

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Analytická chemie



Bc. Markéta Konečná

EXTRAKCE NUKLEOTIDŮ Z ROSTLINNÉ MATRICE A JEJICH
STANOVENÍ IONTOVĚ VÝMĚNNOU VYSOKOÚČINNOU
KAPALINOVOU CHROMATOGRÁFIÍ

Extraction of nucleotides from plant matrix and their determination by ion-
exchange high performance liquid chromatography

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Jana Sobotníková, Ph. D.

Praha 2018

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 31. srpna 2018.

.....

Bc. Markéta Konečná

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala všem, kteří mi poskytli podklady pro vypracování této práce. Zvláště pak děkuji vedoucí diplomové práce paní RNDr. Janě Sobotníkové, Ph. D. za odborné vedení a konzultování diplomové práce a za trpělivost a rady, které mi po celou dobu poskytovala. V neposlední řadě je mou milou povinností poděkovat svým rodičům a blízkým za morální a materiální podporu, které se mi dostávalo po celou dobu studia.

Abstrakt

V této diplomové práci byly optimalizovány chromatografické podmínky pro HPLC analýzu ribonukleotidů AMP, ADP a ATP. Pro separaci byla využita chromatografická kolona Nucleogel SAX 1000-8, 50 x 4,6 mm, od německé firmy Marcherey-Nagel. Mobilní fázi tvořil roztok KH_2PO_4 o koncentraci 0,2 mol/L, jehož pH bylo upraveno 1 mol/L hydroxidem draselným na hodnotu $\text{pH} = 5,00$. Jako nejvhodnější průtoková rychlost byl zvolen 1,0 mL/min. Analýza probíhala s využitím isokratické eluce. Detekce byla provedena DAD detektorem při vlnové délce $\lambda = 260$ nm. Látky byly eluovány v pořadí AMP ($t_r = 0,911$ min), ADP ($t_r = 1,667$ min) a ATP ($t_r = 7,262$ min). Celková doba analýzy směsi standardů, za výše zmíněných podmínek, trvala 10 minut.

Pro extrakci adenosin-5'-ribonukleotidů z reálné matrice byly použity mražené a lyofilizované listy tabáku virginského (*Nicotiana tabacum L.*). Byly využity dvě metody extrakce. První postup byl založen na extrakci AMP, ADP a ATP z listů rostliny tabáku vařící deionisovanou vodou. Druhá metoda využívala k extrakci, místo deionisované vody, 0,07 mol/L HClO_4 .

Klíčová slova: HPLC, adenosinové ribonukleotidy, AMP, ADP, ATP, tabák virginský

Abstract

In this thesis chromatographic conditions for the HPLC analysis of ribonucleotides AMP, ADP and ATP were optimized. For their separation chromatographic column, Nucleogel SAX 1000-8, 50 x 4,6 mm, from the German company Marcherey-Nagel was used. The mobile phase of a 0,2 mol/L solution of KH_2PO_4 , its pH was adjusted with 1mol/L with potassium hydroxide to pH = 5,00. As the most suitable flow rate was selected 1,0 mL/min. The analysis was conducted using an isocratic elution. Detection was conducted by a DAD detector at a wavelength of $\lambda = 260$ nm. Substances were eluted in the following order AMP ($t_r = 0,911$ min), ADP ($t_r = 1,667$ min) and ATP ($t_r = 7,262$ min). The total analysis time of the mixture of standards, under the conditions mentioned above, lasted for 10 minutes.

For the extraction of adenosine-5-ribonucleotides the real matrix frozen and lyophilized leaves of tobacco virginia (*Nicotiana tabacum L.*) have been used. Two methods of extraction were applied. The first procedure was based on the extraction of AMP, ADP and ATP from the leaves of the tobacco plant by boiling deionized water. In the second method 0,07 mol/L HClO_4 for the extraction instead of deionized water was used.

Keywords: HPLC, adenosine ribonucleotides, AMP, ADP, ATP, tobacco virginia

Obsah

Prohlášení	2
Poděkování	3
Abstrakt	4
Abstract	5
Obsah	6
Seznam zkratk	8
1 Úvod	10
2 Teoretická část	11
2.1 Studované látky	11
2.1.1 Nukleotidy	11
2.1.2 Adenosinové nukleotidy	13
2.1.2.1 Adenosinmonofosfát (AMP)	14
2.1.2.2 Adenosindifosfát (ADP)	15
2.1.2.3 Adenosintrifosfát (ATP)	16
2.2 Rostlinná matrice	17
2.2.1 Historie tabáku	17
2.2.2 Tabák – rod Nicotiana	18
2.2.2.1 Tabák virginský	18
2.2.3 Rostlinný stres	19
2.2.4 Mechanismy odolnosti rostlin	20
2.3 Metoda měření	22
2.3.1 Historie	22
2.3.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)	22
2.3.2.1 Instrumentace HPLC	23
2.3.3 Iontově výměnná chromatografie (IEC)	27
2.4 Literární rešerše analýzy AMP, ADP a ATP z reálné matrice	30
3 Experimentální část	32
3.1 Chemikálie	32
3.2 Přístroje a pomůcky	32
3.3 Rostlinný materiál	33

3.4	Postup	33
3.4.1	Příprava mobilní fáze	33
3.4.2	Příprava standardních roztoků	33
3.4.3	Příprava roztoků standardů pro sestavení kalibrační křivky	33
3.4.4	Extrakce z rostlinného materiálu	34
4	Výsledky a diskuze	35
4.1	Optimalizace metody	35
4.2	Stabilita roztoků standardů	37
4.3	Kalibrační závislost pro roztoky standardů	38
4.4	Stanovení AMP, ADP a ATP v reálných vzorcích	40
5	Závěr	45
6	Zdroje	47

Seznam zkratek

°C	stupně Celsia, jednotka teploty
μL	mikrolitr, jednotka objemu
μm	mikrometr, jednotka míry
A	Absorbance
ABA	Kyselina abscisová
ADP	Adenosindifosfát
AMP	Adenosinmonofosfát
ATP	Adenosintrifosfát
AU	absorpční jednotka
c	molární koncentrace [mol/L]
cAMP	Cyklický adenosinmonofosfát
cGMP	Cyklický guanosinmonofosfát
cm	centimetr, jednotka míry
DAD	detektor diodového pole
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
FAD	Flavinadenindinukleotid
g	gram, jednotka váhy
GA	Kyselina gibberelová
GMP	Guanosinmonofosfát
GTP	Guanosintrifosfát
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IEC	iontově výměnná chromatografie
l	tloušťka absorpční vrstvy [cm]
LOD	mez detekce
LOQ	mez stanovitelnosti
m/z	poměr molekulové hmotnosti a nábojového čísla
MF	mobilní fáze
mg	miligram, jednotka váhy
mm	milimetr, jednotka míry

MPa	megapascal, jednotka tlaku
NAD	Nikotinamidadeninukleotid
nm	nanometr, jednotka míry
NMR	spektroskopie nukleární magnetické resonance
PDA	druh detektoru diodového pole
pH	záporný dekadický logaritmus koncentrace vodíkových iontů
pKa	logaritmický tvar disociační konstanty kyseliny
psi	jednotka tlaku, 1 psi = 6 894,8 Pa
RNA	Ribonukleová kyselina
RP-HPLC	Reverse phase HPLC (HPLC s obrácenými fázemi)
SF	stacionární fáze
t_r	retenční čas [min]
UHPLC	ultravysokoúčinná kapalinová chromatografie
UPLC	ultravysokotlaká kapalinová chromatografie
UV/VIS	ultrafialovo-viditelná oblast světla
ϵ	molární absorpční koeficient [L/cm·mol]

1 Úvod

Nukleotidy jsou nedílnou součástí každého živého organismu (v podobě DNA/RNA). Skládají se ze sacharidové skupiny (ribózy/deoxyribózy), dusíkaté báze a zbytku kyseliny fosforečné. Dusíkaté báze se dělí na purinové, molekulární struktura s dvěma kruhy (thymin, uracil a cytosin), a pyrimidinové, molekulární struktura s jedním kruhem (adenin a guanin). Podle počtu navázaných zbytků kyseliny fosforečné rozlišujeme mono-, di- a tri- fosfáty. Předmětem zájmu této práce jsou adenosinové ribonukleotidy: adenosinmonofosfát AMP, adenosindifosfát ADP a adenosintrifosfát ATP. Podle jejich intracelulární koncentrace lze zjistit aktuální energetický/metabolický stav organismu (rostlin i živočichů) [1 – 4].

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC, High Performance Liquid Chromatography) se využívá k separaci, identifikaci a zjištění obsahu široké škály látek ve vzorku. K separaci dochází v separační koloně při vysokém tlaku. Ta obsahuje dvě nemísitelné fáze, stacionární a mobilní. Principem separace je rozdílná afinita analytu ke stacionární a mobilní fázi, dochází k rovnovážné distribuci (rozpuštěnosti, adsorpci, iontové výměně, bioafinitě) analytu mezi obě fáze. Složky opouštějí kolonu v různou dobu, v pořadí podle toho, jak jsou v koloně zadržovány. Následně vstupují do detektoru, který vyhodnocuje změny ve složení mobilní fáze měřením fyzikálních a chemických veličin. Velmi často se využívá spektrofotometrický detektor. HPLC umožňuje analyzovat s vysokou citlivostí téměř veškeré organické látky. V současnosti se jedná o jednu z hlavních analytických metod, která se využívá nejen v oblasti výzkumu, ale i vývoje [5 – 7].

V této diplomové práci byly nejprve optimalizovány podmínky pro separaci a identifikaci adenosinových ribonukleotidů (AMP, ADP a ATP), metodou iontové výměnné HPLC. Cílem bylo v co nejkratším možném čase dosáhnout nejlepšího chromatografického rozlišení všech 3 nukleotidů. Dalším úkolem bylo nalezení vhodné extrakční techniky pro stanovení těchto látek v rostlinné matrici (listy tabáku virginského).

2 Teoretická část

2.1 Studované látky

2.1.1 Nukleotidy

Každá buňka v těle obsahuje řadu biomolekul. Jedná se o organické sloučeniny, které se podílejí na stavbě buňky a jejím správném fungování. Mezi tyto molekuly patří nukleotidy, které jsou složkou deoxyribonukleové kyseliny neboli DNA a ribonukleové kyseliny neboli RNA. Jedná se o podjednotku, která je spojena do dlouhého řetězce (je polymerizována) za účelem tvorby nukleových kyselin. Skládá se ze tří menších složek: ribózového cukru, dusíkaté báze a zbytku kyseliny fosforečné. Nukleotidy pomáhají uchovat genetickou informaci, která je poté nezbytná při tvorbě genů. Dále také pomáhají při tvorbě bílkovin nezbytných pro vývoj buněk a jejich zdraví. Nukleotidy patří mezi složky, které naše tělo umí extrahovat z potravy; do buněk jsou odesílány v průběhu trávicího procesu. V rámci probíhajících studií o původu a funkcích nukleotidů vědci zjistili, že některé z nukleotidů vznikly patrně spontánně, když se život vytvářel v prehistorických dobách [1, 2].

Jedním z klíčových chemických rozdílů mezi DNA a RNA je, že RNA obsahuje sacharid ve formě ribózy, ale v DNA je obsažen sacharid ve formě deoxyribózy, z níž byl odstraněn kyslík. Deoxyribóza obsahuje 5 atomů uhlíku. Podle konvence jsou uhlíky na tomto cukru označeny 1' až 5'.

Nukleotidy dále obsahují jednu, dvě nebo tři fosfátové skupiny. Tyto kombinace jsou označovány jako monofosfáty, difosfáty či trifosfáty a je možné, aby byly připojeny ke kterékoliv volné OH skupině sacharidu. U ribonukleotidů (nukleotidy obsahující ribózu) jsou to pozice 2', 3' a 5' a u deoxyribonukleotidů (nukleotidy s deoxyribózou) jsou to uhlíky na 3' a 5' pozici. Možné je také uspořádání, které neobsahuje žádnou fosfátovou skupinu. Tato sloučenina se neoznačuje jako nukleotid, ale jako nukleosid a tvoří ho pouze báze a molekula cukru [1 – 4].

Dusíkaté báze, které tvoří DNA a RNA, obsahují minimálně dva atomy dusíku. K deoxyribóze (i ribóze) jsou připojeny k jejímu 1' uhlíku. DNA (i RNA) obsahuje čtyři různé báze, které lze rozdělit do dvou tříd: pyrimidiny (cytosin (C), thymin (T) a uracil (U)) a puriny (adenin (A) a guanin (G)). Puriny obsahují molekulární strukturu s dvěma

kruhy, která je navázána na molekulu sacharidu, zatímco pyrimidinové nukleotidy obsahují strukturu pouze s jedním kruhem. DNA obsahuje dva puriny (adenin a guanin) a dva pyrimidiny (thymin a cytosin). RNA obsahuje nukleotidy adenin, guanin a cytosin, na místě thyminu se nachází pyrimidinový uracil. Po navázání báze na molekulu cukru se nepatrně změní i její název, například z adeninu se stává adenosin, z guaninu se stává guanosin apod. Nukleotidy jsou pojmenovány pomocí třípísmenných zkratk. Ty pocházejí z názvu kombinace báze, případně cukru a typu fosfátové skupiny, která je k němu připojena (ATP – adenosintrifosfát). Mezi nukleotidy řadíme jak nukleosidové estery kyseliny fosforečné, difosforečné či trifosforečné (např. GMP, ADP, GTP) tak i cyklické 3',5'-fosfodiester (cAMP, cGMP) [1 – 4, 8].

Spojením mezi molekulou cukru jednoho nukleotidu a fosfátovou skupinou druhé molekuly vzniká nukleová kyselina. Každé spojení mezi nukleotidy je kovalentní vazba. Kombinací nukleových kyselin vzniká DNA a RNA. DNA i RNA jsou součástí chromozomů, které přenášejí genetickou informaci do nově vznikajících dceřiných buněk [1, 2].

Organizmy dokážou získat nukleotidy dvěma způsoby. Některé z nich jsou vyrobeny tělem a jsou známé jako endogenní nukleotidy. Jiné jsou absorbovány z potravy a jsou nazývány exogenními nukleotidy. K vytvoření DNA jsou potřebné všechny tyto nukleotidy, je nezbytné, aby každý živý organismus (včetně lidí) přijímal různé zdroje potravin, které poskytují nukleotidy se všemi pěti dusíkatými bázemi. Jestliže dojde k nedostatečnému příjmu nukleotidů, nemůže DNA ani RNA správně fungovat. Například DNA by nebyla schopna řádně kontrolovat funkci buněk a RNA by nedokázala pomoci buňkám vytvářet proteiny. To by mohlo způsobit poškození buněk a tkání, které tyto buňky tvoří, a následně způsobit vážné zdravotní potíže [1].

Jak již bylo zmíněno, nukleotidy mají v buňkách několik podstatných funkcí. Zde jsou přehledně vyjmenovány a doplněny ještě o některé další [3, 9]:

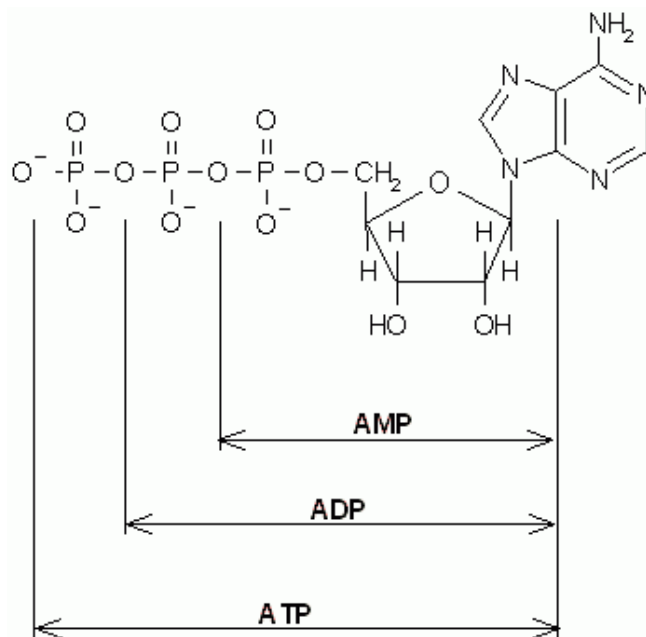
- a) jedná se o monomerní jednotky nukleových kyselin;
- b) jsou prekurzory DNA a RNA;
- c) v signálních kaskádách zastávají funkce druhých posílů (cAMP a cGMP)
- d) klíčové molekuly energetického metabolismu (především ATP);
- e) adeninové nukleotidy jsou součástí řady kofaktorů enzymů (např. NAD, FAD, koenzym A);

f) metabolické regulátory:

- cAMP je prostředníkem hormonálních účinků
- fosforylace proteinu závislá na ATP – aktivuje fosforylázu a inaktivuje glykogen syntázu
- alosterický regulátor – glykogen fosforyláza aktivovaná ATP a inaktivovaná AMP

2.1.2 Adenosinové nukleotidy

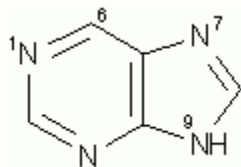
Adenosinové ribonukleotidy je souhrnný název pro ATP, ADP, AMP a cAMP. Vazbou cukru ribózy na adenin vzniká ribonukleosid a jeho fosforylované formy jsou označovány jako adenosinfosfáty (obr. 1). Adenosinfosfáty slouží mimo jiné i jako efekторы aktivity regulačních enzymů, kdy ATP je inhibítořem katabolických drah (předeřším citrátového cyklu a glykolýzy) a ADP s AMP tyto dráhy naopak aktivují. Energetický stav buňky lze vyjádřit tzv. energetickým nábojem, jenž se počítá z aktuálních intracelulárních koncentrací ATP, ADP a AMP, a proto je význam adenosinfosfátů pro energetické poměry zásadní [3].



Obr. 1 Struktura adenosinfosfátů: AMP, ADP a ATP [3]

Adenin patří mezi purinové báze. Purin je heterocyklická, bicyklická, aromatická dusíkatá sloučenina s pětičlenným imidazolovým kruhem, který je připojen na šestičlenný pyrimidinový kruh (viz obr. 2). Puriny patří mezi jedny z nejvíce

rozšířených heterocyklických sloučenin. V živém systému není pravděpodobně biochemická reakce, která do jisté míry nezahrnuje deriváty či substituenty purinu. Například jsou součástí nukleových kyselin v RNA či DNA a také jsou součástí energetických kofaktorů (ATP, GTP). Podstatnou úlohu mají například při glykolýze či citrátovém cyklu [3, 10, 11].



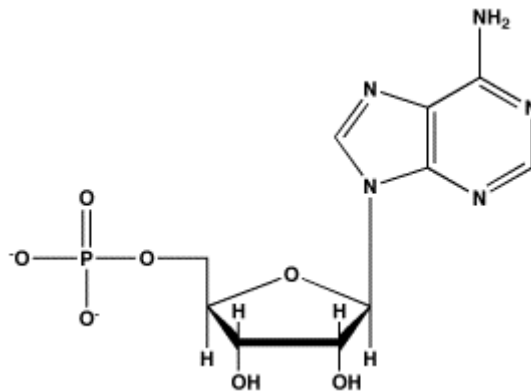
Obr. 2 Struktura purinu [3]

Adenosinové ribonukleotidy obsahují několik fosfátových skupin. Jedná se tedy o látky vysoce polární, nestabilní a s podobnou strukturou. Určení jejich koncentrace poskytuje významné informace pro pochopení buněčného energetického metabolismu, a proto je velmi podstatné nalezení vhodné metody k jejich stanovení. Nejběžněji používanou separační technikou pro stanovení těchto látek je vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) [9 – 12].

2.1.2.1 Adenosinmonofosfát (AMP)

Adenosin 5'-monofosfát (AMP), jehož struktura je uvedena na obr. 3, je známý také pod názvem 5'-adenylová kyselina. Jedná se o ester kyseliny fosforečné a nukleosidu adenosinu. AMP je endogenní purinový nukleotid, který je jednou ze strukturních složek DNA či RNA. Skládá se z jedné fosfátové skupiny, sacharidu ribózy a dusíkaté báze adeninu. Lze ho nalézt ve všech živých organizmech, jelikož je součástí energetického metabolismu [13, 14].

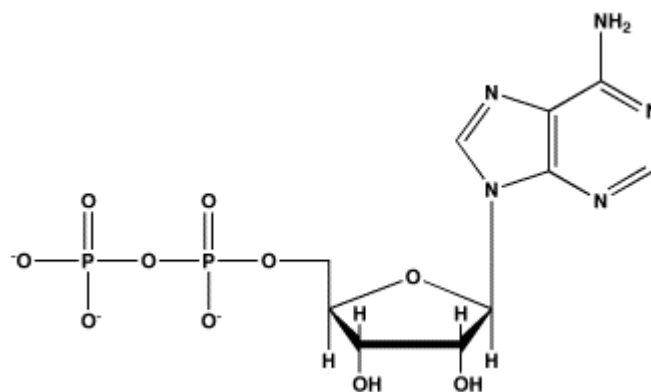
Adenosinmonofosfát (AMP) vzniká sekvenční hydrolýzou extracelulárního adenosintrifosfátu (ATP) a adenosindifosfátu (ADP). AMP je dále hydrolyzován cAMP diesterázou na adenosin, který je poté rychle metabolizován a následně je vyloučen z oběhu. Jedná se o jeden z aktivátorů katabolických procesů, které doplňují hladinu ATP, protože jeho koncentrace v buňkách roste při energetickém vyčerpání [3, 15].



Obr. 3 Struktura AMP [16]

2.1.2.2 Adenosindifosfát (ADP)

Adeninový nukleotid ADP obsahuje nukleovou bázi adenin, sacharid ribózu a dvě fosfátové skupiny v 5' poloze, jak je vidět na obr. 4. Adenosindifosfát patří spolu s adenosinmonofosfátem (AMP) a adenosintrifosfátem (ATP) mezi jedny ze základních buněčných energetických metabolitů, které se podílí na systému přenosů energie při metabolických dějích. Při metabolických reakcích díky jedné makroergické vazbě, kterou obsahuje, může energii uvolňovat nebo naopak může dosáhnout i nové makroergické vazby s dalším fosfátem. Mimo jiné se v první fázi procesu zástavy krvácení podílí na tvorbě destičkového trombu. Největší část ho vzniká defosforylací ATP díky enzymu ATPáza a také fosforylací AMP (enzymem adenylátkinázou). Díky jeho fosforylaci (substrátové či membránové) vzniká ATP. Dále se ADP na ATP mění například při fotosyntéze (pomocí sluneční energie) nebo při buněčné respiraci (pomocí energie získané rozkladem glukózy) [17 – 19].



Obr. 4 Struktura ADP [16]

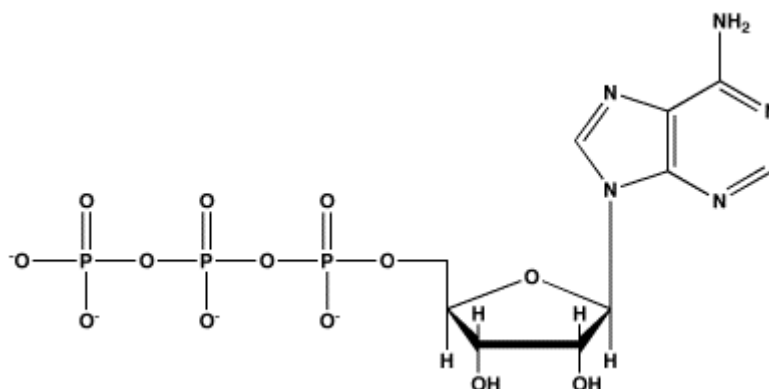
2.1.2.3 Adenosintrifosfát (ATP)

Adenosin-5'-trifosfát (viz obr. 5) je multifunkční nukleotid, který obsahuje tři negativně nabitě fosfátové skupiny (zbytky od kyseliny fosforečné) navázané na ribózu a dusíkatou bázi adenin. Tyto tři fosfáty jsou propojeny vzájemně a zároveň jsou k ribóze připojeny fosfodiesterovou vazbou. Ve všech těchto vazbách se udržuje energie této molekuly [3, 20 – 24].

ATP má několik důležitých rolí v biologických procesech. Je obecně známý jako substrát primární energie v živých organismech a signalizační molekula, která koordinuje odpovědi na energetický stav, částečně se podílí na modulaci iontových kanálů a také na aktivaci signalizační kaskády. Kromě jeho úloh v energetickém metabolismu a signalizaci je ATP začleňován do nukleových kyselin polymerázami v procesech DNA, replikaci a transkripci [3, 20 – 24].

ATP je také používán jako indikátor životaschopnosti a poškození buněk. Jeho množství je spojeno s řadou nemocí, jako je například hypoxie, buněčné poškození, apoptóza, kardiovaskulární onemocnění, Alzheimerova choroba, některé ze zhoubných nádorů, Parkinsonova choroba a hypoglykemie. Proto se zajištění spolehlivých, citlivých a selektivních analytických metod ATP stává naléhavým úkolem jak v klinické diagnostice, tak i pro léčbu různých onemocnění. Doposud byly pro zjištění obsahu ATP vyvinuty různé metody například: HPLC, NMR spektroskopie, kapilární elektroforéza a optické snímání na bázi aptameru [3, 20 – 24].

Jak již bylo zmíněno, ATP je významnou látkou, která zajišťuje jak skladování, tak i přenos chemické volné energie v buňce. Jeho štěpením (nejčastěji transferázami, hydrolázami a ligázami) vzniká ADP nebo AMP. Uvolněná energie se vloží do nově vznikajících kovalentních vazeb nebo se využije pro pohyb či aktivní transport. Díky enzymu adenylátcykláza vznikne štěpením z ATP cyklický AMP (cAMP). Aby došlo k syntéze ATP z ADP, musí docházet k procesům substrátové nebo membránové fosforylace [3, 20 – 24].



Obr. 5 Struktura ATP [16]

2.2 Rostlinná matrice

V této diplomové práci posloužil tabák virginský jako rostlinná matrice, ze které byly extrahovány studované adenosinové ribonukleotidy.

2.2.1 Historie tabáku

Už staré indiánské civilizace prosluly v Americe, kolébce tabáku, jeho kouřením při různých rituálních obřadech. Domorodci vdechovali aromatický kouř z vlastnoručně vyrobených kornoutů z palmových listů, které naplnili suchými tabákovými listy. Kornout nejprve na jedné straně zapálili a poté na druhé straně sáli dým, jenž vydechovali nosem a ústy [25, 26].

Když Kryštof Kolumbus objevil v roce 1492 Ameriku, přivezl nám mimo ostatních objevů i tabák a společně s ním i kouření. To se velice rychle rozmohlo. O rozšíření této byliny po celé Francii se zasloužila především Kateřina Medicejská. Tabák byl švédským přírodovědcem Karlem Linné (zakladatel systematické botaniky, jak ji známe dnes) pojmenován Nicotiana na počest Jeana Nicota, který byl francouzským vyslancem u portugalského dvora [25, 26].

Tabáku byly přisuzovány nejrůznější léčivé účinky. A právě o nich se chtěl v 16. století přesvědčit již zmiňovaný Francouz Jean Nicot, jenž ho z tohoto důvodu začal pěstovat [25, 26].

Několik let poté, co se tabák dostal v roce 1605 prostřednictvím obchodních cest z Turecka do Ruska, vydal ruský car přísný zákaz kouření tabáku. Za jeho porušení byly vynášeny velmi přísné tresty. I přes nejrůznější snahy o potlačení kouření, které probíhaly po celé Evropě, se ho nepodařilo vymýtit. V 17. století se rozšířilo po celé

Evropě. V naší zemi se poprvé ujalo za vlády Rudolfa II. a rozšířilo se během třicetileté války [25, 26].

Užívání tabáku prošlo během let několika fázemi. Od vdechování tabákového kouře, žvýkání, šňupání, až po kouření dýmky nakonec vyvrcholilo v roce 1881 vynalezením stroje na výrobu cigaret [25, 26].

2.2.2 Tabák – rod *Nicotiana*

Tabák se řadí do čeledi lilkovitých (*Solanaceae*). Rod *Nicotiana* obsahuje zhruba 65 druhů rostoucích především v subtropické Americe, Austrálii a Tichomoří.

Patří mezi jednoleté rostliny, které mají mělké, dlouhé a vláknité kořeny. Na jediné přímé žláznatě chlupaté lodyze, jenž dorůstá i několika metrové výšky, postupně vyrůstají jednoduché, velké a celokrajné listy. Jedná se o hlavní zpracovávaný produkt, který se vyznačuje omamující vůní a hořko-štiplavou chutí. Květy rostou ve vrcholičnatých květenstvích. Plodem je dvoupouzdrá tobolka s velkým množstvím drobných semen [27].

2.2.2.1 Tabák virginský

Nicotiana tabacum L. (obr. 6), tabák obecný (virginský), patří mezi nejrozšířenější. Jeho listy jsou široce kopinaté, řapík křídlatě rozšířený, květy s trubkovitými až nálevkovitými korunami, růžovými až červenými. Jedná se o jednoletou (v tropech i víceletou) 80 až 300 cm vysokou žláznatě chlupatou bylinu [28].



Obr. 6 *Nicotiana tabacum* L. [29]

Stejně jako tabák selský, pochází z Jižní a Střední Ameriky. V Evropě se pěstoval nejprve jako léčivá a okrasná rostlina, později pro své jedovaté alkaloidy v listech. V České republice se pěstuje v nejteplejších oblastech Moravy. Po sklizení se požadované části byliny fermentují a zpracovávají do kuřáckých výrobků. Sklizené listy obsahují 75 – 95 % vody, kyselinu citrónovou a jablečnou, 0,6 – 6 % účinné složky, kterou tvoří pyridinový alkaloid nikotin a jeho deriváty normikotin, anabasin, nikotylin, nikotianin aj. Sušené listy tabáku obsahují až 9 % látek ze skupiny alkaloidů, které jsou v různých částech rostlin vázány v podobě solí karboxylových kyselin. Avšak jedovatá je celá rostlina [30 – 33].

2.2.3 Rostlinný stres

Během života jsou rostliny vystavovány různým stresovým faktorům, které zpomalují jejich životní funkce, poškozují je a v nejhorším případě zapříčiní jejich uhynutí. Tyto faktory mohou být rozděleny do dvou skupin podle toho, zda se jedná o vliv životného (biotického) či neživotného (abiotického) charakteru. Příkladem biotického stresu je útok patogenu, negativní působení okolních organismů (bakterie, viry, houby, bezobratlí a parazitické rostliny) a stárnutí. Abiotický stres se dělí podle měnících se podmínek vnějšího prostředí a může být fyzikální nebo chemické povahy. Rozlišujeme primární abiotický stres, kam patří sucho, teplota (zvýšená či snižená), intenzivní světlo, nadbytek solí v půdě, přítomnost těžkých kovů a toxických látek v prostředí. Mezi sekundární abiotický stres řadíme osmotický a oxidativní stres [34, 35].

Největší hrozbou je především rostlinný patogen, organismus, který tráví celý svůj životní cyklus (nebo pouze jeho část) uvnitř rostliny, a právě tím jí škodí. Cest, jak mohou patogeny rostliny napadat, je hned několik. Obvyklý je například vstup přes různá mechanická poranění, plísně většinou penetrují povrchy listů a bakterie dokáží prostoupit skrz průduchy nebo stomata. Po vniknutí patogenního organismu do rostliny, uplatňuje patogen jednu z následujících strategií: patogen se snaží rostlinu zabít, opakem tomu jsou patogeny biotrofní, které nechávají rostliny naživu a hemibiotrofní patogeny, jež zabíjí hostitelskou rostlinu až v pozdějších fázích vývoje. Tento proces se nazývá patogenezé a skládá se z infekce, kolonizace a reprodukce patogenu. Schopnost patogenu způsobit nemoc se nazývá virulence [35].

Pro rozpoznání konkrétního typu abiotického stresu reagují rostliny řadou biochemických i fyziologických změn, jimiž ovlivňují nejrůznější procesy na úrovni buněk i celých rostlin. Reakce na tento druh stresu jsou většinou regulovány hormony ABA a GA (ABA = kyselina abscisová, GA = kyselina gibberelová). Abiotický stres, stejně jako biotický, řídí expresi rostlinných genů. Během abiotického stresu dochází u rostlin především k dysfunkci proteinů; a je zároveň jednou z klíčových příčin, proč dochází k poklesu úrody po celém světě [36, 37].

2.2.4 Mechanismy odolnosti rostlin

Zkoumáním vztahů mezi vnějším prostředím a stresovými reakcemi rostliny lze rozpoznat přenos podnětů, které vyvolávají stres na rozhraní orgánů rostliny s vnějším prostředím, a rovněž přenos signálů uvnitř rostliny. Obranné mechanismy proti stresu lze rozdělit do dvou kategorií [38].

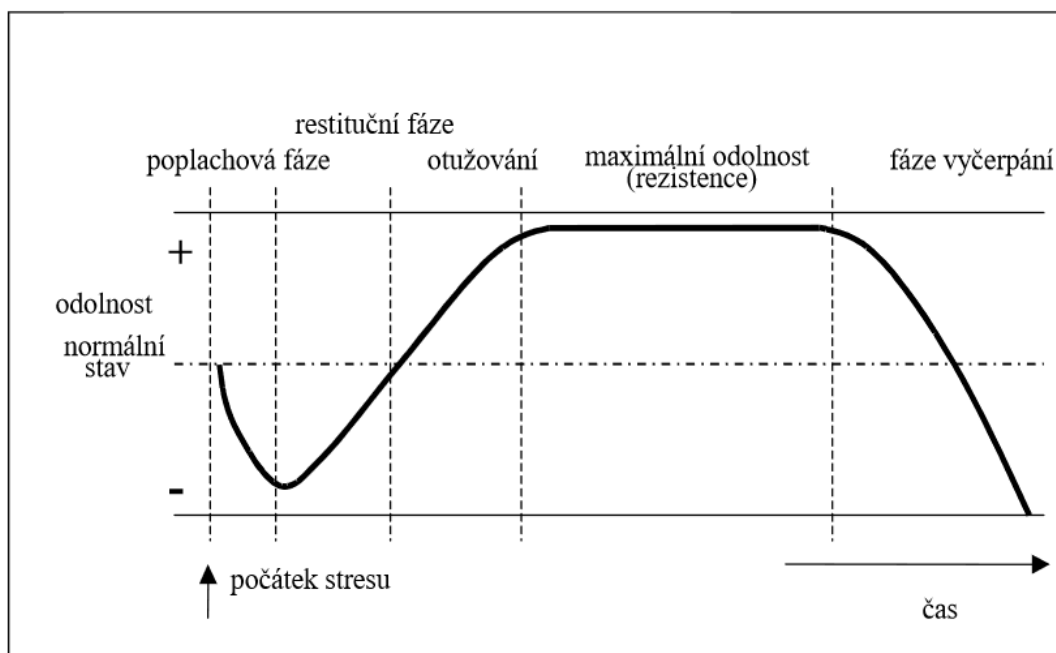
Prvními jsou mechanické bariéry, které zabraňují vystavení hostitelské rostliny stresu („avoidance mechanisms“). Jsou převážně pasivního a dlouhodobého charakteru, např. silná kutikula na listech, výrazná impregnace buněčných stěn a rezervoáry vody [38].

Druhou skupinou jsou mechanismy, které tvoří tzv. aktivní obranu rostlin („tolerance mechanisms“). Snaží se omezit negativní dopad stresorů, dokud nedojde k jejich proniknutí k plazmatické membráně buněk a do symplastu. Pokud k tomu dojde, spustí se řetězec změn, který je označován jako stresová reakce. Jaký bude průběh a výsledek stresové reakce nezáleží pouze na intenzitě, délce působení stresového faktoru, ale i na rostlině samotné (stadium vývoje, vitalita, genotyp, adaptační schopnosti). Kvůli působení více stresových faktorů v přírodních podmínkách současně je zkoumání vlivu stresu na rostliny komplikovaný proces. Často dochází k působení stresorů pouze jen na část rostliny a tam k lokální stresové reakci, která ale může následně způsobit stres i v ostatních orgánech rostliny [38].

Rezistence je označována jako schopnost rostliny přežít při nepříznivých podmínkách. Lze ji rozdělit na avoidanci a toleranci, které tvoří komplex obranných reakcí. Při avoidanci se rostlina snaží předcházet nebo rovnou vyhnout stresu (např. zkrácením životního cyklu, vývojem vhodného typů kořenů či listů, složením kutikuly). Jedná se o pasivní způsob ochrany, jenž spočívá v anatomickém a morfoloickém přizpůsobení. Strategie aktivního odolávání stresoru s pokusem co nejvíce zmírnit jeho

působení je označována za toleranci. Získává se postupně během procesu zvaném aklimace (otužování), při které se rostlina snaží o ustanovení nového rovnovážného stavu. Jedná se o vyrovnávání se s novými podmínkami. Takto získané vlastnosti jsou nedědičné, reverzibilní a závisí na změně metabolismu [39, 40].

Průběh stresové reakce, která vede k toleranci, obsahuje několik fází (viz obr. 7). První fáze je označována jako poplachová. Dochází k rozeznání působení stresoru, tato informace je signálními drahami předána dalším částím buňky a následuje změna určitých genů. Stresová informace se rozšíří po celé rostlině. Další částí je restituční fáze, během které rostlina aktivuje své obranné mechanismy, což jí umožňuje překonat působení stresoru (otuží se a získává vyšší odolnost). V následující fázi, rezistenci, rostlina odolává působení stresoru a snaží se přežít. Během dlouhodobého stresu může dojít k úplnému vyčerpání energetických rezerv a k následnému úhynu rostliny. Výsledek stresové reakce neovlivňuje pouze doba působení stresu. Závisí také na typu stresoru, jeho velikosti a rychlosti jeho nástupu. Ze strany rostliny poté záleží na jejím genotypu, fyziologickém stavu a vývojovém stadiu [39, 40].



Obr. 7 Schéma průběhu stresové reakce [39]

2.3 Metoda měření

2.3.1 Historie

Chromatografii vynalezl v roce 1903 ruský botanik Michail Semyonovič Cvet, který ji použil k oddělení rostlinných pigmentů: chlorofylu, karotenů a xantofylů. Hlavní rozvoj separačních technik začal po 2. světové válce. Na začátku 70. let 20. století zavedli Horváth, Guiochon a další do kapalinové chromatografie stacionární fáze, které byly založené na porézním silikagelu. Tyto stacionární fáze byly stabilní při vyšších tlacích a dali tak vzniknout dnes velmi využívané vysoko účinné kapalinové chromatografii (HPLC) [41 – 43].

V počátcích HPLC byly populární tzv. pelikulární stacionární fáze (větší neporézní částice obalené vrstvou drobnějších porézních částic). Mezi ně lze zařadit produkt zvaný „fused-core particle“. Jednalo se o neporézní silikonové jádro obalené silnou vrstvou slinutých (fused) silikonových nanočástic. Dále se také zkoušeli například monolitické stacionární fáze. Monolit má tvar jediné velké částice, která zcela zaplňuje vnitřek kolony. Takto plněné kolony neobsahují mezičásticové prostory a veškerá mobilní fáze musí tedy protékat póry monolitu, které jsou však větší než u částic. Díky tomu dochází v koloně k rychlejšímu přenosu hmoty [41].

K dalšímu významnému vývoji HPLC došlo až v roce 2003, kdy společnost Agilent Technologies představila úplně porézní kolony Zorbax Quick Solution, jejíž částice SF byly menší než 2 μm . Jednalo se o evoluční směr v kolonové technologii. O rok později zavedla společnost Waters na trh kapalinový chromatograf Acquity UPLC s tlakovou kompatibilitou okolo 80 MPa, vyšší než běžných 40 MPa (6000 psi). Tato technika je označovaná jako ultravysokotlaká kapalinová chromatografie (UPLC) [43].

2.3.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie je jedním z typů kapalinové chromatografie. Tato metoda se používá jak v kvalitativních, tak i kvantitativních aplikacích neboli pro identifikaci a kvantifikaci sloučenin. Analýza vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) začíná nadávkováním kapalného vzorku do chromatografické kolony. Ten je poté unášen přes kolonu kapalným rozpouštědlem (mobilní fáze) pomocí čerpadla, které udržuje jeho průtok konstantní. Na konci kolony

se nachází detektor, který má za úkol registrovat přítomnost složek ve vzorku (ne rozpouštědla). Využívají se především spektrofotometrické detektory. Principem této metody, aby došlo k oddělení složek vzorku, je tedy interakce mezi analytem, kapalnou mobilní fází (MF) a stacionární fází (SF) [44 – 46].

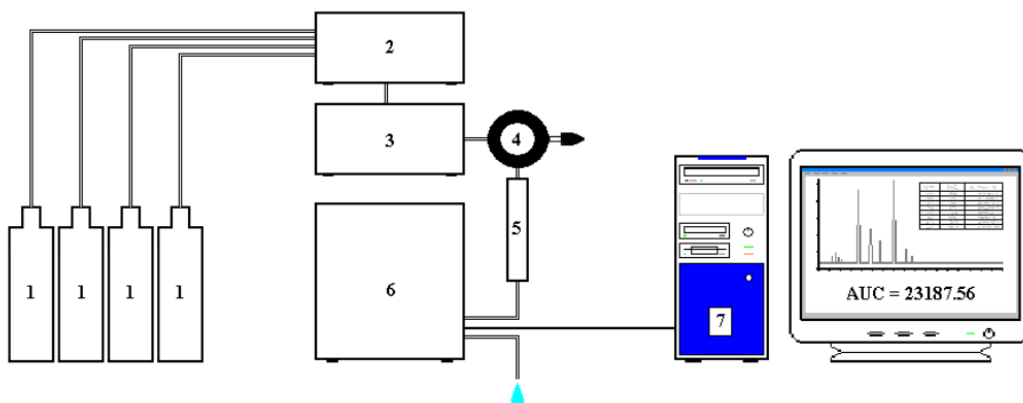
Mobilní fáze v HPLC může být jak polární, tak i nepolární kapalina, mohou jimi být např. benzen, aceton, acetonitril, ethanol, methanol, voda nebo také roztoky anorganických kyselin a zásad o dané iontové síle a pH. Volbou pH můžeme ovlivnit chromatografické chování jak analytu, tak i SF. Pro kontrolu pH mobilní fáze se používají pufrů, výběr pufru se řídí pufrací kapacitou pufru. Obvykle se používá fosfátový či acetátový pufr [46].

Stacionární fází bývají nejčastěji oxid křemičitý (silikagel), oxid hlinitý (alumina), aktivní uhlí, silikagel s navázanými funkčními skupinami či organické polymery (např. polystyren-divinylbenzenové kopolymery, methakrylátové polymery). Na silikagel, který slouží v tomto případě jako nosič SF, mohou být navázány funkční skupiny (vlastní SF), kterými jsou nepolární uhlovodíky (C8 – oktan, C18 – oktadekan), iontově výměnné skupiny, chirální selektory či bioafinitní ligandy [5, 6, 44].

Jednou z nejdůležitějších výhod HPLC je, že se jedná o rychlý, automatizovaný a vysoce přesný proces separace. Další velkou výhodou je, že měření s vysokým rozlišením a reprodukovatelnými výsledky, lze provést ve velmi krátkém čase (10 až 30 minut). Nepochybně se jedná o nákladnou metodu, která vyžaduje velké množství drahých organických látek, ale která zároveň představuje univerzální a velmi přesný způsob identifikace chemických složek [5, 6, 44].

2.3.2.1 Instrumentace HPLC

Přístroj HPLC se skládá z několika částí (viz obr. 8): zásobníku MF, čerpadla, injektoru, kolony, detektoru a počítače (zařízení pro zpracování dat). Nevýhodou je, že celá aparatura spotřebovává poměrně velké množství rozpouštědel, a tudíž se nejedná o přenosnou techniku. Vzorky, které se pomocí této metody analyzují, se musí nejprve shromáždit a až potom mohou být zpracovány. Analýza však poté trvá většinou méně než hodinu. Než k ní však dojde, musí být metoda optimalizována a vzorek dostatečně upraven, aby byl připraven pro nadávkování [5, 7, 47]



Obr. 8 Schéma HPLC systémů: 1) zásobníky mobilní fáze, 2) vysokotlaké čerpadlo, 3) směšovací zařízení, 4) dávkovací zařízení, 5) kolona, 6) detektor, 7) zapisovací zařízení [7]

Kolony

Správná volba kolony má pro HPLC analýzu zásadní význam. Dochází v ní totiž k samotnému chromatografickému procesu. Hlavním požadavkem na kolonu je, aby během nejkratšího možného času dokázala rozdělit co největší počet látek, avšak s co největší účinností. Účinnost kolony závisí na kvalitě použitého sorbentu, její délce, materiálu, z kterého je vyrobena, způsobu plnění a na několika dalších faktorech [49].

Nejčastějšími materiály, ze kterých se chromatografické kolony vyrábí jsou sklo a nerezová ocel. S kolonami vyrobenými ze skla lze však pracovat pouze při tlaku do 30 MPa. Proto je důležité si předem ujasnit při jakém pracovním tlaku bude analýza probíhat. Vnitřní průměr kolon se pohybuje v rozmezí 2,1 – 4,6 mm a délka od 5 do 25 cm [49].

Náplně kolon lze rozdělit na dvě skupiny: anorganické materiály a organické polymery. Mezi anorganické materiály patří již zmíněný silikagel, alumina nebo zirkonia. Zirkoniové náplně je možné, na rozdíl od silikagelu, používat při vyšších teplotách a jsou i chemicky stabilnější. V dnešní době se však staly oblíbenými kolony s chemicky vázanými SF. Jedná se především o silikagel, na jehož hydroxylové skupiny lze chemicky navázat nepolární uhlovodíkový řetězec různé délky (C4, C8, nebo C18), ale i spoustu jiných funkčních skupin, polární (např. amidové nebo kyanoskupiny), iontově výměnné či chirální selektory. Z organických polymerů se využívají například deriváty dextransu a agarózy, estery kyseliny methakrylátové zesíťené divinylbenzenem nebo ethylendimethylakrylátem (Zeokarb, Amberlite) či celulóza. I na tyto materiály lze

navázat různé funkční skupiny. Oba druhy náplní se využívají i v iontově výměnné chromatografii [48 – 50, 53].

Detektory

Detektory, které se používají v kapalinové chromatografii lze rozdělit do dvou skupin [6, 7]:

1. optické (spektrofotometrický, fluorimetrický, refraktometrický, hmotnostní)
2. elektrochemické (voltmetrický a vodivostní)

Spektrofotometrický detektor

Nejčastěji používaným druhem detektoru je spektrofotometrický detektor neboli UV/VIS detektor, který měří absorpci záření eluátu v oblasti vlnových délek od 190 do 800 nm. Principem jeho fungování je velikost odezvy, která je dána Lambert-Beerovým zákonem: $A = \varepsilon \cdot c \cdot l$, vyjadřující vztah mezi tloušťkou absorbující vrstvy (l), koncentrací absorbující složky (c) a velikostí absorpce neboli absorbancí (A). Vlnovou délku detektoru je zde nutné volit s ohledem na absorbanci mobilní fáze. Spektrofotometrické detektory lze podle konstrukčního typu rozdělit na čtyři typy [46, 51, 52]:

Detektory s fixní vlnovou délkou – Jako zdroj záření používají při 254 nm nízkotlakou rtuťovou výbojku, při 229 nm kadmiovou a při 214 nm zinkovou výbojku. U všech těchto typů výbojek se musí dodatečně použít filtr, protože ani jedna neposkytuje absolutně monochromatické záření.

Detektory s měnitelnou vlnovou délkou – Pouze s vlnovými délkami, které byly předem stanoveny.

Detektory s programovatelnou (nastavitelnou) vlnovou délkou – Lze si vybrat z několika vlnových délek v rozmezí 190 – 700 nm. Během analýzy je možné podle potřeby vlnovou délku změnit.

Detektory diodového pole (DAD, PDA) – Snímají celé spektrum v reálném čase, aniž by muselo dojít k přerušení chromatografické separace. Fotodiody, ze kterých se detektor skládá, určují jeho spektrální rozlišení. Počet těchto diod se pohybuje od 512 po 1024 na pole. Tento typ detektorů umožňuje detekci analytu při jakémkoliv zvolené vlnové délce.

Refraktometrický detektor

Tento detektor je založen na principu změření změny indexu lomu eluátu při průchodu měrnou celou. Jestliže je rozdíl indexu lomu analytu a MF velký, zvyšuje se tím i citlivost detektoru. Odezva detekční cely však závisí na teplotě, a proto je nezbytné u ní udržovat stálou teplotu temperováním. Jedná se o diferenční měření, kdy paprsek prochází měřenou a srovnávací celou, a následně detektor změří rozdíl intenzity dopadajícího světla. Tento detektor má nízkou citlivost (píky mohou být pozitivní i negativní) a není vhodný pro gradientovou eluci. Využívá se pro analýzu cukrů, lipidů a polymerů, tj. látek, které neabsorbují ani nefluoreskují [46, 51, 52].

Hmotnostní detektor

Tento detektor se používá pro detekci iontů, jež vznikají ionizací analytů. Nejprve se však ionty rozpuštěné v mobilní fázi musejí převést na ionty v plynné fázi. Poté lze ionty analyzovat podle poměru hmotnosti k náboji (m/z). Na základě získaných hmotnostních spekter je možné identifikovat látky, které vycházejí z kolony. Jedná se o univerzální, vysoce selektivní a citlivý detektor, který se používá v plynové i kapalinové chromatografii [51, 52].

Elektrochemický detektor

Tento typ detektorů se využívá k měření elektrického proudu, který vzniká, když měrnou celou projde oxidovatelná či redukovatelná látka. Převážně se k detekci používá tříelektrodové zapojení složené z pracovní, pomocné a referentní elektrody. Pracovní elektroda může být například ze skelného uhlíku, uhlíkových vláken diamantu, platiny, zlata, mědi a dalších materiálů. Tyto specifické detektory mají vysokou citlivost a rychlou odezvu. Jejich nevýhodou je však pasivace elektrod a následné čištění. Rozlišujeme dva druhy detektorů tohoto typu. První jsou amperometrické detektory (koncentrační detektory). Při vhodně vloženém napětí na elektrodu měří elektrický proud, který odpovídá redukci či oxidaci složek v eluentu. Druhou variantou jsou coulometrické detektory (hmotnostní detektory), ve kterých dochází k úplné elektrolýze analytu. Využívají velkoplošné elektrody vyrobené například z porézního uhlíku [46, 51, 52].

Vodivostní detektor

Tyto detektory patří mezi univerzální detektory. Mezi dvěma elektrodami, které jsou umístěné v průtokové cele (válcovitého tvaru), měří elektrickou vodivost eluátu. Aby se zabránilo polarizaci elektrod, vkládá se mezi ně střídavé napětí. Tento typ detektoru je konstrukčně nenáročný a jeho celu je možné snadno miniaturizovat na objem menší než 5 μ l. Vysoké požadavky jsou kladeny na mobilní fázi, která musí být nevodivá (bez přídavku pufru), avšak musí být schopná rozpouštět analyzované látky. Ideální je jako mobilní fázi použít redestilovanou vodu či příměsí polárních organických rozpouštědel, které těmto podmínkám vyhovují. Vodivostní detektor se používá převážně v iontové výměnné chromatografii [46, 51, 52].

2.3.3 Iontově výměnná chromatografie (IEC)

Tato separační metoda je založena na silných elektrostatických interakcích mezi ionizovanými skupinami iontoměniče (stacionární fáze) a opačně nabitými ionty v okolním roztoku (mobilní fáze). Během separace dochází ke styku stacionární fáze tvořené ionexem (měnič iontů; nerozpustná látka) a kapalné fáze. Obecná rovnice iontové výměny je [5, 53, 54]:



Díky disociaci dochází k uvolnění iontů navázaných na stacionární fázi, které mohou být následně nahrazeny ionty z roztoku, jež mají větší afinitu k ionexu (mají větší náboj, jedná se o větší iont). Uplatňuje se zde i princip chemické rovnováhy. A to, pokud mají ionty se slabší vazbou na SF dostatečnou koncentraci, mohou vytěsnit i ionty, které se na SF vážou pevněji. Ionty se pohybují v koloně různými rychlostmi a dochází tak k jejich separaci [5, 53, 54].

Ionexy lze rozdělit do několika skupin. Například podle chemického složení rozlišujeme anorganické či organické ionexy. Dále podle skupenství a tvaru, dělíme ionexy na pevné, kapalné a pelikulární ionexy. Třetím klasifikačním hlediskem je druh ionogenní funkční skupiny, kterou ionex obsahuje. Patří sem nerozpustné katexy (kyseliny) a anexy (báze). Katexy jsou nerozpustné polyvalentní kyseliny, které uvolňují a vyměňují kationty. Obsahují kyselé funkční skupiny $-\text{SO}_3\text{H}$ (sulfoskupina – silný katex) či $-\text{COOH}$ (karboxyskupina – slabý katex). Anexy jsou nerozpustné

polymerní báze, které jsou schopny uvolňovat a vyměňovat anionty. Jsou jimi například kvartérní amonné soli (silný anex) či aminoskupiny (slabý anex) [5, 53, 54].

Silné anexy a silné katexy jsou ionizovány v celém rozsahu pH používaném v IEC a jejich kapacita se proto změnami pH nemění. Lze je použít pro separaci slabých kyselin či zásad. Podstatou separace je především náboj separovaných analytů, které nejsou v závislosti na pH vždy plně ionizovány. Pokud tedy jsou ve vzorku obsaženy silné kyseliny nebo silné zásady, jejich ionizace není hodnotou pH mobilní fáze ovlivněna a jsou v celém rozsahu zcela ionizované. Silné katexy při $\text{pH} < 2$ nebo silné anexy při $\text{pH} > 10$ mohou při těchto extrémních hodnotách pH katalyzovat řadu reakcí, kterými by mohlo dojít ke změně vzorku (např. hydrolyza esterů či peptidů apod.) [5, 53, 54].

Hodnotou pH mobilní fáze je ovlivněna i kapacita (retenční chování) slabých iontoměníčů. Jestliže se pH mobilní fáze významně sníží pod pK_a hodnotu imobilizovaných funkčních skupin slabého katexu (přibližně o dvě jednotky pH), může jako měnič kationtů přestat fungovat. Neboť v případě, že je slabý katex v protonované formě, dochází mezi ním a protonem k velice pevné vazbě, kvůli které už nemůže dojít k výměně za kation analytu. Naopak, jestliže je pH výrazně vyšší, než je pK_a , všechny funkční skupiny slabého katexu mohou s ionty vzorku interagovat s maximální kapacitou. Pokud je pH blízké hodnotě pK_a je slabý katex disociován pouze částečně. Stejně podmínky platí i pro slabé anexy, avšak jejich iontově výměnná kapacita je naopak vysoká při nízkých pH a nízká při vysokých pH [5, 53, 54].

Mobilní fáze, které se používají při IEC, jsou většinou vodné roztoky pufrů. Jejich vlastnosti však musejí být upraveny tak, aby byly vhodné pro separaci látek (vhodné pH MF, náboj a velikost iontů pufru, koncentrace pufru apod.). V praxi se nejčastěji používají pufrы, které obsahují fosforečnany, boritany, dusičnany či chloristany [5, 53, 54].

Kolony pro IEC jsou na bázi silikagelu nebo je na silikagel chemicky navázána příslušná funkční skupina. Tyto materiály však mají omezenou chemickou stabilitu. Například při hodnotě pH kolem 2 dochází k narušení chemické vazby mezi silikagelem a funkční skupinou nebo při $\text{pH} > 7$ dochází k rozpouštění silikagelového nosiče. Pro IEC se využívají i kolony na bázi polymerů (deriváty polystyrenu a polyakrylamidu), které mají výbornou chemickou i mechanickou odolnost. Lze je využít v širokém

spektru pH a jsou stabilní až do 100 °C. Řadíme sem například kolony na bázi hydroxyalkylmethakrylátových gelů (Spherony či HEMA gely) nebo na bázi (poly)styrenu zesíťovaného divinylbenzenem (Dowex, Zerolit) [5, 53, 54].

Detektory vhodnými pro iontově výměnnou chromatografii jsou například: UV, refraktometrický, vodivostní a elektrochemický detektor [5, 53, 54].

2.4 Literární rešerše analýzy AMP, ADP a ATP z reálné matrice

Byla provedena literární rešerše se zaměřením na analýzu všech 3 studovaných nukleotidů v rostlinné matrici, což není běžná matrice pro analýzu AMP, ADP a ATP. Častěji jsou studované nukleotidy analyzovány v živočišné matrici, především k určení čerstvosti ryb či mořských plodů. Výsledky rešerše jsou shrnuty v tabulce níže (tabulka 1). Většinou se jedná o využití reverzní stacionární fáze C18 od různých výrobců a isokratické či gradientové eluce. Detekce byla buď spektrofotometrická či byl použit hmotnostní spektrometr.

Tabulka 1 Literární rešerše

Matrice	Analyty	Technika	Kolona	Podmínky měření	Zdroj
Citrusové plody	ADP, ATP	LC-MS	C18 (Kinetex, 2,6 μm , 150 \times 4,6 mm)	Isokratická eluce; MF: 99:1 (v:v) acetonitril/mravenčan amonný (pH = 6,7); Průtok 0,4 nebo 0,6 mL/min; Dávkování vzorku 2 nebo 5 μL	[12, 55]
Citrusové plody	ADP, ATP	HPLC-UV	C18 (RP-18e, LichroCart 125-4, Lichrospher 100, 5 μm)	Gradientová eluce; MF: fáze A – tetrabutylamonium bisulfátový pufr, fáze B – acetonitril:fáze A (2:1); Průtok MF 0,5 mL/min; Dávkování 10 μL vzorku; Detekce UV detektorem při 260 nm	[12, 55]

Litchi (<i>Litchi chinensi</i>)	AMP, ADP, ATP	HPLC-DAD	Ultrasphere ODS EC 250 × 4,60 mm	Gradientová eluce; MF: fáze A – 0,06mol/L K ₂ HPO ₄ a 0,04mol/L KH ₂ PO ₄ (pH=7,0), fáze B – 100% acetonitril; Průtok MF 1,2 mL/min; Dávkování vzorku 20 µL; Detekce DAD detektorem při 254 nm	[56]
Pinellie trojčetná (<i>Pinellia Ternata</i>)	17 nukleotidů, nukleosidů a nukleových bází	HPLC-DAD	Agilent Zorbax SB-Aq (250 × 4,6 mm, 5 µm) Zorbax SB-Aq guard (12.5 × 4,6 mm, 5 µm)	Gradientová eluce; MF: fosfátový pufr (KH ₂ PO ₄ -Na ₂ HPO ₄) a vodný roztok octanu amonného; Průtok MF 0,9 mL/min; Dávkování 10 µL; Detekce DAD detektorem	[57]
Kreveta pacifická (<i>Litopenaeus vannamei</i>)	10 nukleotidů a podobných sloučenin	HPLC-DAD	Shimadzu ODS-3 C18 (250 × 4,6 mm, 5 µm)	Gradientová eluce; MF: fáze A – 0,02mol/L K ₂ HPO ₄ a 0,02mol/L KH ₂ PO ₄ (pH=5,8), fáze B – methanol; Průtok MF 1,0 mL/min; Dávkování vzorku 10 µL Detekce DAD detektorem při 254 nm	[58]

3 Experimentální část

3.1 Chemikálie

- Standardy: Adenosin-5'-monofosfát sodná sůl 99%, Sigma-Aldrich, Německo
- Adenosin-5'-difosfát sodná sůl 95%, Sigma-Aldrich, Německo
- Adenosin-5'-trifosfát disodná sůl 90%, Sigma-Aldrich, Německo
- Dihydrogenfosforečnan draselný 99% p.a., Lach-Ner, s.r.o., ČR
- Methanol 99,5% p.a., Lach-Ner, s.r.o., ČR
- Octan amonný 99,7% p.a. Lach-Ner, s.r.o., ČR
- Deionizovaná voda (čištěná systémem Milli-Q Plus, Millipore), USA
- Hydroxid draselný 85% p.a., Penta, s.r.o., ČR
- Kyselina octová 98% p.a., Lachema, a.s., ČR
- Kyselina chloristá 70% p.a.

3.2 Přístroje a pomůcky

- HPLC sestava Waters 2690 Alliance s DAD detektorem Waters 996, USA
- Chromatografická kolona VA 50/4,6 Nucleogel SAX 1000-8, Marcherey-Nagel, Německo
- Chromatografický systém Empower 3, Waters,
- Analytické váhy 2004 MP, Sartorius, Německo
- Analytické váhy NBL-254i, Adam Nimbus
- Ultrazvuková lázeň FB15061, Fisherbrand, USA
- pH metr AD1000 pH/mV & Temperature meter, Adwa, Maďarsko
- Elektrická trouba s dvoj plotýnkou EC-320, Orava, Slovensko
- Lednice s mazákem AZ-Automatic, Amica, Polsko
- Laboratorní sklo
- Teploměry
- Membránové filtry Nylon 66 o velikosti pórů 0,45 μm , Supelco, Tchaj-wan
- pH papírky, Lachema, ČR
- Automatické pipety Biohit, BIOHIT, Finsko

3.3 Rostlinný materiál

- Zmražené a lyofilizované listy tabáku *Nicotiana tabacum L.*

3.4 Postup

3.4.1 Příprava mobilní fáze

Byl připraven 0,2mol/L roztok KH_2PO_4 (navážka 27,22 g KH_2PO_4 doplněna deionizovanou vodou po rysku do odměrné baňky o objemu 1000 mL). Následně bylo u roztoku upraveno pH 1mol/L KOH na hodnotu pH = 5,00. Takto upravená mobilní fáze se vždy před měřením nejprve ještě přefiltrovala, aby nedošlo k žádnému vniknutí malých částic do chromatografického systému, přes membránový filtr s velikostí pórů 0,45 μm . Mezi měřeními byla MF uchovávána v lednici.

3.4.2 Příprava standardních roztoků

Naváženy byly vždy přibližně 4 mg standardu příslušného nukleotidu. Navážka byla poté rozpuštěna ve vialce v odpovídajícím množství 0,05mol/L KH_2PO_4 (pH = 7,50), aby vznikl zásobní roztok standardu o výsledné koncentraci 1 mg/mL. Standardy a roztoky standardů byly před i po analýze uchovávány v mrazáku.

3.4.3 Příprava roztoků standardů pro sestavení kalibrační křivky

Pro proměření kalibrační závislosti standardů AMP, ADP a ATP byly připraveny z příslušného zásobního roztoku o koncentraci 1 mg/mL postupným ředěním pomocí 0,05mol/L KH_2PO_4 (pH = 7,50), následující kalibrační řady:

pro AMP – 0,0002 až 1,0 mg/mL

pro ADP – 0,0002 až 1,0 mg/mL

pro ATP – 0,002 až 1,0 mg/mL

Každý vzorek byl 3krát (série nejnižších koncentrací 5krát) nadávkován na kolonu v objemu 5 μL . Po sestavení kalibrační křivky pro jednotlivé standardy byla určena mez detekce (LOD) a mez stanovitelnosti (LOQ) jednotlivých standardů. LOD byla určena jako nejnižší koncentrace, kterou bylo možné změřit při kalibraci a dala se odlišit od šumu základní linie. LOQ byl spočítán jako 3,3 násobek LOD.

3.4.4 Extrakce z rostlinného materiálu

Pro extrakci adenosin-5'-ribonukleotidů byly v experimentální části této diplomové práce použity listy rostliny tabáku *Nicotiana tabacum L.* Jednalo se o listy jak zmražené, tak lyofilizované, které byly pro analýzu patřičně upraveny (rozetřeny na prášek v třecí misce). Aby nedošlo ke kontaminaci z prsů (výskyt ATP, bakterií s ATP), pracovalo se se vzorky v laboratorních rukavicích. Balíček zmražených listů byl po zjištění celkové hmotnosti rozdělen na pět stejných částí. Po odvážení každé části byly listy zabaleny do alobalu a opět uloženy do mrazáku. Pro extrakci byla použita vždy zvlášť jedna z navážených částí. Ta byla v kádince zalita 10 mL deionizované vody zahřáté na 100 °C, přiklopena hodinovým sklíčkem, a ihned umístěna na 20 minut do ultrazvukové lázně temperované na 75 °C. Po skončení procesu byla kádinka přesunuta mimo lázeň, aby roztok vychladl na laboratorní teplotu [57]. Do vialky bylo poté napipetováno 450 µL přefiltrovaného roztoku extrahovaných listů tabáku, ke kterému bylo přidáno 450 µL 0,05mol/L KH_2PO_4 (pH = 7,50). Takto byl vzorek připraven k okamžité analýze.

Lyofilizované listy byly nejprve ve třecí misce tloučkem rozetřeny, aby vznikl homogenní prášek. Extrakce probíhala v ultrazvukové lázni (temperované na 75 °C) v kádince, ve které byly 0,2 g prášku z listů tabáku doplněny 5 mL vroucí deionisované vody. Po 20 minutách byla kádinka z ultrazvuku vyndána a ponechána, dokud roztok nedosáhl laboratorní teploty. Po filtraci bylo odebráno 450 µL roztoku do vialky, který byl doplněn 450 µL 0,05mol/L KH_2PO_4 (pH = 7,50). Následně bylo možné vzorek analyzovat.

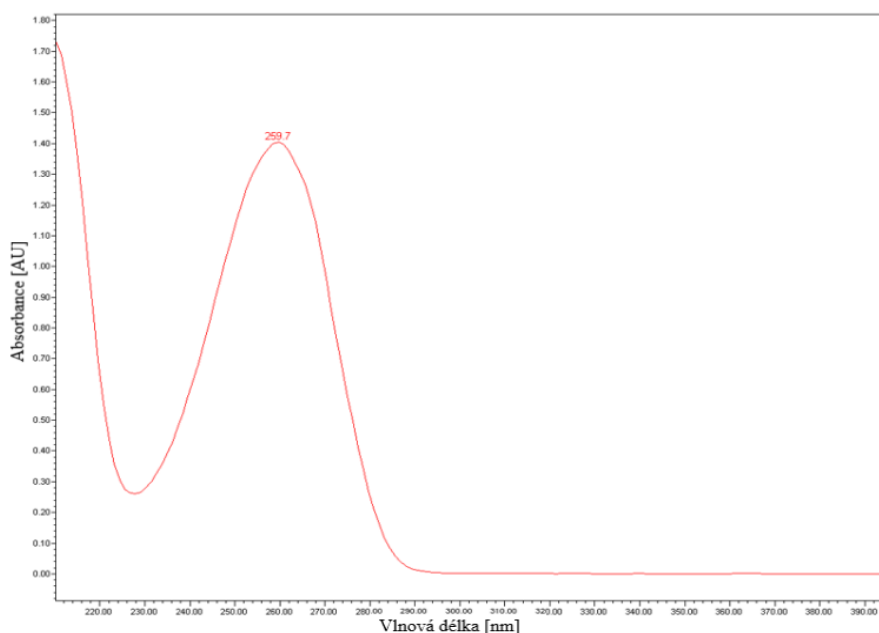
Další extrakční postup využíval HClO_4 , extrakce probíhala podobně jako u předešlých postupů. Místo destilované vody se do kádinky k 0,2 g prášku lyofilizovaných tabákových listů přililo 5 ml 0,07mol/L HClO_4 zahřáté na 100 °C. Kádinka se následně přikryla hodinových sklíčkem a vložila se na 20 minut do 75°C ultrazvukové lázně. Poté se kádinka, stejně jako v předchozích případech, přesunula mimo lázeň, aby roztok vychladl na laboratorní teplotu. Pro měření se extrahovaný vzorek nejprve musel zneutralizovat 1mol/L KOH a až potom byl přefiltrován do vialky, naředěn 1:1 (v:v) 0,05mol/L KH_2PO_4 (pH = 7,50) a změřen chromatografickým systémem. Mimo analýzu se všechny vyextrahované vzorky uchovávaly v mrazáku.

4 Výsledky a diskuze

4.1 Optimalizace metody

Cílem optimalizace metody bylo najít vhodné podmínky pro současné stanovení AMP, ADP a ATP. Bylo nutné dosáhnout dobrého rozlišení analyzovaných látek v přijatelném čase a následně ve výsledném chromatogramu získat ostré a symetrické píky, najít tedy vhodnou mobilní fázi (rychlost průtoku, koncentrace a pH pufru) a vhodnou vlnovou délku pro detekci. V úvahu byly brány i výsledky rešerše [9, 57 – 60].

Pro detekci standardů byla použita vlnová délka 260 nm, tedy vlnová délka odpovídající absorpčnímu maximu spekter změřených pro standardy nukleotidů pomocí DAD detektoru přímo v mobilní fázi (obr. 9).



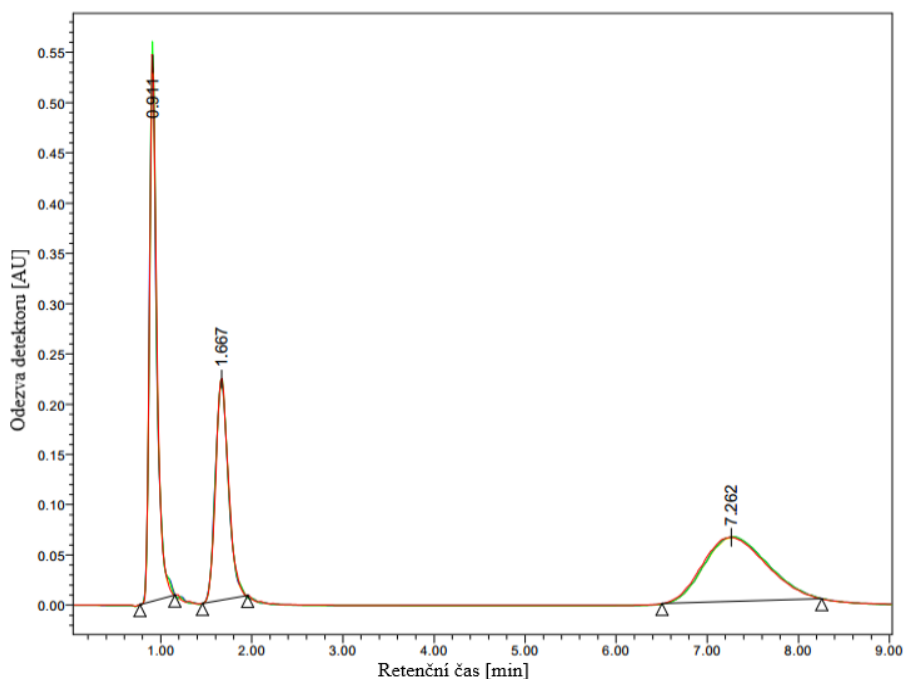
Obr. 9 Příklad absorpčního spektra AMP v mobilní fázi

Pro dělení látek byla použita isokratická eluce, a to z důvodu možnosti využití jednodušší instrumentace (negradietové čerpadlo) a kratšího ustavování separačních podmínek. Jako první MF byl vyzkoušen fosforečnanový pufr, 0,2mol/L KH_2PO_4 , o pH 3,50, průtoková rychlost MF byla 0,5 mL/min. Tyto experimentální podmínky byly zvoleny na základě článku výrobce používané kolony (Macherey-Nagel): Ion

Exchange chromatografie of nucleotides [59]. Při použití této mobilní fáze byly retenční časy studovaných nukleotidů dlouhé, nejméně zadržovaný nukleotid AMP eluoval okolo 11. minuty. Proto byl průtok této mobilní fáze zvýšen nejprve na 0,7 mL/min a poté na 1,0 mL/min. K vyhovujícímu zkrácení retenčních časů touto změnou experimentálních podmínek ale nedošlo. V mobilní fázi složené z 0,2 mol/L KH_2PO_4 , pH = 3,50, a při průtokové rychlosti 1 mL/min měl standard ATP totožný retenční čas jako standard AMP, docházelo k jejich koeluci. První zásobní roztoky standardů studovaných nukleotidů byly totiž rozpuštěny pouze v deionizované vodě, a i když byly uchovávány v mrazáku a rozmrazovány na co možná nejkratší dobu, došlo k rozkladu zásobního roztoku ATP na AMP. Další zásobní roztoky nukleotidů již byly připraveny rozpuštěním v 0,05 mol/L KH_2PO_4 (pH = 7,50) v koncentraci 1 mg/mL. Takto připravené roztoky vykazovaly při skladování v mrazáku dostatečnou stabilitu, viz. kapitola 4.2.

S nově připravenými zásobními roztoky standardů nukleotidů byla provedena optimalizace složení mobilní fáze, tedy koncentrace dihydrogenfosforečnanu draselného byla měněna v rozsahu hodnot od 0,1 mol/L po 0,5 mol/L, pH fosforečnanového pufru bylo upraveno na hodnoty 2,60; 3,50; 4,40 a 5,00. Také byl vyzkoušen přídavek organického modifikátoru methanolu k fosforečnanovému pufru, a to v množství 5 a 10 objemových procent. Přídavek organického modifikátoru v některých případech zrychluje eluci analytů v IEC a zlepšuje tvar píků. Tento pozitivní efekt bohužel v případě studovaných nukleotidů nebyl zaznamenán. Vyšší množství methanolu nemohlo být použito z důvodu srážení fosforečnanového pufru vlivem organického rozpouštědla. Také byl jako mobilní fáze vyzkoušen octanový pufr (0,2 mol/L $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, pH 5,00, průtok 1,0 mL/min), ale lepší výsledky ve srovnání s fosforečnanovým pufrem nebyly dosaženy.

Jako nejvhodnější byl nakonec zvolen roztok 0,2 mol/L KH_2PO_4 s pH 5,00. Průtoková rychlost MF byla 1 mL/min, kdy píky byly dostatečně oddělené, ostré (s výjimkou ATP) a látky se tedy daly jednoduše identifikovat (obr. 10). Objem nástřiku autosampleru byl nastaven na 5 μL . Tlak se během analýzy pohyboval kolem 400 psi (2,8 MPa) a teplota kolony byla 25 °C. Separace probíhala v koloně Nucleogel SAX 1000-8, 50 x 4,6 mm.



Obr. 10 Chromatogram směsi AMP ($t_r = 0,911$ min), ADP ($t_r = 1,667$ min) a ATP ($t_r = 7,262$ min). Použitá kolona: Nucleogel SAX 1000-8, 50 x 4,6 mm, složení MF: 0,2mol/L KH_2PO_4 (pH = 5,00), průtok MF: 1 mL/min, velikost nástřiku: 5 μL , UV detekce při vlnové délce: 260 nm.

4.2 Stabilita roztoků standardů

Stabilita roztoků standardů (AMP) o koncentraci 1 mg/mL, rozpuštěných v 0,05mol/L KH_2PO_4 s pH = 7,50 byla zjišťována:

- za snížené teploty (4 °C), chráněné před světlem (lednice)
- za snížené teploty (-18 °C), chráněné před světlem (mrazák)

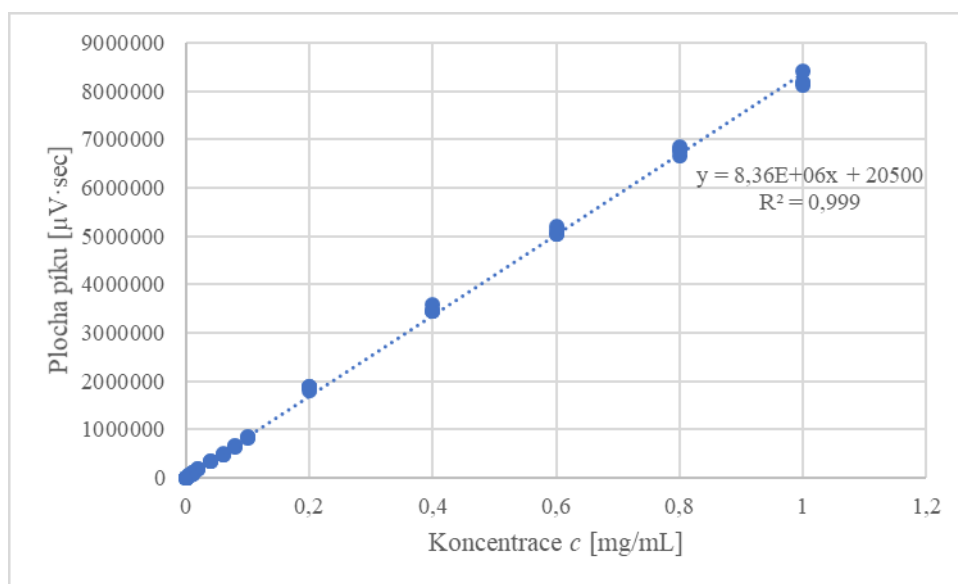
Měření pro zjištění stability probíhala v různých časových úsecích: ihned po přípravě roztoku, 3 hodin od přípravy, 24 hodin a týden od přípravy. Podle porovnání naměřených hodnot ploch píku klesl obsah AMP v roztoku, který byl skladován v lednici za 3 h o 5 %, 12 h o 23 %, 24 h o 44 % a za týden o 74 %. Když byl ten samý roztok standardu skladován v mrazáku klesl obsah AMP za 3 h o 2 %, 12 h o 7 %, 24 h o 12 % a za týden o 21 %. Předpokládalo se stejné chování všech standardů a výsledek byl uplatněn na všechny tři standardy. Podobná stabilita zásobních roztoků byla zjištěna i pro ADP a ATP, i když jejich úbytek nebyl sledován ve všech výše uvedených podmínkách, bylo zvoleno uchovávání v mrazáku. Podle poklesu obsahu nukleotidů v zásobních roztocích bylo tedy zřejmé, že nejvhodnější uchovávání roztoků standardů je v mrazáku. Avšak ani tam by nebylo vhodné uchovávat roztoky příliš

dlouho (maximálně týden), protože rozklad látek v nich obsažených (především ATP) je nízkou teplotou pouze zpomalen, nikoliv zastaven.

4.3 Kalibrační závislost pro roztoky standardů

V následujících obrázcích (obr. 11 – 13) jsou zobrazeny kalibrační závislosti jednotlivých standardů. Ty byly sestrojeny, po proměření daných vzorků, z hodnot pro plochu píku v závislosti na koncentraci daného kalibračního roztoku. Po proložení bodů regresní přímkou byla získána směrnice přímky a koeficient determinace. Kalibrace probíhala za výše zmíněných optimalizovaných podmínek, tedy byla použita kolona Nucleogel SAX 1000-8, 50 x 4,6 mm, mobilní fáze byl 0,2 mol/L roztok KH_2PO_4 (pH = 5,00), průtok MF byl 1 mL/min, velikost nástřiku vzorku 5 μL a detekce probíhala při vlnové délce 260 nm. Bylo pracováno s čistými látkami (standardy) bez přítomnosti rostlinného materiálu.

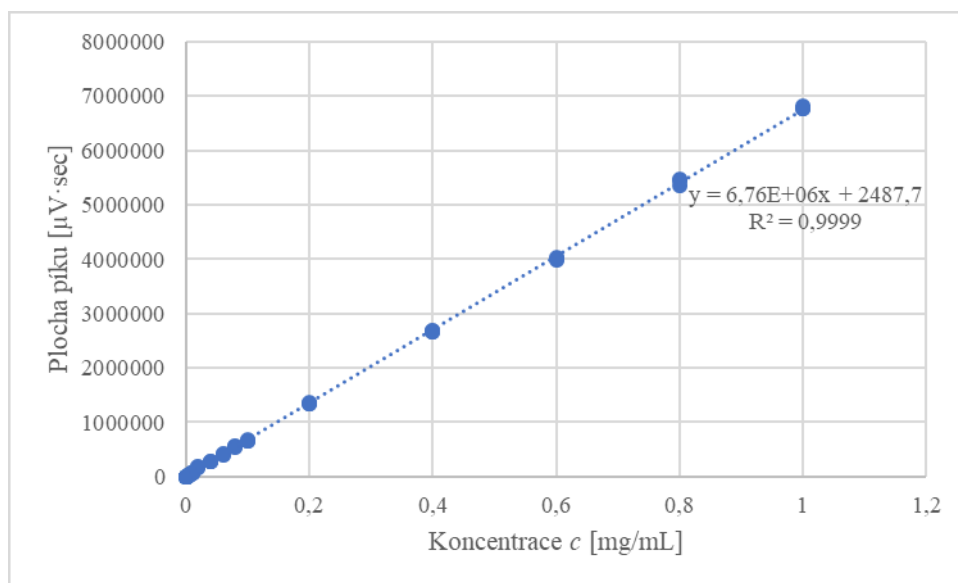
AMP poskytoval v daném chromatografickém systému ostrý, symetrický pík s retenčním časem $t_r = 0,911$ minuty. Kalibrační závislost byla sledována v koncentračním rozmezí: 0,0002 – 1,0 mg/mL (obr. 11). Pro AMP byla stanovena mez detekce (LOD): $2,0 \cdot 10^{-4}$ mg/mL ($5,8 \cdot 10^{-7}$ mol/L), a mez stanovitelnosti (LOQ): $6,6 \cdot 10^{-4}$ mg/mL ($1,9 \cdot 10^{-6}$ mol/L).



Obr. 11 Kalibrační závislost plochy píku AMP na koncentraci roztoku standardu AMP. Použitá kolona: Nucleogel SAX 1000-8, 50 x 4,6 mm, složení MF: 0,2 mol/L KH_2PO_4 (pH = 5,00), průtok MF: 1 mL/min, velikost nástřiku: 5 μL , UV detekce při vlnové délce: 260 nm.

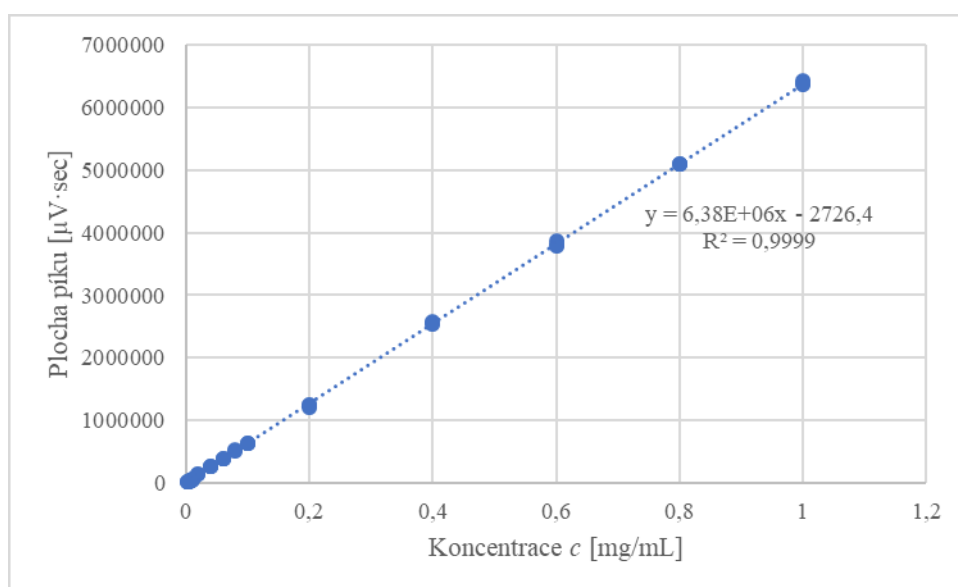
Standard ADP poskytoval v daném chromatografickém systému, stejně jako AMP, ostrý a symetrický pík s retenčním časem $t_r = 1,667$ minuty. Kalibrační závislost byla sledována ve stejném koncentračním rozmezí jako u AMP a to:

0,0002 – 1,0 mg/mL, (viz obr. 12). Z naměřených výsledků byla pro ADP stanovena mez detekce (LOD): $2,0 \cdot 10^{-4}$ mg/mL ($4,7 \cdot 10^{-7}$ mol/L), a mez stanovitelnosti (LOQ): $6,6 \cdot 10^{-4}$ mg/mL ($1,5 \cdot 10^{-6}$ mol/L).



Obr. 12 Kalibrační závislost plochy píku ADP na koncentraci roztoku standardu ADP-Použitá kolona: Nucleogel SAX 1000-8, 50 x 4,6 mm, složení MF: 0,2mol/L KH_2PO_4 (pH = 5,00), průtok MF: 1 mL/min, velikost nástřiku: 5 μL , UV detekce při vlnové délce: 260 nm.

ATP poskytoval v daném chromatografickém systému symetrický, avšak jednalo se o širší (více rozmytý) pík než u předešlých dvou ribonukleotidů. Retenční čas tohoto standardu byl $t_r = 7,262$ minuty. Kalibrační závislost byla sledována v koncentračním rozmezí: 0,002 – 1,0 mg/mL (obr. 13). Koncentrace 0,0002 mg/mL ATP byla už příliš nízká a nebylo možné rozlišit pík dané látky od šumu základní linie. Proto nebyla série koncentrací 0,001 – 0,0002 mg/mL využita pro kalibrační závislost. Pro ATP byla stanovena mez detekce (LOD): $2,0 \cdot 10^{-3}$ mg/mL ($3,9 \cdot 10^{-6}$ mol/L), a mez stanovitelnosti (LOQ): $6,6 \cdot 10^{-3}$ mg/mL ($1,3 \cdot 10^{-5}$ mol/L).



Obr. 13 Kalibrační závislost plochy píku ATP na koncentraci roztoku standardu ATP. Použitá kolona: Nucleogel SAX 1000-8, 50 x 4,6 mm, složení MF: 0,2mol/L KH₂PO₄ (pH = 5,00), průtok MF: 1 mL/min, velikost nástřiku: 5 μL, UV detekce při vlnové délce: 260 nm.

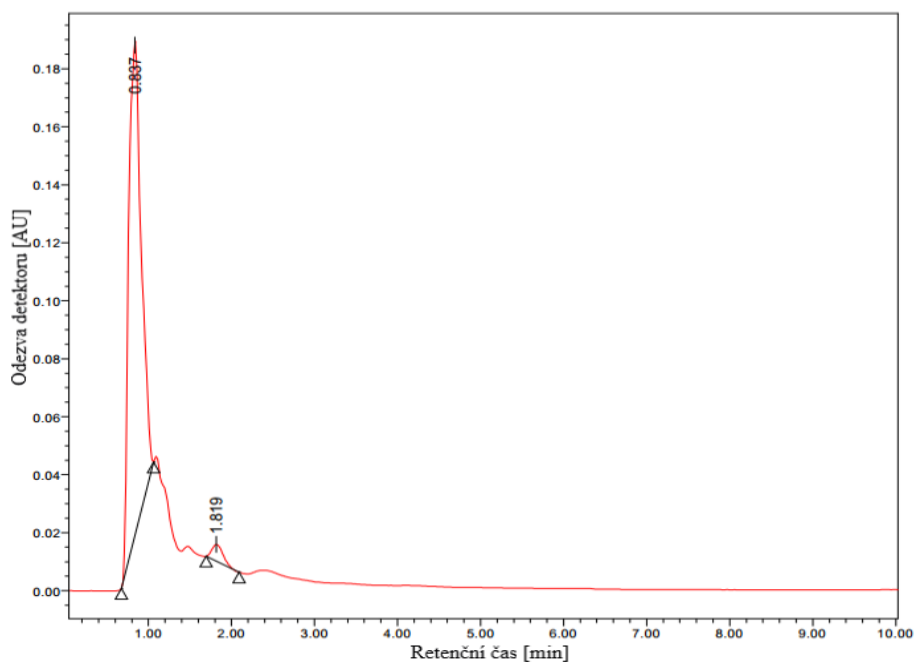
Všechny kalibrační závislosti byly lineární v celém koncentračním rozsahu. V tabulce 2 jsou přehledně zobrazeny kalibrační parametry všech standardů.

Tabulka 2 Přehled kalibračních parametrů

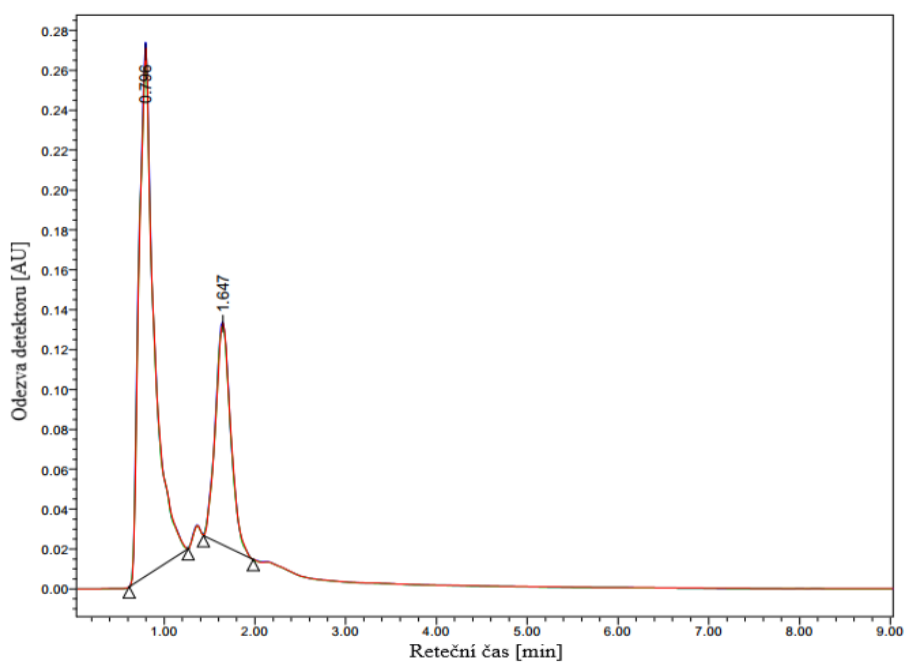
Standard	Retenční čas [min]	Rovnice Kalibrační závislosti	Koeficient determinace R ²
AMP	0,911	$y = 8,36 \cdot 10^6 x + 20500$	0,9990
ADP	1,667	$y = 6,76 \cdot 10^6 x + 2487,7$	0,9999
ATP	7,262	$y = 6,38 \cdot 10^6 x - 2726,4$	0,9999

4.4 Stanovení AMP, ADP a ATP v reálných vzorcích

Pro stanovení AMP, ADP a ATP v rostlinné matrici byly použity tabákové listy zpracované dvěma různými způsoby: mražené listy tabáku a lyofilizované listy tabáku. Vzorky byly připravovány několikrát, nebyly tak měřeny pouze z jedné extrakce. Pro extrakci byly použity postupy zjištěné z literární rešerše, které podle autorů byly pro extrakci námi studovaných látek dostačující. Na obrázcích 14 a 15 jsou chromatogramy získané při extrakci z mražených tabákových listů (obr. 14) a extrakci z lyofilizovaných tabákových listů (obr. 15)



Obr. 14 Chromatogram vyextrahovaných látek z mraženého tabáku (extrakce deionisovanou vodou). Použitá kolona: Nucleogel SAX 1000-8, 50 x 4,6 mm, složení MF: 0,2mol/L KH_2PO_4 (pH = 5,00), průtok MF: 1 mL/min, velikost nástřiku: 5 μL , UV detekce při vlnové délce: 260 nm.

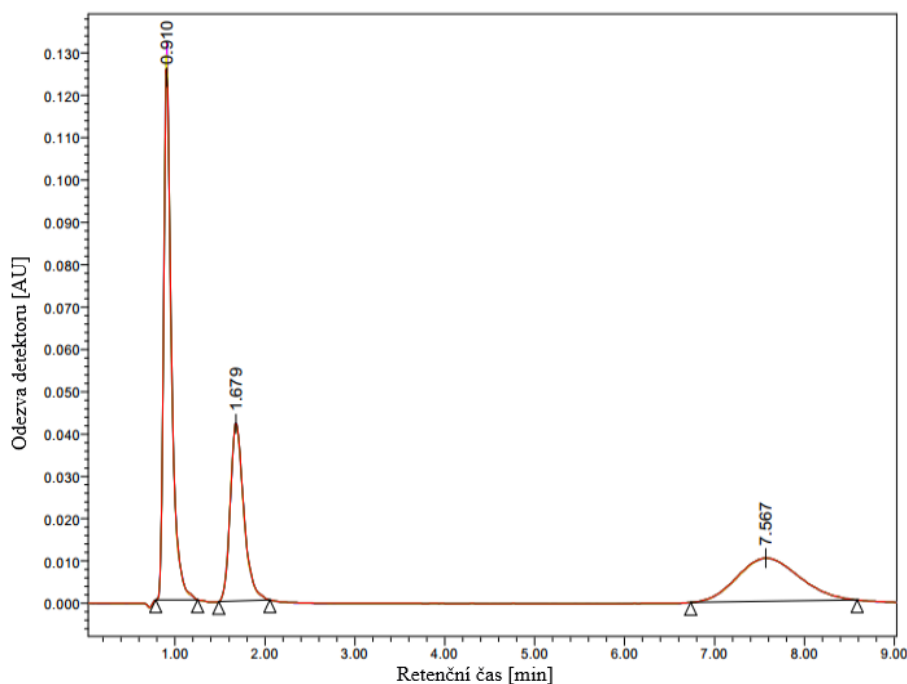


Obr. 15 Chromatogram vyextrahovaných látek z lyofilizovaného tabáku (extrakce deionisovanou vodou). Použitá kolona: Nucleogel SAX 1000-8, 50 x 4,6 mm, složení MF: 0,2mol/L KH_2PO_4 (pH = 5,00), průtok MF: 1 mL/min, velikost nástřiku: 5 μL , UV detekce při vlnové délce: 260 nm.

V obou chromatogramech na obr. 14 a 15 je možné vyhodnotit 2 píky, jejichž retenční časy jsou velice podobné retenčním časům standardů AMP a ADP. Pík s retenčním časem odpovídajícím ATP nebyl v chromatogramu zaznamenán. Retenční čas druhého píku se od retenčního času standardu ADP liší o 9 sekund (byl kratší), u prvního píku je rozdíl 7 sekund v porovnání s retenčním časem standardu AMP. Nejdříve této skutečnosti nebyl přisuzována velký význam, teplota v laboratoři významně vzrostla vlivem tropického počasí a také mohlo dojít k mírné degradaci stacionární fáze.

Aby bylo možné vyhodnotit účinnost extrakčního postupu, bylo k mraženým i lyofilizovaným listům tabáku přidáno známé množství standardů AMP, ADP a ATP a byla provedena extrakce vroucí deionisovanou vodou, postup viz kapitola 3.4.4. Naměřené plochy píků, u kterých jsme předpokládali, že odpovídají standardům AMP a ADP, byly výrazně vyšší, než by odpovídalo přidanému množství standardů. Při opakování extrakce tabákových listů s přidanými standardy se výsledky velmi dramaticky lišily.

Jelikož extrakce probíhala za vysokých teplot (75 °C až 100 °C) a naměřené plochy píků vykazovaly takové odlišnosti, bylo nutné ověřit, zda nedochází k destrukci námi studovaných adenosin-5'-ribonukleotidů ve vzorku. Směs zásobních roztoků standardů byla tedy před měřením upravena stejně jako extrahovaný vzorek (vařící deionisovaná voda a temperovaná ultrazvuková lázeň) a byla provedena extrakce bez přítomnosti rostlinné matrice. Ze změřeného chromatogramu této extrakční směsi (obr. 16) bylo zjevné, že zvoleným extrakčním postupem nedochází k destrukci studovaných nukleotidů. Koncentrace každého ze standardů ve směsi byla $7,7 \cdot 10^{-2}$ mg/mL. Výtěžek standardů z této extrakce byl: AMP 119,5 % ($9,2 \cdot 10^{-2}$ mg/mL), ADP 81,8 % ($6,3 \cdot 10^{-2}$ mg/mL), ATP 92,2 % ($7,2 \cdot 10^{-2}$ mg/mL). U standardu AMP došlo, v extrahovaném roztoku standardů, dokonce ke zvýšení obsahu. Pravděpodobně to bylo způsobeno rozkladem některého či obou zbylých standardů na AMP.

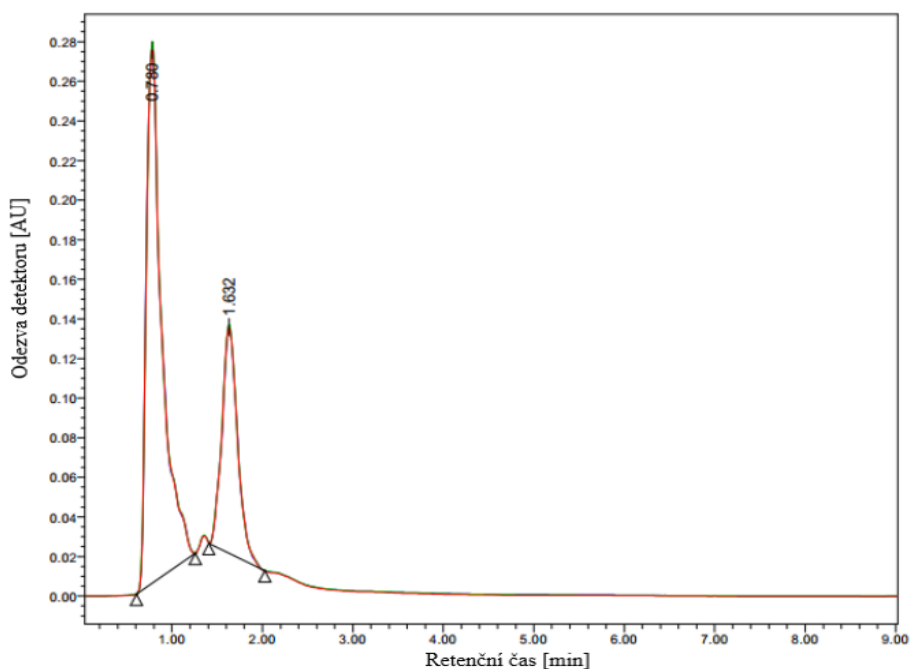


Obr. 16 Chromatogram směsi standardů po extrakci deionisovanou vodou, Použitá kolona: Nucleogel SAX 1000-8, 50 x 4,6 mm, složení MF: 0,2mol/L KH_2PO_4 (pH = 5,00), průtok MF: 1 mL/min, velikost nástřiku: 5 μL , UV detekce při vlnové délce: 260 nm.

Nejprve byly píky na chromatogramech extrahovaných vzorků (obr. 14 a 15) prisuzovány látkám AMP a ADP, i když retenční časy obou zaznamenaných píků nebyly úplně totožné s retenčními časy standardů AMP a ADP, naměřenými v optimalizované MF (viz obr. 10). Po porovnání chromatogramů na obr. 14 a 15 s chromatogramem změřeným pro extrahovanou směs standardů bez rostlinné matrice (obr. 16) a především po bližším prozkoumání absorpčních maxim píků 1 a 2 analytů extrahovaných z tabákových listů (obr. 14 a 15), byla tato domněnka vyvrácena. První pík, který měl patřit AMP měl jiný průběh absorpční křivky s absorpčním maximem při 255 nm. Druhý pík měl náležet ADP. I u něho došlo k posunu absorpčního maxima, a to k delším vlnovým délkám. Obě látky, vyextrahované z tabákových listů vroucí deionisovanou vodou, se chromatograficky chovají velmi podobně jako AMP a ADP. Je tedy možné, že došlo k tvorbě nějakého komplexu/aduktu s látkami přítomnými v rostlinné matrici, a že část molekuly studovaných adenosin-5'-ribonukleotidů, zodpovědná za vazbu na iontově výměnnou kolonu, zůstala zachována.

Další možností, jak extrahovat studované látky z lyofilizovaných listů tabáku byla, podle literární rešerše, extrakce kyselinou chloristou. Do kádinky s 0,2 g

homogenní rostlinné matrici bylo přilito 5 ml vařícího roztoku 0,07mol/L HClO₄. Kádinka byla přikryta hodinovým sklíčkem a vložena na 20 minut do temperované ultrazvukové lázně. Po vychladnutí byl extrahovaný vzorek zneutralizován 1mol/L KOH, přefiltrován do vialky a naředěn 1:1 (v:v) 0,05mol/L KH₂PO₄ (pH = 7,50). Na obr. 17 je změřený chromatogram. Po jeho vyhodnocení však bylo bohužel zřejmé, že se jedná o stejné látky jako v případě extrakce vroucí deionisovanou vodou.



Obr. 17 Chromatogram látek vyextrahovaných 0,07mol/L HClO₄ z lyofilizovaných listů tabáku. Použitá kolona: Nucleogel SAX 1000-8, 50 x 4,6 mm, složení MF: 0,2mol/L KH₂PO₄ (pH = 5,00), průtok MF: 1 mL/min, velikost nástřiku: 5 μL, UV detekce při vlnové délce: 260 nm.

5 Závěr

V této diplomové práci byla optimalizována metoda iontové výměnné vysokoúčinné kapalinové chromatografie pro současné stanovení AMP, ADP a ATP. Byly nalezeny tyto chromatografické podmínky:

Kolona:	Nucleogel SAX 1000-8, 50 x 4,6 mm
Dávkování:	5 μ L
Detekce:	DAD, 260 nm
Typ eluce:	isokratická
Mobilní fáze:	0,2mol/L KH_2PO_4 , pH = 5,00
Průtok mobilní fáze:	1 mL/min
Čas analýzy:	10 minut
Teplota:	25 °C
Vyhodnocení:	Chromatografický software Empower 3

Při těchto podmínkách se podařilo dosáhnout separace všech analytů. Výsledné retenční časy standardů byly: AMP = 0,911 min, ADP = 1,667 min, ATP = 7,262 min.

Dále byla zjištěna stabilita zásobních roztoků standardů při různých podmínkách během několika časových úseků. Pro vyhodnocení množství studovaných látek v reálném vzorku byly následně sestrojeny kalibrační závislosti pro všechny tři standardy. Z naměřených výsledků byly pro všechny tři standardy určeny mez detekce (LOD) a mez stanovitelnosti (LOQ). Pro AMP bylo stanoveno LOD: $2,0 \cdot 10^{-4}$ mg/mL ($5,8 \cdot 10^{-7}$ mol/L), a LOQ: $6,6 \cdot 10^{-4}$ mg/mL ($1,9 \cdot 10^{-6}$ mol/L). Pro ADP bylo stanoveno LOD: $2,0 \cdot 10^{-4}$ mg/mL ($4,7 \cdot 10^{-7}$ mol/L), a LOQ: $6,6 \cdot 10^{-4}$ mg/mL ($1,5 \cdot 10^{-6}$ mol/L). Pro ATP bylo stanoveno LOD: $2,0 \cdot 10^{-3}$ mg/mL ($3,9 \cdot 10^{-6}$ mol/L), a LOQ: $6,6 \cdot 10^{-3}$ mg/mL ($1,3 \cdot 10^{-5}$ mol/L).

Optimalizovaná separační metoda byla následně použita k analýze reálného vzorku listů tabáku virginského (*Nicotiana tabacum L.*). Jednalo se o mražené a lyofilizované listy rostliny tabáku. Na základě literární rešerše byly vyzkoušeny dvě metody extrakce studovaných nukleotidů, a to vroucí deionisovanou vodou s následnou extrakcí ultrazvukem při teplotě 75 °C po dobu 20 minut a vroucí kyselinou chloristou s extrakcí v 75°C ultrazvukové lázni po dobu 20 minut. Nicméně ani jedním z použitých extrakčních postupů se nepodařilo zkoumané adenosinové ribonukleotidy extrahovat.

Důvodem mohla být špatně zvolená extrakční metoda, ale i nevhodně zvolený způsob uchování rostlinné matrice.

6 Zdroje

- [1] UNGVARSKY, J. *Nucleotide*, Salem Press (2017).
- [2] *Nucleotides and Nucleic Acids. Onondaga Community College*, Dostupné z: <http://myhome.sunyocc.edu/~weiskirl/nucleotides_nucleicacid.htm> [cit. 10. 8. 2018].
- [3] KODÍČEK, M. *Výkladový slovník biochemických pojmů* (2004).
- [4] *A Closer Look: Chemical Structure of a Nucleotide. Prentice Hall*, Dostupné z: <http://www.phschool.com/science/biology_place/biocoach/dnarep/chemstruc.html> [cit. 11. 8. 2018].
- [5] COUFAL, P., Dostupné z: <<https://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/>> [cit. 11. 8. 2018].
- [6] KLIMEŠ, J. a. kol. *Kontrola léčiv I.*, Praha, 2002.
- [7] PRAUS, P.; VONTOROVÁ, J. *Analytická chemie II.* Ostrava: 2015.
- [8] TREMBLAY, S. *Foods High in Nucleic Acid*. Dostupné z: <<https://www.livestrong.com/article/326559-foods-high-in-nucleic-acid/>> [cit. 13. 8. 2018].
- [9] *Biological Functions of Nucleotides. University of Houston*, Dostupné z: <<http://www.uh.edu/dtu/19-Nuc%20Mata-1-08.htm>> [cit. 10. 8. 2018].
- [10] HOSMANE, R. S. *Chapter 2: Ring-Expanded ('Fat') Purines and their Nucleoside/Nucleotide Analogues as Broad-Spectrum Therapeutics*. In: GRIBBLE, G. W. e JOULE, J. A. (Ed.). *Progress in Heterocyclic Chemistry*: Elsevier, p. 35-68, 2009. ISBN 0959-6380.
- [11] *Purine*. Dostupné z: <<https://www.sciencedirect.com/topics/chemistry/purine>> [cit. 12. 8. 2018].
- [12] ČERNÁ, M. *Stanovení adenosindifosfátu a adenosintrifosfátu mikrokapalinou chromatografií*. *Chemické Listy* **107**, s. 222-224 (2013).
- [13] HOSSAIN, M. S. et al. *Dietary effects of adenosine monophosphate to enhance growth, digestibility, innate immune responses and stress resistance of juvenile red sea bream, Pagrus major*. *Fish & Shellfish Immunology*, p. 523-533, 2016. ISSN 1050-4648.

- [14] WANG, D. et al. *The effect of adenosine 5'-monophosphate (AMP) on tenderness, microstructure and chemical–physical index of duck breast meat*. Journal of the Science of Food and Agriculture. p. 96.
- [15] HOLIEN, J. K. et al. *AMP and adenosine are both ligands for adenosine 2B receptor signaling*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, p. 202-206, 2018. ISSN 0960-894X.
- [16] *Purines, Pyrimidines, Nucleosides, and Nucleotides*. Dostupné z: <http://www.siumed.edu/~eniederhoffer/web_lessons/bmb_na.htm> [cit. 10. 8. 2018].
- [17] *Adenosindifosfát*. Dostupné z: <<https://leporelo.info/adenosindifosfat>> [cit. 10. 8. 2018].
- [18] *Adenosindifosfát (ADP)*. Dostupné z: <<http://www.gate2biotech.cz/dictionary.php?word=476>> [cit. 12. 8. 2018].
- [19] *Adenosine diphosphate*. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Adenosine_diphosphate#section=Top> [cit. 14. 8. 2018].
- [20] LI, F. et al. *A fluorescent “on-off-on” probe for sensitive detection of ATP based on ATP displacing DNA from nanoceria*. Talanta, p. 285-291, 2018. ISSN 0039-9140.
- [21] LIAN, Y. et al. *Direct and simultaneous quantification of ATP, ADP and AMP by ¹H and ³¹P Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy*. Talanta, p. 485-492, 2016. ISSN 0039-9140.
- [22] ZHANG, T. et al. *Target-catalyzed assembly formation of metal-ion dependent DNazymes for non-enzymatic and label-free amplified ATP detection*. Sensors and Actuators B: Chemical, p. 70-75, 2018. ISSN 0925-4005.
- [23] LASKY, J. *Adenosine triphosphate (ATP)*, Salem Press (2014).
- [24] LIU, J. et al. *Stimulation of acetoin production in metabolically engineered Lactococcus lactis by increasing ATP demand*. Applied Microbiology And Biotechnology, p. 9509-9517, 2016. ISSN 1432-0614.
- [25] NOVÁK, M. *O kouření*. Praha: Avicem, 1980.
- [26] PEJML, K. *Celý svět kouří (Dějiny tabáku)*. Praha, 1947.

- [27] *Tabák viržinský*. Dostupné z: <<http://www.biotox.cz/enpsyro/pj3rnic.html>> [cit. 10. 8. 2018].
- [28] *Nicotiana tabacum* – *tabák virginský*. Dostupné z: <<http://botanika.wendys.cz/index.php/14-herbar-rostlin/387-nicotiana-tabacum-tabak-virginsky>> [cit. 10. 8. 2018].
- [29] *Tabák virginský*. Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Tab%C3%A1k_virginsk%C3%BD> [cit. 11. 8. 2018].
- [30] *NICOTIANA TABACUM L.* – *tabák virginský / tabak virginsky*. Dostupné z: <<https://botany.cz/cs/nicotiana-tabacum/>> [cit. 17. 8. 2018].
- [31] JAHODÁŘ, L. *Farmakobotanika – Semenné Rostliny*. Praha: Karolinum, 2006.
- [32] BALOUN, J. a kol. *Rostliny způsobující otravy a alergie*. Praha: Avicenum 1989.
- [33] CIEŚLA, P.; MICHNIEWSKA, A. *Wpływ wybranych związków chemicznych na organizmy żywe*. Kraków: 2003. Dostupné z: <http://uatacz.up.krakow.pl/~wwwchemia/pliki/ISBN_978_83_7271_796_2_Wplyw_wybranych_zwiazkow_chemicznych_na_organizmy_zywe_1.pdf#page=18> [cit. 10. 8. 2018].
- [34] CAMPBELL, N. A.; REECE, J. B. *Biologie*. Brno: Computer Press, a.s., 2006.
- [35] BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists, 2000.
- [36] SUGIO, A. et al. *The Cytosolic Protein Response as a Subcomponent of the Wider Heat Shock Response in Arabidopsis*. *The Plant Cell*, p. 642, 2009.
- [37] WANG, W. et al. *Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response*. *Trends in Plant Science*, p. 244-252, 2004. ISSN 1360-1385.
- [38] PITERKOVÁ, J. a kol. *Oxidativní stres: lokalizace tvorby aktivních forem kyslíku a jejich degradace v rostlinném organismu*. *Chemické Listy* **99**, s. 455-466 (2005).
- [39] PROCHÁZKA, S. *Fyziologie rostlin*. Praha: Academia, 1998. ISBN 80-200-0586-2.
- [40] PAVLOVÁ, L. *Fyziologie rostlin*. Praha: Karolinum, 2005. ISBN 80-246-0985-1.

- [41] ŠVEC, F. *Co dnes hýbe kapalinovou chromatografií?* Chemické Listy **103**, s. 266-270 (2009).
- [42] SCHWARTZ, J. J. *Chromatography*, Salem Press (2013).
- [43] MAJORS, R. E. *Historical developments in HPLC and UHPLC column technology: The past 25 years*. LC-GC North America, p. 818-840, 2015. ISSN 15275949.
- [44] *High Performance Liquid Chromatography*. Dostupné z: <<https://chemistry.tutorvista.com/analytical-chemistry/high-performance-liquid-chromatography.html>> [cit. 12. 8. 2018].
- [45] RUSAK, D. A. *High-performance liquid chromatography (HPLC)*, Salem Press (2013).
- [46] DOUŠA, M. *Teorie HPLC / Základy HPLC*. Dostupné z: <<http://www.hplc.cz>> [cit. 15. 8. 2018].
- [47] COSKUN, O. *Separation techniques: Chromatography*. Northern Clinics of Istanbul, p. 156-160, 2016. ISSN 2536-4553.
- [48] CHURÁČEK, J.; JANDERA, P. *Úvod do vysokoúčinné kapalinové kolonové chromatografie*. Praha: SNTL, 1984.
- [49] KLÍMA, J.; GRAFNETTEROVÁ, J. *Využití kapalinové a plynové chromatografie v klinické farmakologii*. Praha: Avicenum, 1987.
- [50] SNYDER, R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. *Practical HPLC Method Development*. Wiley-Interscience, 1997.
- [51] *Kapalinová chromatografie*. Dostupné z: <https://is.mendelu.cz/eknihovna/opory/zobraz_cast.pl?cast=52970> [cit. 13. 8. 2018].
- [52] CVAČKA, J. *Detekce ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii*. 2010. Praha. Dostupné z: <<http://web.natur.cuni.cz/~analchem/bosakova/hplc3.pdf>>. Přednáška. Přírodovědecká fakulta UK v Praze.
- [53] SOBOTNÍKOVÁ, J. *Iontově výměnná chromatografie*. Praha. Dostupné z: <<https://web.natur.cuni.cz/~suchan/IEC.pdf>>. Přednáška. Přírodovědecká fakulta UK v Praze.
- [54] *Část 14 – Iontově výměnná chromatografie*. Dostupné z: <http://fchi-oppa.vscht.cz/uploads/AK-skripta/Kap_14.pdf> [cit. 27. 8. 2018].

- [55] ČERNÁ, M. *Stanovení adenosintrifosfátu a adenosindifosfátu v reálných vzorcích*. 2013. Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze, Praha.
- [56] LIU, H. et al. *A Simple and Rapid Determination of ATP, ADP and AMP Concentrations in Pericarp Tissue of Litchi Fruit by High Performance Liquid Chromatography*. 2006.
- [57] ZUO, H. L., et al. *Simultaneous Determination of 17 Nucleotides, Nucleosides and Nucleobases in Pinellia Ternata by High Performance Liquid Chromatography*. 2003. ISSN 2325-9906
- [58] QIU, W. et al. *Analysis of 10 nucleotides and related compounds in Litopenaeus vannamei during chilled storage by HPLC-DAD*. LWT – Food Science and Technology, p. 187-193, 2016. ISSN 0023-6438.
- [59] *Ion Exchange chromatography of nucleotides*. Dostupné z: <<http://www.mn-net.com/DesktopModules/TabID/8991/default.aspx>> [cit. 28. 8. 2018].