

STANOVENÍ ADENOSINDIFOSFÁTU A ADENOSINTRIFOSFÁTU MIKROKAPALINOVOU CHROMATOGRAPHIÍ

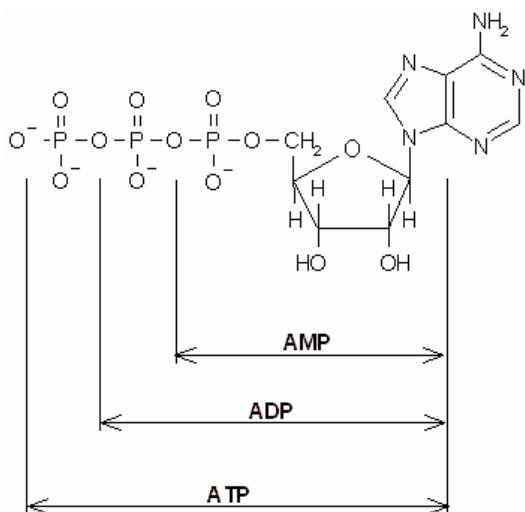
MARTINA ČERNÁ

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie, Albertov 6, 128 43 Praha 2
cerna-ma@seznam.cz

Úvod

Adenosindifosfát (ADP) a adenosintrifosfát (ATP) jsou nukleotidy (tj. fosforečné estery nukleosidů, anhydridy kyseliny fosforečné neboli adenosinfosfáty)¹. Jejich struktura je uvedena na obr. 1. Mají makroergické fosfátové vazby, které svým štěpením poskytují systému energii. Adenosin a jeho nukleotidy poskytují kromě energie i substráty pro různé biochemické procesy^{3,4}. Nukleotidy a příbuzné fosforylované metabolity jsou hlavní součástí nukleových kyselin, fungují také jako koenzymy v biochemických reakcích a jako prekurzory v RNA syntézách^{4,5,7,8}. Stanovování adenosinfosfátů v jídle a tkáních je velmi významné pro zjištění energetického stavu buňky^{6–8}.

Adenosinové nukleotidy jsou díky přítomnosti několika fosfátových skupin velmi polární a mohou interferovat s chemickým stanovením³. Z tohoto důvodu nejsou zadržovány na koloně při klasické chromatografii s reverzními fázemi^{3,9}. Určení jejich koncentrace v buňkách poskytuje cenné informace pro pochopení buněčného energetického metabolismu, a proto je důležité nalézt vhodnou metodu k jejich stanovení³. Chemická podobnost, nestabilita, vysoká polarita, náboj a různá koncentrace v určitých situacích však analýzu těchto látek znesnadňuje⁴. Nejčastěji používanou separační technikou pro stanovení adenosinfosfátů je vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)⁷.



Obr. 1. Struktura ADP a ATP; převzato z cit.²

Původně se ADP a ATP stanovovaly na iontově výměnné koloně⁴. Postupně se k separaci nukleotidů začaly používat iontově potlačovací HPLC a iontově párová chromatografie³. Využit lze rovněž enzymovou analýzu, bioluminiscenci, ³¹P nukleární magnetickou rezonanci, vysokoúčinnou kapilární elektroforézu nebo plynovou chromatografii^{8,10}. Pro stanovení ATP je vhodná i luciferázová analýza¹⁰. ADP a ATP jsou aktivní v ultrafialové (UV) oblasti, a tudíž lze stanovit UV detekcí¹¹. Pro tuto detekci se v literatuře uvádí vlnová délka 254 nm (cit.^{8,10–12}). Další autoři stanovovali ADP a ATP při vlnové délce 257 nm nebo při 260 nm (cit.^{7,13–15}).

Jedna z neefektivnějších metod HPLC pro separaci nukleotidů je iontově párová chromatografie¹⁶. Má výhody jak iontově výměnné, tak reverzní chromatografie¹⁷. K analýze aniontů se do mobilní fáze přidávají iontově párová činidla nejčastěji na bázi tetrabutylamonium a triethylamonium, například tetrabutylamonium hydrogensulfát (TBAHS), tetrabutylamonium bromid, též také *N,N'*-dimethylhexylamin (DMHA) a netěkavý tetrabutylamonium hydroxid^{8,9,13}. Předpokládá se, že zadržení nukleotidů je způsobeno vznikem „iontového páru“ mezi pozitivně nabitými iontově párovými činidly a negativně nabitými nukleotidy^{3,9}. Hydrofobní kolona pak neutrální iontový pár zadrží⁹. Separaci nukleotidů lze zlepšit přidáním různého množství organického modifikátoru do mobilní fáze, změnou pH či elučního gradientu⁸. Klíčové pro zadržení nukleotidů na koloně je vhodný výběr iontově párového činidla a jeho koncentrace^{3,4,9}.

K analýze nukleotidů je výhodné použít kolonu s malým průměrem, kde stačí málo rozpouštědla a iontově párových činidel při zachování velké separační síly^{3,18}. Miniaturizace kolon tak může vést ke zlepšení citlivosti měření a většímu počtu detegovaných sloučenin s nízkými limity detekce¹⁸. Pro miniaturizované metabolické analýzy bylo provedeno málo studií^{18,19}. Důvodem je, že se zabývá hlavně analýzami rostlin, mikrobu a tělních tekutin, kde jsou vzorky v relativně velkém objemu a není tedy vyžadována velká citlivost stanovení. Předpokládá se ale, že s růstem možností využití metabolomiky bude třeba analyzovat i látky o malém objemu dostatečně citlivou metodou.

Cílem předkládané práce bylo nalézt podmínky stanovení adenosindifosfátu a adenosintrifosfátu pomocí mikrokapalinové chromatografie s detektorem diodového pole. Následně měla být proměřena kalibrační závislost směsí ADP a ATP o různých koncentracích. Dále měly být zjištěny limity detekce (LOD) a limity stanovení (LOQ) obou analytů. Nakonec se měly tyto limity porovnat s LOD a LOQ nalezenými v literatuře při použití stejných metod a velmi podobných experimentálních podmínek.

Experimentální část

Mikrokapalinová chromatografie s detektorem diodového pole byla prováděna na přístroji Agilent Technologies 1200 series. Detektor diodového pole byl nastaven na snímání při vlnových délkách 210, 220, 254 a 260 nm. Jelikož zjištěná absorpční maximum bylo při 260 nm a měření při 254 nm poskytovalo velmi podobné výsledky, byly uvažovány pouze výsledky naměřené při vlnových délkách 254 a 260 nm. Stanovení adenosindifosfátu a adenosintrifosfátu bylo prováděno na koloně C₁₈ (Zorbax SB-C₁₈ Agilent, 5 µm, 150 × 0,5 mm). Mobilní fáze obsahovala iontově párové činidlo tetrabutylamonium bisulfát (TBAS) a sestávala z tetrabutylamonium bisulfátového pufru (fáze A) a acetonitrilového pufru (fáze B). Fáze A se skládala z 5,7 mmol dm⁻³ TBAS a 30,5 mmol dm⁻³ KH₂PO₄ (pH 5,8). Fáze B se skládala z acetonitrilu a fáze A v poměru 2:1. Stanovení probíhalo při gradientové eluci, která je uvedena v tab. I. Průtok mobilní fáze byl 10 µl min⁻¹. Dávkovaný objem byl 500 nl.

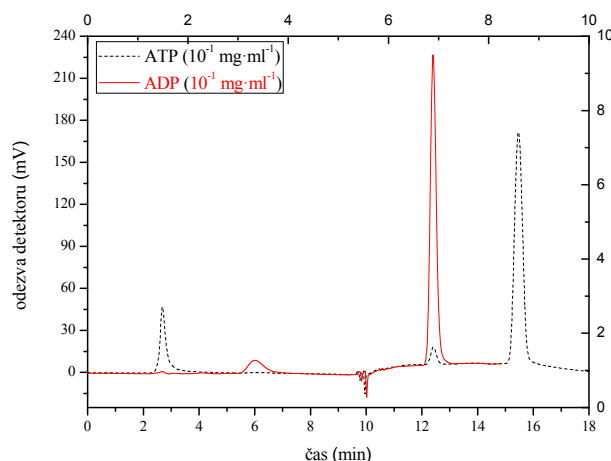
Nejprve byla provedena analýza adenosindifosfátu a adenosintrifosfátu při uvedených podmínkách. Chromatogram, který odpovídá daným analýzám, je znázorněn na obr. 2. Dále pak byly proměřeny kalibrační směsi o různých koncentracích (viz tab. II). Chromatogram, odpovídající separaci směsi ADP a ATP, je uveden na obr. 3.

Dále byly stanoveny limity detekce a stanovení obou analytů. Experimentálně byly limity získány určením koncentrací ADP a ATP, které odpovídaly trojnásobku šumu pro limit detekce a desetinásobku šumu pro limit stanovení. Limity detekce a stanovení pro oba analyty jsou uvedeny v tab. III. Buchholz a spol. uvádějí limity detekce u stanovení ADP a ATP metodou HPLC-UV o velikosti 0,63 mmol dm⁻³ (cit.¹¹). Další autoři stanovili limit detekce podobnou metodou pro ADP jako 0,1 mg l⁻¹ (tj.

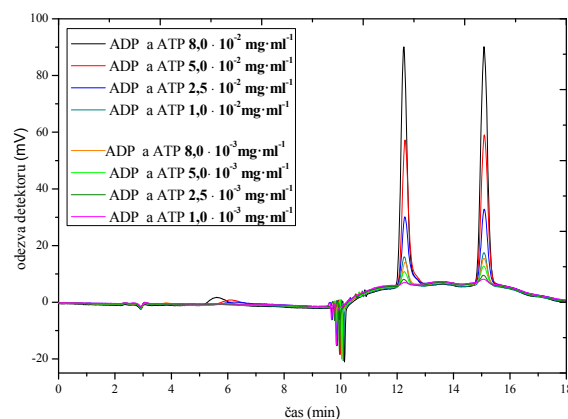
Tabulka I

Eluční gradient mobilní fáze v objemových procentech. Použitá kolona C₁₈ (Zorbax SB-C₁₈ Agilent, 5 µm, 150 × 0,5 mm). 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 acetonitrilu a fáze A v poměru 2:1. Průtok mobilní fáze byl 10 µl min⁻¹. Dávkovaný objem byl 500 nl. Detekce detektorem diodového pole, který měřil při 210, 220, 254 a 260 nm.

| Čas [min] | Množství fáze A [obj. %] |
|--------------|-----------------------------|
| 0 | 90 |
| 3,0 | 60 |
| 7,2 | 60 |
| 7,5 | 90 |
| 12,0 | 90 |



Obr. 2. Analýza adenosindifosfátu a adenosintrifosfátu. Použitá kolona C₁₈ (Zorbax SB-C₁₈ Agilent, 5 µm, 150 × 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 z acetonitrilu a fáze A v poměru 2:1. Průtok mobilní fáze byl 10 µl min⁻¹. Dávkovaný objem byl 500 nl. Detektor diodového pole při 254 nm.



Obr. 3. Kalibrační závislost směsí adenosindifosfátu a adenosintrifosfátu o různých koncentracích. Použitá kolona C₁₈ (Zorbax SB-C₁₈ Agilent, 5 µm, 150 × 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 z acetonitrilu a fáze A v poměru 2:1. Průtok mobilní fáze byl 10 µl min⁻¹. Dávkovaný objem byl 500 nl. Detektor diodového pole při 254 nm.

0,23 µmol dm⁻³) a LOD pro ATP byl určen na hodnotu 0,11 mg l⁻¹ (tj. 0,22 µmol dm⁻³). 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 µmol dm⁻³). Obdobných výsledků bylo dosaženo

Tabulka II
Koncentrace kalibračních směsí ADP a ATP

| Koncentrace analytů ve směsi [mg ml ⁻¹] | <i>c</i> _{ADP} ve směsi [μmol dm ⁻³] | <i>c</i> _{ATP} ve směsi [μmol dm ⁻³] |
|---|--|--|
| 8,0 · 10 ⁻² | 187,4 | 157,8 |
| 5,0 · 10 ⁻² | 117,1 | 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 | 9,9 |
| 2,5 · 10 ⁻³ | 5,9 | 4,9 |
| 1,0 · 10 ⁻³ | 2,3 | 2,0 |

Tabulka III

Limity detekce (LOD) a limity stanovení (LOQ) adenosindifosfátu a adenosintrifosfátu. Použitá kolona byla C₁₈ (Zorbax SB-C₁₈ Agilent, 5 μm, 150 × 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 z acetonitrilu a fáze A v poměru 2:1. Stanovení probíhalo při gradientové eluci, která je uvedena v tab. I. Průtok mobilní fáze byl 10 μl min⁻¹. Dávkovaný objem byl 500 nl. Detektor diodového pole měřil při 260 nm.

| Analyt | Limity | <i>c</i> [mg ml ⁻¹] | <i>c</i> [μmol dm ⁻³] |
|--------|--------|---------------------------------|-----------------------------------|
| ADP | LOD | 6 · 10 ⁻⁴ | 1,4 |
| | LOQ | 3 · 10 ⁻³ | 7,0 |
| ATP | LOD | 1 · 10 ⁻³ | 2,0 |
| | LOQ | 5 · 10 ⁻³ | 9,9 |

i ve studii Coolena a spol., kteří zjistili LOD pro ADP jako 0,072 μmol dm⁻³ a LOD ATP jako 0,049 μmol dm⁻³ (cit.¹⁰). Stejný vědecký tým dosáhl limitu stanovení pro adenosindifosfát při hodnotě koncentrace o velikosti 0,239 μmol dm⁻³ a LOQ adenosintrifosfátu jako 0,162 μmol dm⁻³. Námi zjištěné limity detekce a stanovení jsou tedy nepatrně větší nebo srovnatelné s LOD a LOQ uváděné v literatuře.

Závěr

V rámci předkládané práce byly nalezeny podmínky stanovení adenosindifosfátu a adenosintrifosfátu pomocí mikrokapalinové chromatografie s detektorem diodového pole. Analýza probíhala na koloně C₁₈. Oba analyty byly nejlépe separovány při použití iontově párového činidla

tetrabutylamonium bisulfátu v mobilní fázi. Ke stanovení bylo použito gradientové eluce a průtok mobilní fáze byl 10 μl min⁻¹. Nejlepších a srovnatelných výsledků bylo dosaženo u měření analytů při 254 nm a 260 nm. Pomocí optimalizovaných podmínek byly zjištěny limity detekce a limity stanovení obou analytů. Limit detekce pro ADP byl 1,4 μmol dm⁻³ a limit stanovení stejného analytu byl 7,0 μmol dm⁻³. Limit detekce ATP byl zjištěn při hodnotě 2,0 μmol dm⁻³ a jeho LOQ bylo 9,9 μmol dm⁻³. V předkládané práci byly naměřeny limity detekce a limity stanovení, které jsou nepatrně větší nebo srovnatelné s limity uváděnými v literatuře.

LITERATURA

- Koštř J.: *Biochemie*. Avicenum, Praha 1974.
- http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002_v1/hesla/adenosinfosfaty.html. Staženo 31. 3. 2011.
- Qian T., Cai Z., Yang M. S.: *Anal. Biochem.* 325, 77 (2004).
- Cordell R. L., Hill S. J., Ortori C. A., Barrett D. A.: *J. Chromatogr., B* 871, 115 (2008).
- Klawitter J., Schmitz V., Klawitter J., Leibfritz D., Christians U.: *Anal. Biochem.* 365, 230 (2007).
- Pierro D., Tavazzi B., Perno C. F., Bartolini M., Balestra E., Calio R., Giardina B., Lazzarino G.: *Anal. Biochem.* 231, 407 (1995).
- Xue X., Wang F., Zhou J., Chen F., Li Y., Zhao J.: *J. Agr. Food. Chem.* 57, 4500 (2009).
- Huang D., Zhang Y., Chen X.: *J. Chromatogr., B* 784, 101 (2003).
- Fung E. N., Cai Z., Burnette T. C., Sinhababu A. K.: *J. Chromatogr., B* 754, 285 (2001).
- Coolen E. J., Arts I. C., Swennen E. L., Bast A., Cohen Stuart M. A., Dagnelie P. C.: *J. Chromatogr. B* 864, 43 (2008).
- Buchholz A., Hurlebaus J., Wandrey C., Takors R.: *Biomol. Eng.* 19, 5 (2002).
- Viant M. R., Pincetich C. A., Hinton D. E., Tjeerdema R. S.: *Aquat. Toxicol.* 76, 329 (2006).
- Ferreira I. M., Mendes E., Gomes A. M., Faria M. A., Ferreira M. A.: *Food. Chem.* 74, 239 (2001).
- Bernocchi P., Ceconi C., Cargnoni A., Pedersini P., Curello S., Ferrari R.: *Anal. Biochem.* 222, 374 (1994).
- Kimura Y., Shibasaki S., Morisato K., Ishizuka N., Minakuchi H., Nakanishi K., Matsuo M., Amachi T., Ueda M., Ueda K.: *Anal. Biochem.* 326, 262 (2004).
- Tomiya N., Ailor E., Lawrence S. M., Betenbaugh M. J., Lee Y. C.: *Anal. Biochem.* 293, 129 (2001).
- Kawamoto Y., Shinozuka K., Kunitomo M., Haginaka J.: *Anal. Biochem.* 262, 33 (1998).
- Edwards J. L., Edwards R. L., Reid K. R., Kennedy R. T.: *J. Chromatogr., A* 1172, 127 (2007).
- Ni Q., Reid K. R., Burant C. F., Kennedy R. T.: *Anal. Chem.* 80, 3539 (2008).