ (Zorbax SB-C₁₈ Agilent, 5 μm, 150 x 0,5 mm). Mobilní fáze se sestávala z tetrabutylamonium bisulfátového pufru (fáze A) a acetonitrilového pufru (fáze B). Fáze A se skládala z 5,7 mmol·dm⁻³ tetrabutylamonium bisulfátu (TBAS) a 30,5 mmol·dm⁻³ KH₂PO₄ (pH = 5,8). Fáze B se skládala 2:1 = acetonitril:fáze A. Dělení probíhalo při gradientové eluci (0,0 min 90 % fáze A; 3,0 min 60 % fáze A; 7,2 min 60 % fáze A; 7,5 min 90 % fáze A; 12,0 min 90 % fáze A). Průtok mobilní fáze byl 10 μl·min⁻¹. Dávkovaný objem byl 500 nl. Teplota kolony nebyla sledována. Koncentrace ATP nalezená ve vzorku pomeranče byla 7 · 10⁻³ mg·ml⁻¹, tj. 14 μmol·dm⁻³.

4.5.1 Citrusové plody

Optimalizovanou metodou pro stanovení ADP a ATP byly analyzovány citrusové plody, pomeranč a mandarinka. V citrusových plodech bylo nalezeno jen ATP, a to o koncentracích řádově v jednotkách $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Při analýze pomeranče byla určena koncentrace ATP odhadem na velikost $7 \cdot 10^{-3} \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, tj. $14 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Chromatogram analýzy pomeranče, vč. přidavku standardu ATP do reálného vzorku, je uveden na **obrázku 22**. Během stanovení analytů v mandarince byla získána koncentrace adenosintrifosfátu na hodnotu $4 \cdot 10^{-3} \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, tj. $7,9 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Na **obrázku 23** je zobrazen chromatogram analýzy mandarinky vč. přidavku standardu ATP.

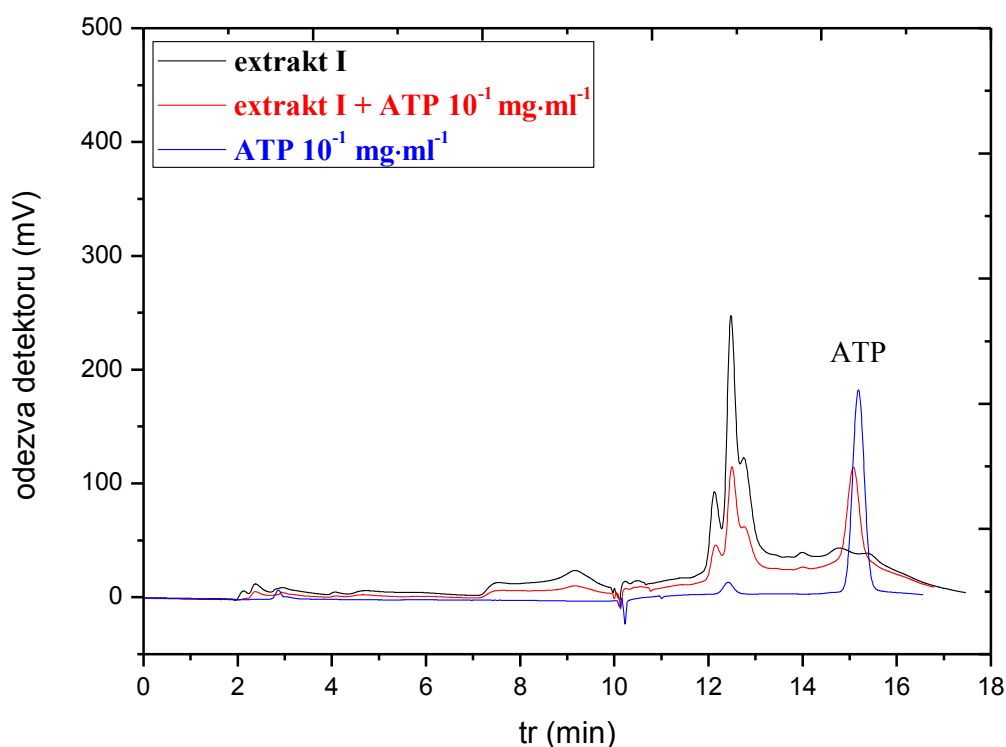


Obrázek 23 Analýza reálného vzorku mandarinky, vč. přidavku standardu ATP do vzorku. Měřeno na kapilárním HPLC s DAD detektorem, který snímal signál při 260 nm. Použitá kolona byla C₁₈ (Zorbax SB-C₁₈ Agilent, 5 μm , 150 x 0,5 mm). Mobilní fáze se sestávala z tetrabutylamonium bisulfátového pufru (fáze A) a acetonitrilového pufru (fáze B). Fáze A se skládala z 5,7 $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ tetrabutylamonium bisulfátu (TBAS) a 30,5 $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ KH_2PO_4 (pH = 5,8). Fáze B se skládala 2:1 = acetonitril:fáze A. Dělení probíhalo při gradientové eluci (0,0 min 90 % fáze A; 3,0 min 60 % fáze A; 7,2 min 60 % fáze A; 7,5 min 90 % fáze A; 12,0 min 90 % fáze A). Průtok mobilní fáze byl 10 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$. Dávkovaný objem byl 500 nl. Teplota kolony nebyla sledována. Koncentrace ATP nalezená ve vzorku mandarinky byla $4 \cdot 10^{-3} \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, tj. $7,9 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$.

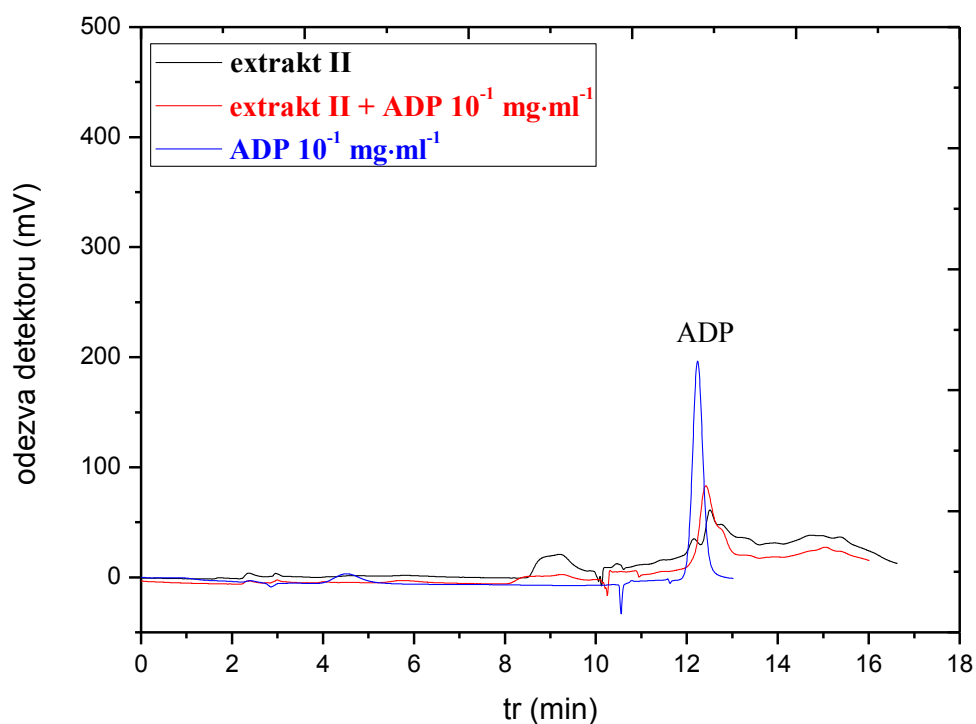
4.5.2 Extrakty z rostlin

V průběhu analýzy extraktu HCl (I) z rostlin bylo nalezeno pouze ATP a nikoliv ADP. Koncentrace adenosintrifosfátu v tomto vzorku byla odhadem určena jako $3 \cdot 10^{-3} \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, tj. $5,9 \text{ } \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Chromatogram stanovení ATP v reálném vzorku extraktu HCl (I) z rostlin vč. přídavku standardu ATP je uveden na **obrázku 24**.

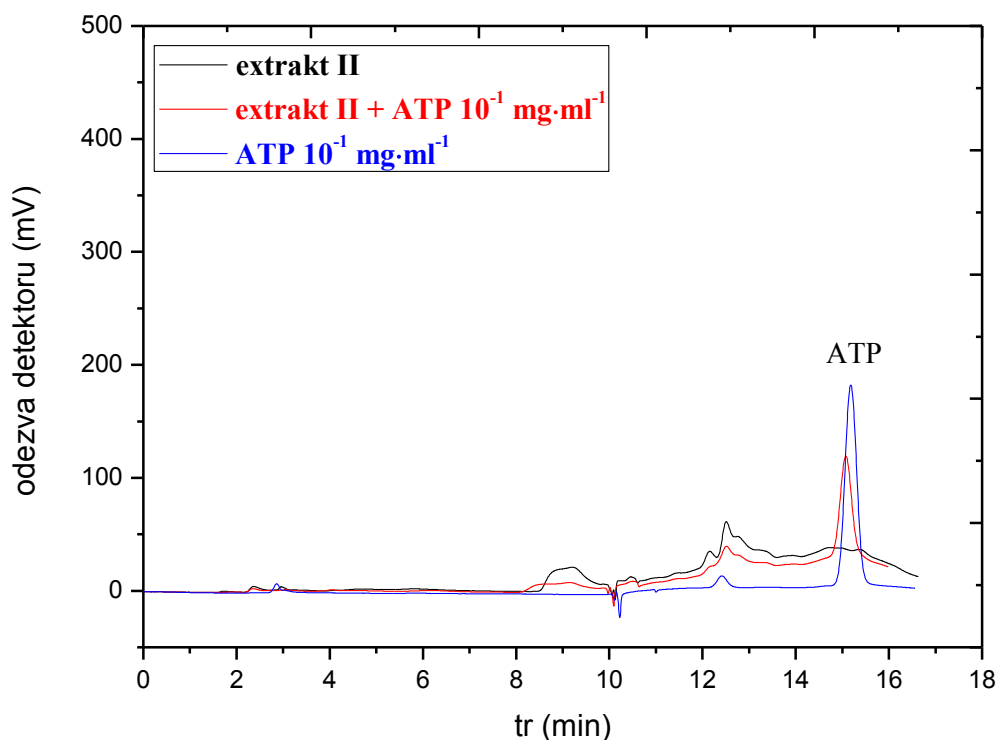
Separace ADP a ATP v extraktu z rostlin HClO_4 (II) je znázorněna na **obrázcích 25 a 26**. V tomto extraktu byla koncentrace adenosindifosfátu stanovena odhadem asi na velikost $1 \cdot 10^{-2} \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, tedy $23 \text{ } \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Množství adenosintrifosfátu v tomto vzorku bylo určeno jako $1 \cdot 10^{-3} \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, tj. $2,0 \text{ } \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$.



Obrázek 24 Analýza extraktu HCl (I) z rostlin, vč. přídavku standardu ATP do vzorku. Měřeno na kapilárním HPLC s DAD detektorem, který snímal signál při 260 nm. Použitá kolona byla C_{18} (Zorbax SB- C_{18} Agilent, $5 \text{ } \mu\text{m}$, $150 \times 0,5 \text{ mm}$). Mobilní fáze se sestávala z tetrabutylamonium bisulfátového pufru (fáze A) a acetonitrilového pufru (fáze B). Fáze A se skládala z $5,7 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ tetrabutylamonium bisulfátu (TBAS) a $30,5 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ KH_2PO_4 (pH = 5,8). Fáze B se skládala 2:1 = acetonitril:fáze A. Dělení probíhalo při gradientové eluci (0,0 min 90 % fáze A; 3,0 min 60 % fáze A; 7,2 min 60 % fáze A; 7,5 min 90 % fáze A; 12,0 min 90 % fáze A). Průtok mobilní fáze byl $10 \text{ } \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$. Dávkovaný objem byl 500 nl. Teplota kolony nebyla sledována. Koncentrace ATP nalezená ve vzorku byla asi $3 \cdot 10^{-3} \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, tj. $5,9 \text{ } \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$.

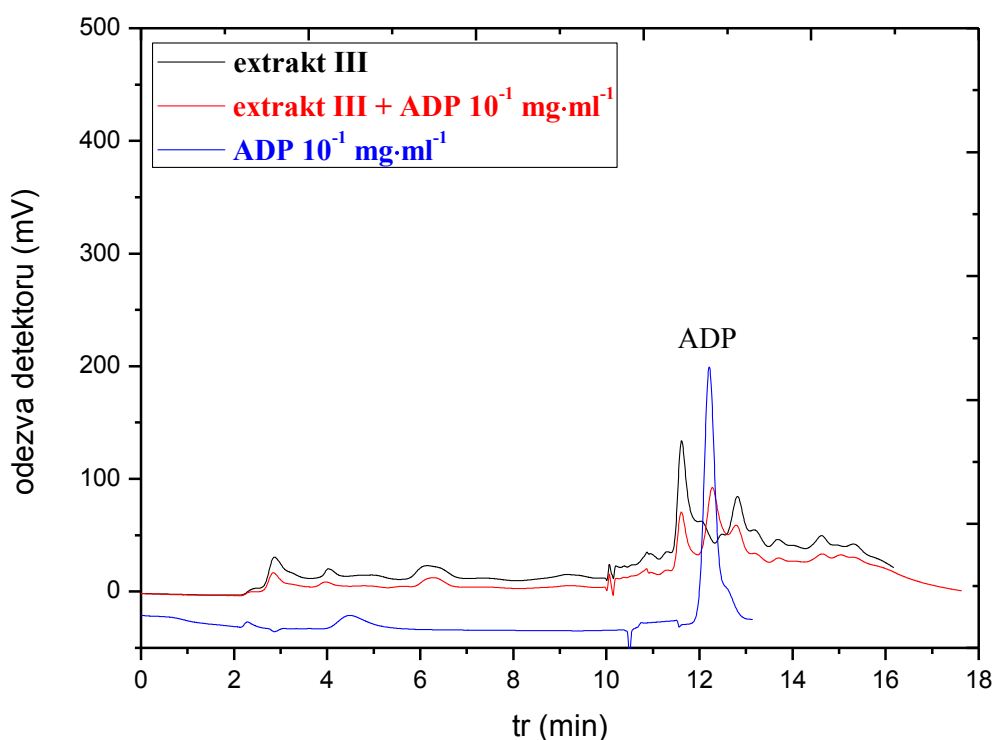


Obrázek 25 Analýza extraktu z rostlin HClO_4 (II), vč. přidavku standardu ADP do vzorku. Měřeno na kapilárním HPLC s DAD detektorem, který snímal signál při 260 nm. Použitá kolona byla C_{18} (Zorbax SB- C_{18} Agilent, 5 μm , 150 x 0,5 mm). Mobilní fáze se sestávala z tetrabutylamonium bisulfátového pufru (fáze A) a acetonitrilového pufru (fáze B). Fáze A se skládala z 5,7 $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ tetrabutylamonium bisulfátu (TBAS) a 30,5 $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ KH_2PO_4 (pH = 5,8). Fáze B se skládala 2:1 = acetonitril:fáze A. Dělení probíhalo při gradientové eluci (0,0 min 90 % fáze A; 3,0 min 60 % fáze A; 7,2 min 60 % fáze A; 7,5 min 90 % fáze A; 12,0 min 90 % fáze A). Průtok mobilní fáze byl 10 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$. Dávkovaný objem byl 500 nl. Teplota kolony nebyla sledována. Koncentrace ADP nalezená ve vzorku byla asi $1\cdot 10^{-2}$ $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, tj. 23 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$.

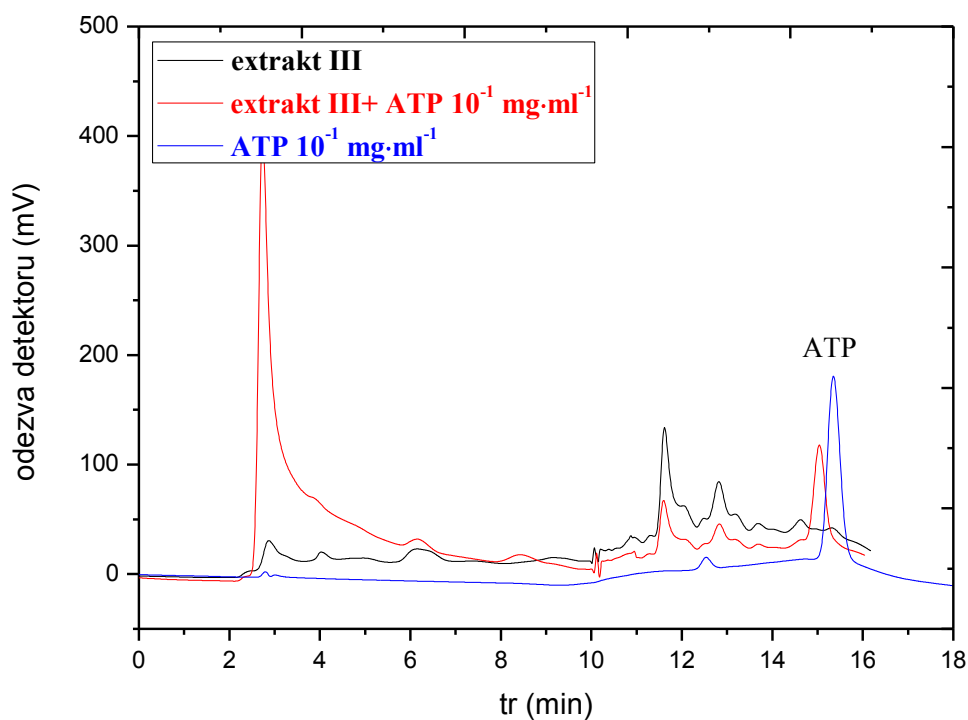


Obrázek 26 Analýza extraktu z rostlin HClO_4 (II), vč. přidavku standardu adenosintrifosfátu do vzorku. Měřeno na kapilárním HPLC s DAD detektorem, který snímal signál při 260 nm. Použitá kolona byla C_{18} (Zorbax SB- C_{18} Agilent, 5 μm , 150 x 0,5 mm). Mobilní fáze se sestávala z tetrabutylamonium bisulfátového pufru (fáze A) a acetonitrilového pufru (fáze B). Fáze A se skládala z 5,7 $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ tetrabutylamonium bisulfátu (TBAS) a 30,5 $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ KH_2PO_4 (pH = 5,8). Fáze B se skládala 2:1 = acetonitril:fáze A. Dělení probíhalo při gradientové eluci (0,0 min 90 % fáze A; 3,0 min 60 % fáze A; 7,2 min 60 % fáze A; 7,5 min 90 % fáze A; 12,0 min 90 % fáze A). Průtok mobilní fáze byl 10 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$. Dávkovaný objem byl 500 nL. Teplota kolony nebyla sledována. Koncentrace ATP nalezená ve vzorku byla asi $1 \cdot 10^{-3}$ $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, tj. 2,0 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$.

Při analýze extraktu NaOH (III) z rostlin bylo ve vzorku zjištěno malé množství ADP i ATP. Koncentrace analytů byla určena odhadem podle velikosti píku v chromatogramu. Reálný vzorek obsahoval $2 \cdot 10^{-3} \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ADP i ATP. To odpovídá $4,7 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ pro ADP a $4,0 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ pro ATP. Chromatogramy stanovení adenosindifosfátu a adenosintrifosfátu v reálném vzorku extraktu NaOH (III) z rostlin vč. přídavek standardu ADP a ATP jsou uvedeny na **obrázcích 27 a 28**.

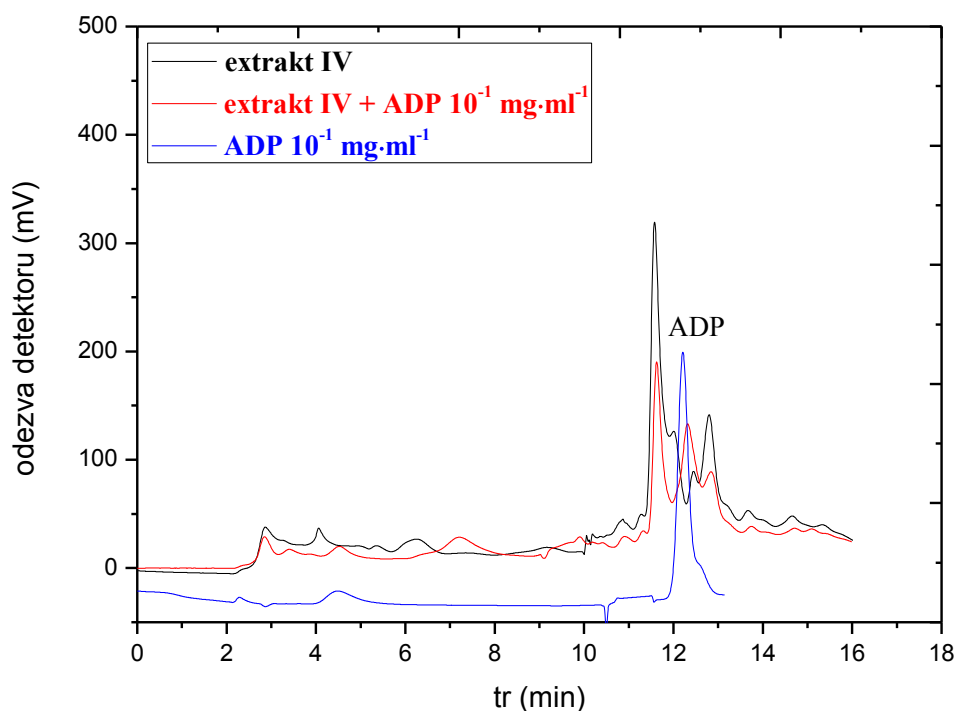


Obrázek 27 Analýza extraktu z rostlin NaOH (III), vč. přídavek standardu ADP do vzorku. Měřeno na kapilárním HPLC s DAD detektorem, který snímal signál při 260 nm. Použitá kolona byla C_{18} (Zorbax SB- C_{18} Agilent, $5 \text{ }\mu\text{m}$, $150 \times 0,5 \text{ mm}$). Mobilní fáze se sestávala z tetrabutylamonium bisulfátového pufru (fáze A) a acetonitrilového pufru (fáze B). Fáze A se skládala z $5,7 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ tetrabutylamonium bisulfátu (TBAS) a $30,5 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ KH_2PO_4 ($\text{pH} = 5,8$). Fáze B se skládala 2:1 = acetonitril:fáze A. Dělení probíhalo při gradientové eluci (0,0 min 90 % fáze A; 3,0 min 60 % fáze A; 7,2 min 60 % fáze A; 7,5 min 90 % fáze A; 12,0 min 90 % fáze A). Průtok mobilní fáze byl $10 \text{ }\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$. Dávkovaný objem byl 500 nL. Teplota kolony nebyla sledována. Koncentrace ADP nalezená ve vzorku byla asi $2 \cdot 10^{-3} \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, tj. $4,7 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$.

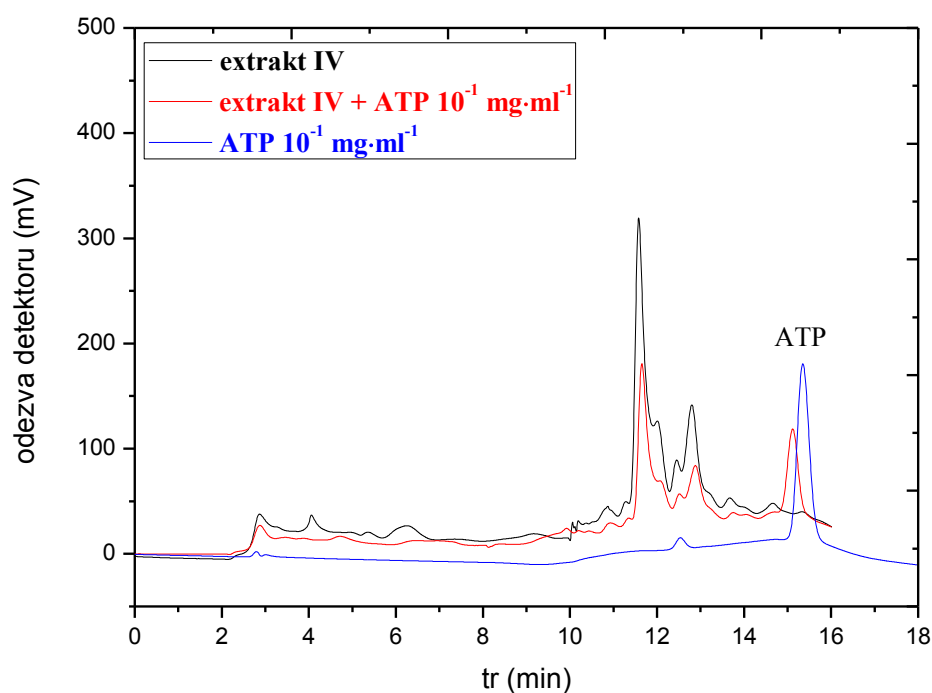


Obrázek 28 Analýza extraktu z rostlin NaOH (III), vč. přídavku standardu ATP do vzorku. Měřeno na kapilárním HPLC s DAD detektorem, který snímal signál při 260 nm. Použitá kolona byla C_{18} (Zorbax SB- C_{18} Agilent, 5 μm , 150 x 0,5 mm). Mobilní fáze se sestávala z tetrabutylamonium bisulfátového pufru (fáze A) a acetonitrilového pufru (fáze B). Fáze A se skládala z 5,7 $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ tetrabutylamonium bisulfátu (TBAS) a 30,5 $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ KH_2PO_4 (pH = 5,8). Fáze B se skládala 2:1 = acetonitril:fáze A. Dělení probíhalo při gradientové eluci (0,0 min 90 % fáze A; 3,0 min 60 % fáze A; 7,2 min 60 % fáze A; 7,5 min 90 % fáze A; 12,0 min 90 % fáze A). Průtok mobilní fáze byl 10 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$. Dávkovaný objem byl 500 nl. Teplota kolony nebyla sledována. Koncentrace ATP nalezená ve vzorku byla $2 \cdot 10^{-3}$ $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, tj. 4,0 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$.

Separace adenosindifosfátu a adenosintrifosfátu ve 2. extraktu z rostlin NaOH (IV) je znázorněna na **obrázcích 29** a **30**. Množství ADP v extraktu bylo určeno odhadem na velikost $3 \cdot 10^{-3} \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, tedy $7,0 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Koncentrace ATP byla zjištěna na hodnotu $1 \cdot 10^{-3} \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, tj. $2,0 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$.



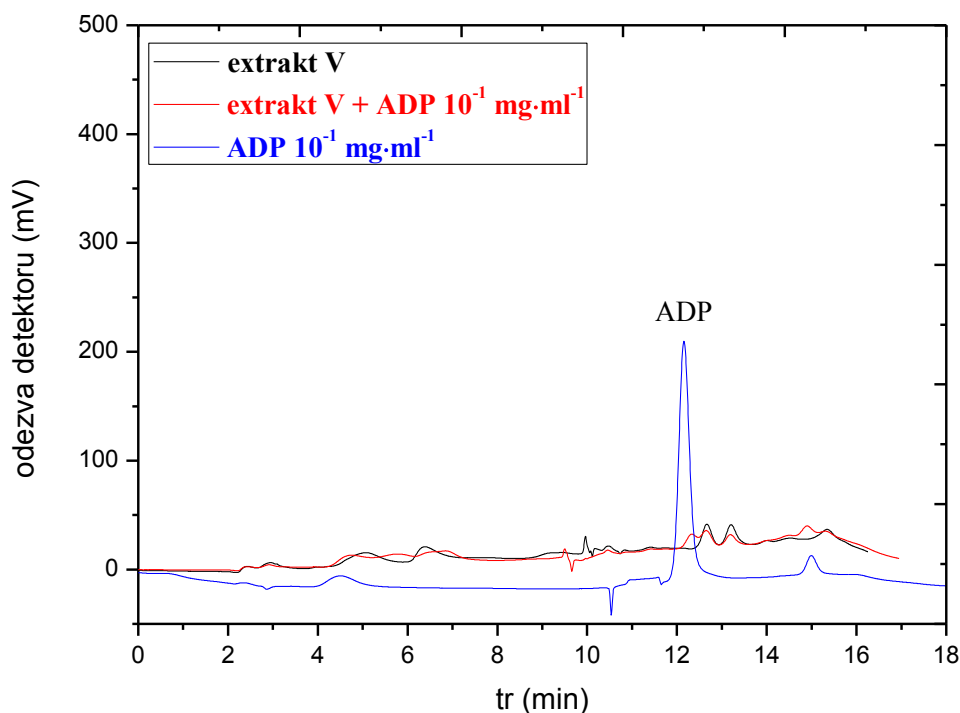
Obrázek 29 Analýza 2. extraktu z rostlin NaOH (IV), vč. přidavku standardu ADP do vzorku. Měřeno na kapilárním HPLC s DAD detektorem, který snímal signál při 260 nm. Použitá kolona byla C₁₈ (Zorbax SB-C₁₈ Agilent, 5 μm , 150 x 0,5 mm). Mobilní fáze se sestávala z tetrabutylamonium bisulfátového pufru (fáze A) a acetonitrilového pufru (fáze B). Fáze A se skládala z $5,7 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ tetrabutylamonium bisulfátu (TBAS) a $30,5 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ KH₂PO₄ (pH = 5,8). Fáze B se skládala 2:1 = acetonitril:fáze A. Dělení probíhalo při gradientové eluci (0,0 min 90 % fáze A; 3,0 min 60 % fáze A; 7,2 min 60 % fáze A; 7,5 min 90 % fáze A; 12,0 min 90 % fáze A). Průtok mobilní fáze byl $10 \text{ }\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$. Dávkovaný objem byl 500 nl. Teplota kolony nebyla sledována. Koncentrace ADP nalezená ve vzorku byla $3 \cdot 10^{-3} \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, tj. $7,0 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$.



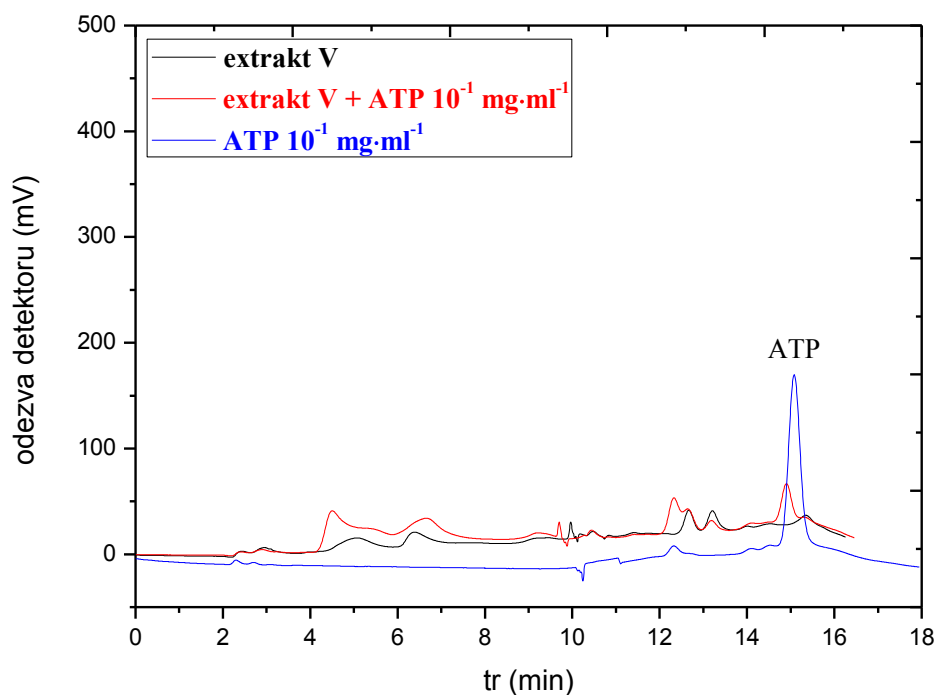
Obrázek 30 Analýza 2. extraktu z rostlin NaOH (IV), vč. přídavku standardu ATP do vzorku. Měřeno na kapilárním HPLC s DAD detektorem, který snimal signál při 260 nm. Použitá kolona byla C₁₈ (Zorbax SB-C₁₈ Agilent, 5 μm, 150 x 0,5 mm). Mobilní fáze se sestávala z tetrabutylamonium bisulfátového pufru (fáze A) a acetonitrilového pufru (fáze B). Fáze A se skládala z 5,7 mmol·dm⁻³ tetrabutylamonium bisulfátu (TBAS) a 30,5 mmol·dm⁻³ KH₂PO₄ (pH = 5,8). Fáze B se skládala 2:1 = acetonitril:fáze A. Dělení probíhalo při gradientové eluci (0,0 min 90 % fáze A; 3,0 min 60 % fáze A; 7,2 min 60 % fáze A; 7,5 min 90 % fáze A; 12,0 min 90 % fáze A). Průtok mobilní fáze byl 10 μl·min⁻¹. Dávkovaný objem byl 500 nl. Teplota kolony nebyla sledována. Koncentrace ATP nalezená ve vzorku byla asi 1 · 10⁻³ mg·ml⁻¹, tj. 2,0 μmol·dm⁻³.

Během analýzy nukleotidů v extraktu z rostlin TRIS-acetát EDTA (V) bylo zjištěno, že reálný vzorek obsahuje oba stanovované analyty. Koncentrace adenosindifosfátu v tomto vzorku byla odhadem určena na hodnotu $4 \cdot 10^{-4} \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, tedy $0,94 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Množství ATP v tomto extraktu bylo cca $7 \cdot 10^{-3} \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, a to odpovídá $14 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Chromatogramy analýz reálného vzorku extraktu TRIS-acetát EDTA (V) z rostlin, ve kterém byly zjištěny ADP i ATP, jsou uvedeny na **obrázcích 31** a **32**.

Při použití optimalizované metody pro stanovení ADP a ATP se podařilo nalézt v extraktech rostlin analyty o koncentraci v jednotkách $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$. V předchozích letech byly na Katedře analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze analyzovány extrakty z rostlin metodou kapilární elektroforézy. Touto technikou bylo zjištěno množství ADP a ATP v reálných vzorcích extraktů z rostlin přibližně na hodnotě koncentrace $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ (nepublikované výsledky RNDr. Tomáše Křížka, Ph.D.). Kapilární HPLC je tedy o 1 řád citlivější metoda pro stanovení adenosindifosfátu a adenosintrifosfátu než kapilární elektroforéza.



Obrázek 31 Analýza extraktu z rostlin TRIS-acetát EDTA (V), vč. přidavku standardu ADP do vzorku. Měřeno na kapilárním HPLC s DAD detektorem, který snímal signál při 260 nm. Použitá kolona byla C_{18} (Zorbax SB- C_{18} Agilent, 5 μm , 150 x 0,5 mm). Mobilní fáze se sestávala z tetrabutylamonium bisulfátového pufru (fáze A) a acetonitrilového pufru (fáze B). Fáze A se skládala z 5,7 $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ tetrabutylamonium bisulfátu (TBAS) a 30,5 $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ KH_2PO_4 (pH = 5,8). Fáze B se skládala 2:1 = acetonitril:fáze A. Dělení probíhalo při gradientové eluci (0,0 min 90 % fáze A; 3,0 min 60 % fáze A; 7,2 min 60 % fáze A; 7,5 min 90 % fáze A; 12,0 min 90 % fáze A). Průtok mobilní fáze byl $10 \text{ }\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$. Dávkovaný objem byl 500 nL. Teplota kolony nebyla sledována. Koncentrace ADP nalezená ve vzorku byla $4 \cdot 10^{-4} \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, tj. $0,94 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$.



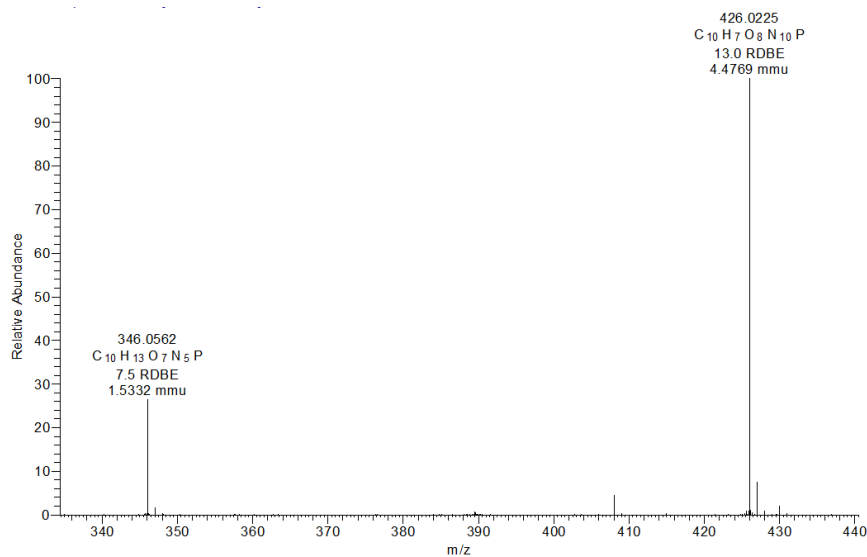
Obrázek 32 Analýza extraktu z rostlin TRIS-ac EDTA (V), vč. přídavku standardu ATP do vzorku. Měřeno na kapilárním HPLC s DAD detektorem, který snímal signál při 260 nm. Použitá kolona byla C_{18} (Zorbax SB- C_{18} Agilent, 5 μm , 150 x 0,5 mm). Mobilní fáze se sestávala z tetrabutylamonium bisulfátového pufru (fáze A) a acetonitrilového pufru (fáze B). Fáze A se skládala z 5,7 $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ tetrabutylamonium bisulfátu (TBAS) a 30,5 $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ KH_2PO_4 (pH = 5,8). Fáze B se skládala 2:1 = acetonitril:fáze A. Dělení probíhalo při gradientové eluci (0,0 min 90 % fáze A; 3,0 min 60 % fáze A; 7,2 min 60 % fáze A; 7,5 min 90 % fáze A; 12,0 min 90 % fáze A). Průtok mobilní fáze byl 10 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$. Dávkovaný objem byl 500 nl. Teplota kolony nebyla sledována. Koncentrace ATP nalezená ve vzorku byla $7 \cdot 10^{-3}$ $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, tj. 14 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$.

4.6 Hmotnostní spektrometrie

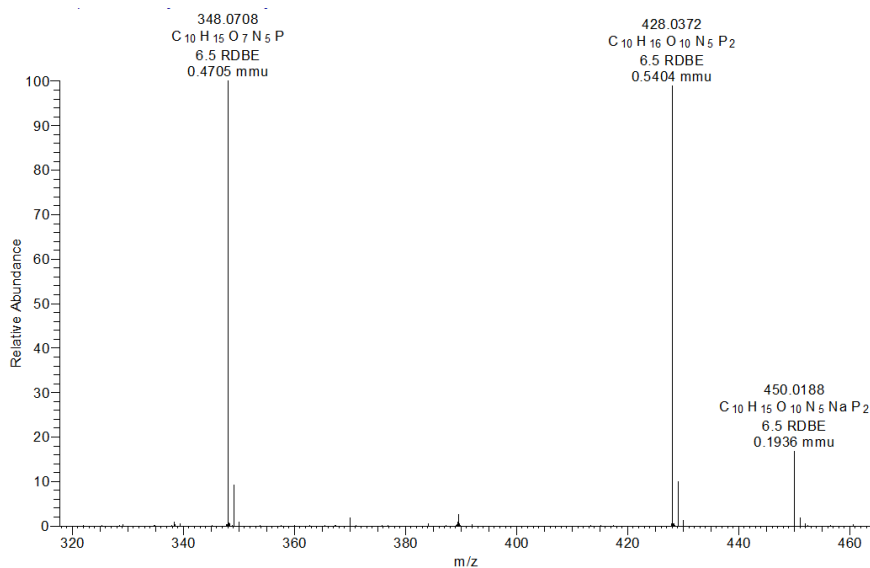
Pro zvýšení citlivosti měření byly ADP a ATP analyzovány i metodou LC-MS. Stejně techniky bylo využito již při bakalářské práci a nyní byla snaha nalézt výhodnější experimentální podmínky měření. Vzhledem k tomu, že v předchozí navržené metodě stanovení analytů pomocí HPLC-UV a kapilární HPLC-DAD bylo použito netěkavého iontově párového činidla, které není kompatibilní s MS detekcí, bylo nutné znovu optimalizovat podmínky analýzy stanovení adenosindifosfátu a adenosintrifosfátu.

Prekurzorovým iontem je pík s nejvyšší intenzitou. Píky fragmentů píky jsou píky látek, které vznikly fragmentací analytu. V hmotnostních spektrech se vyskytují hlavně ionty ve tvaru $[\text{M}+\text{H}]^+$ a $[\text{M}-\text{H}]^-$. Píky 506 m/z a 508 m/z náleží ionizovanému ATP. Dále se v MS spektrech objevují píky o hodnotě 426 m/z či 428 m/z , které odpovídají ionizovanému ADP. Fragmentové píky 346 m/z a 348 m/z reprezentují adenosinmonofosfát, který vznikl pravděpodobně fragmentací ADP. V MS spektrech se také vyskytují adukty analytů se

sodíkem. Sodné ionty se vyskytují všude, a proto nelze vzniku aduktů zabránit. Sodné adukty s ADP a ATP jsou vyjádřeny například píky o hodnotě 450, 530 či 552 m/z.



Obrázek 33 Hmotnostní spektrum ADP měřeno v negativním módu. Prekurzorový iont je při hodnotě 426 m/z a odpovídá [M-H]⁻. Fragmentový pík o velikosti 346 m/z pravděpodobně odpovídá AMP, tedy [M-H]⁻.

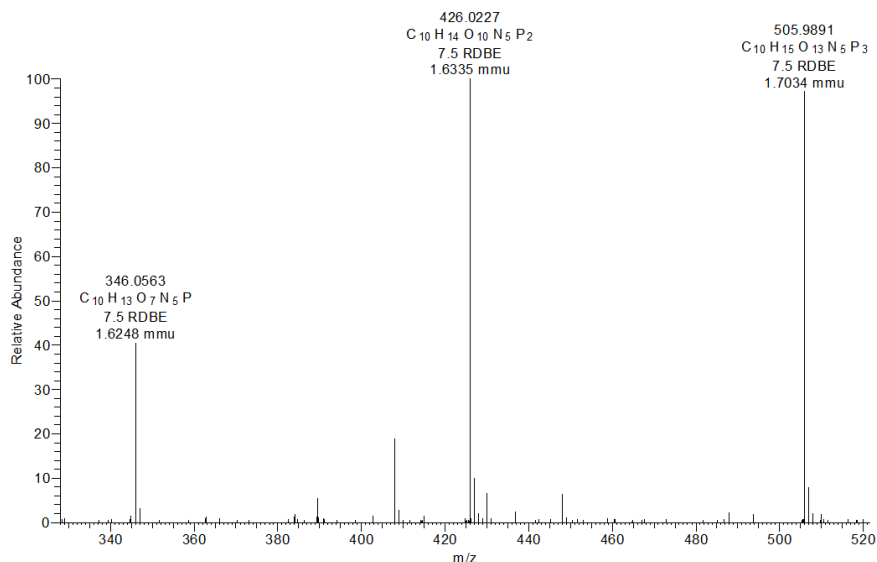


Obrázek 34 Hmotnostní spektrum ADP v pozitivním módu. Prekurzorový iont je při hodnotě 428 m/z. Tato hmota odpovídá [M+H]⁺. Fragmentový pík o velikosti 348 m/z pravděpodobně odpovídá AMP, tedy [M+H]⁺, které se odštěpilo z původního analytu. Pík o 450 m/z patří pravděpodobně aduktu ADP se sodnými ionty, tedy [M+Na]⁺.

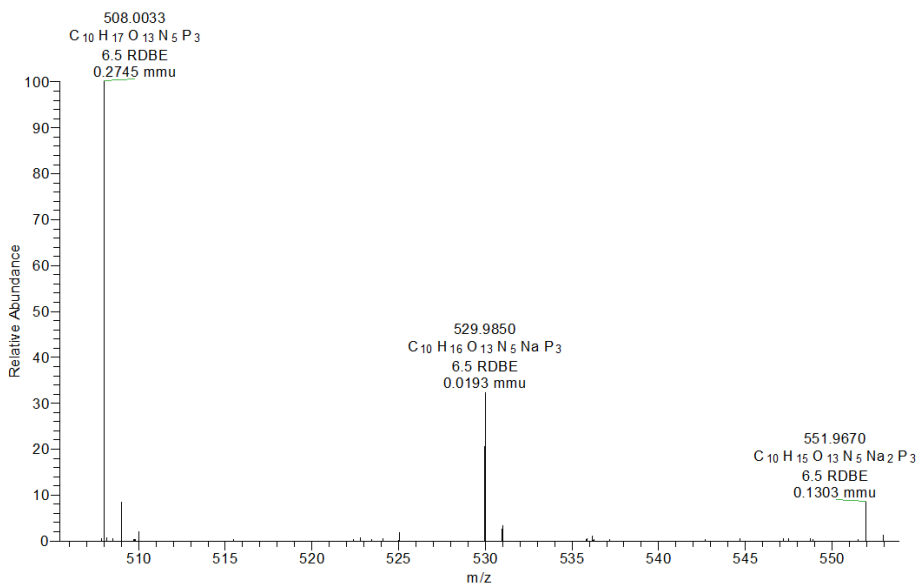
4.6.1 Přímý nástřik do MS

Analýzy byly nejprve provedeny metodou přímého nástřiku standardů ADP a ATP do hmotnostního spektrometru. Měření bylo prováděno v pozitivním i negativním módu. Ionizace pomocí chemické ionizace za atmosférického tlaku k dostatečné ionizaci analytů

nevedla. Analýzy byly proto prováděny ionizací elektrosprejem. Analyzátozem byla lineární iontová past (LTQ) v kombinaci s Orbitrapem, která fungovala ve skenovacím módu, to znamená, že snímala všechny dopadající ionty na detektor. Hmotnostní spektra získaná při analýze nukleotidů v obou módech jsou na **obrázcích 33, 34, 35 a 36**.



Obrázek 35 Hmotnostní spektrum ATP při měření v negativním módu. Prekurzorový iont je při 506 m/z, což odpovídá $[M-H]^-$. Fragmentový pik o velikosti 426 m/z odpovídá s největší pravděpodobností ADP, tedy $[M-H]^-$. Další fragmentový pik při 346 m/z je AMP, tedy opět iont $[M-H]^-$.



Obrázek 36 Hmotnostní spektrum ATP v pozitivním módu. Prekurzorový iont je při hodnotě 508 m/z. Tato hmota odpovídá iontu $[M+H]^+$. Píky o hodnotách 530 m/z a 552 m/z patří pravděpodobně aduktům analytu se sodnými ionty, tedy $[M+Na]^+$ a $[M+2Na]^+$.

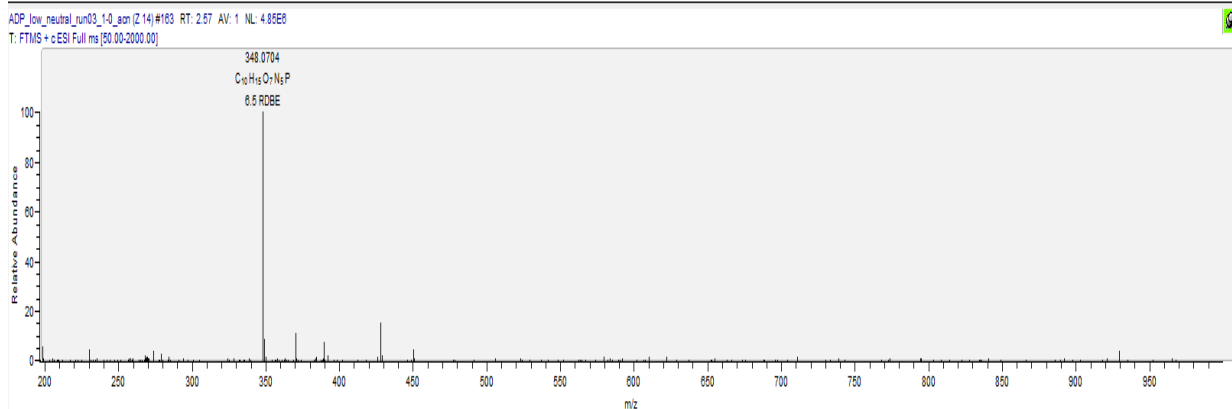
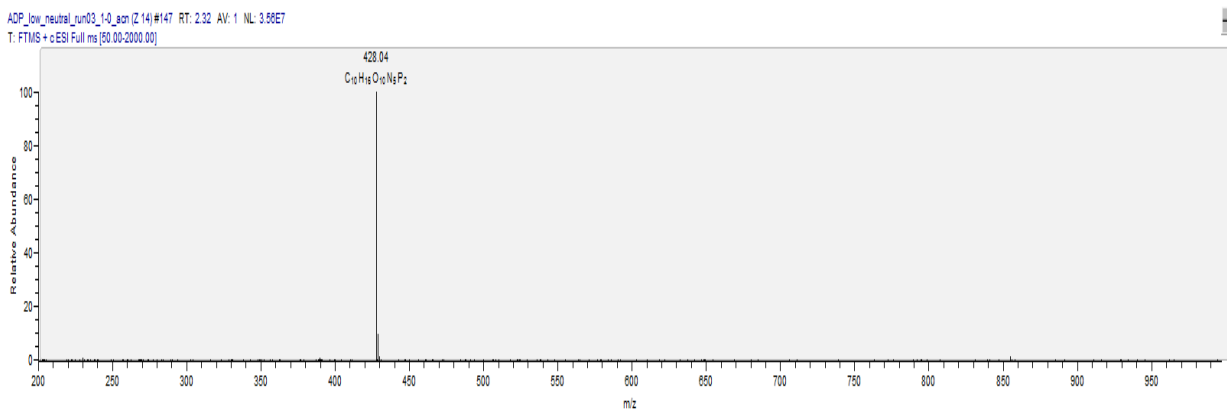
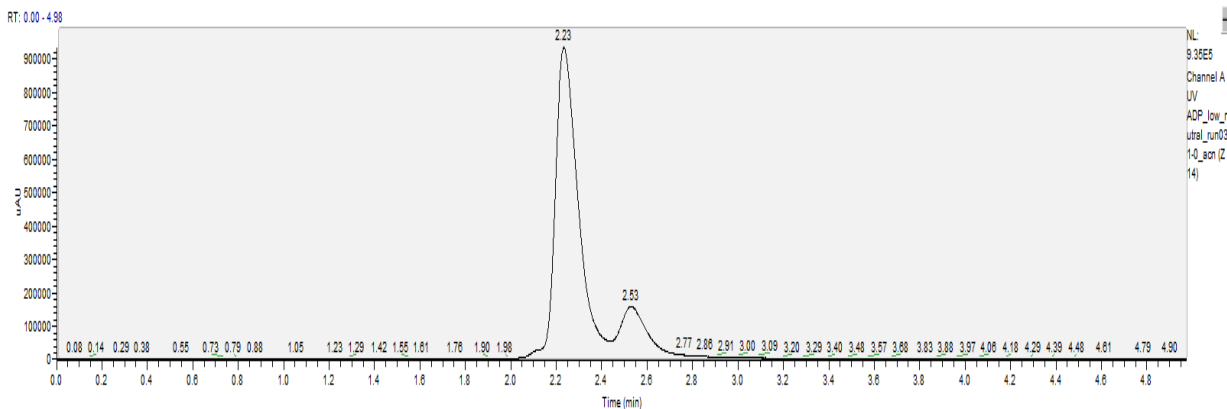
4.6.2.LC-MS

Pro analýzy adenosindifosfátu a adenosintrifosfátu metodou LC-MS bylo použito celkem pět kolon. Při použití HILIC kolony od firmy Phenomenex se nepodařilo získat odpovídající výsledky analýzy. Stejně tak se nepodařilo od sebe separovat analyty při testování metody UPLC s kolonou C₁₈ pro UPLC. K separaci analytů vedly zbývající kolony, tzn. kolona C₁₈ pro klasickou HPLC, fenyl-hexylová a Zic HILIC kolona. Měření MS probíhalo v pozitivním módu. K jasné identifikaci ADP a ATP ve směsi nukleotidů sloužilo hmotnostní spektrum. Při analýzách byl pozorován rozklad adenosindifosfátu na adenosinmonofosfát. Rozklad ADP a ATP je častým jevem a v rámci této diplomové práce nebylo zkoumáno, zda a jak by bylo možné mu zabránit.

V rámci předkládané diplomové práce nebyly zjišťovány limity detekce a stanovení zkoumaných nukleotidů. V bakalářské práci bylo metodou LC-MS/MS dosaženo limitu detekce pro ADP o velikosti $1 \cdot 10^{-5} \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$, tj. $23 \text{ nmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a LOD adenosintrifosfátu byl $1 \cdot 10^{-4} \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$, tj. $198 \text{ nmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ [62]. Z publikované literatury vyplývá, že Coulier a kol. dosáhli metodou LC-MS limitu detekce pro ADP i ATP $0,02 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ [13]. Tým v čele s Caiem našel stejnou technikou LOD obou nukleotidů na hodnotě $0,2 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ [9]. Při tandemové hmotnostní detekci s kapalinovou chromatografií byl limit detekce obou analytů 2 pmol [26]. Limit kvantifikace byl hmotnostní spektrometrií stanoven na hodnotě $0,6 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ pro ADP a $0,5 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ pro ATP [2]. Stejnou detekční technikou bylo dosaženo limitu kvantifikace pro ADP $1,0 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a pro ATP $1,8 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ [22].

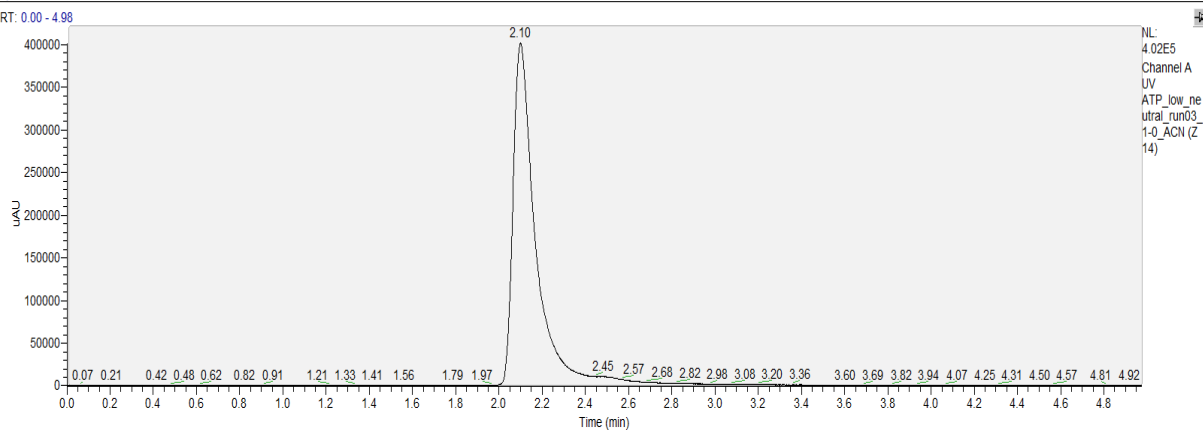
4.6.2.1 Kolona C₁₈

Pro separaci analytů byla vyzkoušena kolona C₁₈ na přístroji LC-MS s elektrosprejem a LTQ-Orbitrapem. Mobilní fáze obsahovala acetonitril a mravenčanové pufrý o kyselém, neutrálním i bazickém pH. Nejlepších výsledků s touto kolonou bylo dosaženo při použití soli s neutrálním pH. Složení mobilní fáze bylo 99:1 (v/v) acetonitril: HCOONH₄ o pH 6,7. Chromatogramy ADP a ATP včetně jejich hmotnostních spekter jsou na **obrázcích 37 a 38**. Na dalším záznamu (**obrázek 39**) je zaznamenána separace směsi ADP a ATP při použití téměř stejných podmínek jako u analýz jednotlivých nukleotidů (rozdíl je v nepatrně menším průtoku mobilní fáze a menším dávkování vzorku).



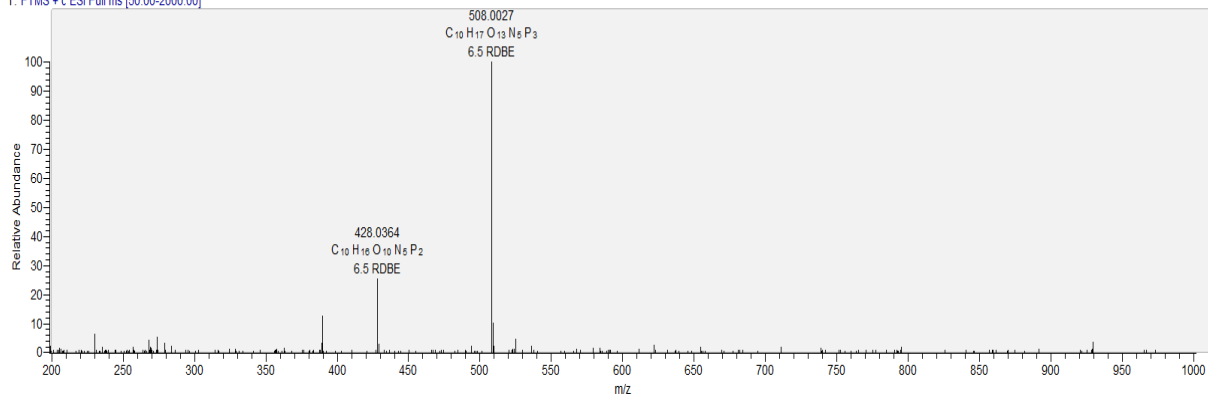
Obrázek 37 Chromatogram ADP získán metodou LC-UV-MS. Ionizace elektrosprejem a analyzátozem byla LTQ-Orbitrap. Měření v pozitivním módu. Použitá kolona C_{18} (Kinetex, 2,6 μ m, 150 x 4,6 mm, Phenomenex). Mobilní fáze obsahovala 99:1 (v/v) acetonitril/mravenčan amonný (pH = 6,7). Dělení probíhalo při izokratické eluci. Průtok mobilní fáze byl 0,6 ml·min⁻¹. Dávkovaný objem byl 5 μ l. První hmotnostní spektrum s píkem o hodnotě 428 m/z odpovídá prvnímu píku v chromatogramu s retenčním časem 2,23 min. Tento pík v hmotnostním spektru náleží ADP, tj. $[M+H]^+$. Druhé hmotnostní spektrum přísluší druhému chromatografickému píku s retenčním časem 2,53 min a reprezentuje AMP o m/z 348, tj. $[M+H]^+$.

atp

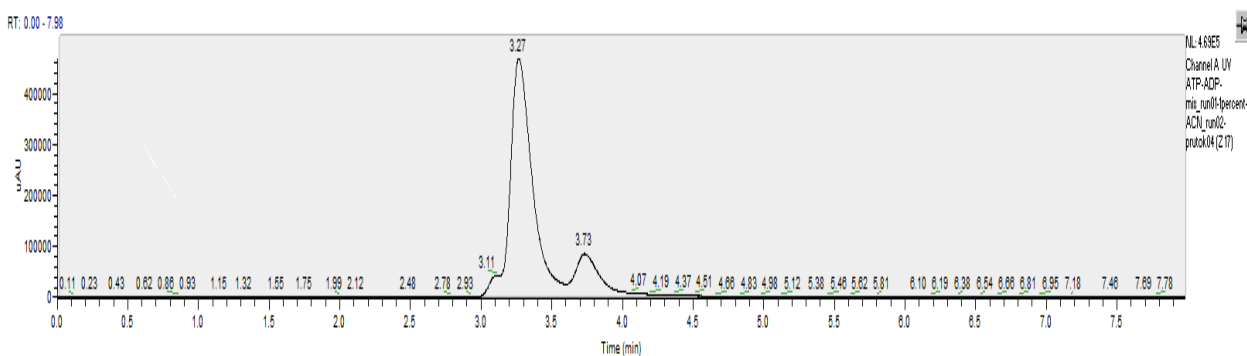
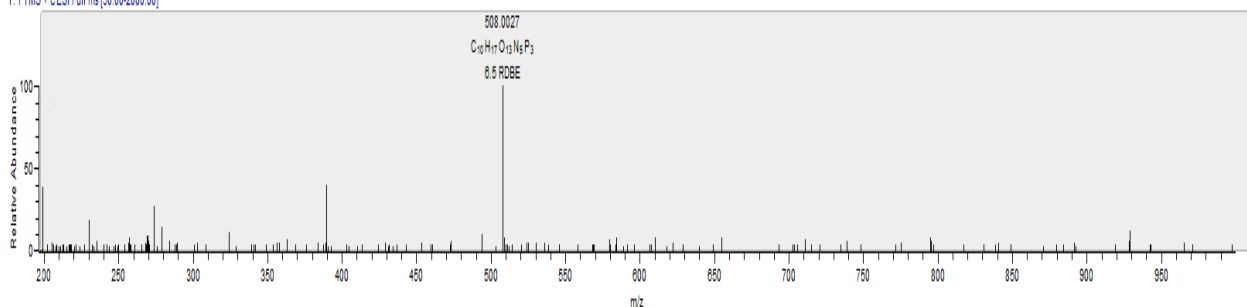
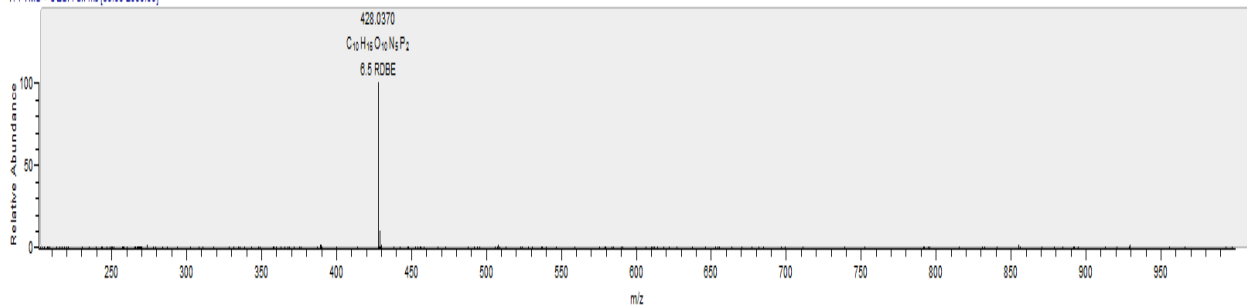


ATP_low_neutral_run03_1-0_ACN (Z 14) #144 RT: 2.27 AV: 1 NL: 3.59E6

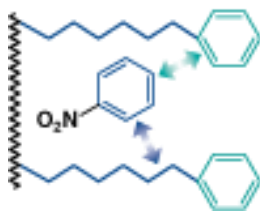
T: FTMS+ c.ESI Full ms [50.00-2000.00]



Obrázek 38 Chromatogram ATP získán metodou LC-UV-MS. Měření v pozitivním módu. Použitá kolona C₁₈ (Kinetex, 2,6 μm, 150 x 4,6 mm, Phenomenex). Mobilní fáze obsahovala 99:1 (v/v) acetonitril/mravenčan amonný (pH = 6,7). Dělení probíhalo při izokratické eluci. Průtok mobilní fáze byl 0,6 ml·min⁻¹. Dávkovaný objem byl 5 μl. Hmotnostní spektrum chromatografického piku s retenčním časem 2,10 min obsahuje prekurzorový ion 508 m/z, který patří ATP, tj. [M+H]⁺. Fragmentový iont s hodnotou 428 m/z přísluší ADP po ionizaci, tj. [M+H]⁺.

ATP-ADP-mix_run01-1percent-ACN_run02-protol04 (Z17) #200 RT: 3.16 AV: 1 NL: 7.28E5
T: FTMS + eESI Full ms [50.00-2000.00]ATP-ADP-mix_run01-1percent-ACN_run02-protol04 (Z17) #213 RT: 3.37 AV: 1 NL: 1.17E7
T: FTMS + eESI Full ms [50.00-2000.00]

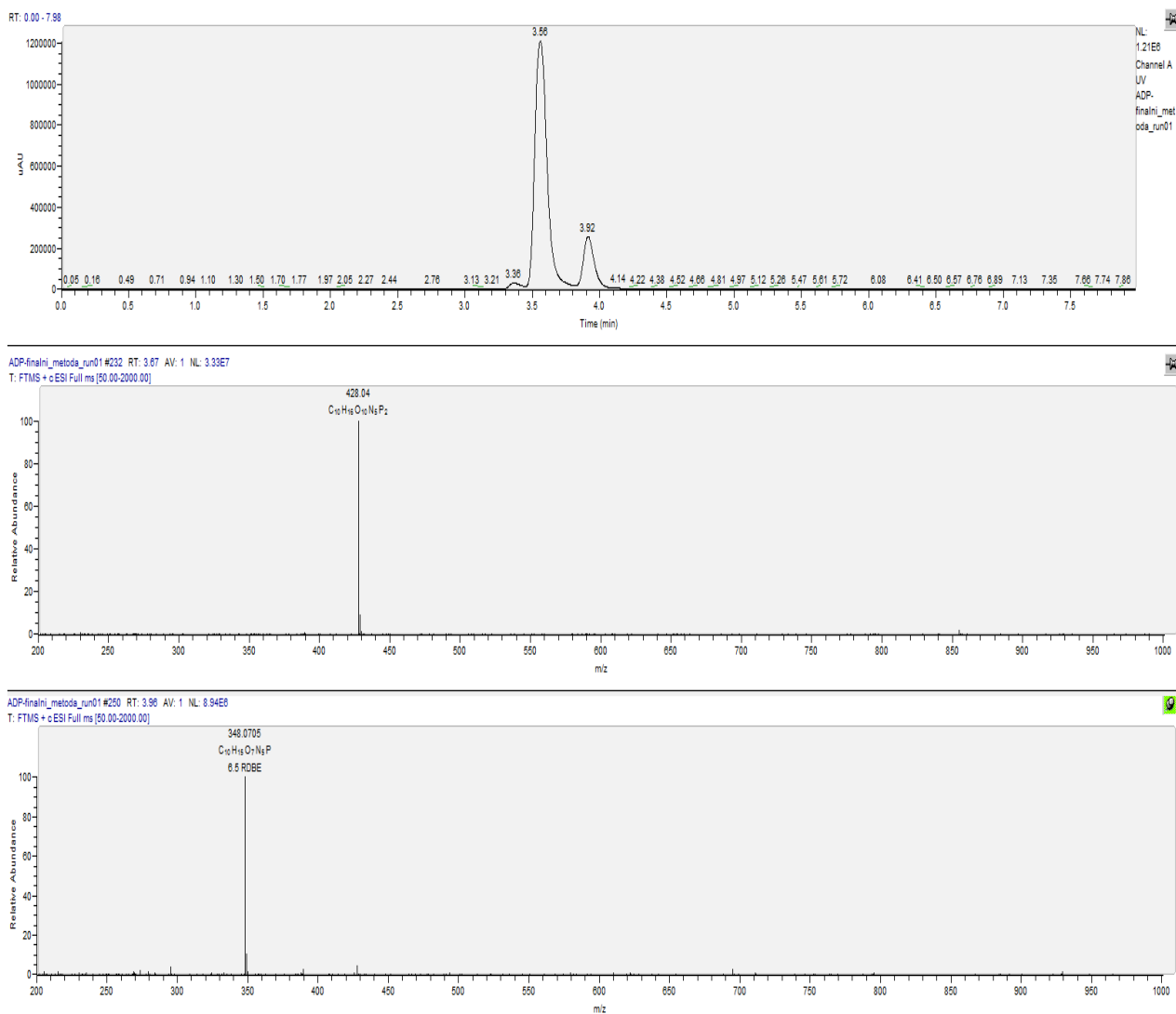
Obrázek 39 Chromatogram směsi ADP a ATP, který byl získán metodou LC-UV-MS. Ionizace elektrosprejem a analyzátozem byla zvolena LTQ-Orbitrap. Měření bylo prováděno v pozitivním módu. Byla použita kolona C₁₈ (Kinetex, 2,6 μm, 150 x 4,6 mm, Phenomenex). Mobilní fáze obsahovala 99:1 (v/v) acetonitril/mravenčan amonný (pH = 6,7). Dělení probíhalo při izokratické eluci. Průtok mobilní fáze byl 0,4 ml·min⁻¹. Dávkovaný objem byl 2 μl. První hmotnostní spektrum odpovídá prvnímu píku v chromatogramu s retenčním časem 3,11 min a zahrnuje pík o hodnotě 508 m/z. Tento hmotnostní pík náleží ATP, tj. [M+H]⁺. Druhé hmotnostní spektrum přísluší druhému chromatografickému píku s retenčním časem 3,27 min a znázorňuje ADP, tj. [M+H]⁺. Třetí pík v chromatogramu s t_R 3,73 min reprezentuje pravděpodobně AMP vzniklé rozkladem ADP.



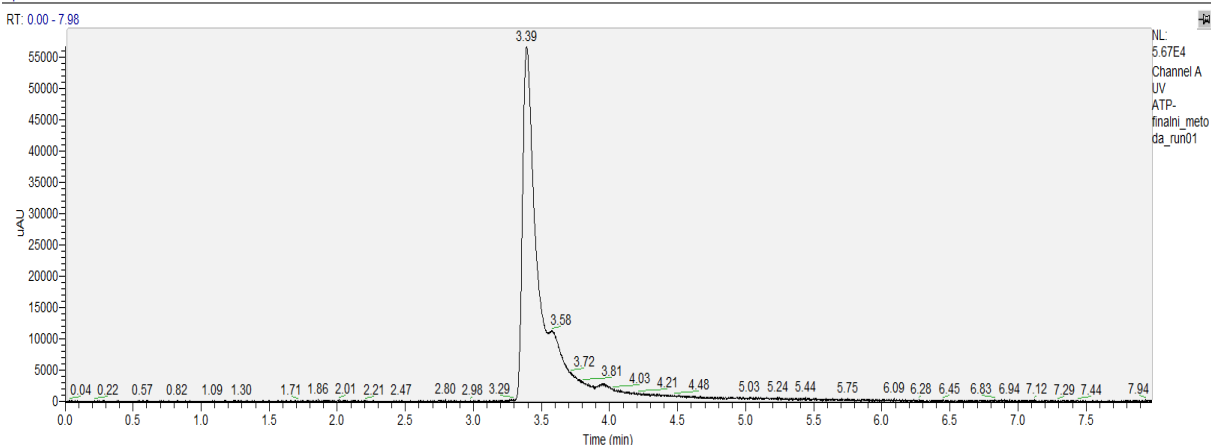
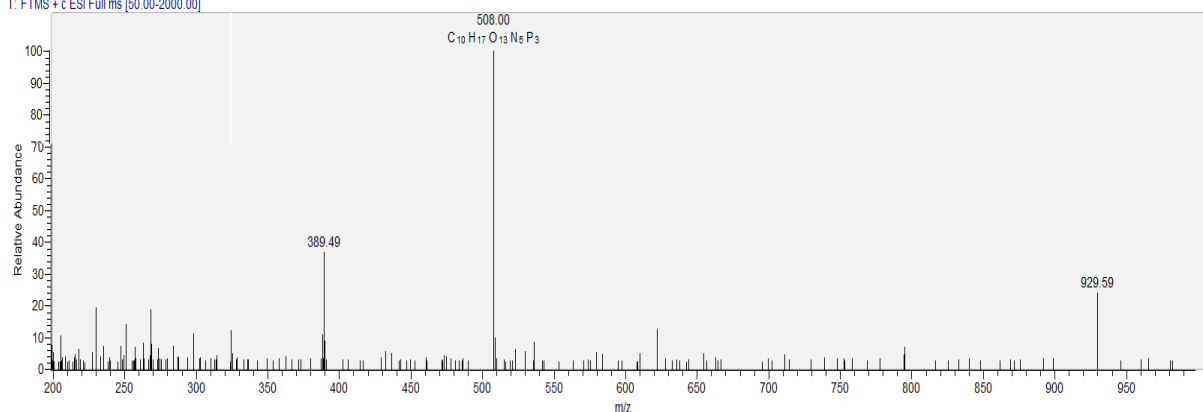
Obrázek 40 Struktura fenyl-hexylové kolony (převzato z [64]).

4.6.2.2 Fenyl-hexyl kolona

Fenyl-hexylová kolona (**obrázek 40**) s mobilní fází o obsahu 95:5 (v/v) acetonitril/mravenčan amonný (pH = 6,7), poskytovala podmínky, při kterých bylo možné od sebe odseparovat analyty ve směsi. Chromatogram jednotlivých nukleotidů, včetně jejich hmotnostních spekter, je na **obrázcích 41 a 42**. Na dalším záznamu (**obrázek 43**) je znázorněn chromatogram směsi ADP a ATP včetně hmotnostního spektra.

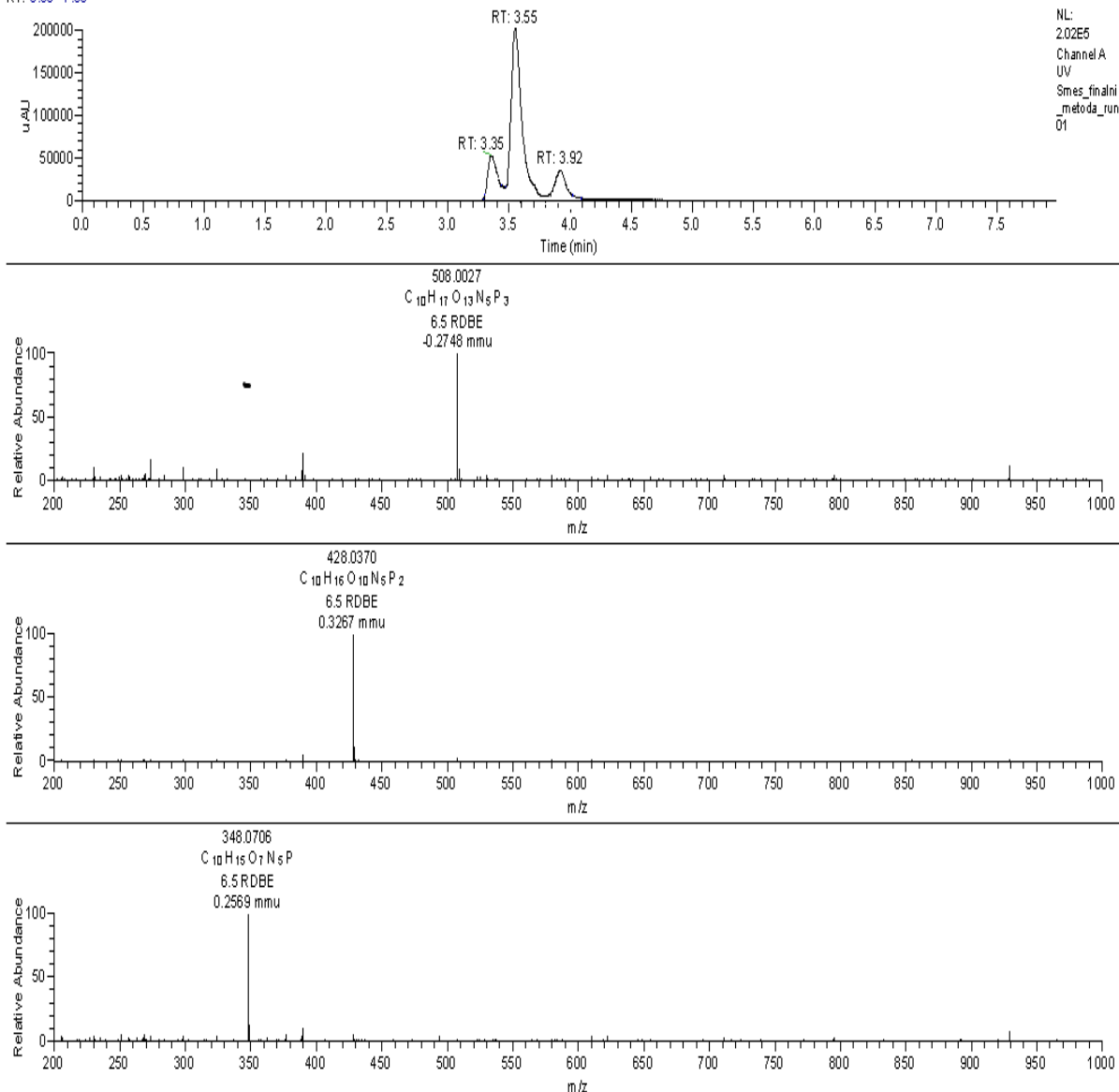


Obrázek 41 Chromatogram adenosindifosfátu, který byl získán metodou LC-UV-MS. Ionizace byla prováděna elektrosprejem a analyzátozem byla zvolena lineární iontová past-Orbitrap. Měření bylo prováděno v pozitivním módu. Byla použita kolona fenyl-hexyl (Luna, 5 μ m, 250 x 4,6 mm, Phenomenex). Mobilní fáze obsahovala 95:5 (v/v) acetonitril/mravenčan amonný (pH = 6,7). Dělení probíhalo při izokratické eluci. Průtok mobilní fáze byl zvolen 0,6 ml·min⁻¹. Dávkovaný objem byl 2 μ l. První hmotnostní spektrum s píkem o hodnotě 428 m/z odpovídá prvnímu píku v chromatogramu s retenčním časem 3,58 min. Tento hmotnostní pík náleží ADP, tj. $[M+H]^+$. Druhé hmotnostní spektrum přísluší druhému chromatografickému píku s $t_R = 3,92$ min a reprezentuje AMP, tj. $[M+H]^+$ o m/z 348.

ATP-finahi_metoda_run01 #221 RT: 3.50 AV: 1 NL: 8.57E5
T: FTMS + c ESI Full ms [50.00-2000.00]

Obrazek 42 Chromatogram adenosintrifosfátu, který byl získán metodou LC-UV-MS. Ionizace byla prováděna elektrosprejem a analyzátozem byla zvolena lineární iontová past-Orbitrap. Měření v pozitivním módu. Byla použita kolona fenyl-hexyl (Luna, 5 μm , 250 x 4,6 mm, Phenomenex). Mobilní fáze obsahovala 95:5 (v/v) acetonitril/mravenčan amonný (pH = 6,7). Dělení probíhalo při izokratické eluci. Průtok mobilní fáze byl $0,6 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Dávkovaný objem byl 2 μl . Hmotnostní spektrum obsahuje pík o hodnotě 508 m/z, který odpovídá prvnímu píku v chromatogramu s retenčním časem 3,39 min. Tento hmotnostní pík náleží ATP, tj. $[\text{M}+\text{H}]^+$.

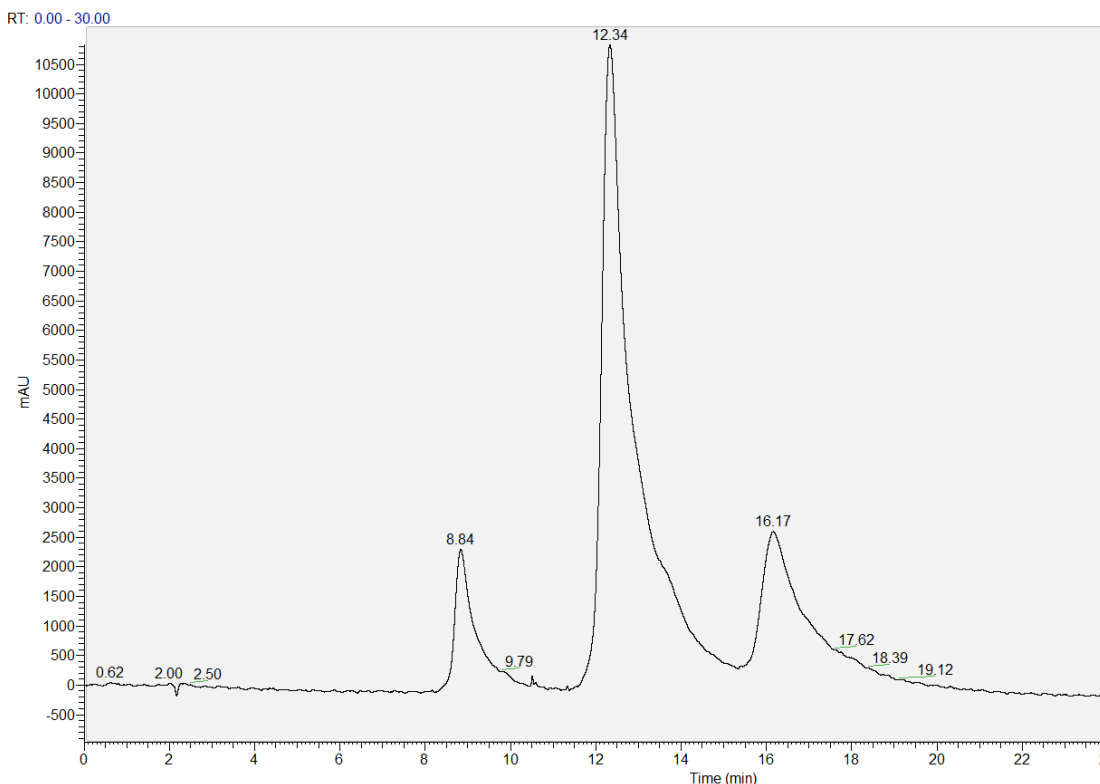
RT: 0.00 - 7.98



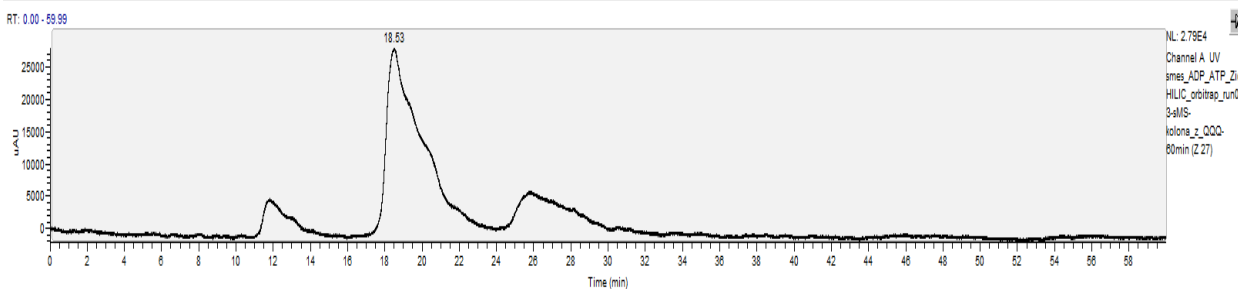
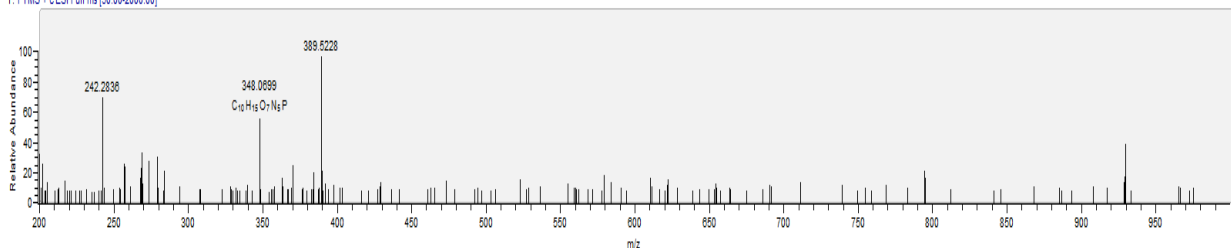
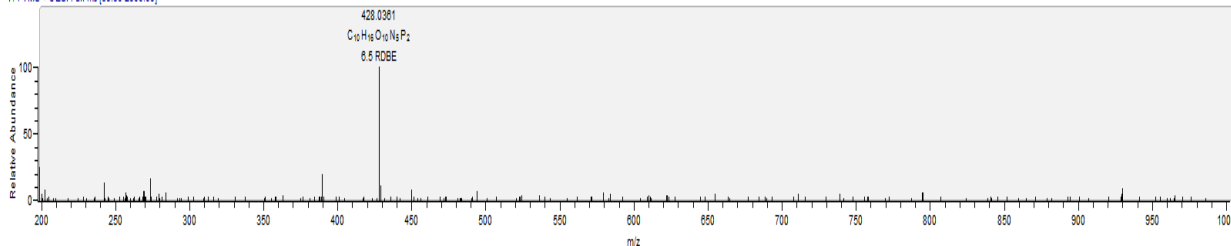
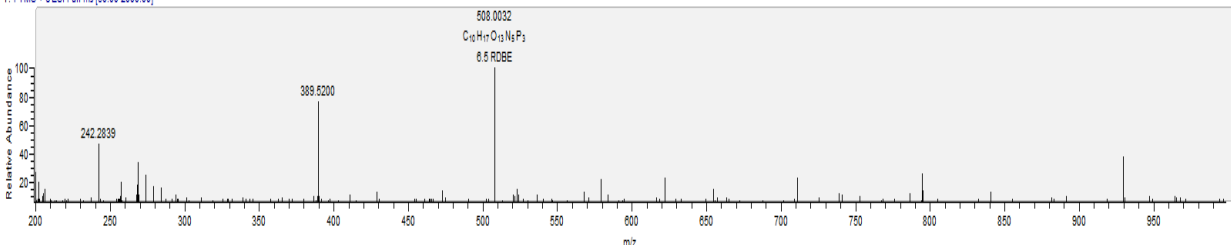
Obrázek 43 Chromatogram směsi adenosindifosfátu a adenosintrifosfátu, který byl získán metodou LC-UV-MS. Ionizace byla prováděna elektrospřejem a analyzátozem byla lineární iontová past-Orbitrap. Měření v pozitivním módu. Byla použita kolona fenyl-hexyl (Luna, 5 μ m, 250 x 4,6 mm, Phenomenex). Mobilní fáze obsahovala 95:5 (v/v) acetonitril/mravenčan amonný (pH = 6,7). Dělení probíhalo při izokratické eluci. Průtok mobilní fáze byl 0,6 ml·min⁻¹. Dávkovaný objem byl 2 μ l. První hmotnostní spektrum patří prvnímu chromatografickému píku s retenčním časem 3,35 min. Obsahuje pik o hodnotě 508 m/z, který náleží ATP, tj. $[M+H]^+$. Druhé hmotnostní spektrum patří druhému píku v chromatogramu s $t_R = 3,55$ min, přičemž hmotnostní pik 428 m/z patří ADP, tj. $[M+H]^+$. Ve třetím hmotnostním spektru je vidět AMP. Toto spektrum reprezentuje třetí pik v chromatogramu s retenčním časem 3,92 min. Pik 348 m/z v MS spektru odpovídá iontu $[M+H]^+$ pro AMP.

4.6.2.3 Zic HILIC kolona

Poslední testovanou kolonou byla kolona Zic HILIC od firmy Merck. Při hledání vhodných podmínek se vycházelo z literatury [63]. Mobilní fáze sestávala ze 70:30 (v/v) acetonitril/octan amonný (100 mM, pH = 5,35). Tato kolona však poskytovala chromatogramy se širokými a nevzhlednými píky. To bylo pravděpodobně způsobeno kontaminací kolony při předchozím používání. Směs nukleotidů byla nejprve analyzována na trojitěm kvadrupólu (Thermo Scientific TSQ Vantage). Za těchto podmínek neposkytoval hmotnostní detektor žádný signál, ale pouze UV signál spektrofotometrického detektoru. Důvodem mohla být nadbytečná koncentrace soli v mobilní fázi vstupující do iontového zdroje, při které nedocházelo k dostatečné ionizaci analytů. Signál, který poskytl spektrofotometrický detektor, je uveden na **obrázku 44**. Při použití iontové pasti jako analyzátoru byl získán UV záznam spektrofotometrického detektoru a z hmotnostního spektrometru i hmotnostní spektra jednotlivých píků z chromatogramu. Chromatogram s hmotnostními spektry je uveden na **obrázku 45**.



Obrázek 44 UV záznam chromatogramu směsi adenosindifosfátu a adenosintrifosfátu, který byl získán metodou LC-UV-MS. MS neposkytoval žádný signál. Ionizace elektrosprejem a analyzátozem byl trojitý kvadrupól (Thermo Scientific TSQ Vantage). Vlnová délka spektrofotometrického detektoru byla nastavena na hodnotu 260 nm. Použitá kolona Zic HILIC (Peek HPLC column, 3,5 μm , 150 x 4,6 mm, Merck). Mobilní fáze obsahovala 70:30 (v/v) acetonitril/octan amonný (100 mM, pH = 5,35). Dělení probíhalo při izokratické eluci. Průtok mobilní fáze byl $0,7 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Dávkovaný objem byl $2 \mu\text{l}$.

smes_ADP_ATP_ZicHILIC_orbitrap_run03-MS-kolona_z_QQQ-60min (Z27)#785 RT: 12.50 AV: 1 NL: 2.84E5
T: FTMS + e ESI Full ms [50.00-2000.00]smes_ADP_ATP_ZicHILIC_orbitrap_run03-MS-kolona_z_QQQ-60min (Z27)#1188 RT: 18.53 AV: 1 NL: 1.15E6
T: FTMS + e ESI Full ms [50.00-2000.00]smes_ADP_ATP_ZicHILIC_orbitrap_run03-MS-kolona_z_QQQ-60min (Z27)#1887 RT: 26.89 AV: 1 NL: 3.33E5
T: FTMS + e ESI Full ms [50.00-2000.00]

Obrázek 45 Chromatogram směsi adenosindifosfátu a adenosintrifosfátu, který byl získán metodou LC-UV-MS. Ionizace byla prováděna elektrospřejem a analyzátozem byl zvolen LTQ-Orbitrap. Měření v pozitivním módu. Byla použita kolona Zic HILIC (Peek HPLC column, 3,5 μm , 150 x 4,6 mm, Merck). Mobilní fáze obsahovala 70:30 (v/v) acetonitril/octan amonný (100 mM, pH = 5,35). Dělení probíhalo při izokratické eluci. Průtok mobilní fáze byl 0,7 ml·min⁻¹. Dávkovaný objem byl 2 μl . První hmotnostní spektrum patří prvnímu chromatografickému píku s retenčním časem 12 minut. MS spektrum obsahuje pik o hodnotě 348 m/z, který odpovídá AMP, tj. $[\text{M}+\text{H}]^+$. Druhé hmotnostní spektrum patří druhému píku v chromatogramu s retenčním časem 18,53 min, přičemž hmotnostní pik 428 m/z patří adenosindifosfátu, tj. $[\text{M}+\text{H}]^+$. Ve třetím hmotnostním spektru je vidět ATP. Toto spektrum reprezentuje třetí pik v chromatogramu s retenčním časem 26 minut. Pik 348 m/z v hmotnostním spektru odpovídá iontu $[\text{M}+\text{H}]^+$ pro ATP.

Z chromatogramu a hmotnostních spekter na **obrázku 45** je patrné, že v HILIC chromatografickém módu na koloně Zic HILIC elují nukleotidy v opačném pořadí, tedy AMP, ADP a jako poslední ATP, než bylo pozorováno u předchozích separačních kolon.

Děje se tak pravděpodobně proto, že Zic HILIC je kolona s normálním uspořádáním fází na rozdíl od ostatních používaných kolon, které mají reverzní uspořádání fází.

5. Závěr

V rámci této diplomové práce byly zjištěny vhodné podmínky pro stanovení ADP a ATP metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Metoda byla založena na iontové párové chromatografii a koloně C₁₈. Mobilní fáze obsahovala fosforečnanový pufr v poměru s acetonitrem a v obou složkách mobilní fáze byl tetrabutylamonium bisulfát jako iontové párové činidlo. Při gradientové eluci došlo k rozdělení ADP a ATP až na základní linii. Změřením UV spektra zkoumaných nukleotidů bylo zjištěno, že měření je nejcitlivější při vlnové délce 260 nm.

Optimalizovaná metoda byla použita k analýze reálných vzorků citrusových plodů a extraktů z rostlin. V každé reálné matrici byl nalezen alespoň jeden hledaný nukleotid. Množství ADP a ATP v reálných vzorcích bylo odhadnuto řádově na jednotky $\mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie se pro stanovení ADP a ATP jeví jako metoda o jeden řád citlivější než metoda kapilární elektroforézy, která byla testována na Katedře analytické chemie Přírodovědecké fakulty UK v Praze v předchozích letech.

S využitím HPLC-UV a kapilární HPLC-DAD a nalezených podmínek stanovení analytů byly určeny limity detekce a stanovení adenosindifosfátu a adenosintrifosfátu. LOD a LOQ získané metodou HPLC i kapilární HPLC dosahují řádově jednotek $\mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a lze je tedy považovat za srovnatelně citlivé. Tyto limity jsou také velmi podobné nebo nepatrně vyšší než uvádí literatura, zabývající se obdobnými metodami pro stanovení ADP a ATP. Jak vyplývá z poslední kapitoly této diplomové práce, použití LC-MS dává jistou naději pro snížení limitů detekce a limitů stanovení u nukleotidů ADP a ATP v porovnání s HPLC-UV a kapilární HPLC-DAD. Problémem však může být fragmentace ADP, popřípadě ATP již v ionizačním zdroji, tedy elektrospreji. Tento problém fragmentace nukleotidů byl již pozorován v rámci mé bakalářské práce, která se zabývala stanovením a analýzou adenosindifosfátu a adenosintrifosfátu pomocí HPLC-MS/MS.

6. Literatura

1. Košťtř J.: *Biochemie*. Avicenum, **1974**.
2. Wang J., Lin T., Lai J., Cai Z., Yang M. S.: *Analysis of adenosine phosphates in HepG-2 cell by a HPLC-ESI-MS system with porous graphitic carbon as stationary phase*. Journal of chromatography B, 877, 2019-2024 **2009**.
3. Berg J. M., Tymoczko J. L., Stryer L.: *Biochemistry*, sixth edition. W. H. Freeman and Company, **2007**.
4. Voet D., Voet J. G.: *Biochemistry*, third edition. John Wiley&sons Inc., **2004**.
5. Garrett R., Grisham C. M.: *Biochemistry*, second edition. Saunders College Publ., **1999**.
6. Murray R., Granner D. K., Mayes P. A., Rodwell V. W.: *Harperova biochemie*. H&H, **1998**.
7. Qian T., Cai Z., Yang M. S.: *Determination of adenosine nucleotides in cultured cells by ion-pairing liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry*. Analytical Biochemistry, 325, 77-84, **2004**.
8. Nain V. S., Pannu J., Raj M., Atul A., Budhiraja R. D.: *Facts about high-energy phosphates estimation in heart*. Research journal of pharmaceutical, biological and chemical sciences, 2, 772-779, **2011**.
9. Cai Z., Song F., Yang M. S.: *Capillary liquid chromatographic-high-resolution mass spectrometric analysis of ribonucleotides*. Journal of chromatography A, 976, 135-143, **2002**.
10. Jaoudé M. A., Randon J.: *Capillary monolithic titania column for minaturized liquid chromatography and extraction of organo-phosphorous compounds*. Analytical bioanalytical chemistry, 400, 1241-1249, **2011**.
11. De Vijlder T., Boschmans J., Witters E., Lemiere F.: *Study on the loss of nucleoside mono-, di- and triphosphates and phosphorylated peptides to a metal-free LC-MS hardware*. International journal of mass spectrometry, 304, 83-90, **2011**.
12. Blanco S. L., Suárez M. P., San Juan F.: *Seasonal changes of nucleotides in musel (Mytilus galloprovincialis) mantle tissue*. Comparative biochemistry and physiology - part B, 143, 384-390, **2006**.

13. Coulier L., Bas R., Jespersen S., Verheij E., Van der Werf M. J., Hankemeier T.: *Simultaneous quantitative analysis of metabolites using ion-pair liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry*. Analytical chemistry, 78, 6573-6582, **2006**.
14. Klawitter J., Schmitz V., Klawitter J., Leibfritz D., Christians U.: *Development and validation of an assay for the quantification of 11 nucleotides using LC/LC-electrospray ionization –MS*. Analytical Biochemistry, 365, 230-239, **2007**.
15. Xue X., Wang F., Zhou J., Chen F., Li Y., Zhao J.: *Online cleanup of accelerated solvent extraction for determination of adenosine 5'-triphosphate (ATP), adenosine 5'-diphosphate (ADP), and adenosine 5'-monophosphate (AMP) in royal jelly using high-performance liquid chromatography*. Journal of agricultural and food chemistry, 57, 4500-4505, **2009**.
16. Cordell R. L., Hill S. J., Ortori C. A., Barrett D. A.: *Quantitative profiling of nucleotides and related phosphate-containing metabolites in cultured mammalian cells by liquid chromatography tandem electrospray mass spectrometry*. Journal of chromatography B, 871, 115-124, **2008**.
17. Pabst M., Grass J., Fischl R., Léonard R., Jin C., Hinterkorn G., Borth N., Altmann F.: *Nucleotides and nucleotide sugar analysis by liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry on surface-conditioned porous graphitic carbon*. Analytical chemistry, 82, 9782-9788, **2010**.
18. Pierro D., Tavazzi B., Perno C. F., Bartolini M., Balestra E., Calio R., Giardina B., Lazzarino G.: *An ion-pairing high-performance liquid chromatographic method for the direct simultaneous determination of nucleotides, deoxynucleotides, nicotinic coenzymes, oxypurines, nucleosides and bases in perchloric acid cell extracts*. Analytical Biochemistry, 231, 407-412, **1995**.
19. Huang D., Zhang Y., Chen X.: *Analysis of intracellular nucleoside triphosphate levels in normal and tumor cell lines by high-performance liquid chromatography*. Journal of chromatography B, 784, 101-109, **2003**.
20. Poole C. F.: *The essence of chromatography*. Elsevier, **2003**.
21. Snyder L. R., Kirkland J. J., Glajch J. L.: *Practical HPLC method development*, second edition. John Wiley & sons, Inc., **1997**.
22. Yang W-C., Sedlak M., Regnier F. E., Mosier N., Ho N., Adamec J.: *Simultaneous quantification of metabolites involved in central carbon and energy metabolism using*

reversed-phase liquid chromatography-mass spectrometry and in vitro ¹³C labeling. Analytical chemistry 80, 9508-9516, **2008**.

23. Harvey David: *Modern Analytical chemistry*. McGraw Hill companies, **2000**.

24. Kellner R., Mermet J-M., Otto M., Valcárcel M., Widmer H. M.: *Analytical chemistry*, second edition. Wiley-vch, **2004**.

25. Dyckmans J., Raubuch M.: *A modification of a method to determine adenosine nucleotides in forest organic layers and mineral soils by ion-paired reversed-phase high-performance liquid chromatography*. Journal of microbiological methods, 30, 13-20, **1997**.

26. Yang S., Sadilek M., Synovec R. E., Lidstrom M. E.: *Liquid chromatography-tandem quadrupole mass spectrometry and comprehensive two-dimensional gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry measurement of targeted metabolites of Methylobacterium extorquens AM1 grown on two different carbon sources*. Journal of chromatography A, 1216, 3280-3289, **2009**.

27. Veciana-Nogues M. T., Izquierdo-Pulido M., Vidal-Carou M. C.: *Determination of ATP related compounds in fresh and canned tuna fish by HPLC*. Food chemistry, 59, 467-472, **1997**.

28. Cohen S., Megherbi M., Jordheim L. P., Lefebvre I., Perigaud C., Dumontet C., Guitton J.: *Simultaneous analysis of eight nucleoside triphosphates in cell lines by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry*. Journal of chromatography B, 877, 3831-3840, **2009**.

29. Holčápek M., Jirásko R., Lída M.: *Basic rules for the interpretation of atmospheric pressure ionization mass spectra of small molecules*. Journal of chromatography A, 1217, 3908-3921, **2010**.

30. Cvačka J.: *Vysokoučinná kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí (přednášky, 2007)*.

31. Dunn W. B., Bailey N. J. C., Johnson H. E.: *Measuring the metabolome: current analytical technologies*. Analyst, 130, 606-625, **2005**.

32. Coolen E. J., Arts I. C., Swennen E. L., Bast A., Cohen Stuart M. A., Dagnelie P. C.: *Simultaneous determination of adenosine triphosphate and its metabolites in human whole blood by RP-HPLC and UV-detection*. Journal of chromatography B 864, 43-51, **2008**.

33. Edwards J. L., Kennedy R. T.: *Metabolomic analysis of eukaryotic tissue and prokaryotes using negative mode MALDI time-of-flight mass spectrometry*. Analytical chemistry, 77, 2201-2209, **2005**.
34. Edwards J. L., Edwards R. L., Reid K. R., Kennedy R. T.: *Effect of decreasing column inner diameter and use of off-line two-dimensional chromatography on metabolite detection in complex mixtures*. Journal of chromatography A, 1172, 127-134, **2007**.
35. Ni Q., Reid K. R., Burant C. F., Kennedy R. T.: *Capillary LC-MS for high sensitivity metabolomic analysis of single islets of langerhans*. Analytical chemistry, 80, 3539-3546, **2008**.
36. Tomiya N., Ailor E., Lawrence S. M., Betenbaugh M. J., Lee Y. C.: *Determination of nucleotides and sugar nucleotides involved in protein glycosylation by high-performance anion-exchange chromatography: sugar nucleotide contents in cultured insect cells and mammalian cells*. Analytical biochemistry, 293, 129-137, **2001**.
37. Luo B., Groenke K., Takors R., Wandrey C., Oldiges M.: *Simultaneous determination of multiple intracellular metabolites in glycolysis, pentose phosphate pathway and tricarboxylic acid cycle by liquid chromatography-mass spectrometry*. Journal of chromatography A, 1147, 153-164, **2007**.
38. <http://www.hplc.cz> (citace **3.12.2012**).
39. Fung E. N., Cai Z., Burnette T. C., Sinhababu A. K.: *Simultaneous determination of Ziagen and its phosphorylated metabolites by ion-pairing high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Journal of chromatography B, 754, 285-295, **2001**.
40. Bajad S. U., Wenyun L., Kimball E. H., Yuan J., Peterson C., Rabinowitz J. D.: *Separation and quantitation of water soluble cellular metabolites by hydrophilic interaction chromatography-tandem mass spectrometry*. Journal of chromatography A, 1125, 76-88, **2006**.
41. Watanabe Y., Ikegami T., Horie K., Hara T., Jaafar J., Tanaka N.: *Improvement of separation efficiencies of anion-exchange chromatography using monolithic silica capillary columns modified with polyacrylates and polymethacrylates containing tertiary amino or quaternary ammonium groups*. Journal of chromatography A, 1216, 7394-7401, **2009**.
42. Ganzera M., Vrabl P., Worle E., Burgstaller W., Stuppner H.: *Determination of adenine and pyridine nucleotides in glucose-limited chemostat cultures of penicillium simplicissimum*

by one-step ethanol extraction and ion-pairing liquid chromatography. *Analytical biochemistry*, 359, 132-140, **2006**.

43. Yamaoka N., Kudo Y., Inazawa K., Inagawa S., Yasuda M., Mawatari K-I., Nakagomi K., Kaneko K.: *Simultaneous determination of nucleosides and nucleotides in dietary foods and beverages using ion-pairing liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry*. *Journal of chromatography B*, 878, 2054-2060, **2010**.

44. Lui H., Cantwell F. F.: *Electrical double-layer model for sorption of ions on octadecylsilyl bonded phases including the role of residual silanol groups*. *Analytical chemistry*, 63, 993-1000, **1991**.

45. Ferreira I. M., Mendes E., Gomes A. M., Faria M. A., Ferreira M. A.: *The determination and distribution of nucleotides in dairy products using HPLC and diode array detection*. *Food chemistry*, 74, 239-244, **2001**.

46. Buescher J. M., Moco S., Sauer U., Zamboni N.: *Ultrahigh performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for fast and robust quantification of anionic and aromatic metabolites*. *Analytical chemistry*, 82, 4403-4412, **2010**.

47. Holčápek M.: *Hmotnostní spektrometrie v organické analýze (přednášky, 2010)*.

48. Němcová I., Engst P., Jelínek I. a kol.: *Spektrometrické analytické metody II*. Karolinum, **1998**.

49. Štícha M.: *Analytická hmotnostní spektrometrie (přednášky, 2011)*.

50. Gross J. H.: *Mass Spectrometry a textbook*. Springer, **2004**.

51. Uehara T., Yokoi A., Aoshima K., Tanaka S., Kadowaki T., Tanaka M., Oda Y.: *Quantitative phosphorus metabolomics using nanoflow liquid chromatography-tandem mass spectrometry and culture-derived comprehensive global internal standards*. *Analytical chemistry*, 81, 3836-3842, **2009**.

52. Okuma H., Watanabe E.: *Flow system for fish freshness determination based on double multi-enzyme reactor electrodes*. *Biosensors & Bioelectronics* 17, 367-372, **2002**.

53. Saher S., Fernández-García N., Piqueras A., Hellín E., Olmos E.: *Reducing properties, energy efficiency and carbohydrate metabolism in hyperhydric and normal carnation shoots cultured in vitro: a hypoxia stress?* *Plant physiology and biochemistry*, 43, 573-582, **2005**.

54. Mateos R. M., Bonilla-Valverde D., Del Rio L. A., Palma J. M., Corpas F. J.: *NADH-dehydrogenases from pepper fruits: effect of maturation*. *Physiologia plantarum*, 135, 130-139, **2009**.
55. Haink G., Deussen A.: *Liquid chromatography method for the analysis of adenosine compounds*. *Journal of chromatography B*, 784, 189-193, **2003**.
56. Buchholz A., Hurlebaus J., Wandrey C., Takors R.: *Metabolomics: quantification of intracellular metabolite dynamics*. *Biomolecular engineering*, 19, 5-15, **2002**.
57. Viant M. R., Pincetich C. A., Hinton D. E., Tjeerdema R. S.: *Toxic actions of dinoseb in medaka (*Oryzias latipes*) embryos as determined by in vivo ³¹P NMP, HPLC-UV and ¹H NMR metabolomics*. *Aquatic toxicology*, 76, 329-342, **2006**.
58. Bernocchi P., Ceconi C., Cargnoni A., Pedersini P., Curello S., Ferrari R.: *Extraction and assay of creatine phosphate, purine, and pyridine nucleotides in cardiac tissue by reversed-phase high-performance liquid chromatography*. *Analytical Biochemistry*, 222, 374-379, **1994**.
59. Kimura Y., Shibasaki S., Morisato K., Ishizuka N., Minakuchi H., Nakanishi K., Matsuo M., Amachi T., Ueda M., Ueda K.: *Microanalysis for MDR1 ATPase by high-performance liquid chromatography with titanium dioxide column*. *Analytical biochemistry*, 326, 262-266, **2004**.
60. Štulík K. a kol.: *Analytické separační metody*. Nakladatelství Karolinum, **2004**.
61. Lange D. L., Kader A. A.: *Elevated carbon dioxide exposure alters intracellular pH and energy charge in avocado fruit tissue*. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 122, 253-257, **1997**.
62. Černá M.: *Analýza adenosintrifosfátu a adenosindifosfátu pomocí HPLC-MS/MS*. Bakalářská práce. Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie, **2011**.
63. <http://www.mn-net.com> (citace **24.4.2013**)
64. <http://www.mercksequant.com> (citace **20.2.2013**)
65. <http://www.sigmaaldrich.com> (citace **19.4.2013**)
66. McLafferty F. W., Tureček F.: *Interpretation of mass spectra*, fourth edition. University science books, **1993**.
67. <http://web.vscht.cz/poustkaj> (citace **5.5.2013**)