

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Analytická chemie

Studijní obor: Analytická chemie



Ing. Eva Zborníková

Vývoj nové metody analýzy nukleotidového fondu v bakteriálních buňkách
Development of a novel method for nucleotide pool analysis in bacterial cells

Disertační práce

Školitel:
Ing. Dominik Rejman, PhD

Praha, 2019

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem 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.

V Praze dne 18.6.2019

Ing. Eva Zborníková

Tato disertační práce vznikla na Ústavu organické chemie a biochemie Akademie věd během let 2014–2019. Práce je postavena na komplexní rešerši ke zpracovanému tématu, jedné souhrnné publikaci, nepublikovaných výsledcích a použití metody pro biologické účely.

Školitel: Ing. Dominik Rejman, PhD

Ústav Organické chemie a biochemie Akademie věd vvi, Flemingovo náměstí 2,
Praha 6

Konzultant: prof. RNDr. Pavel Coufal, Ph.D.

Katedra Analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy, Hlavova 8,
Praha 2

Poděkování:

Za obětavost, trpělivost a nadšení pro vědu děkuji především svému školiteli, Ing. Dominiku Rejmanovi, PhD. Za vhlad do vědecké práce děkuji svému bývalému školiteli Ing. Ivanu Rosenbergovi, PhD. Za vstřícný přístup a trpělivost děkuji také celé oborové radě.

ABSTRAKT (CZ)

Předkládaná dizertační práce se zabývá stanovením nukleotidů v bakteriálních buňkách. Nukleotidy hrají klíčovou úlohu ve většině metabolických dějů, a proto informace o jejich zastoupení je důležitým vodítkem o vlivu interních i externích podmínek na látkovou přeměnu bakterií.

Dosud publikované práce zabývající se analýzou nukleotidů a jiných intracelulárních metabolitů lze rozdělit na dvě skupiny podle používané techniky: a) práce s metabolomickým přístupem a b) práce s úzkou skupinou cílových analytů pro rutinní analýzu. V případě a) většinou autoři využívají nejmodernější techniky LC-MS/MS, v případě b) robustní UV detekci nejčastěji ve spojení s IP-LC. Cílem této práce bylo spojit oba přístupy a získat metodu pro rutinní analýzu, která by ale využívala benefitů hmotnostní detekce, jako je citlivost a selektivita, a zároveň by nevyžadovala náročné optimalizování MS/MS přechodů a odbornou obsluhu. Hlavní záměr nové HILIC-MS metody je její univerzální aplikovatelnost ve většině biologických a biochemických laboratoří.

ABSTRACT (EN)

This thesis deals with the determination of nucleotides in bacterial cells. Nucleotides play crucial role in most of the metabolic pathway. Determining their concentrations could give us important clues about the influence of internal and external conditions on the bacterial metabolism.

Previously published papers dealing with the analysis of nucleotides and other intracellular metabolites can be divided into two groups according to the analytical approach: a) metabolomic approach and b) targeted approach dealing with narrow group of target analytes. In the case a) most authors use the state-of-the-art LC-MS/MS technique, whereas in the case b) robust UV detection coupled mainly to IP-LC is widely used. The aim of this study was to combine both approaches to obtain a method for routine analysis that would take advantages of mass detection, such as sensitivity and selectivity, while avoiding the need of demanding optimization of MS/MS transitions and expert service. The main purpose of the newly developed HILIC-MS method is its universal applicability in most biological and biochemical laboratories.

SEZNAM ZKRATEK:

(p)ppGpp	guanosin tetra- a pentafofát (guanosin 5'-difofát-3'-difofát, guanosin 5'-trifofát-3'-difofát)
2D	dvoudimenzionální
ADP	adenosin difofát
AEC	adenylátová energie
AMP	adenosin monofofát
APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku
API	ionizace za atmosférického tlaku
APPI	fotoionizace za atmosférického tlaku
ATP	adenosin trifofát
BEH	bridged ethyne hydride
C18	oktadecyl
cAMP	cyklický adenin monofofát
c-di-GMP	cyklický diguanosin monofofát
CN	kyanoethylová kolona
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxynukleotid trifofát
DoE	návrh experimentu
ERLIC	kapalinová chromatografie využívající elektrostatické repulze
ESI	ionizace elektrosprejem
FA	kyselina mravenčí
FAD	flavin adenin dinukleotid
GC	plynová chromatografie
GC-MS	plynová chromatografie s hmotnostní detekcí
SF	stacionární fáze
GDP	guanosin difofát
GTP	guanosin trifofát
HAc	kyselina octová
HILIC	hydrofilní interakční kapalinová chromatografie
IEC	iontově výměnná chromatografie
ICH	The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use
IP-LC	iontově-párová chromatografie
IS	vnitřní standard
IT	iontová past
LB	lysogenní bujón
LC-MS	kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí
LOD	limit detekce
LOQ	limit kvantifikace
MALDI	desorpce s asistencí matrice
MBP	maltose-binding protein
ME	matriční efekty
MFa	matriční faktor
MF	mobilní fáze
MS I	Magic spot I
MS II	Magic spot II
MS	hmotnostní spektrometrie
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie

NAD	nikotinamid adenin dinukleotid
NADH	redukovaný nikotinamid adenin dinukleotid
NADP	nikotinamid adenin dinukleotid fosfát
NADPH	redukovaný nikotinamid adenin dinukleotid fosfát
NH ₂	amino kolona
NH ₄ Ac	octan amonný
NTP	nukleotid trifosfát
PFP	pentaflorfenylová kolona
pGpp	GMP 3'-difosfát
ppGpp	guanosin tetrafosfát (guanosin 3'-difosfát-5'-difosfát)
pppGpp	guanosin pentaosfát (guanosin 3'-difosfát-5'-trifosfát)
QqQ	trojitý kvadrupól
qTOF	hybridní analyzátor doby letu s kvadrupólem
RNA	ribonukleová kyselina
RP	reverzní fáze
RSD	relativní směrodatná odchylka
SF	stacionární fáze
SiOH	silikagelová kolona
SPE	extrakce na tuhou fázi
SR	stringentní odpověď
THF	tetrahydrofuran
TOF	analyzátor doby letu
UHPLC	chromatografie s velmi vysokým rozlišením
ULQ	horní mez detekce
USP	U.S. Pharmacopeia
UV	ultrafialový
ZcH	ZIC-cHILIC
ZH	ZIC-HILIC
ZpH	ZIC-pHILIC
ε	extinkční koeficient
λ _{max}	absorpční maximum
σ	směrodatná odchylka

OBSAH

1 CÍLE PRÁCE	9
2 TEORETICKÝ ÚVOD	10
2.1 ANALÝZA NUKLEOTIDŮ V BAKTERIÁLNÍCH BUŇKÁCH	10
2.2 KULTIVACE BAKTERIÍ	11
2.3 ODBĚR A ZPRACOVÁNÍ BAKTERIÁLNÍCH VZORKŮ	12
2.4 ODBĚR VZORKU	13
2.4.1 EXTRAKCE NUKLEOTIDŮ	14
2.4.2 PŘEČIŠTĚNÍ A ZAKONCENTROVÁNÍ	14
2.5 KVANTIFIKACE	15
2.5.1 ANALÝZA	15
2.5.1.1 Autoradiografie	16
2.5.1.2 Enzymatická detekce	16
2.5.2 METODY VYUŽÍVAJÍCÍ SPEKTROFOTOMETRICKOU DETEKCI	17
2.5.2.1 Ionově-výměnná chromatografie (IEC)	17
2.5.2.2 Ionově-párová chromatografie (IP-LC)	19
2.5.3 METODY VYUŽÍVAJÍCÍ HMOTNOSTNÍ DETEKCE	20
2.5.4 HYDROFILNÍ INTERAKČNÍ KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE (HILIC)	21
2.5.4.1 Mobilní fáze	22
2.5.4.2 Stacionární fáze	22
2.5.4.3 Separace nukleotidů	24
2.5.5 VALIDACE	25
(i) Přesnost.....	25
(ii) Selektivita	26
(iii) Linearita a pracovní rozsah.....	26
(iv) Limit detekce (LOD), limit kvantifikace (LOQ)	26
(v) Robustnost	27
(vi) Matriční efekty (ME)	27
(vii) Opakovatelnost a reprodukovatelnost	28
(viii) Výťažnost.....	28
(ix) Citlivost.....	28
2.6 STRINGENTNÍ ODPOVĚĎ	29
3 VÝSLEDKY A DISKUSE	32
3.1 VÝVOJ SEPARAČNÍ METODY	32
3.1.1 STACIONÁRNÍ FÁZE (SF)	32
3.1.2 MOBILNÍ FÁZE	36
3.1.3 NÁSTRÍK	38
3.2 VÝVOJ PODMÍNEK DETEKCE A KVANTIFIKACE	39
3.2.1 DETEKCE	39
3.2.2 KVANTIFIKACE	40
3.2.2.1 Vnitřní standard (IS) a matriční efekty (ME).....	40
3.2.2.2 Kalibrační křivka	42
3.2.3 VALIDACE	43
3.3 VYUŽITÍ METODY PŘI ANALÝZE REÁLNÝCH VZORKŮ	43
3.3.1 IN VITRO EXPERIMENTY	43
3.3.2 ANALÝZA BAKTERIÁLNÍCH EXTRAKTŮ	43
3.3.2.1 Optimalizace zpracování vzorku	43

3.3.2.2	Indukovaná stringentní odpověď	44
3.3.2.3	Aplikace na mykobakterie	46
4	ZÁVĚR	48
5	LITERATURA:	49
6	KOMENTÁŘE K OSTATNÍM PUBLIKACÍM:	57
6.1	SEZNAM PUBLIKACÍ:	57
6.2	SEZNAM PATENTŮ:	58
6.3	SEZNAM PLAKÁTOVÝCH SDĚLENÍ:	59
6.4	SEZNAM PŘEDNÁŠEK:	59
7	SEZNAM PŘÍLOH:	60

1 CÍLE PRÁCE

Tato dizertační práce je zaměřena na vývoj univerzální metody pro analýzu obsahu nukleotidů v bakteriálních buňkách, která by měla být jednoduchá, robustní a zároveň použitelná v (téměř) každé biologické laboratoři. Hlavní práce je věnována optimalizaci analytických parametrů, od výběru vhodné kolony a mobilní fáze po možnosti zvýšení citlivosti za použití vysoce citlivých hmotnostních detektorů. Dále jsou porovnány jednotlivé extrakční postupy pro co nejvyšší výtěžnost jednotlivých analytů s ohledem na jejich opakovatelnost.

Velký důraz je kladen na jednotlivé kroky, které mohou vést k nepřesným výsledkům a které mohou kriticky ovlivnit celou analýzu. V důsledku je předložen jednoduchý manuál, který by po úpravě parametrů podle vybavení laboratoře měl sloužit v každé laboratoři zabývající se analýzou biologického materiálu.

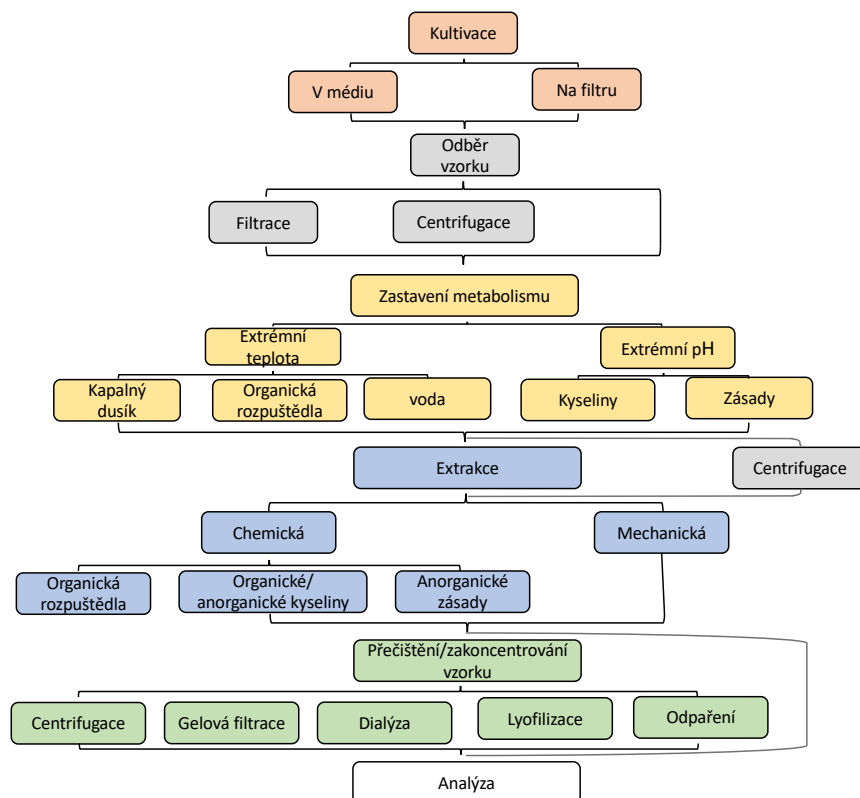
Metoda byla vyvíjena na dvou HPLC-MS přístrojích s jednoduchým kvadrupólem a na závěr validována na přístroji UPLC-qTOF s kolonou Zic-cHILIC. Vyvinutá metoda byla aplikována na buněčné extrakty bakterií *Escherichia coli* kultivovaných jednak za standardních podmínek a jednak za přítomnosti antibiotika mupirocinu, který u *E. coli* vyvolává stringentní odpověď, což se projeví mj. změnou koncentrací některých nukleotidů. Závěrem byla otestována univerzálnost použití i na extraktech jiného bakteriálního rodu, a to *Mycobacterium smegmatis*.

2 TEORETICKÝ ÚVOD

2.1 Analýza nukleotidů v bakteriálních buňkách

Nukleotidy jsou malé polární molekuly, které se aktivně účastní mnoha biochemických pochodů v prokaryontních buňkách i buňkách rostlin, živočichů a hub. Adenosin trifosfát (ATP) slouží jako stálá “energetická měna” buňky [1], zatímco guanosin trifosfát (GTP) je využíván jako okamžitý zdroj energie při proteosyntéze. Uridinové deriváty jsou nejběžnějšími intermediáty při přeměně uhlovodíků [2] a jejich cytidinová analoga slouží jako meziprodukty při biosyntéze fosfolipidů [3]. Nukleotidy se uplatňují jako stavební jednotky makromolekul – deoxyribonukleové kyseliny (DNA) a ribonukleové kyseliny (RNA). Některé deriváty nukleotidů slouží v buňkách jako koenzymy (např. ATP, acetylkoenzym A, nikotin adenin dinukleotid [NAD], nikotin adenin dinukleotid fosfát [NADP], flavin adenin dinukleotid [FAD]), jiné mají regulační efekt. Takovéto nukleotidy, které různými způsoby ovlivňují metabolismus na buněčné úrovni, se nazývají “druhými posly” (např. cyklický adenin monofosfát [cAMP], cyklický diguanosin monofosfát [c-di-GMP] a guanosin tetra- a penta-fosfát [(p)ppGpp] [4]). Nejen přítomnost konkrétních nukleotidů v buněčném extraktu, ale i jejich koncentrace svědčí o fyziologickém stavu, ve kterém se buňka nachází. Proto je jejich identifikace a kvantifikace důležitou součástí rutinní analýzy v biochemických a biologických laboratořích, kde se zabývají vlivy konkrétních modifikací enzymového aparátu, genetickou úpravou nebo vlivem podmínek prostředí na metabolismus buňky. Stanovení nukleotidů je také nedílnou součástí metabolomiky, která se zabývá stanovením nízkomolekulárních látek, které se uplatňují v metabolismu celého organismu (tzv. metabolom), tkání nebo jednotlivých buněk [5].

Analýzou nukleotidů v buněčném extraktu se zabývalo mnoho laboratoří od 40. let 20. století [6, 7]. Tento úkol se skládá ze sekvence postupů (**Obrázek 1**), kdy každý krok může citelně ovlivnit výsledek analýzy. Níže budou diskutovány dílčí kroky a nejběžnější postupy, které se při stanovování intracelulárních metabolitů uplatňují.



Obrázek 1: Schéma nejběžnějších postupů pro studování intracelulárních metabolitů v buňkách.

2.2 Kultivace bakterií

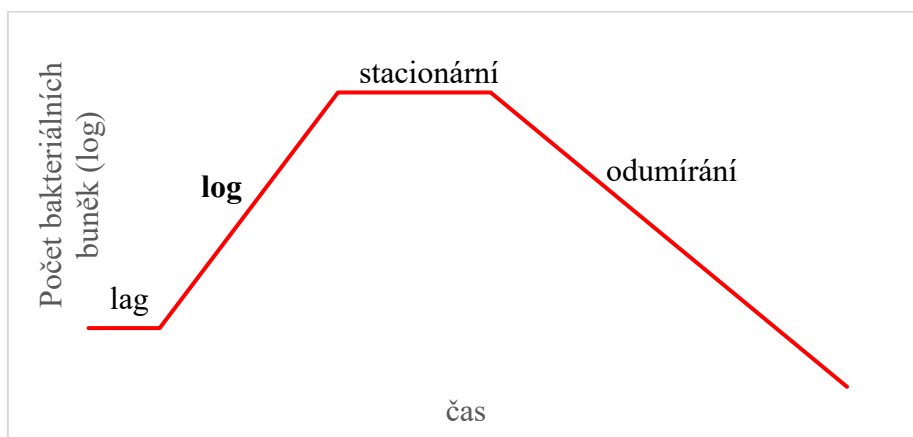
Bakterie se pěstují pro účely stanovení metabolitů v (i) tekutých půdách nebo (ii) na filtru. Kultivační médium má vliv na hodnotu intracelulárních i extracelulárních metabolitů. Nejčastěji se používá definované minimální médium připravované podle jednoznačně daného protokolu [8, 9]. V takovémto minimálním médiu jsou obsažené zdroje organických i anorganických biogenních prvků a jeho pH je upraveno na optimální hodnotu pro růst daného bakteriálního rodu. Složení kultivačního média se liší podle bakteriálního rodu a podle požadavků na zdroje živin. Velkou výhodou minimálního média je jeho přesně definované složení, a tedy i možnost zopakovat experiment za konstantních podmínek. Také použití bioreaktoru umožňuje přesné dodržení kultivačního roztoku a tím i zvyšuje opakovatelnost experimentu [10].

Další možností je použití univerzálního bujónu, který je bohatý na živiny a jednoduchý na přípravu. Nejběžnějším bujónem je LB-médium (lyzogenní bujón, z angl. Lysogeny Broth, někdy nazývané také Lauria-Bertani médium), připravené v 50. letech Giuseppe Bertaním [11]. LB médium se od počátku hojně využívá pro kultivaci *E. coli* pro laboratorní i průmyslové účely. Zásadní nevýhodou tohoto média je rozdílné složení mezi jednotlivými šaržemi, protože se připravuje z kvasinkového extraktu, což může ovlivnit opakovatelnost jednotlivých experimentů.

Kultivace na filtru se využívá obvykle pro metabolické studie [9, 12]. Buňky narostlé na určitou optickou hustotu (OD, z angl. optical density) v kapalném médiu se přefiltrují přes

nitrocelulózový filtr a spolu s filtrem přemístí na agarosový podklad smočený v kompletním minimálním médiu. Výhodou takového přístupu je velmi rychlý odběr vzorku a zastavení metabolismu.

Bakterie během kultivace prochází čtyřmi fázemi růstu (**Obrázek 2**) – (i) počáteční **lag** fází, kdy se buňka adaptuje na růstové podmínky, a ještě nedochází k dělení, (ii) exponenciální, nebo též logaritmickou fází (**log** fáze), kdy dochází ke zdvojení populace za určitý časový úsek, (iii) stacionární fází, ve které obvykle dojde zásoba některé živiny v médiu nebo naopak je do média uvolněno příliš mnoho toxického produktu metabolismu. V této fázi je vyrovnaná rychlost růstu a úhynu buněk, a (iv) fáze odumírání. Většinou se stanovují intracelulární metabolity v (ii) exponenciální fázi růstu, kdy je v médiu dostatek živin a koncentrace metabolitů odpovídá složení média a bakteriálnímu druhu.



Obrázek 2: Grafické znázornění typické křivky růstu bakterií v kultivačním médiu (podle [13])

Na konci 60. let 20. století D. Atkinson popsal pomocí jednoduché rovnice:

$$AEC = ([ATP] + 0.5 [ADP]) / ([ATP] + [ADP] + [AMP]) \quad (1)$$

kde ATP značí adenosin trifosfát, ADP adenosin difosfát a AMP adenosin monofosfát, zda se buňka nachází v rovnovážném energetickém stavu. Parametr, který popisuje tato rovnice, nazval poměrem adenylátové energie (AEC, z angl. Adenylate Energy Charge) a ukazuje, zda převládá syntéza nebo hydrolýza ATP [14]. Pomocí tohoto poměru lze určit, v jaké fázi růstu se buňka nachází. V exponenciální fázi růstu je hodnota $AEC > 0,8$, nižší hodnoty ukazují na stacionární fázi růstu [15].

2.3 Odběr a zpracování bakteriálních vzorků

Zvolený způsob vzorkování hraje klíčovou úlohu v dosažených výsledcích. Látková přeměna některých nukleotidů je velmi rychlá, např. ATP se účastní biochemických přeměn v řádech milimolů na litr za sekundu [16]. Jiné nukleotidy jsou nestabilní a snadno podléhají chemické degradaci (např. redukovaný nikotinamid adenin dinukleotid [NADH] a redukovaný nikotinamid adenin dinukleotid fosfát [NADPH]). Polyfosfáty, např. trifosfáty nebo (p)ppGpp (guanosin 3'-difosfát-5'-difosfát a guanosin 3'-difosfát-5'-trifosfát), jsou náchylné k hydrolýze, a to převážně v kyselém prostředí. (p)ppGpp díky přítomnosti volných fosfátů na labilnější pozici 3' podléhá jak hydrolýze, tak i cyklizaci v zásaditém prostředí (participací 2'-hydroxylové skupiny). Je tedy nezbytné brát ohled na všechny výše zmíněné faktory a snažit se o co nejrychlejší zastavení metabolismu a o co nejšetrnější extrakci analytů. Obvykle se

příprava analytického vzorku z buněčného materiálu skládá z několika kroků – 1) odběr vzorku; 2) extrakce analytů; a 3) přečištění a/nebo zakoncentrování vzorku. Nejběžnější postupy pro každý krok jsou shrnuty na **Obrázku 1**. Důležitým parametrem pro odběr a extrakci bakteriálních vzorků je kromě celkové výtěžnosti analytů také celkový čas a náklady.

2.4 Odběr vzorku

Obvyklý postup je oddělení bakterií od kultivačního média buď (i) filtrací [17] nebo (ii) centrifugací [18] a následné zastavení metabolismu. Protože zastavení metabolismu musí nastat co nejdříve po odběru buněk, upřednostňuje se filtrování kultivační půdy, které trvá v řádu jednotek vteřin, před odstředěním, trvajícím jednotky minut. Během této doby může docházet k enzymatickým reakcím, které dynamicky mění metabolický profil [19]. Navíc jsou buňky během separačního kroku vystaveny stresu a tím je pozměněn i jejich metabolismus. Opakovatelnost měření při použití centrifugace je tedy výrazně nižší [19]. Centrifugační krok může být zařazen až po zastavení metabolismu [20, 21], kdy hladinu nukleotidů již dramaticky neovlivňuje. Díky citlivějším detekčním technikám není potřeba pro stanovení analytů velké množství vzorku, jako tomu bylo dříve, což dovoluje upřednostnit filtraci či přímou kultivaci na filtru před odstředěním.

Kultivace na filtru je oblíbená při metabolomických studiích 21. století a obvykle následuje protokol Bennetta *a kol.* [9]. Spočívá v šetrné filtraci buněk v rané exponenciální fázi růstu ($OD_{650} \approx 0,1$) a následné kultivaci buněk na filtru na agarosové misce do kýžené optické hustoty, měřené po intenzivním promytí buněk vázaných na filtr určitým objemem média. Velkou výhodou je rychlé oddělení filtru s buňkami od média a jeho přesunutí do extrakčního rozpouštědla.

Analytický vzorek se také může připravit bez počátečního oddělení buněk od média. Alikvot buněčné kultury spolu s růstovým médiem je tak přidán do extrakčního roztoku, kde dojde zároveň k inaktivaci enzymů. Tento způsob je jednoduchý a obvykle šetrný k rychle se metabolizujícím analytům. Nevýhodou je ale nízká koncentrace analytů ve vzorku a jeho vysoká komplexnost. Kromě stanovovaných metabolitů jsou často přítomny i mnohé složky matrice a také vysoká koncentrace solí z růstového média [22]. Často bývá tedy po extrakci zařazen ještě přečišťující a koncentrační krok [21].

Stejně jako při oddělení buněk od média i u zastavení metabolismu hraje klíčovou úlohu rychlost. Nejčastěji se inaktivace enzymů dosahuje teplotním nebo pH šokem. Při teplotním šoku dochází k okamžitému zmrazení metabolismu kapalným dusíkem [19, 21] nebo ledovými organickými rozpouštědly. Z roztoků organických rozpouštědel je nejpoužívanější ledový methanol s vodou (obvykle 60%), díky vysoké průchodnosti buněčnou stěnou. Dále se používá např. glycerol v solném roztoku [23], který vyniká vysokou výtěžností, ovšem zbytky glycerolu jsou špatně odstranitelné z buněčných pelet. Teplotní šok může také nastat varem [10]. Pro dosažení prudké změny pH se používají silné anorganické kyseliny, jako kyselina chlorovodíková, fosforečná nebo chloristá [24], která byla použita i v pionýrských pracích [25], nebo méně často báze.

Zvolený způsob ovlivňuje nejen celkovou výtěžnost metabolitů, ale i integritu buněčné stěny. Je-li buněčná stěna při tomto kroku narušena, dochází k úniku intracelulárních metabolitů do rozpouštědla a tím k nesprávnému stanovení jejich hladiny. Důležitou úlohu hraje také složení buněčné stěny stanovovaného mikroorganismu, kdy nejkritičtější prosakování je pozorováno u gramnegativních bakterií (např. *E. coli*) a nejméně patrné je u eukaryotických

buněk/mikroorganismů (např. *Sacharomyses cerevisiae*) [16, 22]. Obecně úniku vnitrobuněčných metabolitů nelze zcela zabránit, je tedy nezbytné stanovit míru jejich prolínání [22], pokud nejsou buňky v době zastavení metabolismu odděleny od růstového média.

2.4.1 Extrakce nukleotidů

Extrakce umožňuje uvolnění intracelulárních metabolitů z buněčných pelet pro jejich následnou analýzu. Extrakční postupy se liší podle organismu, ze kterého se uvolňují, a stanovovaných analytů. Různé extrakční protokoly poskytují odlišné výsledky ve složení metabolitů, na čemž se shodují všichni autoři srovnávacích studií [10, 16, 19, 26]. Menší míra shody panuje již v jejich výsledcích, kdy např. Hiller *a kol.* doporučují pro extrakci *E. coli* vařící vodu a pozorují výbornou opakovatelnost [10], zatímco Winder *a kol.* vařící rozpouštědla rezolutně odmítají a upozorňují na výrazně nižší výtěžnost intracelulárních metabolitů [16]. K extrakci může docházet po inaktivaci enzymů nebo souběžně s ní.

Pro komplexní metabolomické studie se obvykle používá extrakce studenými organickými rozpouštědly v různém poměru, která může být doplněna mechanickou desintegrací buněčné stěny, např. pomocí ultrazvuku, opakovaného zmrazení a rozmrazení vzorku nebo pomocí skleněných kuliček. Nejčastěji používanými rozpouštědly jsou 60% ethanol [16], 60% methanol [26], 80% methanol [27], popřípadě kombinace voda/methanol/chloroform [19, 28], která je vhodná zvláště pro extrakci méně polárních látek. Běžné jsou také silné kyseliny, často se používá kyselina chloristá [29] nebo trichloroctová [30], které extrahují intracelulární analyty bez nutnosti mechanické desintegrace buněčné stěny nebo opakovaného zmrazení a rozmrazení vzorku [31] a v neposlední řadě rychle inaktivují případnou přetrvávající enzymatickou aktivitu. Na druhou stranu při použití kyseliny chloristé dochází k nereprodukovatelným výsledkům, a i přes zařazení neutralizačního kroku hydroxidem draselným může dojít k poškození hmotnostně spektrometrického (MS) detektoru [10], ať již zbytkovým rozpuštěným chloristanem draselným [32], který se vysráží na vstupu do detektoru, nebo vlastním použitím kyseliny. Další nevýhodou je degradace acidolabilních analytů, proto je pro komplexní metabolomickou studii potřeba tyto analyty extrahovat i jiným rozpouštědlem, například zásadou [10].

Také zásady, jako např. hydroxid draselný [33] způsobují rozklad labilních látek a při následujícím neutralizačním kroku vzniká velké množství soli, která ruší hmotnostní detekci [16]. Stejně tak se pro prokaryotické buňky nedoporučuje extrakce horkým ethanolem, která způsobuje rozklad termolabilních analytů a únik intracelulárních metabolitů do média [16]. Naopak u eukaryotních kvasinek stanovili Lorek *a kol.* [34] pro tuto metodu medián výtěžnosti na 95 %.

Pro extrakci nukleotidů se kromě výše zmíněných rozpouštědel používají běžně ledové organické kyseliny (0,5 – 1M kyselina mravenčí [FA] [20, 35, 36] nebo octová [HAc] [21, 37]), které jsou dostatečně účinné a zároveň šetrné. Zároveň není vyžadován neutralizační krok, protože jsou těkavé, a tak snadno odstranitelné, např. lyofilizací.

2.4.2 Přečištění a zakoncentrování

Přečišťující krok bývá zařazen při použití kyselin či zásad, po kterých následuje neutralizace, nebo je-li vzorkována celá mikrobiální kultura do extrakčního média bez předchozího separačního kroku. V prvním případě je třeba odstranit velké množství soli, které by mohlo ovlivňovat nebo znemožnit detekci, zvláště v případě použití MS. Při vzorkování celé kultury do extrakčního média následuje přečištění a koncentrace analytů na SPE (extrakce na

tuhou fází, z angl. Solid Phase Extraction) koloně (Sepharosa), ze které jsou následně uvolněny vysokou koncentrací soli (2M LiCl) [20]. Výhodou je, je-li výsledná sůl v solventu nerozpustná, a tedy je možné ji odstranit centrifugací. Buď tomu tak je vhodnou volbou neutralizačního činidla, jako v případě chloristanu draselného, nebo se vysráží ze vzorku vhodným organickým rozpouštědlem, např. LiCl 96% ethanolem [21]. Pokud je ve vzorku vysoká koncentrace rozpuštěné soli, odstraňuje se dialýzou [20], což je časově náročný krok.

Výsledný extrakt je potřeba pro účely analýzy obvykle zakonzentrovat. Běžnými postupy jsou odpaření za vakua a lyofilizace, která je šetrná k termolabilním analytům. Lyofilizát či odparek je následně zředěn vhodným rozpouštědlem a analyzován zvolenou technikou. Povaha rozpouštědla se liší nejen podle polaritativnosti analytů, ale i podle separačního kroku, kdy složení nástřikového solventu by mělo být co nejbližší počátečním chromatografickým podmínkám. Pro separaci polárních nukleotidů na oktadecylové (C18) koloně se odparek či lyofilizát rozpouští ve vodě [20], na HILIC koloně ve vodném acetonitrilu (70% acetonitril, [38]; 70% acetonitril s 100 mM uhličitanem amonným, [39]; 50% acetonitril, [40]), popř. také ve vodě [41].

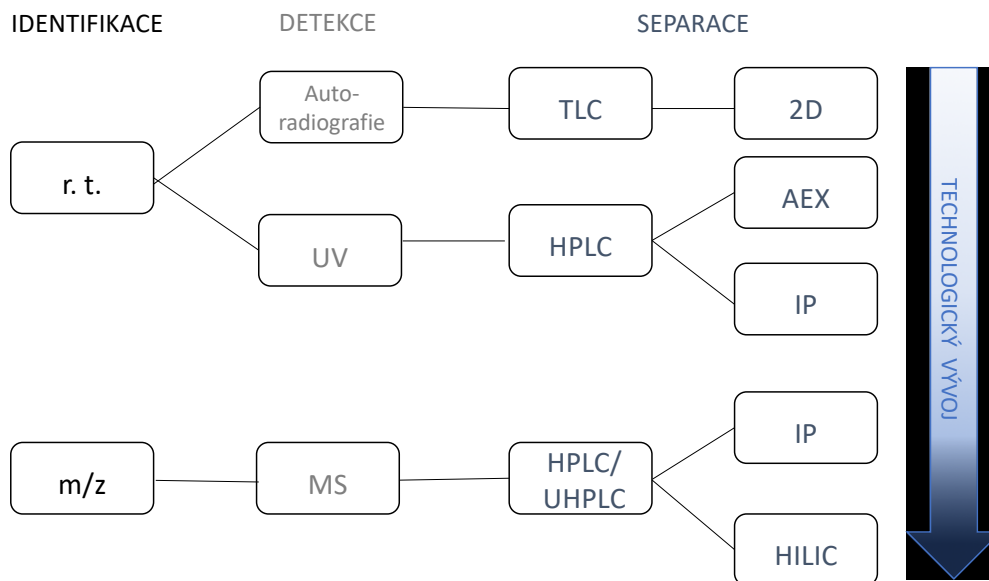
V případě, že extrakční rozpouštědlo je kompatibilní s následnou analýzou a detekční koncovka je dostatečně citlivá, koncentrační krok se může vynechat [42]. Především se tak případně degradaci labilních analytů a zkrátí se čas přípravy vzorku.

2.5 Kvantifikace

2.5.1 Analýza

Používané metody lze rozdělit do dvou majoritních skupin podle detekční koncovky (**Obrázek 3**). Zatímco detekce na základě absorpce světla v ultrafialové oblasti (UV) převládá v rutinních analýzách v biologických laboratořích, MS detekce se uplatňuje nejčastěji při metabolomickém profilování. Oba přístupy mají svá pozitiva i negativa, která se mění s vývojem používané techniky. Pro speciální analýzy byla využívána i autoradiografie [36], následná enzymatická esej [1, 6, 36], nebo konduktometrická detekce [43]. Cílem těchto technik bylo zvýšení citlivosti, specifity nebo obojího zároveň. Dnes jsou obvykle tyto metody nahrazeny vysoce citlivou a specifickou hmotnostní detekcí.

Níže jsou jednotlivé separační kroky rozděleny podle obvyklého způsobu detekce se zaměřením na použití pro kvalitativní a kvantitativní analýzu nukleotidů. Neznamena to, že by se např. při použití hydrofilní interakční kapalinové chromatografie (HILIC, z angl. Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography) nukleotidy nekvantifikovaly spektrofotometricky [44], nebo naopak že by bylo nemožné iontovou chromatografií spojit s hmotnostní detekcí [45].



Obrázek 3: Nejběžnější postupy při analýze nukleotidů.

2.5.1.1 Autoradiografie

Autoradiografie je analytická technika, která se používá k vizualizaci distribuce radioaktivně značených částic v ploše, ať již biologického materiálu, jako je tenký řez tkáně nebo buňky, nebo gelu či chromatogramu. Vizualizace je docílena vystavením speciálního fotografického filmu účinkům ionizujícího záření, které pochází z radioaktivních částic. Kvantifikace lze poté docílit pomocí denzitometrie [46] nebo scintilačního detektoru [36].

V dobách, kdy nebyla MS detekce příliš rozšířena, ionizace byla možná pouze za snížené tlaku a MS analyzátory nedosahovaly příliš vysoké citlivosti, se pro detekci a kvantifikaci nízkých koncentrací nukleotidů používalo jejich značení radioaktivním fosfátem ^{32}P . Buňky byly inkubovány v médiu, které obsahovalo volný radioaktivní fosfát $^{32}\text{P}_i$ a velmi nízkou koncentraci neznačeného fosfátu. Po oddělení buněk od média se výsledný metabolický extrakt podrobil chromatografii, ať již v tenké vrstvě [36], na papíře nebo na nitrocelulosemém filtru [47]. I když metoda přináší velkou výhodu ve vysoké citlivosti, nevyniká selektivitou a je třeba důsledné separace všech molekul, které obsahují fosfát, nejen nukleotidů.

2.5.1.2 Enzymatická detekce

Enzymatická detekce je založená na reakci enzymu se substrátem, jejíž produkt má určitou kvantitativně měřitelnou vlastnost, nejčastěji absorpci nebo emisi světla při určité vlnové délce. Např. Schneider *a kol.* využili luminiscence (spontánní emise světla) při stanovení koncentrace ATP v *E. coli* v závislosti na rychlosti růstu po reakci s luciferázou [1]. Reakce enzymu se substrátem je specifická, navíc jsou pro určité enzymatické reakce i snadno dostupné předpřipravené komerční sady, např. NAD^+/NADH . Nevýhodou je použitelnost těchto metod pouze pro konkrétní nukleotidy nikoli pro celkové zastoupení všech nukleotidů v buňce. Detekční limity jsou často vyšší ve srovnání s MS a některé metody mohou poskytovat falešně pozitivní či negativní výsledky.

2.5.2 Metody využívající spektrofotometrickou detekci

Spektrofotometrická detekce patří mezi spektrální techniky, spolu s např. infračervenou spektrometrií a nukleární magnetickou rezonancí. Principem je pohlcení světla o různé vlnové délce, které je vysíláno monochromatickým zdrojem záření. K tomu dochází při průchodu roztoku vzorku kyvetou. Intenzita světla, která není pohlcena, se měří na detektoru a je v určitém rozsahu koncentrací přímo úměrná množství absorbující látky v roztoku. Tuto úměru lze vyjádřit Lambert-Beerovým zákonem, který je dán vztahem:

$$A = \varepsilon_{\lambda} c l \quad (2)$$

kde A je naměřená absorbance, ε_{λ} je molární absorpční koeficient o vlnové délce λ , c je koncentrace absorbující látky a l je tloušťka absorpční vrstvy. Pokud měříme pouze jednu či několik málo vlnových délek, hovoříme o spektrometrii. Pokud měříme současně celé spektrum v určitém rozsahu vlnových délek, hovoříme o spektrofotometrii.

Díky přítomnosti nukleobáze absorbují nukleotidy UV záření. Absorpční maxima (λ_{\max}) se liší v závislosti na přítomné nukleobázi a jejich hodnoty jsou vedeny v **Tabulce 1**. Vzhledem k tomu, že se λ_{\max} všech nukleobází pohybuje v oblasti kolem 260 nm, často je právě tato vlnová délka použita k jejich simultánní identifikaci a kvantifikaci. Detekce pomocí UV absorpce se používá od pionýrských prací do dnešní doby a využívá při tom dvou majoritních výhod: 1) při separaci jednotlivých analytů se mohou použít jakákoli aditiva a rozpouštědla neabsorbující v oblasti blízké λ_{\max} nukleobází; a 2) při kvantifikaci se využívá vztahů Lambert-Beerova zákona (2), který je v rozmezí 2-3 koncentračních řádů ve většině případů lineární (viz.2.5.5, (iii) Linearita a pracovní rozsah). V tomto případě jsou obvykle nukleotidy separovány pomocí iontově-výměnné chromatografie (IEC, z angl. Ion Exchange Chromatography) na iontoměničích nebo s využitím iontově-párových činidel na reverzní fázi (IP-LC, z anglického Ion Pair Liquid Chromatography).

Báze	Zkratka	ε_{260} [L·mol ⁻¹ ·cm ⁻¹] ^[48]	$\varepsilon_{\lambda_{\max}}$ [L·mol ⁻¹ ·cm ⁻¹] ^[49]	λ_{\max} ^[48, 49]
Adenin	A	15020	15400	259
Guanin	G	12080	13700	252
Cytosin	C	7070	9000	271
Uracil	U	9660	10000	262
Thymin	T	8560	9650	267
Hypoxantin	Hyp	7500 ^[50]	12300	248

Tabulka 1: Hodnoty extinkčních koeficientů (ε) při 260 nm (ε_{260}) a při maximální vlnové délce ($\varepsilon_{\lambda_{\max}}$) a vlnové délky absorpčního maxima (λ_{\max}).

2.5.2.1 Iontově-výměnná chromatografie (IEC)

Principem IEC jsou interakce mezi nabitými analyty a opačně nabitými funkčními skupinami iontoměniče (ionexu), který je ukotven na stacionární fázi (SF). Síla interakce závisí na velikosti náboje analytu i ionexových skupin. Analyt je pak vytěsněn rostoucím koncentračním gradientem mobilní fáze [51]. Eluční pořadí je určeno velikostí celkového náboje analytu, v případě nukleotidů jsou tedy monofosfáty eluovány nejdříve a polyfosfáty

nejpozději. Cyklické monofosfáty vykazují velmi slabou retenci a nukleosidy se eluují blízko mrtvého objemu.

Podle polaritý funkčních skupin dělíme ionexy na katexy (polyvalentní kyseliny, které vyměňují kationty), anexy (polyvalentní báze, které vyměňují anionty) a amfolity (vyměňují kationty a anionty). Podle síly interakce pak rozlišujeme ionexy slabé a silné. Příklady jsou uvedeny v **Tabulce 2**.

		Typ	Příklad	Aplikace
anex	silný	kvarterní amin	SAX (kvarterní amin) DOWEX-1-Cl (trimethylbenzylammonium chlorid)	organické a anorganické kyseliny, nukleotidy
	slabý	aminy	DEAE (diethylaminomethyl)	nukleotidy, peptidy, proteiny, cukry
katex	silný	sulfonové kyseliny	SCX (sulfonát)	peptidy, proteiny; kationty kovů
	slabý	karboxylové kyseliny	CM (karboxymethyl)	anorganické kyseliny, kationty kovů

Tabulka 2: Příklady běžných anexů a katexů.

Funkční skupiny ionexů jsou navázány na syntetické vysokomolekulární látky na bázi celulózy, styrenu nebo akrylátu s použitím síťovacího činidla divinylbenzenu. Ten slouží ke stabilizaci vzniklých pórů různé velikosti, které ovlivňují použití ionexu (mikropóry se hodí pro separaci nízkomolekulárních látek, zatímco makropóry jsou vhodné pro separaci makromolekul).

Nukleotidy jsou ve slabě kyselém, neutrálním i bazickém prostředí záporně nabitě, pro jejich separaci se proto používá anexu. Před zdomácněním vysokoúčinné kapalinové chromatografie se nukleotidy dělily na silných anexech v kyselém pH [7, 52-54] i na slabých anexech [55, 56]. Výhoda slabých anexů spočívala především v použití těkavých pufrů, např. NH_4HCO_3 , ve slabě bazickém prostředí. Pomocí gradientu pH se podařilo rozdělit i polohové isomery AMP, které nesou totožný náboj a pouhým iontovým gradientem separovatelné nejsou [55].

S aplikací HPLC s UV detekcí se výrazně zkrátí čas analýzy, snížilo potřebné množství vzorku i spotřeba rozpouštědel. Standardně se používají kolony s vázaným kvarterním aminem v kyselém pH, často s použitím fosfátového pufru [21, 57-59]. Ačkoli se touto technikou při vhodně zvoleném gradientu daří rozdělit většinu nukleotidů, má své limity. Problematické je hlavně rozmývání dlouho zadržovaných analytů, tedy polyfosfátů, a jejich nedostatečné rozlišení [57], koeluce nukleosid trifosfátů (NTP) a jejich deoxy analog (dNTP) [21] nebo nutnost použít vysokou koncentraci soli pro jejich eluci. Ta zapříčiňuje rychlé stárnutí kolony a tím nereprodukovatelné retenční časy. Také doba potřebná k promytí kolony se často

neúměrně prodlužuje. Jako jediná metoda ke stanovení kompletního nukleotidového fondu v buněčném extraktu tak IEC není vhodná a často bývá doplněna nebo někdy i nahrazena IP-LC.

V roce 2007 použil Kiefer *a kol.* novou techniku, která spojuje IEC s MS detekcí díky zařazení elektrolytického supresoru před detektor pro analýzu centrálních metabolitů Krebsova cyklu [60]. Supresor, zařazený za kolonu, odstraňuje z MF draselné ionty a hydroxidové ionty mění na vodu, která je na rozdíl od KOH kompatibilní s ESI-MS detekcí. Využil tak výhod selektivní detekce pomocí MS a dobrého rozdělení na ionexové koloně. V následujících letech byla metoda upravena za použití kapilárních anexových kolon, ať již částicových [61], nebo monolytických [45], které díky snížení průtoku umožnily zvýšit citlivost detekce. Relativně dlouhý čas separace a náročnější instrumentace nejsou pro univerzální použití ideální a tato technika nenašla zatím širšího uplatnění.

2.5.2.2 Iontově-párová chromatografie (IP-LC)

IP-LC je v současnosti stále nejrozšířenější technikou pro stanovení nukleotidů v buňkách. Principem je separace analytů na reverzní fázi využívající obvykle jako SF oktadecylovou kolonu (C18) a iontově-párových aditiv v mobilní fázi (MF). Iontově-párová aditiva jsou nabitě molekuly strukturně podobné tenzidům, tedy kromě náboje opačného, než nese analyt, mají vázaný i větší alkylový řetězec [51, 62]. Pro separaci kationtů se běžně používají alkylsulfonové kyseliny a pro anionty alkylamonné soli. Vzniklé iontové páry jsou neutrální, a tedy vykazují větší zádrž na kolonách v reverzní fázi, zatímco mobilita neutrálních analytů zůstává nezměněna. Stejně nabitě analyty jako IP činidlo naopak retenční faktor snižují. Retenci analytů ovlivňuje několik faktorů – druh a koncentrace IP činidla, iontová síla, pH a složení mobilní fáze [63].

Velkou výhodou IP-LC je univerzální aplikace, výborná opakovatelnost a možnost použití vysoce účinných kolon vyvinutých pro RP chromatografii, které poskytují pro většinu analytů ostré píky. Nevýhodou je pak velmi omezené spojení s hmotnostní detekcí.

Aplikace IP-LC zaznamenaly velký nárůst spolu s rozvojem RP-LC v 70. letech. Pro analýzu polárních metabolitů se jemnější technika HPLC stala vhodnější než citlivá plynová chromatografie (GC, z angl. Gas Chromatography), která vyžadovala předchozí úpravu vzorků derivatizací a pro termolabilní analyty byla krajně nevhodnou. Velký podíl na rozvoji IP-LC v analýze buněčného extraktu měla práce Payna a Amese [57], který za použití fosforečnanu tetrabutylamonného separoval většinu nukleotidů a některé další metabolity na C18 koloně, s přídavkem K_2HPO_4 se mu poté podařilo rozdělit i jinak koelující homobazické nukleotid fosfáty (např. AMP, ADP a ATP). Tuto metodu s různými úpravami poté převzalo mnoho autorů [20, 21, 64, 65] a bývá používána dodnes. I tato metoda má své limity a to např. neschopnost rozlišit ppGpp a pppGpp nebo horší retenci pro málo polární nukleosidy a cyklické mononukleotidy. Tyto byly separovány v chromatografii na reverzních fázích (RP) s použitím KH_2PO_4 [66], $(NH_4)H_2PO_4$ [67] nebo fosforečnanu triethylamonného [68].

Pro komplexní analýzu nukleotidového fondu s využitím UV detekce se pak často používá kombinace dvou technik – nejčastěji IP-LC a IEC [20, 21]. Analyty jsou charakterizovány pomocí retenčního času shodného se standardy a často confirmovány pomocí MALDI (desorpce s asistencí matrice, z ang. Matrix-Assisted Laser Desorption)-MS. Touto “off-line dvoudimenzionální (2D) kapalinovou chromatografií” bývá dosaženo dobrého rozlišení

majority analytů a jejich snadné kvantifikace. Přesto je toto spojení náročné na čas, vyžaduje minimálně dva HPLC systémy a pro velmi málo koncentrované látky je UV detekce nevhodná.

2.5.3 Metody využívající hmotnostní detekce

Hmotnostní spektrometrie se řadí také mezi spektrální techniky, stejně jako spektrofotometrie, ačkoli nevyužívá interakce elektromagnetického záření s hmotou, jak je tomu z definice u ostatních spektrálních technik. Principem hmotnostní spektrometrie je rozdělení analytů na základě poměru hmotnosti a náboje (m/z) po jejich převedení na ionty. Rozlišuje (i) ionizaci za sníženého tlaku, ke které dochází v plynné fázi, (ii) ionizaci za atmosférického tlaku (API, z angl. Atmospheric Pressure Ionization), ke které dochází v kapalně fázi, (iii) desorpční ionizaci, při které je analyt ionizován z povrchu matrice a (iv) ionizaci využívající indukčně vázané plazma. V případě malých polárních, a tedy netěkavých, látek, jako jsou nukleosidy a nukleotidy, se v dnešní době využívá výhradně API, která navíc představuje ideální spojení hmotnostního detektoru s HPLC. Nukleotidy lze také po derivatizaci ionizovat za sníženého tlaku, popř. pomocí MALDI. Obě techniky ale vyžadují před vstupem do ionizačního zdroje další krok. Derivatizační krok může mít nízkou účinnost, popř. může vést k rozkladu termolabilních látek, zatímco u MALDI, která se využívá především k identifikaci látek, je nezbytné rozdělení jednotlivých analytů ze směsi. Ani jedna metoda tak není vhodná pro přesné stanovení nukleosidů a nukleotidů.

Hmotnostní detektor je v dnešní době běžnou součástí většiny laboratoří. Zavedení hmotnostní detekce do analýzy bakteriálních buněk se rozšířilo s požadavkem na metabolomické profilování. V pilotních pracích se nejprve uplatňovala plynová chromatografie s jednoduchou hmotnostní detekcí (GC-MS) [16, 69], která ale vyžadovala již zmiňovanou derivatizaci polárních analytů, tedy i nukleotidů. Zavedení tzv. měkkých ionizačních technik umožnilo ionizaci za atmosférického tlaku a tím i spojení hmotnostního analyzátoru s kapalinovou chromatografií. Z ionizačních technik je nejběžnější ionizace elektorsprejem (ESI, z angl. ElectroSpray Ionization), která je i nejvhodnější pro polární analyty. Méně využívaná je chemická ionizace (APCI, z angl. Atmospheric Pressure Chemical Ionization), vhodná pro méně polární molekuly, a vzácně se pro detekci nepolárních a labilních látek využívá fotoionizace (APPI, z angl. Atmospheric Pressure PhotoIonization). Při komplexní analýze metabolitů se nejprve využívaly obě techniky společně, kdy GC umožňovala identifikaci méně polárních analytů, zatímco pomocí LC se separovaly analyty polární bez nutnosti derivatizace [70].

Protože spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí (LC-MS) bylo velmi slibné, rapidně se zvyšovala citlivost a rozlišení hmotnostních analyzátorů. Strukturní informace, které poskytovala elektronová ionizace při použití GC-MS, jsou dosažitelné za pomoci tandemové hmotnostní spektrometrie (MS/MS), kdy mateřský ion sledované látky je aplikovaným napětím rozštěpen na dceřiné ionty. Díky tomu, že při MS/MS dochází ke štěpení jen vybraných analytů, je tato metoda velmi selektivní. Dochází také k výraznému potlačení nežádoucích signálů z matrice a tím se zvyšuje citlivost detekce. Pro tyto vlastnosti je tandemová hmotnostní spektrometrie ideálním nástrojem nejen pro simultánní vyhodnocení stovek metabolitů [9, 42], ale s výhodou se využívá i při kvantifikaci velmi nízkých koncentrací analytů [71].

Pro analýzu polárních nukleotidů ve spojení s hmotnostní detekcí se nejprve používala především chromatografie na reverzní fázi s oktadecylovou kolonou a využitím silných těkavých ion-párových činidel [72]. Ta sice zlepšují chromatografické rozlišení, jak již bylo

uvedeno v sekci 2.5.2.2, ale zároveň potlačují ionizaci analytů [73]. Tyto kationty se usazují na iontovém zdroji, a tak ovlivňují i následné analýzy. Kromě běžných ion-párových činidel na bázi amoniových solí (diethylamin, triethylamin, tetrabutylamin) byly testovány i těžavější aditiva, např. hexafluoroisopropanol, které také supresi ionizace nezabrání.

Další variantou je využití modifikovaných RP kolon vhodných pro analýzu polárních látek, jako např. pentafluorofenyl, různě modifikované C18 kolony. Tyto kolony umožňují použít 100% vodnou fázi a poskytují dostatečnou retenci i pro velmi polární látky bez ion-párových činidel [74].

Stále populárnější možností pro LC-MS analýzu polárních látek je využití HILIC, které přináší řadu výhod. Na HILIC kolonách jsou polární analyty zadrženy bez nutnosti použití vysoké koncentrace interferujících solí, jako je tomu v případě IP-LC, a navíc vysoký obsah organické fáze, která se pro separaci na těchto kolonách používá, usnadňuje ionizaci a tím zvyšuje citlivost detekce

2.5.4 Hydrofilní interakční kapalinová chromatografie (HILIC)

Hydrofilní interakční kapalinová chromatografie se používá od 70. let 20. století. Její pionýrské aplikace se týkaly separace sacharidů [75], ačkoli pojmenována byla až Alpertem v roce 1990 [76], který zároveň popsal mechanismus separace na různých třídách polárních látek. K separaci se používá polární stacionární fáze (nabitá či nenabitá) a k eluci rostoucí koncentrace vody ve vysokoprocentním organickém rozpouštědle. Prakticky je tedy separace podobná rozdělení na normálních fázích, ovšem při uplatnění jiného mechanismu.

Principem HILIC je rozdělení mezi vodnou vrstvu částečně imobilizovanou na polární stacionární fázi a hydrofobní mobilní fázi, na rozdíl od chromatografie na normálních fázích, kde se analyty reverzibilně váží přímo na stacionární fázi. Tento prvotní předpoklad byl potvrzen studiemi na silikagelu [77], kdy byla prokázána tvorba vodné monovrstvy o síle přibližně 0,5 nm od cca 5 % vody v acetonitrilu. Zda při separaci převládá dělení nebo adsorpce se dá odhadnout pomocí dvou rovnic [78]:

$$\log k' = \log k_w' - S \cdot \phi \quad (3)$$

$$\log k' = \log k_B' - A_s/n_B \cdot \log N_B \quad (4)$$

kde k_w' je kapacitní faktor analytu v rozpouštědle s nižší eluční silou (v případě HILIC acetonitrilu), ϕ je objemový poměr rozpouštědla s vyšší eluční silou (vody) a S je směrnice křivky. V rovnici (4) je k_B' kapacitní faktor analytu v rozpouštědle s vyšší eluční silou, A_s a n_B jsou plochy, které obsadily molekuly analytu, resp. vody na povrchu SF , a N_B je molární poměr rozpouštědla s vyšší eluční silou, tedy vody.

Rovnice (3) popisuje typické chování pro separaci na reverzní fázi, tj. dělení mezi dvě kapalně fáze, zatímco rovnice (4) se používá k popisu systému s normálními fázemi, kde se uplatňuje převážně adsorpční mechanismus. Lze-li systém charakterizovat jednou z těchto rovnic, ukazuje to na převládající mechanismus retence.

Při HILIC separaci se uplatňují i další interakce, jako elektrostatické, hydrofobní a vodíkové vazby, jejichž síla závisí na charakteru analytů a použité stacionární fázi. Přesný mechanismus není stále ještě zcela objasněn.

2.5.4.1 Mobilní fáze

Jako mobilní fáze se nejčastěji používá kombinace acetonitrilu jako rozpouštědla s nízkou eluční silou a vody, která má vysokou eluční sílu. Eluotropická řada závisí kromě polaritu rozpouštědla i na jeho schopnosti podílet se na proton-donor a proton-akceptorových interakcích [51, 78]:

acetonitril > tetrahydrofuran > isopropanol > ethanol > methanol > voda

Acetonitril (stejně jako voda) může být obohacen jiným organickým modifikátorem (methanol, isopropanol), které se používají spíše na úpravu selektivity než jako jediné organické rozpouštědlo. Nahrazení organické složky alkoholem vede obvykle ke snížení selektivity i účinnosti a snížení retenčního času. Ve vodě rozpustné vitamíny měly při použití tetrahydrofuranu (THF) obdobnou retenci jako při použití acetonitrilu, avšak THF vykazoval nižší účinnost [79], navíc potlačuje ionizaci v MS. Aceton je také aprotické rozpouštědlo s polaritou blízkou acetonitrilu, ale i on vykazuje horší separační vlastnosti než acetonitril, navíc silně absorbuje v UV oblasti (UV cut off = 330 nm) [80]. Pokud je voda nahrazena jiným protickým rozpouštědlem, hovoříme o nevodné HILIC separaci [81].

Do soustavy může být použit různě koncertovaný pufr v závislosti na rozpustnosti v organické složce a na detekční koncove. Koncentrace a typ použitého pufru ovlivňuje retenci v závislosti na náboji analytu a kolony. Použité ionty pufru (kationty i anionty) se dělí dle Hofmeisterovy série na kosmotropní, tedy ty, které analyty solvatují, a chaotropní, neboli látky působící proti vzniku vodíkových vazeb. S vyšší koncentrací acetonitrilu v mobilní fázi (>80 %) roste vliv hydrofilních interakcí, a tedy i význam použité soli. Při separaci neutrálních analytů retence s rostoucí koncentrací chaotropních iontů soli roste [82], pro nabitě analyty může být pozorován opačný jev [51].

Při použití málo koncentrovaných těžkých rozpouštědel se s výhodou spojuje HILIC s hmotnostní detekcí a umožňuje tak selektivní a citlivou detekci polárních látek, které při použití těžkých pufrů na reverzní fázi nemají dostatečnou retenci. Nejčastějším aditivem je octan amonný nebo mravenčan amonný v koncentracích 5-20 mM, upravený přídatkem příslušné kyseliny nebo hydroxidu na požadované pH. Vysoký podíl organické frakce navíc zvyšuje účinnost ionizace a detekce je ve srovnání se separací na RP citlivější. Snížení limitu detekce (LOD) ještě umocňuje náboj analytu, čím vyšší náboj analyt nese, tím je jeho signál intenzivnější. S výhodou se tedy pH upravuje dvě jednotky pod/nad pKa stanovované složky.

2.5.4.2 Stacionární fáze

S rozšiřujícím se uplatněním HILIC při separaci malých a/nebo polárních molekul roste i trh s nabídkou různých stacionárních fází. Jejich rozdělení a přehled nejběžnějších SF je uveden v **Tabulce 3**.

Typ SF		Příklady funkčních skupin
neutrální		amid, diol, kyano (CN)
nabité	negativně	nemodifikovaný silikagel (SiO ₂), polyaspartová kyselina
	pozitivně	amino (NH ₂), imidazol, triazol
zwitteriontové		fosfocholin, sulfobetain

Tabulka 3: Rozdělení stacionárních fází dle typu [78] a příklady běžně používaných modifikací [83].

Nejčastěji se používají kolony na bázi silikagelu, ať již modifikovaného nebo nemodifikovaného. Ten často bývá zařazen do samostatné skupiny, protože pro kladně nabité analyty funguje jako katex a při rostoucí koncentraci vodné fáze převažují jeho iontoměničové vlastnosti. Dalšími nosičem jsou hybridní materiály, např. BEH (Bridged Ethylene Hydride) a polymerní nosiče, které zvyšují odolnost vůči bazickému pH a teplotě. Roste použití i oxidů kovů, např. TiO₂, ZrO₂, které vykazují vlastnosti Lewisových kyselin a interagují tak s anionty. Tohoto jevu lze využít při separaci organických i anorganických kyselin a také nukleotidů [83, 84].

Uplatnění monolitických kolon při separaci v režimu HILIC není příliš rozšířené, protože velké póry monolitu snižují účinnost separace. Navíc mobilní fáze s vysokým obsahem acetonitrilu má nízkou viskozitu a nezpůsobuje tak vysoký zpětný tlak, jehož potlačení je hlavní předností monolitických kolon. Na druhou stranu je zde potenciál vysoce účinné separace na dlouhých (4 m) kapilárních monolitických kolonách pro komplexní vzorky, např. při proteomické analýze [85].

Při použití nabitých kolon na bázi iontoměničů se dostávají do popředí elektrostatické interakce. Taková separace se nazývá ERLIC (kapalinová chromatografie využívající elektrostatické repulze, z angl. Electrostatic Repulsion Liquid Chromatography) a využívá faktu, že kolona se shodným nábojem jako analyt snižuje jeho retenci, a tak je možné dosáhnout dělení komplexní směsi v isokratickém módu za krátký čas [76].

V posledních letech stoupá obliba “in-house” modifikovaných nosičů, které vykazují jedinečné vlastnosti pro specifické aplikace. Obvykle je ale jejich použití omezeno na vědeckou skupinu, která je vyvinula, a jejich syntéza nebývá rozšířena.

V roce 2004 byla představena technika ultra vysokoúčinné kapalinové chromatografie (UHPLC, z angl. Ultra High Performance Liquid Chromatography), která využívá menší částice (< 2 μm) a tak zvyšuje účinnost a zároveň zkracuje čas výsledné analýzy. O dva roky později byly na trh uvedeny první HILIC kolony s plně porézními částicemi s průměrem < 2 μm (Waters) a následně i povrchně porézní částice < 3 μm. Protože v HILIC separaci je výsledná viskozita MF rozpouštědel výrazně nižší než při RP (acetonitril má při 25 °C 0,369 mPa, zatímco voda 0,89 mPa·s, [80]), nevzniká v systému extrémní zpětný tlak a obecně je HILIC separace v UHPLC snáze realizovatelná. Dnes jsou komerčně dostupné nejběžněji používané fáze v HILIC jako amino, amid, diol, silikagel a sulfobetain.

2.5.4.3 Separace nukleotidů

Nukleotidy, jakožto polární molekuly, představují ideální analyty pro HILIC separaci. Problematické bývá jejich rozpuštění ve vysokoprocenním acetonitrilu, který je potřeba pro souměrné a ostré píky při analýze, a také koeluce stejně fosforylovaných nukleotidů nesoucích jinou nukleobázi, popř. jejich deoxy derivátů.

HILIC kolony, často v UHPLC provedení, našly široké uplatnění v metabolomice jako doplněk k RP separaci. Nejčastěji se používají aminopropylové (kladně nabitě), popř. amidové (neutrální) nebo silikagelové (záporně nabitě) kolony, i když stále roste obliba zwitteriontových fází. Mezi stanovované metabolity patří kromě nukleotidů i aminokyseliny, organické kyseliny a cukry. Např. Bajad *a kol.* srovnali účinnost čtyř kolon v HILIC módu (SiO₂, amid, NH₂, CN) a pěti kolon v reverzní fázi při různých pH na 142 metabolitech, z toho bylo 29 nukleotidů. V této práci nejlépe dopadla NH₂ kolona v bazickém pH, kde přes polovinu metabolitů vykazovalo dobrý tvar píků a pouze 16 % analytů neuspokojivou chromatografií [8]. Byla zde s výhodou použita detekce v pozitivním i negativním módu, kdy látky detekované v ESI+ jsou obvykle brzy elující (tj. nesoucí nejmenší negativní náboj) a díky obecně vyšší citlivosti ESI+ mají i nižší LOD. Bennett *a kol.* převzal tuto metodu a používá pro detekci na NH₂ HILIC koloně ionizaci elektrosprejem v pozitivním módu (ESI+), zatímco detekci v negativním módu je předržena C18 kolona [86]. Pro analýzu 256 metabolitů zvolil Preinerstorfer *a kol.* zwitteriontovou kolonu (Zic-HILIC) v kombinaci s pentafluorfenylovou kolonou (PFP) v reverzní fázi [87].

Při metabolomice díky řádově stovkám analytů během jedné analýzy se využívá MS/MS detekce, aby se zvýšila selektivita i citlivost analýzy. Štěpením vybraných mateřských iontů a detekcí pouze jejich dceřiných iontů se výrazně snižuje šum, proto roste citlivost a tím LOD, ačkoli absolutní množství iontů dopadajících na detektor je nižší než při použití jednoduchého MS módu.

Tyto metody jsou obvykle velmi přesné a citlivé, ale vyžadují sofistikované instrumentální vybavení, školený personál a obvykle využívají drahých isotopicky značených vnitřních standardů. Také vývoj akviziční a vyhodnocovací metody, optimalizace fragmentačních přechodů, udržování konstantního signálu a v neposlední řadě vyhodnocování je často časově náročné.

Tandemové hmotnostní detekce, ať již na trojitém kvadrupólu (QqQ), kvadrupólu spojeném s analyzátozem doby letu (qTOF) nebo v iontové pasti (IT, z angl. Ion Trap) využívají i práce zabývající se pouze identifikací a kvantifikací několika nukleotidů. Vzorky jsou často komplexní matrice, biologické vzorky nebo je vyžadováno velmi nízkých LOD, jako např. v potravinářských vzorcích pro dětskou výživu [71, 88].

Ačkoli rozdělení analytů na kolonách v HILIC módu představuje dokonalý vstup pro hmotnostní detekci, práce, které se zabývají pouze identifikací a kvantifikací nukleotidů, využívají převážně pouze UV detekce. Autoři s výhodou používají netěkavé pufrů, např. fosfátové [44] nebo vysokou koncentraci těkavých pufrů [39, 89, 90]. Kvůli kompatibilitě mobilních fází jsou tak někdy nuceni upřednostnit methanol jako slabší eluent před acetonitrilem [91]. Větší variabilita ve volbě pufrů umožňuje testovat i širší spektrum modifikací SF, např. triazolem [91] nebo cyklofruktanem vázaným na polymerní nosič [90]. Nevýhodou takových metod je nutnost separace analytů na základní linii, vyšší LOD, stanovení nižšího množství analytů a vyžadují nepřítomnost absorbujících koelujících matričních prvků.

Na druhou stranu UV detekce poskytuje výbornou opakovatelnost a linearitu a nevyžaduje přítomnost vnitřního standardu pro kvantifikaci. Pro bakteriální extrakty, kde se koncentrace stanovovaných prvků liší i o několik řádů a kde je vysoké riziko přítomnosti koeluujících látek, se pouze UV detekce používá velmi zřídka, např. Johnsen *a kol.* analyzovali isokraticky extrakt z *E. coli* pomocí dvou Zic-PHILIC kolon v sérii během 70 min a stanovili tak pouze 8 nukleotidů [39].

Metody vyvinuté pouze nebo převážně pro analýzu nukleotidů v HILIC módu využívajících detekci a kvantifikaci pomocí jednoduché hmotnostní spektrometrie, ať již pomocí kvadrupólu nebo analyzátoru doby letu (TOF, z angl. Time Of Flight), jsou velmi vzácné [92, 93] a žádná z nich se nezabývá bakteriálními extrakty. Metody využívají buď externí kalibrace bez přídavku vnitřního standardu [92] nebo kvantifikují na základě UV signálu a MS používají pouze pro potvrzení analytu [93].

2.5.5 Validace

Validace metody je proces, při kterém se určuje vhodnost dané analytické metody pro získání výsledků požadované kvality.

Při validaci se běžně stanovují následující charakteristiky:

(i) přesnost (pravdivost, preciznost), (ii) selektivita (specifičnost), (iii) linearita a pracovní rozsah, (iv) limit detekce a limit kvantifikace (LOQ, z angl. Limit Of Quantification), (v) robustnost [94]. Dále se do validace zahrnují také (vi) matriční efekty, (vii) opakovatelnost a reprodukovatelnost, (viii) výtěžnost a (ix) citlivost. Do validačního protokolu patří i stanovení nejistoty a chyby měření. Níže budou rozebrány běžné validační parametry.

(i) Přesnost

Přesnost je v metrologii definována jako těsnost shody mezi naměřenou hodnotou veličiny a pravou hodnotou veličiny [95]. Tato se skládá z pravdivosti a preciznosti. Pravdivost vyjadřuje těsnost shody mezi průměrnou hodnotou získanou z velkého počtu výsledků měření a přijatou referenční hodnotou. Pravdivost není veličina, a tak nemůže být vyjádřena číselně. Může být pouze odhadnuta a udána jako vychýlení měření (tzv. bias), které vyjadřuje systematickou chybu měření. Preciznost udává těsnost shody mezi jednotlivými nezávislými výsledky měření za specifikovaných podmínek. Preciznost je nepřímo úměrná náhodné chybě měření, která se vyjadřuje jako směrodatná odchylka (σ).

Po roce 2013 byla terminologie upravena (**Tabulka 4**). V odborné literatuře mimo oblast metrologie se termíny „přesnost“ (accuracy) a „preciznost“ (precision) často zaměňují.

Před rokem 2013		Po roce 2013	
Česky	Anglicky	Česky	Anglicky
spolehlivost	Reliability	přesnost	accuracy
přesnost	Precision	pravdivost	trueness
správnost	Accuracy	preciznost	precision

Tabulka 4: Česká a anglická terminologie vztahující se k validaci.

(ii) Selektivita

Ve většině kompendiálních dokumentech [96-98] je selektivita definována jako schopnost metody jednoznačně stanovit analyt v přítomnosti ostatních složek, u kterých se předpokládá, že se ve vzorku mohou vyskytovat. Specifičnost je pak chápána jako absolutní selektivita. Stejně jako u přesnosti i zde panuje nejednota v názvosloví a např. ICH (The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use) [99] používá specifičnost ve významu selektivity, což převzala i USP (U.S. Pharmacopeia) [94].

(iii) Linearita a pracovní rozsah

Linearita analytické metody je její schopnost poskytnout výsledky měření, které jsou úměrné koncentraci analytu ve vzorku, a to buď přímo nebo za použití matematické konverze [94]. Obvyklými funkcemi, které se pro popsání vztahu mezi koncentrací analytu ve vzorku a odpovědí přístroje používají, jsou kromě lineární i logaritmická, kvadratická nebo reciproční. Funkce, které popisují odezvu přístroje zároveň popisují i kalibrační křivku [100]. Pracovní rozsah analytické metody představuje interval mezi horní a dolní koncentrací analytu (včetně těchto hladin), u nichž bylo prokázáno, že jsou určeny s vhodnou úrovní nejistoty měření. Za dolní hranici se obvykle považuje mez stanovitelnosti, za horní hranici poslední bod, který výše zmíněnou definici splňuje [94, 95].

Často bývá pojem „linearita“ zaměněn za rozsah, ve kterém je odezva přístroje přímo úměrná koncentraci analytu. K tomu napomáhají i některé dokumenty s matoucí definicí [99]. V praxi je snahou proložit body kalibrační křivky v pracovním rozsahu co nejjednodušší funkcí (lineární či nelineární) tak, aby zpětně vypočítané koncentrace byly co nejpřesnější, tedy poskytovaly co nejmenší chybu měření.

Zda lze při kalibraci použít lineární nebo nelineární regresi rozhoduje jak zvolená analytická metoda, tak povaha analytů a podmínky měření. Např. pro HPLC s UV detekcí je typické prokládání přímkou v širokém pracovním rozsahu, enzymatické metody se vyznačují nelineární odezvou. V případě MS detekce se mohou vyskytnout oba případy v závislosti na analytu, matici, mobilní fázi a způsobu ionizace. Často se při analýze biologických vzorků pomocí LC-MS(/MS) používá kvadratická či lineární log-log regrese [101].

(iv) Limit detekce (LOD), limit kvantifikace (LOQ)

LOD je nejnižší koncentrace vzorku, která může být za daných experimentálních podmínek spolehlivě detekována, nikoli kvantifikována. Limit stanovitelnosti je nejnižší koncentrace analytu ve vzorku, která může být za daných experimentálních podmínek stanovena s přijatelnou pravdivostí a precizností [94].

LOD se v instrumentálních metodách, které umí měřit odezvu pozadí, obvykle stanovuje jako koncentrace, kde je poměr signálu k šumu (S/N) větší než dvě nebo tři [99]. Druhou možností je k signálu slepého vzorku, kde není přítomen analyt, přičíst 3,3 násobek směrodatné odchylky (σ) a pomocí příslušné regresní rovnice vypočítat koncentraci analytu odpovídající LOD [95, 102].

LOQ se dle doporučení ICH [99, 103] může stanovit také na základě S/N, kdy obvykle je akceptovaný poměr 10:1, ale obecně může být jakýkoli mezi 5:1 a 20:1. Nevýhodou tohoto přístupu je použitelnost pouze na přístrojové metody, tedy nelze aplikovat např. na enzymatické eseje, a nereprodukovatelnost na jiných přístrojích, protože měření šumu se liší přístroj od přístroje [101]. LOQ se dá stanovit také pomocí σ , kdy se k signálu slepého vzorku obvykle přičte její pětinásobek (pro bioanalytické metody) nebo desetinásobek [102]. Doporučované stanovení podle EURACHEM je nezávislé na vybavení a spočívá v nalezení nejnižší koncentrace, která je stanovitelná s předem určenou relativní směrodatnou odchylkou (RSD) [97]. Pro bioanalytické metody je obvykle RSD 20 %.

(v) Robustnost

Robustnost analytické metody vyjadřuje její schopnost zůstat netečnou k malým, ale záměrným změnám parametrů této metody. Robustnost poskytuje informaci o spolehlivosti metody při běžném používání [103]. Na potřebnost metody být robustní se odkazuje již od 60. let [104], přesto mnohé analytické směrnice důkaz robustnosti ve validačním postupu nevyžadují [105, 106]. Mezi obvyklou praxí při zavádění nových bioanalytických metod validace robustnosti nepatří kvůli své časové náročnosti. EURACHEM např. vyžaduje stanovení robustnosti pro interně vyvinuté metody, metody převzaté z vědecké literatury a normalizované metody mimo schválený rozsah použití [97].

Zároveň je třeba brát do úvahy i fakt, že při běžném používání metody se často nemění jen jeden faktor, ale více faktorů současně a tyto se mohou navzájem ovlivňovat (např. změna koncentrace pufru a změna pH), a to synergicky i antagonisticky [101]. Ideální přístup je využít počítačového návrhu experimentů (DoE, z angl. Design of Experiment) a proměřit vybrané faktory [97, 107].

(vi) Matriční efekty (ME)

ME jsou definovány jako vliv jiných než stanovovaných sloučenin přítomných ve vzorku, neboli matrice, na kvantifikaci analytu(/ů) [108]. ME se týkají zejména hmotnostní spektrometrie, a to zvláště hybridní technologie LC-MS(/MS) [101]. Při spojení GC-MS se zdaleka neuplatňují v takové míře [109]. ME způsobují potlačení nebo naopak zesílení signálu, popř. driftování základní linie [108]. Na intenzitu ME má vliv způsob přípravy vzorku a míra jeho přečištění včetně chromatografie [108, 110], koncentrace analytu i matrice [111], komplexnost matrice a její povaha, průtok mobilní fáze a v neposlední řadě i způsob ionizace a konstrukce iontového zdroje [112]. Vzhledem k tomu, že ME vznikají majoritně během ionizace, při které se dle jejího způsobu uplatňuje jiný mechanismus, také intenzita ME bude odlišná. Obecně se ME uplatňují nejvíce při ESI, protože složky matrice ovlivňují tvorbu nabitých kapek a jejich následnou desolvataci, zatímco při APCI se ionty analytu tvoří až v plynné fázi [101]. Také volba ionizačního módu ovlivňuje vliv ME. Ve většině případů se ME silněji uplatňují při pozitivní ionizaci už jen proto, že v ESI+ ionizuje více molekul, ať již žádoucích či nežádoucích. I když ME lze číselně vyjádřit pomocí matričního faktoru (MFa) jako:

$$MFa = A_M / A_s \quad (5)$$

kde A_M je plocha píku standardu určité koncentrace přidaného do matrice a A_s je plocha píku standardu stejné koncentrace v čistém rozpouštědle. Také se udává i normalizovaný MFa na vnitřní standard, jako poměr MFa analytu k MFa vnitřního standardu. ME jsou pak procentuálním vyjádřením MFa. Tedy:

$$ME = MFa \cdot 100 \% \quad (6)$$

Je-li $ME = 100 \%$, žádné ME nejsou pozorovány, je-li $ME < 100 \%$, způsobují ME potlačení signálu, naopak při $ME > 100 \%$ způsobují složky matrice zesílení signálu.

EMA vyžaduje stanovení MF při použití MS detekce z nejméně šesti opakování, kdy RSD by blízko LOQ a hornímu hranici pracovního rozsahu neměla být $> 15 \%$ [113].

(vii) Opakovatelnost a reprodukovatelnost

Opakovatelnost je mírou preciznosti, která ukazuje na velikost náhodné chyby měření. Opakovatelnost porovnává výsledky měření definovaného vzorku za nejlepších možných podmínek, tedy v jedné laboratoři, jedním analytikem, na stejném přístroji, během krátkého časového období. Používá se jako odhad variability výsledků uvnitř série.

Reprodukovatelnost je také mírou preciznosti, ovšem vztahuje se na měření uskutečněné na stejném materiálu různými analytiki pracujícími na různých místech obvykle stejným měřicím postupem. Mezi těmito pojmy leží mezilehlá preciznost, při které se stanovuje míra variability mezi sériemi, tedy stejný materiál se analyzuje stejnou metodou na stejném místě, ovšem různými pracovníky a za použití různého vybavení [95].

(viii) Výtěžnost

Výtěžnost vyjadřuje míru pravdivosti, tedy shody průměrné naměřené hodnoty s pravou hodnotou a odráží tak velikost systematické chyby. Výtěžnost je vlastností analytické metody, nikoli výsledků, které tato metoda poskytuje [100]. Číselně se vyjadřuje jako:

$$\text{Výtěžnost (\%)} = 100 \times \bar{x}_i / \mu_T = 100 - \text{relativní odchylka (\%)} \quad (7)$$

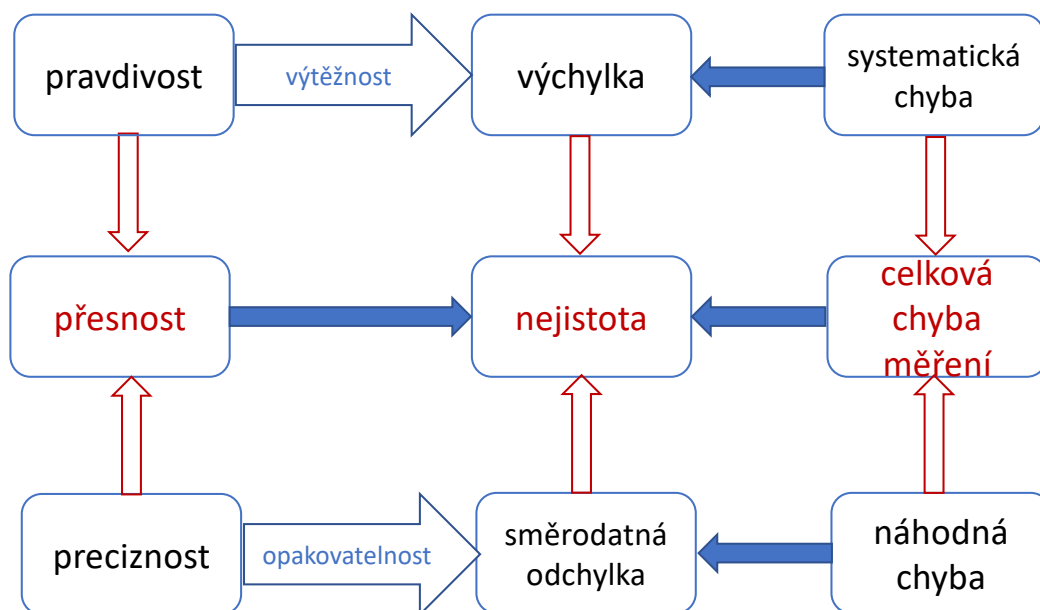
kde \bar{x}_i je průměrná hodnota stanovované veličiny (např. koncentrace) z velkého počtu měření a μ_T je pravá hodnota této veličiny [114].

Ne všechny validační směrnice mají pojem „výtěžnost“ zavedený. Např. EMA [113] stále používá termín „správnost“ (accuracy) místo „pravdivost“ (trueness) a výtěžnost ani výchylku vůbec nezmiňuje, i když doporučuje stejný výpočet jako ISO dokument.

Vztahy mezi jednotlivými vlastnostmi metody a jejich kvantitativní vyjádření jsou znázorněny na **Obrázku 4**.

(ix) Citlivost

Citlivost je změna odezvy přístroje, která odpovídá změně měřené veličiny, např. koncentraci analytu [97]. Často se vyjadřuje jako směrnice kalibrační křivky [115]. Citlivost bývá dávána do souvislosti s LOD, ovšem toto použití je nedoporučováno [116]. Citlivost není považována za důležitou charakteristiku analytické metody [97].

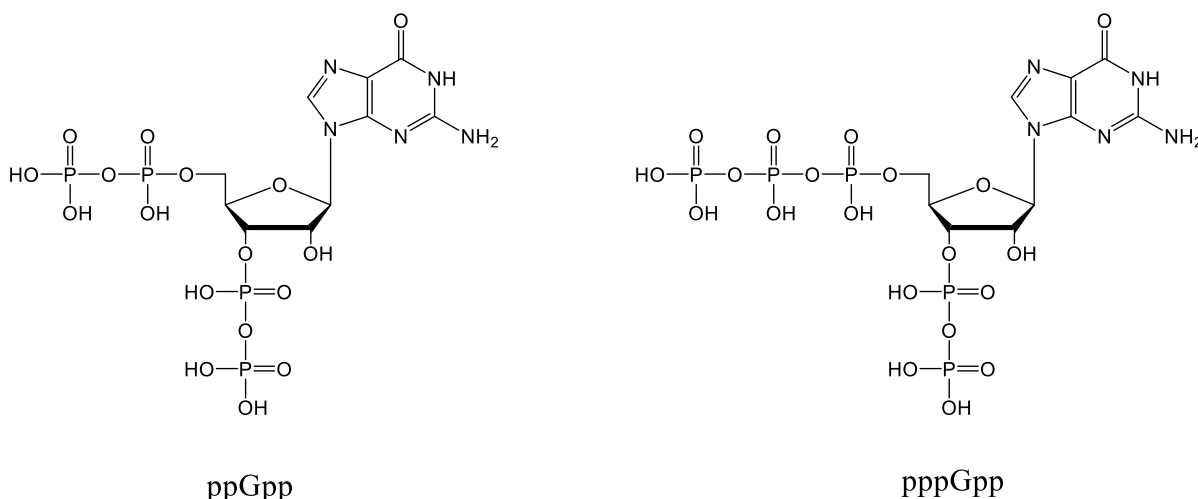


Obrázek 4: Charakteristiky metody, chyby měření a jejich kvantitativní vyjádření. Upraveno podle [117].

2.6 Stringentní odpověď

Nukleotidy jsou součástí signálních drah v buňce. Často se jedná o nestandardní molekuly, které se tvoří v návaznosti na environmentální vlivy. Sledování těchto molekul a jejich koncentrace umožňuje rozpoznat vliv změn prostředí na prokaryotické či eukaryotické buňky. Jedním z obranných mechanismů je také stringentní odpověď (SR, z angl. Stringent Response).

SR je obecně reakce bakteriálních buněk a rostlinných chloroplastů na stresové podmínky, která zajišťuje jejich přežití zpomalením či zastavením růstu. Stresory může být hladovění, ať již nedostatek aminokyselin, mastných kyselin nebo železa, teplotní šok, přítomnost antibiotik, aj. nestandardní podmínky [118]. Tato odpověď je zprostředkována alarmonovými molekulami – guanosin tetrafosfátem (ppGpp) a guanosin pentafosfátem (pppGpp), souhrnně označovány (p)ppGpp (**Obrázek 5.**) Jako alarmony, nebo také druzí posli, jsou označovány nízkomolekulární signální molekuly, které regulují genovou expresi na úrovni transkripce při nevhodných podmínkách prostředí.



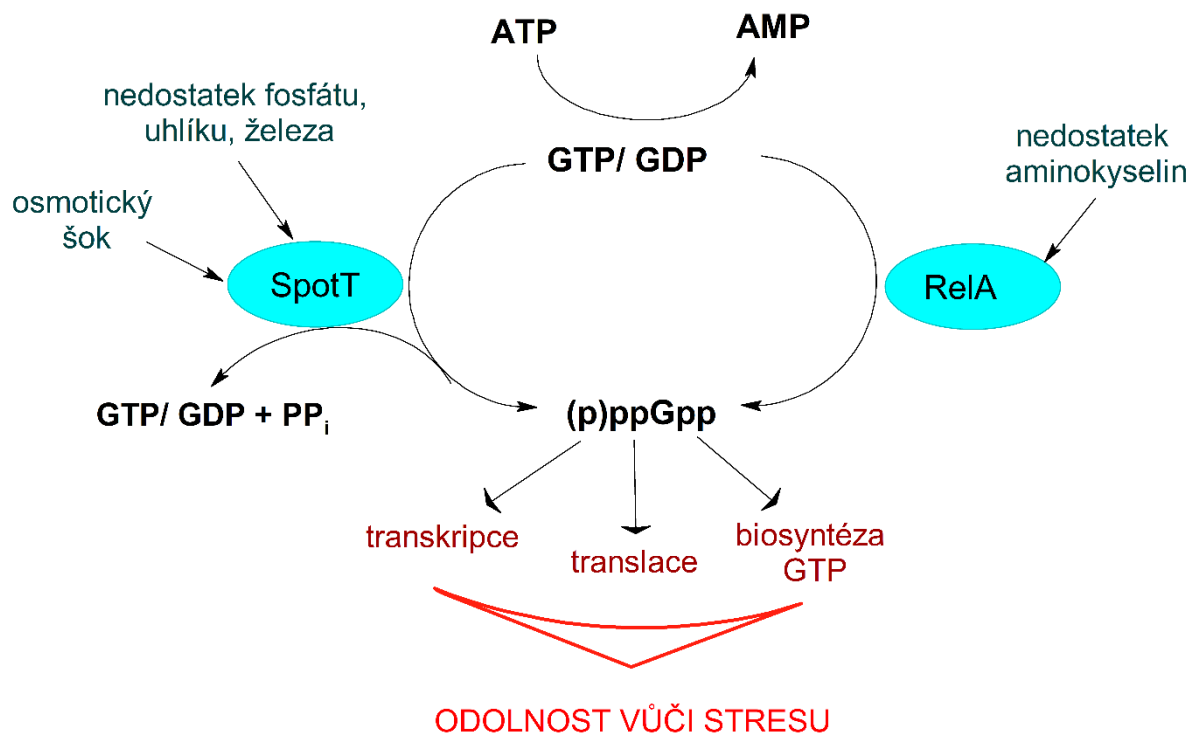
Obrázek 5: Nejběžnější alarmony stringentní odpovědi v bakteriálních buňkách.

V roce 1969 M. Cashel popsal dvě neobvyklé molekuly, které se podílejí na zpomalení biosyntézy RNA při nedostatku aminokyselin u *E. Coli* [35]. Tyto dvě tečky na TLC destičce nazval “Magic Spot I” (MS I) a “Magic Spot II” (MS II). O rok později MS I charakterizoval a správně přiřadil ke struktuře ppGpp [119]. Během následujících desetiletí byl popsán mechanismus působení (p)ppGpp v různých mikroorganismech a některé další alarmonové molekuly, které se na stringentní odpovědi také podílejí, jako např. GMP 3'-difosfát (pGpp) [118].

Metabolismus (p)ppGpp je řízen homology enzymů RelA a SpoT, které se souhrnně nazývají RSH. Tyto zprostředkovávají přenos pyrofosfátu z ATP na GTP nebo guanosin difosfát (GDP), za vzniku pppGpp a ppGpp, a zároveň i jejich hydrolýzu zpět na GTP nebo GDP. Rovnováha mezi hydrolytickou a syntetickou aktivitou RSH enzymů je kritická a mění se podle podmínek prostředí – u *E. Coli* se zvýšená aktivita syntetázy projevuje rostoucí koncentrací (p)ppGpp a následnou stimulací stringentní odpovědi, naopak vyšší aktivita hydrolázy snižuje koncentraci (p)ppGpp a tím schopnost buňky reagovat na nedostatek živin [120] (**Obrázek 6**).

Skupinu RSH enzymů lze rozdělit na vícedoménové a enzymy s jednou doménou. U *E. Coli* řídí SR dva dlouhé vícedoménové enzymy – monofunkční syntetáza RelA, která indukuje SR při nedostatku aminokyselin, a její bifunkční homolog syntetáza a hydroláza SpoT, která je zodpovědná za SR u většiny ostatních podmínek, jiných než nedostatek aminokyselin. U mnohých gramnegativních proteobakterií je SR řízena obdobně, jen RelA-SpoT bývá nahrazen jedním vícedoménovým Rel, který nese označení podle druhu bakterie, např. Rel_{Mtb} u *Mycobacterium tuberculosis* [121]. Jiný způsob regulace je patrný u některých grampozitivních bakterií, např. *Bacillus subtilis*, kde je SR také zprostředkována jedním vícedoménovým Rel, a jedním či více malými jednodoménovými enzymy, nazývanými SAS (z angl. Small Alarmone Synthetase) a SAH (z angl. Small Alarmone Hydrolase) [118].

Každý z alarmonů ze skupiny (p)(p)ppGpp indukuje SR jinou měrou. Např. *E. coli* hromadí ppGpp násobně více než pppGpp během nedostatku aminokyselin [122]. Kromě vyšší koncentrace ppGpp než pppGpp je tetrafosfát účinnějším efektoem při SR [123]. Je tedy velkou výhodou dokázat kvantifikovat jednotlivé analogy (p)(p)ppGpp v jedné metodě.



Obrázek 6: Příčiny a následky stringentní odpovědi. Při nedostatku živin nebo osmotickém šoku jsou aktivovány enzymy RelA/ SpotT, které vedou k syntéze (p)ppGpp z GTP nebo GDP a ATP. Vzniklé efekторы (p)ppGpp ovlivňují transkripci a inhibují translaci a syntézu GTP po dobu trvání stresu. Upraveno podle [124].

3 VÝSLEDKY A DISKUSE

Níže uvedené výsledky shrnují práci, která vedla k **Publikaci 1** a byla použita při tvorbě **Publikace 2**. Jsou zde uvedeny nepublikované výsledky a důkladné porovnání jednotlivých kroků při vývoji metody včetně skrytých úskalí, na které může analytik narazit.

3.1 Vývoj separační metody

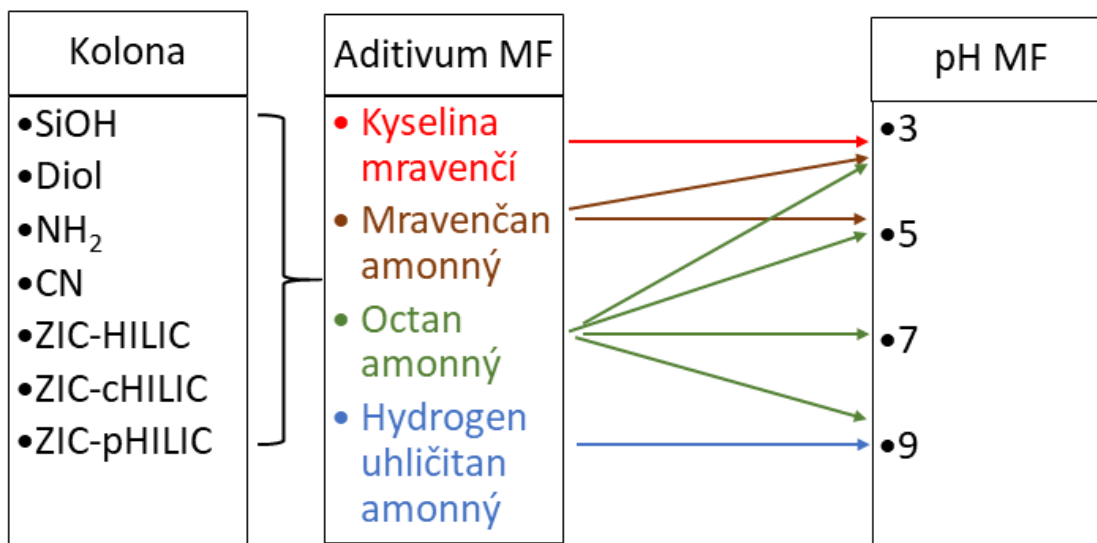
Předpokladem při vývoji chromatografické metody bylo použití techniky HILIC. HILIC, jak bylo uvedeno v 2.5.4, je velmi vhodná pro separaci polárních látek a ideální pro spojení s MS detekcí. Obvykle nevyžaduje přítomnost vysoké koncentrace aditiv v MF, které by způsobovaly iontovou supresi. Zároveň nízký obsah vodné složky způsobuje nižší povrchové napětí nabitých kapek, vznikajících během ionizace, a tím i stabilnější signál [125].

Díky kvantifikaci pomocí hmotnostní spektrometrie bylo potřeba rozdělit na základní linii pouze analyty se stejnou nominální hmotností, jako např. ATP a dGTP (deoxyguanosin trifosfát) (hmotnosti stanovovaných nukleosidů jsou uvedeny v **Příloze 1**) a ty, které nesou stejnou nukleobázi, neboť během ionizace, především v negativním módu, dochází částečně k odštěpení fosfátu. V komplexní matici by tak mohl být nadhodnocený signál méně fosforylovaného nukleotidu.

3.1.1 Stacionární fáze (SF)

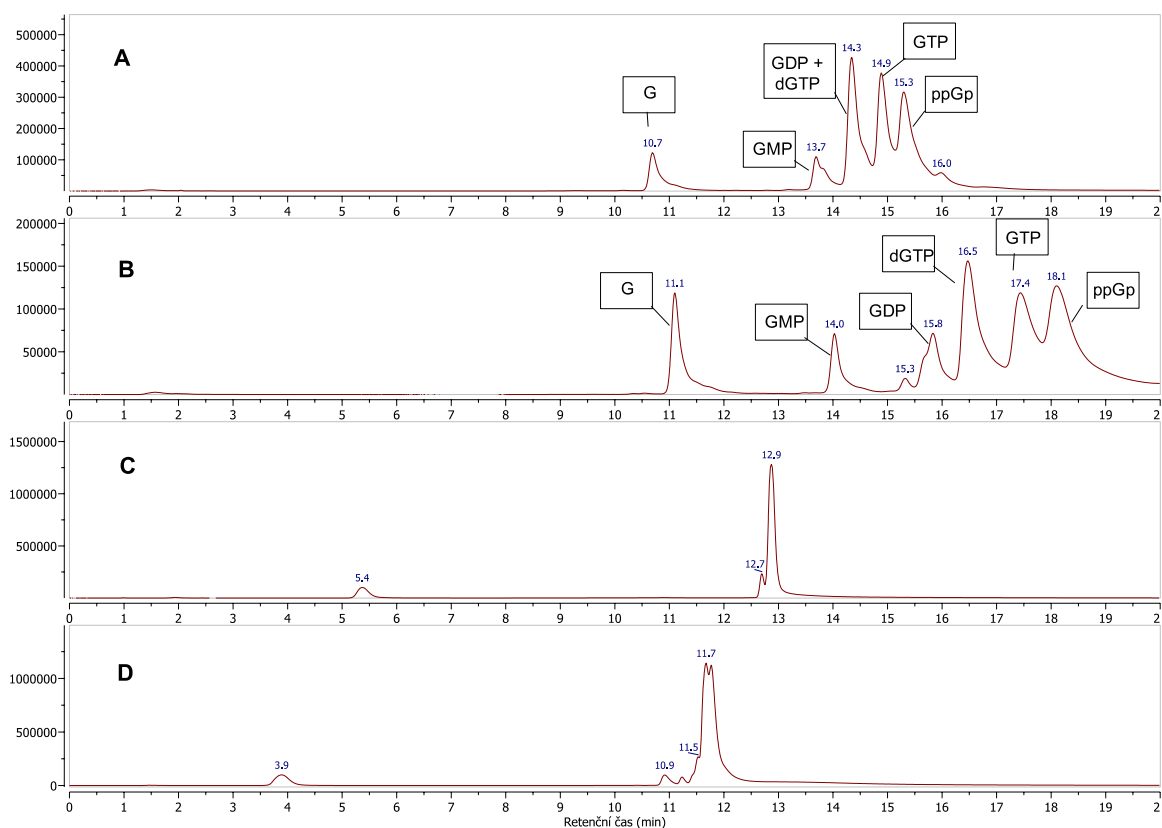
Prvním krokem byl výběr vhodné komerčně dostupné kolony, která by umožňovala rozdělit analyty s širokým spektrem distribučních koeficientů ($\log D$, **Příloha 1**), a tedy i odlišným chromatografickým chováním. Vyzkoušeli jsme osm různých stacionárních fází v HILIC módu, a to (A) sedm HPLC kolon a (B) dvě běžně používané UHPLC kolony pro porovnání účinnosti. SF (A) jsou dvě typicky používané pro HILIC separaci, a to (i) čistý SiOH (Phenomenex) a (ii) příčně propojený diol (Phenomenex); dvě používané v HILIC i RP módu, a to (iii) CN (Phenomenex) a (iv) monolitická NH_2 kolona (Merck) a tři zwitteriontové fáze, (v) ZIC-HILIC (ZH, Merck), s funkční skupinou navázanou na silikagelový nebo polymerní nosič (ZIC-pHILC, ZpH) a (vi) ZIC-cHILIC (ZcH, Merck). S rozšířením techniky UHPLC, zvláště pro rychlé nebo komplexní analýzy, se mezi oblíbené UHPLC HILIC kolony (B) dostaly BEH-HILIC (Waters) a BEH-Amide (Waters), které jsou díky použití hybridních částic stabilní v rozmezí pH 1-12. Vzhledem k tomu, že vyvíjená metoda má mít co nejuniverzálnější použití, vývoj byl realizován na HPLC kolonách za použití HPLC systému ve spojení s jednoduchým kvadrupólem. Na UHPLC kolonách za použití UHPLC systému byly pouze otestovány již optimalizované parametry nebo publikované metody.

Sedm HPLC kolon (A) bylo testováno za různých podmínek (**Obrázek 7**) na směsi nukleotidů a nukleosidů, aby se vybrala taková, která bude nejlépe vyhovovat většině analytů se zaměřením na nukleotidy, a to především fosfáty guanosinu kvůli monitoringu SR.



Obrázek 7: Testované kombinace mobilních fází (pufr, pH) na sedmi HPLC kolonách. pH 9 bylo testováno pouze na polymerní ZIC-pHILIC koloně.

Některé kolony ani uspokojivě polární analyty nezadržely (CN), jiné nevykazovaly dostatečnou separační účinnost (SiOH, diol). Zwitteriontové kolony poskytovaly pro nukleotidy přijatelnou retenci, navíc dokázaly od sebe rozdělit různá analoga guanosin fosfátů se stejnou nominální hmotností (**Obrázek 8**). Díky lepší separační účinnosti ZpH kolony pro pH 5 byla optimalizace gradientu realizována při tomto pH, zároveň odpadla potřeba použití polymerního nosiče a kolona ZpH mohla být nahrazena kolonou ZH.

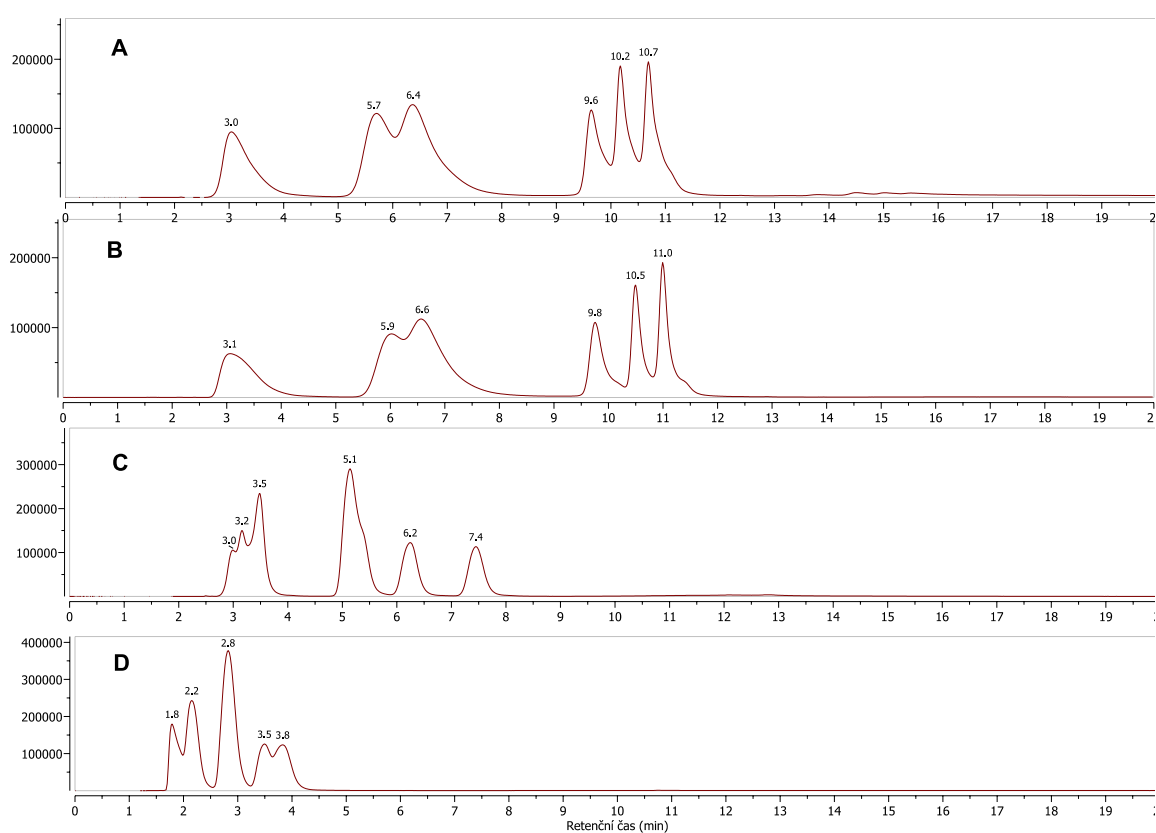


Obrázek 8: Dělení guanosinu a guanosin-fosfátů na kolonách (A) ZIC-pHILIC, 100 x 4.6 mm, 5 μ m, pH 9; ZIC-pHILIC, 100 x 4.6 mm, 5 μ m, pH 5; (C) SiOH, 100 x 4.6 mm, 3 μ m, pH 5; (D) diol, 100 x 4.6 mm, 5 μ m, pH 5. Gradient 80 % B – 100 % B za 8 min, výdrž do 18 min. A = acetonitril, B = 50% acetonitril + 20 mM octan amonný.

Díky přítomnosti stálého obojetného náboje, který je vyvážen 1:1, je v závislosti na pH ovlivněn pouze náboj analytu. Z **Tabulky 5** je patrné, že náboj nukleosidů a nukleobází se se změnou pH MF téměř nemění, a tedy i chromatografické chování bude beze změn [**Obrázek 9, A), B)**], zatímco nukleotidy s rostoucím pH na ZpH koloně snižují retenci (**Obrázek 8**), neboť nesou vyšší záporný náboj. Jak bylo uvedeno v kapitole 2.5.4, mechanismus separace v HILIC módu je komplexní, a kromě dělení mezi imobilizovanou vodnou vrstvou se uplatňují i jiné síly. V případě záporně nabitého povrchu ZH/ZpH kolon při separaci záporně nabitých nukleotidů se jedná o elektrostatické repulze, které s rostoucím nábojem analytu sílí.

Sloučenina	pK _a
Adenin	10.29
Adenosin	12.45
Adenosin monofosfát	1.23
Adenosin difosfát	1.77
Adenosin trifosfát	0.9

Tabulka 5: pK_a vybrané nukleobáze, nukleosidu a nukleotidů. Hodnoty jsou uvedené pro nejsilnější kyselinu, tedy strukturu nesoucí nejmenší záporný náboj (vypočítáno v MarvinSketch).



Obrázek 9: Dělení nukleosidů na kolonách (A) ZIC-pHILIC, 100 x 4.6 mm, 5 μm, pH 9; (B) ZIC-pHILIC, 100 x 4.6 mm, 5 μm, pH 5; (C) SiOH, 100 x 4.6 mm, 3 μm, pH 5; (D) diol, 100 x 4.6 mm, 5 μm, pH 5. Pořadí eluce: Thymidin, Adenosin, Uridin, Inosin, Cytidin, Guanosin. Gradient 80 % B – 100 % B za 8 min, výdrž do 18 min. A = acetonitril, B = 50% acetonitril + 20 mM octan amonný.

Ačkoli u některých nukleosidů zwitteriontová kolona vykazovala široké a chvostující píky (viz. **Obrázek 9**), stanovení jejich intracelulárních koncentrací je marginální, neboť jsou zastoupeny v koncentracích o 2-4 řády nižších než nukleotidy.

Z testovaných UHPLC kolon se neosvědčila ani jedna. Lepšího rozdělení bylo dosaženo na amidové koloně v bazickém pH než na nemodifikované BEH HILIC koloně při pH 5. BEH-amid

při pH 9 poskytuje sice ostré píky pro většinu nukleotidů, ale mnohé z nich koeluuují, mj. i pro nás klíčový GTP, ppGpp a pppGpp.

Pro účely analýzy nukleotidového fondu byly zvoleny zwitteriontové kolony ZH a ZcH. Polymerní ZpH fáze nepřinášela žádný benefit, protože vysoké pH MF snižovalo separační účinnost i přes lepší tvar píků. Navíc neznámé složení polymerního nosič s sebou neslo riziko nečekaného chování v komplexních vzorcích, které může být ovlivněno interakcemi mezi maticí a povrchem polymeru. Díky odlišnému uspořádání stálého dipólu se separační schopnosti ZH a ZcH mírně liší. Hlavní výhodou ZcH je její schopnost oddělit od sebe ppGpp a pppGpp, čímž se výrazně usnadní jejich kvantifikace. Na druhou stranu se částečně překrývají píky NAD a AMP. Zároveň analyty s adeninovou bází snadno zdvojují píky v závislosti na podmínkách (složení nástřiku, MF). Proto úpravy dalších parametrů byly vyvíjeny na každé koloně odděleně, a to nejen v závislosti na přítomné SF, ale v závislosti na rozměru kolony a použitém separačním systému (HPLC/UHPLC).

3.1.2 Mobilní fáze

Další vývoj spočíval v optimalizování složení, průtoku a gradientu mobilní fáze. Z prvního screeningu vyplynulo, že přídavek octanu amonného (NH_4Ac) a slabě kyselé prostředí má příznivý vliv na tvar píku. Pro ZH kolony se jevílo jako nejvhodnější pH 5 a nízká koncentrace NH_4Ac (10 mM). Amonné ionty částečně obsazují záporně nabitý povrch SF, a tak snižují elektrostatickou repulzi, tedy zvyšují retenci [126]. Při použití stejných podmínek na ZcH kolonu ovšem docházelo ke zdvojení píků NAD a AMP, i některé jiné monofosfáty ukazyvaly „shoulder“. Tento jev se podařilo odstranit zvýšením koncentrace NH_4Ac na 25 mM. Vyšší koncentrace pufru s sebou nese riziko potlačení MS signálu [73], na druhou stranu ostré píky umožňují současný přísun většího množství analytu na detektor a tedy zvýšení LOD.

Na ZcH koloně bylo dobré využít výhody separace ppGpp a pppGpp. pppGpp obecně špatně ionizuje a při ionizaci dochází ke ztrátě jednoho, dvou i tří fosfátů, především v negativním módu (více v kapitole 3.2.1). Aby se podpořila ionizace, je dobré zvýšit celkový záporný náboj na molekule. Toho lze dosáhnout zvýšením pH prostředí. Jako kompromis mezi kvalitou chromatografie a intenzitou detekce bylo zvoleno pH 7.

Průtok MF byl vždy optimalizován s ohledem na použitý analytický systém a rozměry kolony. Pro ZH kolony vyšší průtok do určité míry zlepšuje tvar píku i rozlišení, ZcH fáze naopak lepší separační účinnost vykazuje při nižších průtocích. Např. pro kolonu s rozměrem 150 x 2.1 mm byl použitý průtok 300 $\mu\text{l}/\text{min}$ pro kolonu ZH a 150 $\mu\text{l}/\text{min}$ pro kolonu ZcH.

Je třeba brát v potaz i použitý analytický systém, jeho mimokolonové příspěvky a detekční koncovku. V HPLC systému jsou mimokolonové příspěvky řádově vyšší než v UHPLC, je tedy vhodnější použít vyšší průtok, aby se potlačil jejich vliv. Kvalitu MS detekce a stabilitu signálu také ovlivňuje průtok. Obecně je APCI ionizace méně citlivá na vyšší průtoky a poskytuje stabilní signál i při průtoku 1 ml/min, protože k ionizaci analytů dochází až po převedení do plynné fáze [101]. Ionizace pomocí elektrospreje, která je pro malé polární molekuly vhodnější, naopak vyžaduje nižší průtoky. Proto se do HPLC systémů zavádí „splitter“, ať již pasivní či aktivní, který podle použitého průtoku pouští do hmotnostního detektoru jen malou část mobilní fáze s analyty. V případě komerčních UHPLC systémů bývá hmotnostní detektor zařazen sériově přímo za kolonu, popř. za nedestruktivní detektor, a tedy není vhodné operovat s průtoky $>500 \mu\text{l}/\text{min}$. V **Tabulce 6** jsou vedeny všechny použité kombinace rozměru kolony a průtoku.

Stacionární fáze	Rozměr (mm)	Průtok (μl/min)	Systém
ZIC-HILIC	150 x 4,6	500	HPLC/UHPLC
ZIC-HILIC	150 x 2,1	300	UHPLC
ZIC-HILIC	250 x 2,1	150	UHPLC
ZIC-pHILIC	150 x 4,6	1000	HPLC
ZIC-cHILIC	100 x 4,6	1000	HPLC
ZIC-cHILIC	150 x 2,1	150	UHPLC

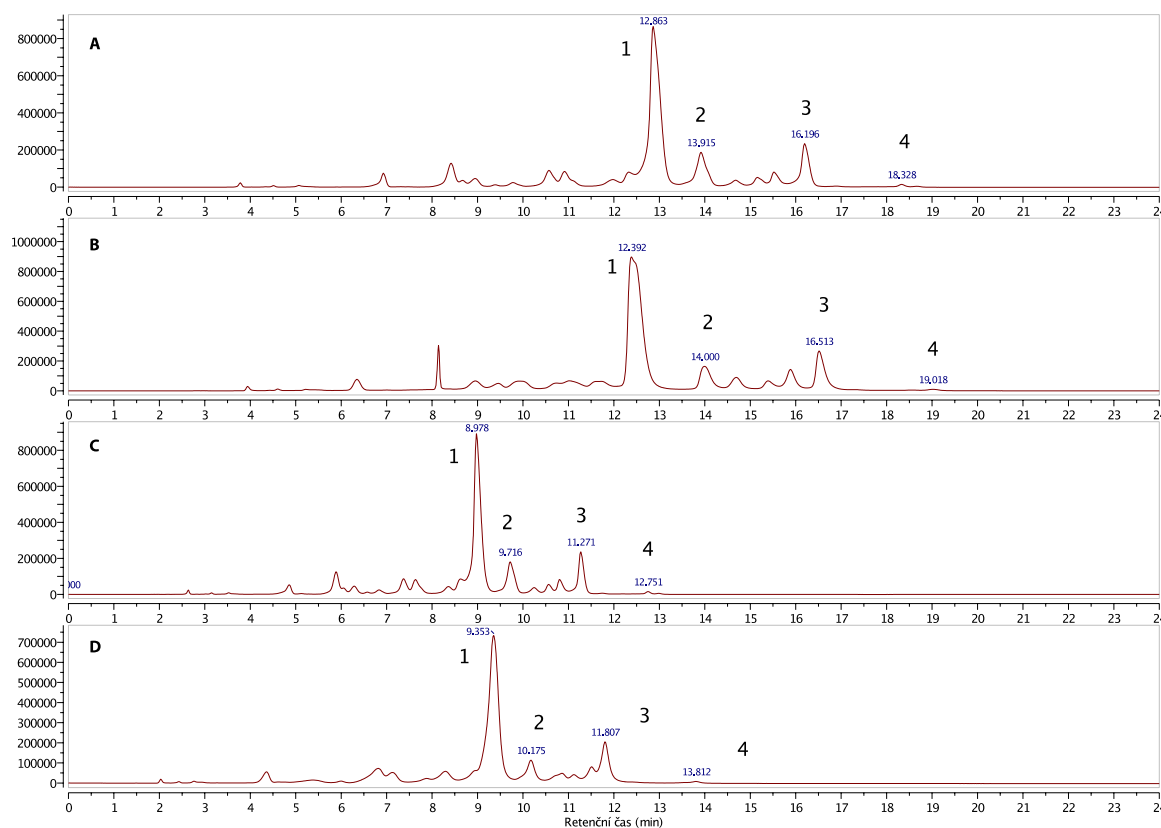
Tabulka 6: Použité kombinace SF, rozměru kolony, průtoku a testovaného systému.

Podmínky gradientu se lišily pro obě kolony díky odlišně koncentrovanému pufru. Octan amonný je v acetonitrilu nerozpustný a dochází k jeho vysrážení. Namíchání zásobního vysoce koncentrovaného pufru (např. 100 mM) vedlo v počátečních fázích gradientu, kdy je v MF vysoká koncentrace acetonitrilu, k postupnému ucpávání nástřikového sedla. Jako nejvhodnější se ukázala varianta upravit 100 mM octan amonný na požadované pH a tímto naředit 100% acetonitril na příslušnou koncentraci octanu amonného v MF. Pro ZH kolony byl jako slabší solvent použitý 90% acetonitril a pro ZcH kolony 75% acetonitril. Vysoké procento vodné složky a pozvolný gradient umožnily dobré rozdělení většiny nukleotidů. Podmínky pro jednotlivé kolony, které byly použity na *in vivo* experimenty a jejich rozměry jsou vedeny v **Tabulce 7**.

Stacionární fáze	Rozměr (mm)	Gradient	Mobilní fáze
ZIC-HILIC	150 x 4,6	80 % B 0. – 2. min, 80-50 % B 2. – 16. min, 50 % B 16. – 20. min	A = 10 mM octan amonný, pH 5; B = 90% acetonitril + 10% 100 mM octan amonný, pH 5
ZIC-HILIC	150 x 2,1	80 % B 0. – 3. min, 80-60 % B 3. – 17. min, 60 % B 17. – 20. min	A = 10 mM octan amonný, pH 5; B = 90% acetonitril + 10% 100 mM octan amonný, pH 5
ZIC-HILIC	250 x 2,1	80 % B 0. – 3. min, 80-60 % B 3. – 25. min	A = 10 mM octan amonný, pH 5; B = 90% acetonitril + 10% 100 mM octan amonný, pH 5
ZIC-cHILIC	150 x 2,1	100 % B 0. – 3. min, 100-70 % B 3. – 20. min, 70 % B 20. - 25. min.	A = 25 mM octan amonný, pH 7; B = 75% acetonitril + 25% 100 mM octan amonný, pH 7

Tabulka 7: Analytické podmínky pro vybrané zwitteriontové kolony, které byly použity pro vývoj metodiky analýzy bakteriálních extraktů.

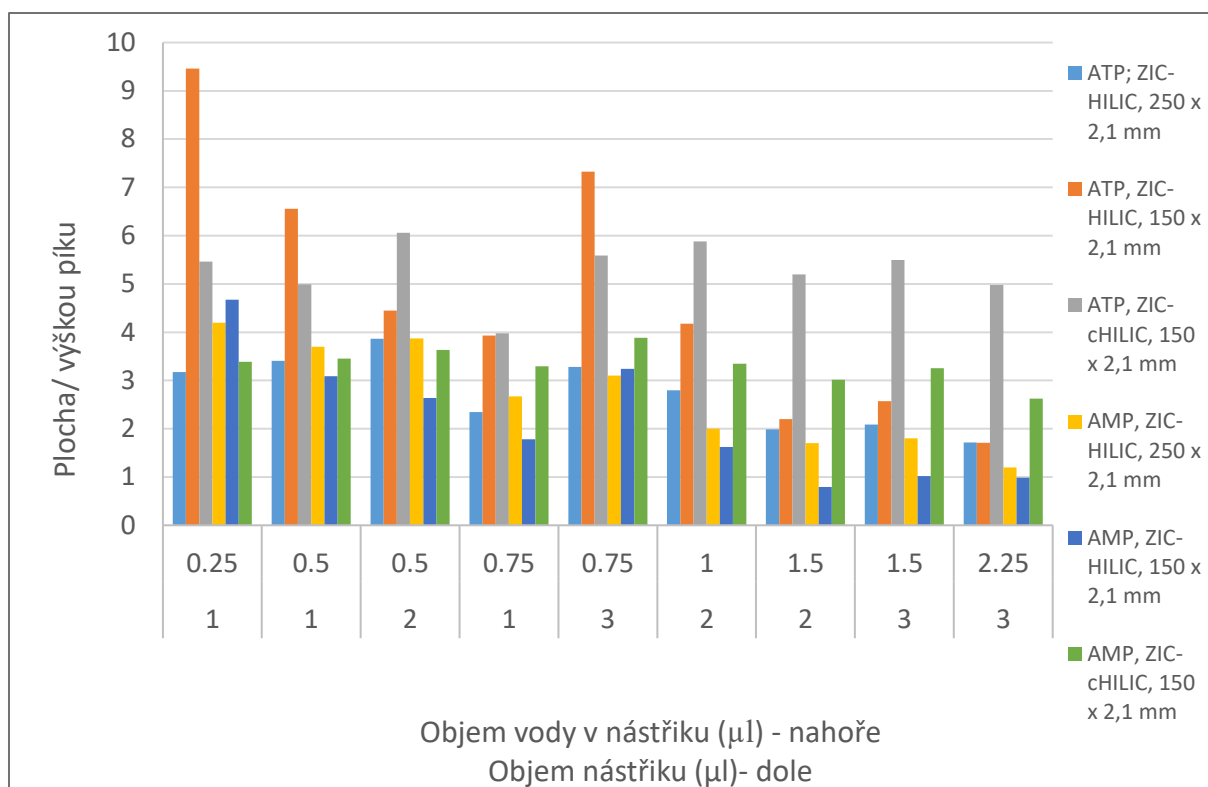
Pro přepočítání gradientu a průtoku z jednoho rozměru kolony na jiný byla otestována i online přístupná chromatografická kalkulačka [127]. Na **Obrázku 10** je patrné, že i když jsou si jednotlivé dvojice chromatogramů podobné [A) a B); C) a D)], nelze jednoduše validovanou metodu přenést na jiný rozměr kolony bez následující confirmace.



Obrázek 10: Analýza připravené směsi nukleotidů *S. typhimurium* (upraveno podle [36]) na různých rozměrech ZIC-HILIC kolon. (A) 250 x 2.1 mm, 3,5 μm ; průtok 0,2 ml/min; nástřik 1 μL . (B) 150 x 4,6 mm, 3.5 μm ; průtok 0.5 ml/min; nástřik 3 μL . (C) 150 x 2,1 mm, 3,5 μm ; průtok 0,2 ml/min; nástřik 1 μL . (D) 150 x 4,6 mm, 3,5 μm ; průtok 0,72 ml/min; nástřik 3 μL . Analyty: 1 = ATP, 2 = UTP, 3 = GTP, 4 = ppGpp.

3.1.3 Nástřik

Vliv složení nástřiku v technice HILIC je diskutován mnohými autory [128-130] a je známý fakt, že ovlivňuje separaci výrazněji než složení nástřiku při chromatografii na reverzních fázích. Nejvhodnější složení nástřiku je takové, které je co nejbližší počátečním chromatografickým podmínkám. Rozpustit velmi polární analyty ve vysokoprocenním aprotickém rozpouštědle je často komplikované, zvláště pro horní body kalibračních křivek. Často bývá opomíjen fakt, že důležitou roli hraje i objem nástřiku, a tedy absolutní množství vody, které se dostane na kolonu, ve vztahu s jejím mrtvým objemem (V_0). Také separační mechanismus, který se uplatňuje, má vliv na kvalitu separace. Jak je patrné z **Obrázku 11**, nejmenší vliv má složení nástřiku na tvar píku na koloně ZcH kvůli relativně vysoké koncentraci soli. Naopak nejvíce je ovlivněna kolona ZH s $V_0 = 296 \mu\text{l}$. Široké, chvostující až zdvojené píky jsou patrné hlavně pro analyty se slabou zádrží, tedy nukleosidy a nukleosidmonofosfáty. Nicméně použití 50% acetonitrilu pro přípravu standardů se jeví jako dostačující a vyšší procento acetonitrilu vedlo spíše k horší opakovatelnosti. Vzhledem k tomu že jedna analýza trvala 30-45 min, proměření kalibrační křivky v triplicátu trvá 12-18 h. Pokud není k dispozici chlazený nástřikový prostor, je třeba brát v úvahu možnost částečného zakonzentrování vzorku, protože relativní evaporační rychlost acetonitrilu je 5,8, zatímco vody jen 0,3 [131].



Obrázek 11: Vliv nástřikového objemu a obsahu vody v nástřiku na kvalitu píku pro méně polární AMP a polárnější ATP na dvou rozměrech kolon (150 x 2,1 mm; $V_0 = 296 \mu\text{l}$ a 250 x 2,1 mm; $V_0 = 436 \mu\text{l}$) a dvou různých stacionárních fázích (ZH a ZcH).

3.2 Vývoj podmínek detekce a kvantifikace

Využití jednoduchého kvadrupólu při detekci a kvantifikaci bylo bezpodmínečným předpokladem této metody a její novelizací oproti předchozím přístupům při kvantifikaci nukleotidového fondu. Pro kontrolu a názornost byl zařazen i DAD detektor, který díky lineární odezvě umožňoval kontrolu nad správnou kalibrací a kvantifikací nekoelujících analytů.

3.2.1 Detekce

Nejprve byla metoda vyvíjena na dvou jednoduchých kvadrupólech, a to Shimadzu LCMS-2020 a Waters 3100, aby byla ověřena její použitelnost za těch nejjednodušších podmínek. Pro biologické experimenty kvůli vyšší přesnosti a nižším LOQ byl zvolen analyzátor qTOF (Acquity qTof, Waters) v módu full scan.

Prvním krokem bylo zvolit vhodný ionizační mód. Ostatní parametry, jako napětí na zdroji, teplota a průtok zmlžujícího plynu, byly optimalizovány podle použitého systému a v závislosti na průtoku. Pokud analyty ionizují v negativním módu, je vhodné ho využít i ke stanovení, zvláště kvůli menším matričním efektům, které se v ESI- neuplatňují v takové míře jako v ESI+ [109]. Na druhou stranu ionizační účinnost je v ESI- i pro negativně nabitě fosfáty nižší a tak dosahuje většina analytů vyšších LOD a LOQ. Oba módy byly porovnány nejen na směsích standardů a profilu kalibrační křivky (viz 3.2.2.), ale také na reálných vzorcích. Zatímco při analýze standardů a kontrolních vzorků (QC) se jevil ESI+ jako vhodnější díky nižším LOQ, na reálných vzorcích se intenzivně projevovала jeho vyšší ionizační účinnost v podobě bohatého spektra a kolísavého signálu silněji ovlivněného ME.

Na druhou stranu v ESI- při ionizaci trifosfátů a polyfosfátů docházelo ke ztrátě jednoho či dvou fosfátů z molekuly, což vedlo k bohatšímu hmotnostnímu spektru a slabšímu signálu mateřského iontu. Tento efekt rostl se zvyšujícím se počtem fosfátů v molekule. Ztráta fosfátů je koncentračně závislá, tedy pomocí kalibrační křivky v definovaném médiu lze určit koncentraci mateřské molekuly bez ohledu na ostatní štěpné produkty. Snížení intenzity mateřského iontu bylo komplikací hlavně pro (p)ppGpp (a jiné alarmony), jejichž přirozená koncentrace v nestresovaných buňkách je velmi nízká. Nabízela se dvě řešení – kvantifikovat jako sumu ppGp + ppGpp (+ pppGpp) v ESI- nebo použít pro tento analyt ESI+, u kterého se odštěpení fosfátu na zdroji uplatňuje v daleko menší míře. Na druhou stranu snáze tvoří adukty s kationty přítomnými v systému, jejichž druh i koncentrace může kolísat v návaznosti na předchozí měření.

Pro detekci nukleotidů v buněčných extraktech se ESI- jeví jako vhodnější díky lepší opakovatelnosti. Na druhou stranu při velmi nízkých koncentracích analytu je náročné udržet záporný náboj během ionizace [132]. Zvýšení napětí na zdroji z 1.2 kV na 2 kV (qTOF) vede k intenzivnějšímu signálu mateřského iontu a u nízkých průtoků (do 300 μ l/min) není ovlivněna stabilita spreje [125].

3.2.2 Kvantifikace

Při využití hmotnostní detekce se kvantifikuje obvykle pomocí MS/ MS na dceřiný ion. I když je absolutní množství dopadajících iontů na detektor menší, díky výraznému snížení pozadí je dosaženo nižší LOQ. Vyžaduje to ale zdlouhavou optimalizaci všech přechodů. Pro experimentální biologické laboratoře tak vysoká přesnost není obvykle potřeba. Stanovení koncentrace pomocí jednoduché MS s sebou nese ale několik rizik: (i) při hraničních koncentracích obvykle vykazuje nelineární chování, (ii) je citlivá k náhodným chybám detektoru a (iii) absolutní signál je závislý na „hmotnostním okně“, ve kterém je analyt stanovován, a tím i na správné kalibraci přístroje.

3.2.2.1 Vnitřní standard (IS) a matriční efekty (ME)

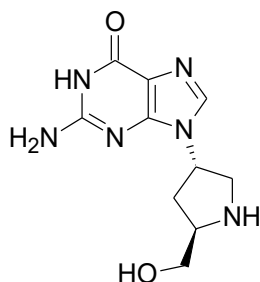
Vnitřní standard (IS) se používá při kvantifikaci pro minimalizování náhodných chyb a matričních efektů, kdy se signál analytu koriguje pomocí signálu IS podle rovnice:

$$R_C = (A_x \times c_{IS}) / A_{IS} \quad (8)$$

kde R_C je korigovaný signál analytu, A_x je plocha píku analytu, A_{IS} je plocha píku vnitřního standardu a c_{IS} je koncentrace vnitřního standardu. Při analýze živých systémů pomocí MS se nejčastěji používají izotopicky značené vnitřní standardy, které kromě značeného prvku mají shodnou molekulu s analytem. Tyto značené standardy se přidávají do extrakčního rozpouštědla nebo do média, a tak poskytují informaci i o extrakční účinnosti. Zároveň by měly kopírovat chromatografické i ionizační chování analytu. Ne pro všechny nukleotidy jsou izotopicky značené standardy dostupné (např. pro analoga guanosinfosfátů) a pro jiné jsou velmi drahé [110]. Navíc v případě vysokých koncentrací analytu, nebo naopak značeného IS, může dojít k potlačení ionizace jedné či druhé složky a výsledky pak nebudou pravdivé.

Byla tedy testována hypotéza, že vhodně zvolený neznačený standard poskytuje velmi podobnou korekci náhodných chyb měření jako značený standard. Protože se práce zaměřuje především na stanovení guaninových nukleotidů, bylo potřeba pro hledaný IS vyhovět následující podmínkám: (i) obsahuje guaninovou bázi, (ii) přirozeně se v bakteriálních buňkách nevyskytuje, (iii) vykazuje podobné ionizační chování jako analyzované nukleotidy a (iv) eluuje mimo oblast s nejvyšším výskytem analytů. Byly srovnány tři syntetizovaná analoga

guaninu, z nichž jeden, **ProG** [133] (**Obrázek 12**), splňoval všechny podmínky. Poskytuje stabilní signál v ESI+ i ESI-, na ZH koloně se eluuje jako poslední a na ZcH koloně jako první. Tím je možné kontrolovat jeho MS odezvu u komplexní matrice i pomocí UV signálu, který neabsorbujícími složkami matrice není ovlivněn.

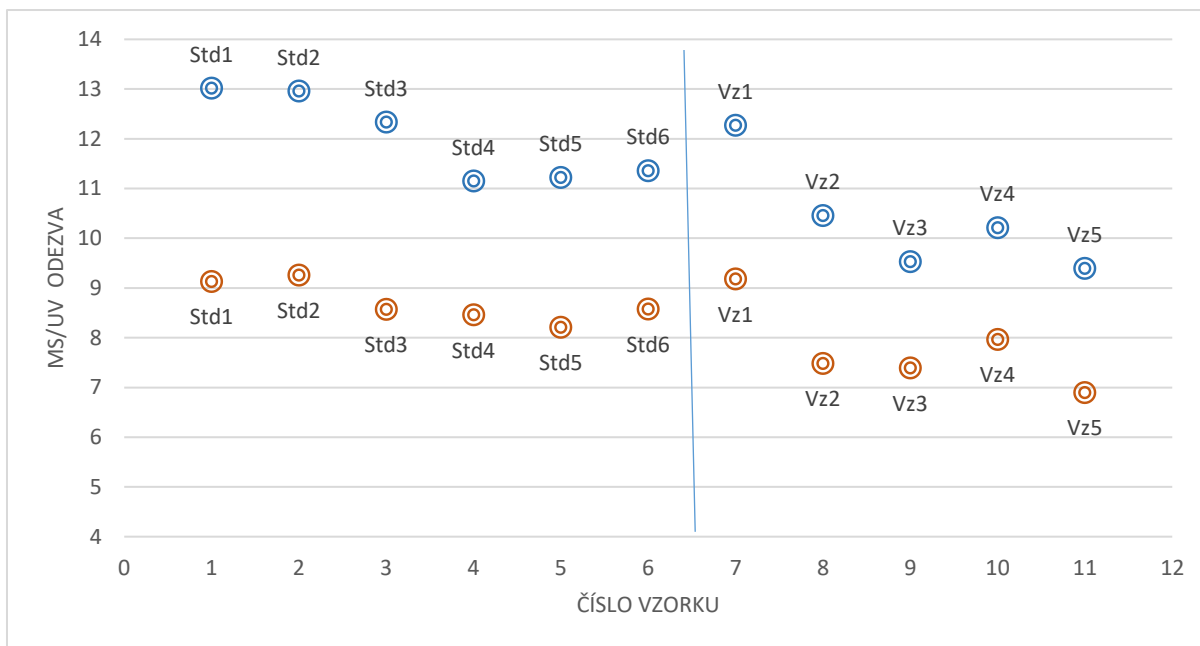


Obrázek 12: Syntetizovaný vnitřní standard ProG pro kvantifikaci nukleotidového fondu.

Pro srovnání byly testovány obě SF, tedy ZH i ZcH a oba ionizační módy, tedy ESI+ i ESI- na rozpouštědlových standardech, extrakčním médiu i reálných vzorcích. Porovnávala se intenzita signálu plně izotopově značeného ATP ($^{13}\text{C}^{10}$ -ATP), který byl přidán do extrakčního média, a ProG, který se přidával do vzorku před analýzou. Mezi jednotlivými kolonami nebyly pozorovány výrazné odchylky, kromě absolutní hodnoty signálu, který je pro ZH kolonu nižší než pro ZcH. V obou ionizačních módech poskytoval ProG stabilní signál v rozpouštědlových standardech i v reálných vzorcích, který korespondoval se signálem $^{13}\text{C}^{10}$ -ATP, a tak je způsobilý korigovat ME v této metodě.

Aby se porovnal schopnost IS negovat změny v signálu způsobené náhodnými vlivy, bylo záměrně náhodně měněno napětí na kapiláře a průtok ionizačního plynu. Koncentrace IS se neměnila, a tak byl UV signál stabilní. Poměr mezi MS a UV signálem driftoval velmi podobně pro ProG jako pro $^{13}\text{C}^{10}$ -ATP (**Obrázek 13**). Z toho plyne, že vhodně zvolený IS může upravit vliv náhodné chyby analytické metody stejně jako izotopově značený standard.

ME se stanovují porovnáním signálu rozpouštědlového standardu se signálem stejného standardu v matrici po extrakci podle rovnic (5 a 6) v kapitole 2.5.5 (vi) Matriční efekty. Jak zde bylo uvedeno, na ME má vliv mnoho faktorů, z nichž jedním z velmi podstatných je chromatografická separace předcházející ionizačnímu procesu. Díky extrakci relativně slabou 1 M kyselinou octovou není v extraktu přítomno velké množství matričních složek, které by eluovaly na zwitteriontových kolonách v regionu analytů, jako např. organické soli nebo fosfolipidy. Proto byly ME stanoveny pro všechny analyty <5 % pro ESI- a <12% pro ESI+. V negativním módu se uplatňovalo pro většinu analytů velmi slabé zvýšení signálu, zatímco pro pozitivní mód bylo pozorované mírné potlačení signálu. Důvodem je, že ESI+ má vyšší ionizační účinnost pro většinu molekul, ať již žádoucích nebo nežádoucích, což vede k bohatšímu spektru a vyšší pravděpodobnosti ME.



Obrázek 13: Porovnání $^{13}\text{C}^{10}$ -ATP (modrý terč) a ProG (oranžový terč) při změnách napětí a průtoku plynu. Kolona ZIC-chILIC 150 x 2,1 mm, 3 μm ; ESI+.

3.2.2.2 Kalibrační křivka

Kalibrace vyjadřuje vztah mezi měřeným analytickým signálem a koncentrací vzorku [134]. Je ohraničena spodní a horní mezí kvantifikace (ULQ, z angl. Upper Limit of Quantification), kdy je detektor již saturován, a je popsána určitou matematickou funkcí. Při použití MS detekce je často tato funkce lineární v mnohem užším rozsahu, než je LOQ a ULQ. Celý interval lze ale popsat jinou funkcí, která odpovídá definici linearita jakožto validačního požadavku, kdy linearita metody je její schopnost v rámci určitého rozsahu měřit výsledky přímo úměrné koncentraci analytu ve vzorku.

U nukleotidů se kalibrační křivka lišila podle ionizačního módu, podle polaritě daného analytu, resp. podle množství přítomných fosfátů, i podle použitých analytických podmínek. Pro ESI- se daly body mezi LOQ a ULQ proložit lineární funkcí pro monofosfáty, pro difosfáty a trifosfáty bylo vhodnější použít funkci kvadratickou. Kalibrační profil se nelišil pro ZH ani ZcH podmínky. V ESI+ poskytují monofosfáty intenzivní odezvu, lépe tedy popisuje vztah mezi signálem a koncentrací lineární log-log funkce. Toto je výrazné hlavně u ZcH podmínek. U ZH podmínek je intenzita signálu slabší, lépe tedy vyhovuje proložení bodů funkce lineární. Odezva difosfátů a trifosfátů koresponduje opět s kvadratickou funkcí u obou kolon. Rozdíl mezi koeficientem determinace (R^2) u polyfosfátů pro lineární a kvadratickou funkci v ESI+ není ale tak výrazný jako v ESI-.

Obecně lze tedy shrnout, že čím slabší signál analyt poskytuje, tím lépe odpovídá jeho koncentrační závislost kvadratické funkci, naopak čím je signál intenzivnější, tím je kalibrační křivka bližší log-log závislosti.

Často se pro vytvoření kalibrační křivky používá vážená regrese, ať již lineární nebo nelineární. Vážená funkce má za úkol zvýhodnit spodní body kalibrační křivky použitím váženého faktoru nejčastěji $1/x$ nebo $1/x^2$. Podle [135] má být použito „odpovídající vážení“. Který vážený faktor je odpovídající jsme stanovili jako součet RSD jednotlivých kalibračních bodů (i) bez použití vážení, (ii) s váženým faktorem $1/x$ a (iii) s váženým faktorem $1/x^2$. Výrazný rozdíl byl mezi neváženou regresí a použitím faktoru $1/x$. Použití faktoru $1/x^2$ mírně snižovalo sumu RSD pouze pro trifosfáty s výrazně kvadratickým profilem, pro di- a

monofosfáty bylo výhodnější použít vážený faktor $1/x$. Aby se zachoval předpoklad co nejjednoduššího modelu a co nejkonstantnějšího výpočtu koncentrací, byla zvolena jednotná vážená regrese $1/x$.

3.2.3 Validace

Validace jednotlivých parametrů metody je důkladně popsána v **Publikaci 1 (Příloha 3)**.

3.3 Využití metody při analýze reálných vzorků

Vyvinutá analytická metoda má sloužit jako screeningový nástroj pro biology, bylo tedy nezbytné otestovat její funkčnost na reálných vzorcích.

3.3.1 *In vitro* experimenty

První testování schopnosti metody detekovat a kvantifikovat různá analoga guanosinfosfátů bylo realizováno na *in vitro* experimentu, kdy se sledovala schopnost enzymů MutT, NudG, NadR, a TrmE štěpit ppGpp (**Publikace 2**). Tyto enzymy a negativní kontrola (maltose-binding protein [MBP]) byly inkubovány s pětinašobnou koncentrací ppGpp v pufru, který se skládal z 40 mM Tris (pH 7,5), 100 mM NaCl a 10 mM MgCl₂. Po inkubaci byly vzorky okamžitě zmrazeny a dodány k analýze.

Kvantifikace byla provedena pomocí externí kalibrační křivky jednotlivých guanosinfosfátů v příslušném pufru na koloně ZH (150 × 2,1 mm, 3,5 μm; průtok 0,3 ml/min). Protože se jednalo o *in vitro* experimenty a pufr, ve kterém byly realizovány, jsme měli dostupný v přesném složení, nebylo nezbytné guanosinfosfáty chromatograficky rozdělit. Složky pufru eluovaly mimo sledované analyty, a tak jejich detekce, a tedy i poměr různě fosforylovaných iontů, nebyla rušena. V praxi se tak ukázala výhodnost použití HILIC separace, která oddělila rušivé matriční složky, s MS detekcí, která selektivně kvantifikovala jednotlivé analyty bez nutnosti použít tandemové hmotnostní spektrometrie. Popis metody je uveden v experimentální části a stanovené výsledky jsou v doprovodném materiálu **Publikace 2 (Příloha 2)**.

3.3.2 Analýza bakteriálních extraktů

Dalším stupněm testování byly bakteriální extrakty. Pro ověření schopnosti metody zachytit reálný obraz intracelulárního složení nukleotidů byl vybrán velmi dobře popsáný kmen *E. Coli* K12. Vzorky byly pěstovány na MOPS minimálním médiu [136], protože použití LB bujónu poskytovalo neopakovatelné výsledky.

3.3.2.1 Optimalizace zpracování vzorku

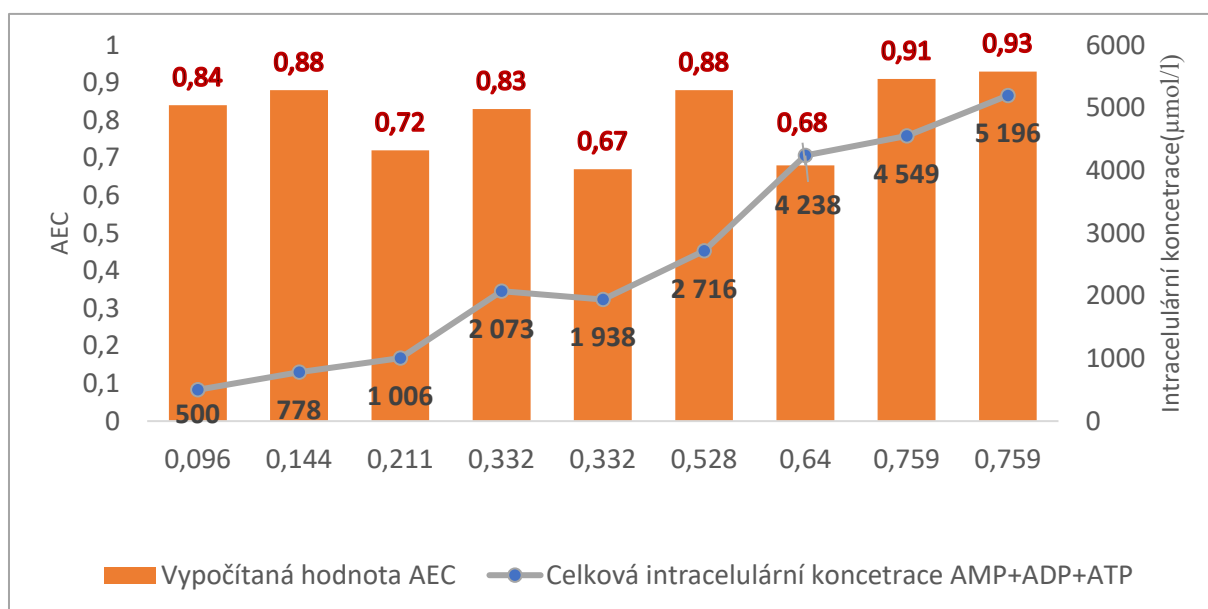
Pro kontrolu, zda při zpracování vzorku nedocházelo k degradaci klíčových nukleotidových metabolitů, se používá výpočet poměru AEC [viz odstavec 2.2, rovnice (1)]. Buňky v exponenciální fázi růstu by měly mít AEC >0,8, tedy ATP by se mělo nacházet v řádově vyšší koncentraci než ADP a koncentrace AMP by měla být zanedbatelná. Nižší hodnoty AEC ukazují na nesprávné zpracování vzorku.

Byly otestovány tři extrakční postupy z literatury, a to (i) extrakce směsí CHCl₃:CH₃OH:H₂O [137], (ii) extrakce ledovou 1 M FA [20] a (iii) extrakce ledovou 1 M HAc [21]; a dva způsoby oddělení buněk od média – (I) centrifugace a (II) filtrace. Pro polární nukleotidy extrakce kyselinou poskytovala vyšší výtěžnost oproti směsi s chloroformem. Při použití slabší kyseliny octové bylo v extraktu přítomno méně nežádoucích prvků matrice, které by rušily MS detekci. U způsobu zpracování bakteriální kultury poskytovala filtrace vyšší AEC ve srovnání s centrifugací, i když rozdíly nebyly tak dramatické, jako uvádějí někteří autoři

[21]. Metoda zpracování a extrakce publikovaná Varikem *a kol.* se jevila pro gramnegativní *E. Coli* jako nejvhodnější. Přesto dosažené hodnoty AEC byly zpočátku <0,8. Byly tedy testovány hypotézy, že (i) po extrakci přetrvává aktivita hydrolytických enzymů, (ii) buňky jsou sklizeny mimo exponenciální růstovou fázi a (iii) doba zpracování buněk před zastavením metabolismu je příliš dlouhá.

Aby byla vyloučena hypotéza (i), byla 1 M kyselina octová fortifikována 100 μM ATP. Po lyofilizaci a rekonstrukci vzorku by výsledná koncentrace měla být 75 μM , což byl přibližně čtyřnásobek očekávané koncentrace ATP. Výrazná defosforylace by byla zaznamenána i značným úbytkem přidaného ATP. Koncentrace ADP ale byla podobná pro fortifikované i nefortifikované vzorky. Přetrvávající enzymatická aktivita tak byla vyloučena.

Pro zjištění, zda se (ii) buňky stále nachází v exponenciální fázi růstu, byly sklizeny při různých OD_{600} od 0,096 do 0,76. S rostoucí optickou hustotou rostla celková koncentrace adenosinfosfátů (ATP+ADP+AMP), ovšem AEC nekopírovalo žádný trend a hodnoty se lišily víceméně náhodně (**Obrázek 14**). Bylo tedy potvrzeno, že buňky *E. Coli* s $\text{OD}_{600} < 1$ nedosahují stacionární fáze růstu a jejich metabolismus není za normálních podmínek pozměněn.



Obrázek 14: Změna AEC s rostoucím OD.

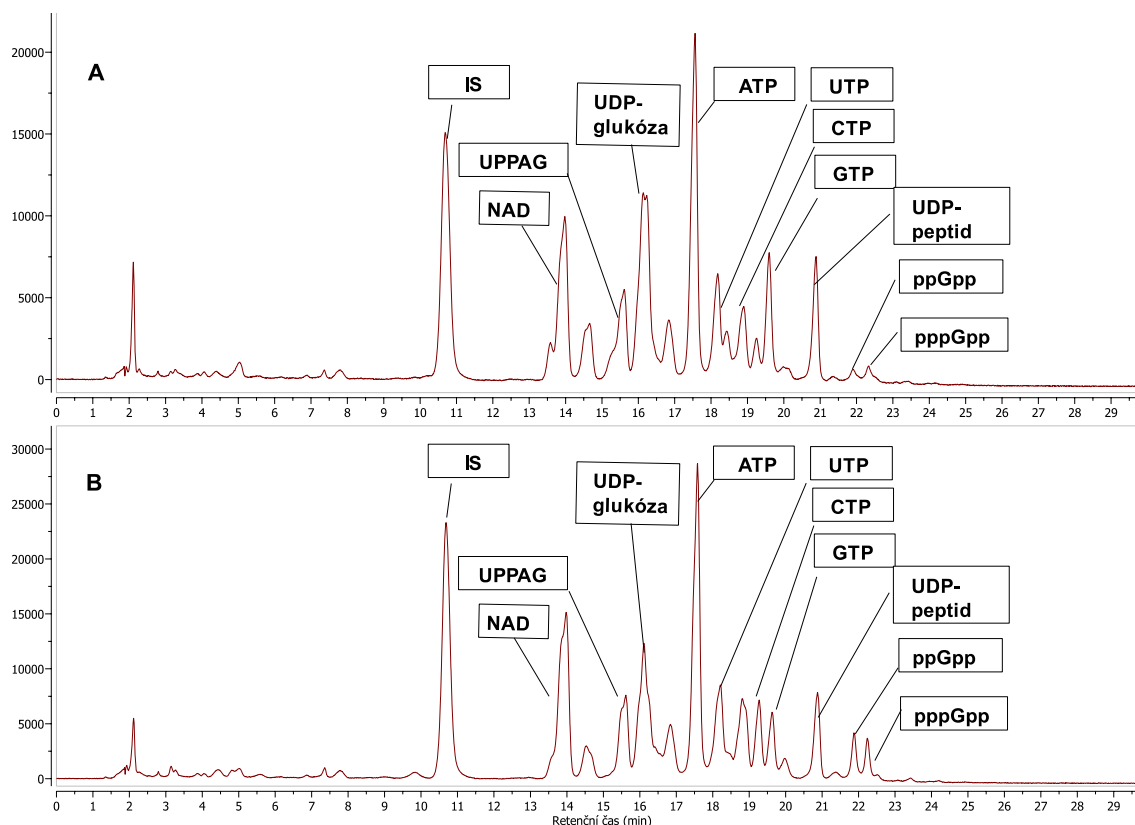
Zbývalo otestovat, zda (iii) není doba mezi sklizením buněk a zastavením jejich metabolismu příliš dlouhá, protože i jednotky vteřin mohou výrazně snížit hladinu ATP. Byl tedy snížen objem filtrovaných buněk na 5 ml a tím snížena doba filtrace o 2-3 vteřiny. Ve všech případech bylo AEC >0,8, tedy doba filtrace je klíčovým faktorem při zpracovávání vzorku pomocí vakuové filtrace. Ta souvisí s filtrovaným objemem i se zručností a praxí obsluhy. Po získání cviku bylo možné filtrovaný objem mírně zvýšit na 8 ml a tím získat koncentrovanější analytický vzorek.

3.3.2.2 Indukovaná stringentní odpověď (SR)

Běžný způsob indukce SR je s využitím antibiotika mupirocinu. To se reverzibilně váže na isoleucyl t-RNA syntetázu a způsobuje tak nedostatek aminokyseliny isoleucinu [138], který vyvolá stringentní odpověď projevující se mj. zvýšenou produkcí alarmonů ppGpp a pppGpp.

Byla ověřena schopnost metody tuto produkci zachytit, rozlišit mezi jednotlivými alarmony a kvantifikovat i malé změny v koncentraci způsobené rozdílnou koncentrací mupirocinu.

Z buněk v exponenciální fázi růstu ($OD_{600} = 0,45$) byly odebrány alikvoty po 8 ml na analýzu a ke zbylé kultuře byl přidán mupirocin v koncentraci 150 $\mu\text{mol/l}$, která byla dále inkubována po dobu 30 min. Všechny vzorky v pentaplikátech byly zpracovány podle [21], včetně čistého média, a byla stanovena jejich koncentrace na koloně ZcH kvůli její schopnosti rozlišit mezi ppGpp a pppGpp a nižším mezím detekce. Výsledky jsou podrobně rozebrány v **Publikaci 1**. Porovnání UV chromatogramu extraktu za fyziologických podmínek s extraktem stresované *E. Coli* je znázorněn na **Obrázku 15**.



Obrázek 15: Porovnání extraktů *E. Coli* K12 při $OD_{600} = 0,45$. A – neindukovaná SR, B – přidavek 150 μM mupirocinu pro indukci SR. Kolona ZIC-chILIC, 150 x 2,1 mm, 3 μm .

Pro zjištění, zda je metoda vhodná i na zaznamenání menších změn v koncentraci nukleotidů, zvláště pak (p)ppGpp, byla realizována esej, která spočívala v indukci SR mupirocinem o koncentraci 20 $\mu\text{mol/l}$ a 150 $\mu\text{mol/l}$ v závislosti na čase. Výsledky jsou uvedeny v **Tabulce 8**. Je patrné, že pro nižší koncentraci mupirocinu byly počáteční koncentrace (p)ppGpp nižší, jak bylo očekáváno, ovšem po celou dobu experimentu kontinuálně rostly a rozdíl, mezi koncentrací ppGpp a pppGpp se zvyšoval. Naproti tomu při použití 150 μM mupirocinu rostly koncentrace pouze po prvních 35 minut inkubace, poté začalo množství (p)ppGpp klesat a rozdíl mezi koncentracemi ppGpp a pppGpp se snížil. Z experimentu je tedy zřejmé, že metoda je dostatečně způsobilá zachytit i relativně malé změny během SR.

Koncentrace mupirocinu = 20 μ M				
čas (min)	ppGpp		pppGpp	
	koncentrace (μ mol/l)	σ (%)	koncentrace (μ mol/l)	σ (%)
7	326,1	23 %	152,9	23 %
15	413,9	7 %	319,3	26 %
25	398,3	7 %	336,9	6 %
35	479,7	5 %	312,9	34 %
45	566,0	7 %	382,7	5 %
Koncentrace mupirocinu = 150 μ M				
čas (min)	ppGpp		pppGpp	
	koncentrace (μ mol/L)	σ (%)	koncentrace (μ mol/l)	σ (%)
5	374,0	7 %	224,1	3 %
10	357,6	10 %	304,3	17 %
15	478,4	22 %	380,1	24 %
35	593,8	10 %	524,8	8 %
45	441,1	20 %	406,9	14 %

Tabulka 8: Časová závislost indukce stringentní odpovědi dvěma různými koncentracemi mupirocinu.

3.3.2.3 Aplikace na mykobakterie

Posledním krokem ověření aplikovatelnosti metody bylo její otestování na jiné bakteriální čeledi. Byla zvolena grampozitivní bakterie *Mycobacterium smegmatis*. Mykobakteria mají silnou hydrofobní buněčnou stěnu a snáze tedy odolávají extrakčním činidlům. Proto se nejdříve porovnála extrakční účinnost silnější kyseliny mravenčí a kyseliny octové. Rozdíly mezi oběma kyselinami nebyly významné, proto byla použita již dobře zavedená extrakce 1 M HAc.

Byly porovnávány bakterie *M. smegmatis* pěstované v definovaném médiu [139] s různým obsahem purinových bází (adeninu, guaninu a hypoxantinu) spolu s bakteriemi, které měly deletovanou oxidoreduktázu *guaB1*. Relativní poměry jednotlivých nukleotidů jsou uvedeny v **Tabulce 9**. Z uvedeného lze vyvodit, že jediný kvantifikovaný nukleotid, na který má signifikantní vliv absence enzymu *guaB1*, je NAD. Detekované koncentrace jsou podobné jako u *E. coli*, ovšem bez stanovení extrakční účinnosti a buněčného objemu nelze naměřené hodnoty přepočítat na intracelulární koncentrace. Další výzkum na bakterii *M. smegmatis* bude pokračovat.

Analyt	Wt	Wt 100 μ M Ade	Wt 100 μ M Gua	Wt 100 μ M Hyp	Δ guaB1	Δ guaB1 100 μ M Ade	Δ guaB1 100 μ M Gua	Δ guaB1 100 μ M Hyp
ATP	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
ADP	53 %	55 %	62 %	57 %	43 %	62 %	60 %	74 %
AMP	5 %	3 %	6 %	4 %	5 %	8 %	8 %	10 %
dATP	24 %	21 %	19 %	24 %	13 %	22 %	16 %	18 %
GTP	60 %	50 %	55 %	56 %	51 %	51 %	67 %	64 %
GDP	18 %	16 %	19 %	22 %	16 %	22 %	21 %	20 %
GMP	2 %	2 %	3 %	3 %	1 %	2 %	1 %	2 %
dGTP	29 %	27 %	25 %	22 %	22 %	22 %	18 %	25 %
dGMP	11 %	7 %	21 %	14 %	6 %	13 %	8 %	12 %
ITP	7 %	8 %	7 %	12 %	8 %	10 %	9 %	6 %
IDP	10 %	16 %	17 %	12 %	7 %	11 %	18 %	35 %
IMP	11 %	10 %	9 %	9 %	6 %	7 %	5 %	5 %
CTP	54 %	47 %	49 %	52 %	49 %	57 %	57 %	67 %
CDP	11 %	19 %	20 %	20 %	12 %	22 %	17 %	22 %
CMP	2 %	3 %	4 %	3 %	2 %	2 %	1 %	1 %
UTP	42 %	43 %	37 %	35 %	29 %	32 %	35 %	39 %
UDP	14 %	15 %	22 %	20 %	9 %	10 %	12 %	13 %
UMP	8 %	5 %	13 %	4 %	8 %	7 %	12 %	6 %
NAD	75 %	47 %	100 %	119 %	145 %	159 %	224 %	284 %
NADH	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	2 %	2 %	2 %	2 %
ppGpp	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
pppGpp	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
AEC	0,80	0,81	0,78	0,80	0,82	0,77	0,77	0,75

Tabulka 9: Relativní poměr jednotlivých nukleotidů v *M. smegmatis* za různých podmínek. ATP = 100 %. Wt = přirozený fenotyp, Δ guaB1 = fenotyp s deletovanou oxidoreduktázou guaB1; 100 μ M Ade = médium s přidaným adeninem v koncentraci 100 μ mol/l, 100 μ M Gua = médium s přidaným guanosinem v koncentraci 100 μ mol/l, 100 μ M Hyp = médium s přidaným hypoxantinem v koncentraci 100 μ mol/l.

4 ZÁVĚR

V předložené práci byla vyvinuta metoda pro analýzu nukleotidů v bakteriálních extraktech novým, zjednodušeným přístupem využívající zwitteriontovou HILIC kolonu s jednoduchou MS detekcí, která umožňuje selektivní detekci bez nutnosti optimalizování MS/MS přechodů. Je tak možné v jednom kroku rozlišit široké spektrum nukleotidů, včetně isomerních struktur jako pGpp a GTP, pGp a GDP, které jsou obtížně stanovitelné vedle sebe. Analyty jsou kvantifikovatelné s pomocí neznačeného externího vnitřního standardu, který je možné přidat až po extrakci.

Metoda byla validována pro 30 analytů a aplikována na *in vitro* i *in vivo* experimenty při indukci stringentní odpovědi.

Z výsledků se metoda jeví jako slibný screeningový nástroj pro biologické účely, která je schopná stanovit a bezpečně odlišit nukleotidy od jiných intracelulárních metabolitů a zachytit i menší změny v koncentracích alarmonů během stringentní odpovědi.

5 LITERATURA:

- [1] D.A. Schneider, R.L. Gourse, Relationship between growth rate and ATP concentration in *Escherichia coli* - A bioassay for available cellular ATP, *J. Biol. Chem.* 279(9) (2004) 8262-8268.
- [2] A. Blanco, G. Blanco, *Carbohydrate Metabolism*, 2017, pp. 283-323.
- [3] I.L.G. Coviella, R.J. Wurtman, Enhancement by cytidine of membrane phospholipid synthesis, *J. Neurochem.* 59(1) (1992) 338-343.
- [4] C.M.G. Reginald H. Garrett, *Biochemistry*, 4 ed., Cengage Learning, 2008.
- [5] O. Fiehn, Metabolomics-the link between genotypes and phenotypes, *Plant mol. biol.* 48(1-2) (2002) 155-71.
- [6] B. Malmgren, C.G. Hedén, Nucleotide metabolism of bacteria and the bacterial nucleus, *Nature* 159(4043) (1947) 577-578.
- [7] W.E. Cohn, The separation of purine and pyrimidine bases and of nucleotides by ion exchange, *Science* 109(2833) (1949) 377-378.
- [8] S.U. Bajad, W.Y. Lu, E.H. Kimball, J. Yuan, C. Peterson, J.D. Rabinowitz, Separation and quantitation of water soluble cellular metabolites by hydrophilic interaction chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1125(1) (2006) 76-88.
- [9] B.D. Bennett, J. Yuan, E.H. Kimball, J.D. Rabinowitz, Absolute quantitation of intracellular metabolite concentrations by an isotope ratio-based approach, *Nat. Protoc.* 3(8) (2008) 1299-1311.
- [10] J. Hiller, E. Franco-Lara, D. Weuster-Botz, Metabolic profiling of *Escherichia coli* cultivations: evaluation of extraction and metabolite analysis procedures, *Biotechnol. Lett.* 29(8) (2007) 1169-1178.
- [11] G. Bertani, Lysogeny at mid-twentieth century: P1, P2, and other experimental systems, *J. Bacteriol.* 186(3) (2004) 595-600.
- [12] M.J. Brauer, J. Yuan, B.D. Bennett, W.Y. Lu, E. Kimball, D. Botstein, J.D. Rabinowitz, Conservation of the metabolomic response to starvation across two divergent microbes, *P. Natl. Acad. Sci. USA* 103(51) (2006) 19302-19307.
- [13] L. Wang, D. Fan, W. Chen, E.M. Terentjev, Bacterial growth, detachment and cell size control on polyethylene terephthalate surfaces, *Sci. Rep.-Uk* 5 (2015) 15159.
- [14] D.E. Atkinson, Energy charge of adenylate pool as a regulatory parameter. Interaction with feedback modifiers, *Biochemistry-U.S.* 7(11) (1968) 4030-&.
- [15] W.J. Wiebe, K. Bancroft, Use of adenylate energy charge ratio to measure growth state of natural microbial communities, *P Natl Acad Sci USA* 72(6) (1975) 2112-2115.
- [16] C.L. Winder, W.B. Dunn, S. Schuler, D. Broadhurst, R. Jarvis, G.M. Stephens, R. Goodacre, Global metabolic profiling of *Escherichia coli* cultures: An evaluation of methods for quenching and extraction of intracellular metabolites, *Anal. Chem.* 80(8) (2008) 2939-2948.
- [17] M.J. Saez, R. Lagunas, Determination of intermediary metabolites in yeast. Critical examination of the effect of sampling conditions and recommendations for obtaining true levels, *Mol. Cell. Biochem.* 13(2) (1976) 73-8.
- [18] F. Letisse, N. Lindley, An intracellular metabolite quantification technique applicable to polysaccharide-producing bacteria, *Biotechnol. Lett.* (22) (2000) 1673-1677.
- [19] H. Meyer, M. Liebeke, M. Lalk, A protocol for the investigation of the intracellular *Staphylococcus aureus* metabolome, *Anal. Biochem.* 401(2) (2010) 250-259.
- [20] M.H. Buckstein, J. He, H. Rubin, Characterization of nucleotide pools as a function of physiological state in *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.* 190(2) (2008) 718-726.

- [21] V. Varik, S.R.A. Oliveira, V. Hauryliuk, T. Tenson, HPLC-based quantification of bacterial housekeeping nucleotides and alarmone messengers ppGpp and pppGpp, *Sci. Rep.-UK* 7 (2017).
- [22] M.R. Mashego, K. Rumbold, M. De Mey, E. Vandamme, W. Soetaert, J.J. Heijnen, Microbial metabolomics: past, present and future methodologies, *Biotechnol. Lett.* 29(1) (2007) 1-16.
- [23] S.-H. Lee, S. Kim, M.-A. Kwon, Y.H. Jung, Y.-A. Shin, K.H. Kim, Atmospheric vs. anaerobic processing of metabolome samples for the metabolite profiling of a strict anaerobic bacterium, *Clostridium acetobutylicum*, *Biotechnol. Bioeng* 111(12) (2014) 2528-2536.
- [24] X. Li, D. Long, J. Ji, W. Yang, Z. Zeng, S. Guo, Z. Ji, G. Qi, S. Chen, Sample preparation for the metabolomics investigation of poly-gamma-glutamate-producing *Bacillus licheniformis* by GC-MS, *J. Microbiol. Meth.* 94(1) (2013) 61-7.
- [25] D.E. Harrison, P. Maitra, The role of ATP in the control of energy metabolism in growing bacteria, *J. Gen. Microbiol.* 53(1) (1968) Suppl:7-8.
- [26] R.P. Maharjan, T. Ferenci, Global metabolite analysis: the influence of extraction methodology on metabolome profiles of *Escherichia coli*, *Anal. Biochem.* 313(1) (2003) 145-54.
- [27] E. Kimball, J.D. Rabinowitz, Identifying decomposition products in extracts of cellular metabolites, *Anal. Biochem.* 358(2) (2006) 273-280.
- [28] J. Tian, P. Sang, P. Gao, R.Y. Fu, D.W. Yang, L. Zhang, J. Zhou, S. Wu, X. Lu, Y. Li, G.W. Xu, Optimization of a GC-MS metabolic fingerprint method and its application in characterizing engineered bacterial metabolic shift, *J. Sep. Sci.* 32(13) (2009) 2281-2288.
- [29] A. Buchholz, R. Takors, C. Wandrey, Quantification of intracellular metabolites in *Escherichia coli* K12 using liquid chromatographic-electrospray ionization tandem mass spectrometric techniques, *Anal. Biochem.* 295(2) (2001) 129-137.
- [30] F. Arezzo, Determination of ribonucleoside triphosphates and deoxyribonucleoside triphosphates in Novikoff-hepatoma cells by high-performance liquid-chromatography, *Anal. Biochem.* 160(1) (1987) 57-64.
- [31] A.S. Bagnara, L.R. Finch, Quantitative extraction and estimation of intracellular nucleoside triphosphates of *Escherichia coli*, *Anal. Biochem.* 45(1) (1972) 24-&.
- [32] A.L. Pogolotti, D.V. Santi, High-pressure liquid chromatography-ultraviolet analysis of intracellular nucleotides, *Anal. Biochem.* 126(2) (1982) 335-345.
- [33] R. Little, H. Bremer, Quantitation of guanosine 5',3'-bisdiphosphate in extracts from bacterial cells by ion-pair reverse-phase high-performance liquid chromatography, *Anal. Biochem.* 126(2) (1982) 381-388.
- [34] M.O. Loret, L. Pedersen, J. Francois, Revised procedures for yeast metabolites extraction: application to a glucose pulse to carbon-limited yeast cultures, which reveals a transient activation of the purine salvage pathway, *Yeast* 24(1) (2007) 47-60.
- [35] M. Cashel, J. Gallant, Two compounds implicated in the function of the RC gene of *Escherichia coli*, *Nature* 221(5183) (1969) 838-841.
- [36] B.R. Bochner, B.N. Ames, Complete analysis of cellular nucleotides by two-dimensional thin-layer chromatography, *J. Biol. Chem.* 257(16) (1982) 9759-9769.
- [37] R.N. Nazar, H.G. Lawford, J.T.F. Wong, An improved procedure for extraction and analysis of cellular nucleotides, *Anal. Biochem.* 35(2) (1970) 305-&.
- [38] P. Kiefer, J.C. Portais, J.A. Vorholt, Quantitative metabolome analysis using liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry, *Anal. Biochem.* 382(2) (2008) 94-100.
- [39] E. Johnsen, S.R. Wilson, I. Odsbu, A. Krapp, H. Malerod, K. Skarstad, E. Lundanes, Hydrophilic interaction chromatography of nucleoside triphosphates with temperature as a separation parameter, *J. Chromatogr. A* 1218(35) (2011) 5981-5986.

- [40] S. Arase, S. Kimura, T. Ikegami, Method optimization of hydrophilic interaction chromatography separation of nucleotides using design of experiment approaches I: Comparison of several zwitterionic columns, *J. Pharmaceut. Biomed.* 158 (2018) 307-316.
- [41] M. Cortese, C. Delporte, D. Dufour, C. Noyon, M. Chaumont, B. De Becker, F. Reye, A. Rousseau, E. Omer, J. Neve, M. Piagnerelli, K.Z. Boudjeltia, B. Robaye, P. Van Antwerpen, Validation of a LC/MSMS method for simultaneous quantification of 9 nucleotides in biological matrices, *Talanta* 193 (2019) 206-214.
- [42] J.D. Rabinowitz, E. Kimball, Acidic acetonitrile for cellular metabolome extraction from *Escherichia coli*, *Anal. Chem.* 79(16) (2007) 6167-6173.
- [43] S.R. Hull, R. Montgomery, Separation and analysis of 4'-epimeric UDP-sugars, nucleotides, and sugar phosphates by anion-exchange high-performance liquid chromatography with conductimetric detection, *Anal. Biochem.* 222(1) (1994) 49-54.
- [44] H. Jin, Y.M. Lao, J. Zhou, H.J. Zhang, Z.H. Cai, A rapid UHPLC-HILIC method for algal guanosine 5'-diphosphate 3'-diphosphate (ppGpp) and the potential separation mechanism, *J. Chromatogr. B* 1096 (2018) 143-153.
- [45] L.F. Leo Jinyuan Wang, Yinsheng Wang, Hongxia (Jessica) Wang, Bill Schnute and Guifeng Jiang, Quantitative profiling of nucleotides using capillary IC-MS/MS, Thermo Fischer Scientific, 2012.
- [46] M.C. Golden, S.J. Hahm, R.E. Elessar, S. Saksonov, J.J. Steinberg, DNA damage by gliotoxin from *Aspergillus fumigatus*. An occupational and environmental propagule: adduct detection as measured by P-32 DNA radiolabelling and two-dimensional thin-layer chromatography, *Mycoses* 41(3-4) (1998) 97-104.
- [47] R.A. Laskey, A.D. Mills, Enhanced autoradiographic detection of P-32 and I125 using intensifying screens and hypersensitized film, *FEBS Lett.* 82(2) (1977) 314-316.
- [48] M.J. Cavaluzzi, P.N. Borer, Revised UV extinction coefficients for nucleoside-5'-monophosphates and unpaired DNA and RNA, *Nucleic Acids Res.* 32(1) (2004) 9.
- [49] TriLink Biotechnologies. www.trilinkbiotech.com. (Accessed 25-01 2019).
- [50] Metabion. <http://www.metabion.com/learning-platform/modifications/other-modified-bases/2deoxyinosine-inosine/>. (Accessed 10-12 2018).
- [51] L. Nováková, M. Douša a kol., *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I*, Europrint 2013.
- [52] W.E. Cohn, C.E. Carter, The separation of adenosine polyphosphate by ion exchange and paper chromatography, *J. Am. Chem. Soc.* 72(9) (1950) 4273-4275.
- [53] W.E. Cohn, The anion exchange separation of ribonucleotides, *J. Am. Chem. Soc.* 72(4) (1950) 1471-1478.
- [54] N.G. Anderson, J.G. Green, M.L. Barber, S.F.C. Ladd, Analytical techniques for cell fractions.3. Nucleotides and related compounds, *Anal. Biochem.* 6(2) (1963) 153-&.
- [55] J. Arendes, R.K. Zahn, W.E.G. Muller, Separation of naturally occurring adenine nucleosides and nucleotides by anion-exchange chromatography, *J. Chromatogr. A* 140(1) (1977) 118-119.
- [56] M. Staehelin, Studies on nucleotide sequences in ribonucleic acids: I. Separation of oligonucleotides on DEAE-cellulose, *Biochim. Biophys. Acta* 49(1) (1961) 11-&.
- [57] S.M. Payne, B.N. Ames, A procedure for rapid extraction and high-pressure liquid chromatographic separation of the nucleotides and other small molecules from bacterial cells, *Anal. Biochem.* 123(1) (1982) 151-161.
- [58] K. Ochi, J.C. Kandala, E. Freese, Initiation of *Bacillus subtilis* sporulation by the stringent response to partial amino-acid deprivation, *J Biol Chem* 256(13) (1981) 6866-6875.
- [59] M. McKeag, P.R. Brown, Modification of high pressure liquid chromatographic nucleotide analysis, *J. Chromatogr. A* 152(1) (1978) 253-254.

- [60] P. Kiefer, C. Nicolas, F. Letisse, J.C. Portais, Determination of carbon labeling distribution of intracellular metabolites from single fragment ions by ion chromatography tandem mass spectrometry, *Anal. Biochem.* 360(2) (2007) 182-188.
- [61] K. Burgess, D. Creek, P. Dewsbury, K. Cook, M.P. Barrett, Semi-targeted analysis of metabolites using capillary-flow ion chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 25(22) (2011) 3447-3452.
- [62] J. Stahlberg, Chromatography: Liquid | Ion pair liquid chromatography, in: *Encyclopedia of Separation Science*, I.D. Wilson (Ed.), Academic Press, Oxford, 2000, pp. 676-684.
- [63] S.C. Moidoveanu, V. David, Chapter 12 - Chromatographic procedures as preliminary separation, in: *Journal of Chromatography Library*, Elsevier 2002, pp. 403-421.
- [64] K. Flardh, T. Axberg, N.H. Albertson, S. Kjelleberg, Stringent control during carbon starvation of marine *Vibrio* sp. strain S14 – Molecular cloning, nucleotide sequence, and deletion of the *RelA* gene, *J. Bacteriol.* 176(19) (1994) 5949-5957.
- [65] D. Huang, Y.H. Zhang, X.G. Chen, Analysis of intracellular nucleoside triphosphate levels in normal and tumor cell lines by high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. B* 784(1) (2003) 101-109.
- [66] A.M. Krstulovic, R.A. Hartwick, P.R. Brown, Reverse Phase Liquid Chromatographic Separation of 3',5'-cyclic ribonucleotides, *Clin. Chem.* 25(2) (1979) 235-241.
- [67] D.L. Ramos, A.M. Schoffstall, Reversed-phase high-performance liquid chromatographic separation of nucleosides and nucleotides, *J. Chromatogr. A* 261 (1983) 83-93.
- [68] C.L. Willis, C.K. Lim, T.J. Peters, Separation of ribonucleotides, deoxynucleotides, cyclic nucleotides and deoxycyclic nucleotides by reverse phase high performance liquid chromatography, *J. Pharmaceut. Biomed.* 4(2) (1986) 247-252.
- [69] P. Jonsson, J. Gullberg, A. Nordstrom, M. Kusano, M. Kowalczyk, M. Sjostrom, T. Moritz, A strategy for identifying differences in large series of metabolomic samples analyzed by GC/MS, *Anal. Chem.* 76(6) (2004) 1738-1745.
- [70] M. Meyer, U. Stenzel, S. Myles, K. Pruffer, M. Hofreiter, Targeted high-throughput sequencing of tagged nucleic acid samples, *Nucleic Acids Res* 35(15) (2007).
- [71] K. Inoue, R. Obara, T. Hino, H. Oka, Development and Application of an HILIC-MS/MS method for the quantitation of nucleotides in infant formula, *J. Agric. Food Chem.* 58(18) (2010) 9918-9924.
- [72] J.E. Vela, L.Y. Olson, A. Huang, A. Fridland, A.S. Ray, Simultaneous quantitation of the nucleotide analog adefovir, its phosphorylated anabolites and 2'-deoxyadenosine triphosphate by ion-pairing LC/MS/MS, *J. Chromatogr. B* 848(2) (2007) 335-343.
- [73] M. Holcapek, K. Volna, P. Jandera, L. Kolarova, K. Lemr, M. Exner, A. Cirkva, Effects of ion-pairing reagents on the electrospray signal suppression of sulfonated dyes and intermediates, *J. Mass Spectrom.* 39(1) (2004) 43-50.
- [74] N.L.T. Padivitage, M.K. Dissanayake, D.W. Armstrong, Separation of nucleotides by hydrophilic interaction chromatography using the FRULIC-N column, *Anal. Bioanal. Chem.* 405(27) (2013) 8837-8848.
- [75] J.C. Linden, C.L. Lawhead, Liquid Chromatography of Sacharides, *J. Chromatogr. A* 105(1) (1975) 125-133.
- [76] A.J. Alpert, Electrostatic repulsion hydrophilic interaction chromatography for isocratic separation of charged solutes and selective isolation of phosphopeptides, *Anal. Chem.* 80(1) (2008) 62-76.
- [77] S.M. Melnikov, A. Holtzel, A. Seidel-Morgenstern, U. Tallarek, A Molecular dynamics study on the partitioning mechanism in hydrophilic interaction chromatography, *Angew. Chem.-Int. Edit.* 51(25) (2012) 6251-6254.

- [78] P. Hemstrom, K. Irgum, Hydrophilic interaction chromatography, *J. Sep. Sci.* 29(12) (2006) 1784-1821.
- [79] A.E. Karatapanis, Y.C. Fiamegos, C.D. Stalikas, A revisit to the retention mechanism of hydrophilic interaction liquid chromatography using model organic compounds, *J. Chromatogr. A* 1218(20) (2011) 2871-2879.
- [80] J.P. Hutchinson, T. Remenyi, P. Nesterenko, W. Farrell, E. Groeber, R. Szucs, G. Dicinoski, P.R. Haddad, Investigation of polar organic solvents compatible with corona charged aerosol detection and their use for the determination of sugars by hydrophilic interaction liquid chromatography, *Anal. Chim. Acta* 750 (2012) 199-206.
- [81] W. Bicker, J.Y. Wu, M. Lammerhofer, W. Lindner, Hydrophilic interaction chromatography in nonaqueous elution mode for separation of hydrophilic analytes on silica-based packings with noncharged polar bondings, *J. Sep. Sci.* 31(16-17) (2008) 2971-2987.
- [82] A.J. Alpert, Effect of salts on retention in hydrophilic interaction chromatography, *J. Chromatogr. A* 1538 (2018) 45-53.
- [83] D.V. McCalley, Understanding and manipulating the separation in hydrophilic interaction liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1523 (2017) 49-71.
- [84] P. Jandera, Stationary and mobile phases in hydrophilic interaction chromatography: a review, *Anal. Chim. Acta* 692(1-2) (2011) 1-25.
- [85] K. Horie, T. Kamakura, T. Ikegami, M. Wakabayashi, T. Kato, N. Tanaka, Y. Ishihama, Hydrophilic interaction chromatography using a meter-scale monolithic silica capillary column for proteomics LC-MS, *Anal. Chem.* 86(8) (2014) 3817-3824.
- [86] B.D. Bennett, E.H. Kimball, M. Gao, R. Osterhout, S.J. Van Dien, J.D. Rabinowitz, Absolute metabolite concentrations and implied enzyme active site occupancy in *Escherichia coli*, *Nat. Chem. Biol.* 5(8) (2009) 593-599.
- [87] B. Preinerstorfer, S. Schiesel, M.L. Lammerhofer, W. Lindner, Metabolic profiling of intracellular metabolites in fermentation broths from beta-lactam antibiotics production by liquid chromatography-tandem mass spectrometry methods, *J. Chromatogr. A* 1217(3) (2010) 312-328.
- [88] M. Mateos-Vivas, E. Rodriguez-Gonzalo, J. Dominguez-Alvarez, D. Garcia-Gomez, R. Carabias-Martinez, Determination of nucleosides and nucleotides in baby foods by hydrophilic interaction chromatography coupled to tandem mass spectrometry in the presence of hydrophilic ion-pairing reagents, *Food Chem.* 211 (2016) 827-835.
- [89] L. Mora, A.S. Hernandez-Cazares, M.C. Aristoy, F. Toldra, Hydrophilic interaction chromatographic determination of adenosine triphosphate and its metabolites, *Food Chem.* 123(4) (2010) 1282-1288.
- [90] N.L.T. Padivitage, M.K. Dissanayake, D.W. Armstrong, Separation of nucleotides by hydrophilic interaction chromatography using the FRULIC-N column, *Anal. Bioanal. Chem.* 405(27) (2013) 8837-8848.
- [91] A.K. Hewavitharana, V. Narayan, J.A. Duley, Separation of highly charged compounds using competing ions with hydrophilic interaction liquid chromatography - Application to assay of cellular nucleotides, *J. Chromatogr. A* 1567 (2018) 233-238.
- [92] H.Q. Zhao, J.H. Chen, Q. Shi, X. Li, W.H. Zhou, D.L. Zhang, L. Zheng, W. Cao, X.R. Wang, F.S.C. Lee, Simultaneous determination nucleosides in marine organisms using ultrasound-assisted extraction followed by hydrophilic interaction liquid chromatography-electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry, *J. Sep. Sci.* 34(19) (2011) 2594-2601.
- [93] E. Rodriguez-Gonzalo, D. Garcia-Gomez, R. Carabias-Martinez, Study of retention behaviour and mass spectrometry compatibility in zwitterionic hydrophilic interaction chromatography for the separation of modified nucleosides and nucleobases, *J. Chromatogr. A* 1218(26) (2011) 3994-4001.

- [94] U.S. Pharmacopeia, Validation of compendial procedures <1225>, in: U.S.P. Convention (Ed.) 40, 2016.
- [95] Kvalimetrie 18, EURACHEM ČR 2013.
- [96] Official Methods of Analysis of AOAC International, 20 ed., AOAC International, 2016.
- [97] B. Magnusson, U. Örnemark (eds.), Eurachem Guide: The Fitness for purpose of analytical methods – A Laboratory guide to method validation and related topics, 2 ed., 2014.
- [98] Compendium of chemical terminology - Gold Book, IUPAC, 2014.
- [99] Validation of analytical procedures: Text and methodology, International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use Q2(R1), 2005.
- [100] E. Rozet, A. Ceccato, C. Hubert, E. Ziemons, R. Oprean, S. Rudaz, B. Boulanger, P. Hubert, Analysis of recent pharmaceutical regulatory documents on analytical method validation, *J. Chromatogr. A* 1158(1-2) (2007) 111-125.
- [101] O. Gonzalez, M.E. Blanco, G. Iriarte, L. Bartolome, M.I. Maguregui, R.M. Alonso, Bioanalytical chromatographic method validation according to current regulations, with a special focus on the non-well defined parameters limit of quantification, robustness and matrix effect, *J. Chromatogr. A* 1353 (2014) 10-27.
- [102] L.A. Currie, Nomenclature in Evaluation of Analytical Methods Including Detection and Quantification Capabilities (IUPAC Recommendations 1995), *Pure Appl. Chem.* 67(10) (1995) 1699-1723.
- [103] International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, R1: Validation of Analytical procedures, Geneva, 2005.
- [104] W.J. Youden, M. Masuyama, The Planning of Experiments, *Bull. Int. Stat. Inst.* 38(1) (1961) 87-92.
- [105] European Medicines Agency. <https://www.ema.europa.eu/en>. (Accessed 02-10 2019).
- [106] FDA U.S. Department of Health and Human Services, Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation, 2013.
- [107] L R Ellison and A Williams (Eds.), Eurachem/CITAC guide: Use of uncertainty information in compliance assessment, 2007.
- [108] C. Dicaire, J.N. Mess, M. Furtado, A. Bergeron, F. Garofolo, Impact of organic solvent additive on the integrity of plasma samples in bioanalysis by LC-MS/MS, *Bioanalysis* 5(19) (2013) 2359-2370.
- [109] H. Trufelli, P. Palma, G. Famiglini, A. Cappiello, An overview of matrix effects in liquid chromatography–mass spectrometry, *Mass Spectrom. Rev.* 30(3) (2011) 491-509.
- [110] A. Periat, I. Kohler, A. Bugey, S. Bieri, F. Versace, C. Staub, D. Guillaume, Hydrophilic interaction chromatography versus reversed phase liquid chromatography coupled to mass spectrometry: Effect of electrospray ionization source geometry on sensitivity, *J. Chromatogr. A* 1356 (2014) 211-220.
- [111] C.G. Enke, A predictive model for matrix and analyte effects in electrospray ionization of singly-charged ionic analytes, *Anal. Chem.* 69(23) (1997) 4885-4893.
- [112] C. Ghosh, C.P. Shinde, B.S. Chakraborty, Influence of ionization source design on matrix effects during LC-ESI-MS/MS analysis, *J. Chromatogr. B* 893 (2012) 193-200.
- [113] Guideline on bioanalytical method validation, European Medicines Agency, Committee for Medicinal Products for Human Us 2011.
- [114] Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results - Part 1: General principles and definitions, in: I.O.f. Standardization (Ed.) ISO 5725-1:1994, 1994, p. 17.
- [115] International vocabulary of metrology – Basic and general concepts and associated terms (VIM), JCGM 200:2012, Bureau International des Poids et Mesures, 2012.
- [116] V. J. Barwick and E. Prichard (Eds), Eurachem Guide: Terminology in analytical measurement – Introduction to VIM 2011.

- [117] A. Menditto, M. Patriarca, B. Magnusson, Understanding the meaning of accuracy, trueness and precision, *Accredit. Qual. Assur.* 12(1) (2007) 45-47.
- [118] A.O. Gaca, P. Kudrin, C. Colomer-Winter, J. Beljantseva, K.Q. Liu, B. Anderson, J.D. Wang, D. Rejman, K. Potrykus, M. Cashel, V. Haurlyliuk, J.A. Lemos, From (p)ppGpp to (pp)pGpp: Characterization of regulatory effects of pGpp synthesized by the small alarmone synthetase of *Enterococcus faecalis*, *J. Bacteriol.* 197(18) (2015) 2908-2919.
- [119] M. Cashel, Kalbache.B, Control of ribonucleic acid synthesis in *Escherichia coli*. 5. Characterization of a nucleotide associated with stringent response, *J. Biol. Chem.* 245(9) (1970) 2309-&.
- [120] K. Potrykus, M. Cashel, (p)ppGpp: Still magical?, *Annu. Rev. Microbiol.* 62 (2008) 35-51.
- [121] K. Braeken, M. Moris, R. Daniels, J. Vanderleyden, J. Michiels, New horizons for (p)ppGpp in bacterial and plant physiology, *Trends Microbiol.* 14(1) (2006) 45-54.
- [122] D.G. M Cashel, VJ Hernandez, D Vinella, *The stringent response in Escherichia coli and Salmonella typhimurium, Escherichia coli and Salmonella: Cellular and molecular biology*, ASM Press, Washington DC, 1996, pp. 1458-1496.
- [123] U. Mechold, K. Potrykus, H. Murphy, K.S. Murakami, M. Cashel, Differential regulation by ppGpp versus pppGpp in *Escherichia coli*, *Nucleic Acids Res.* 41(12) (2013) 6175-6189.
- [124] A.O. Gaca, C. Colomer-Winter, J.A. Lemos, Many means to a common end: The intricacies of (p)ppGpp metabolism and its control of bacterial homeostasis, *J. Bacteriol.* 197(7) (2015) 1146-1156.
- [125] M. Sargent; A. Sage; C. Wolff; C. Mussell; D. Neville; G. Lord; M. Saeed; R. Lad; S. Hird; V. Barwick; A.. R. Godfrey, *Guide to achieving reliable quantitative LC-MS measurements*, LGC (2013).
- [126] R. Zhang, D.G. Watson, L.J. Wang, G.D. Westrop, G.H. Coombs, T. Zhang, Evaluation of mobile phase characteristics on three zwitterionic columns in hydrophilic interaction liquid chromatography mode for liquid chromatography-high resolution mass spectrometry based untargeted metabolite profiling of *Leishmania* parasites, *J. Chromatogr. A* 1362 (2014) 168-179.
- [127] HPLC Method transfer calculator. <https://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/hplc/method-transfer-calculator.html#gradient>. (Accessed 09-05 2018).
- [128] J.C. Heaton, D.V. McCalley, Some factors that can lead to poor peak shape in hydrophilic interaction chromatography, and possibilities for their remediation, *J. Chromatogr. A* 1427 (2016) 37-44.
- [129] R. Corporation, *How To Avoid Common Problems with HILIC method development*, 2017.
- [130] A. Technologies, *Hydrophilic interaction chromatography method development Troubelshooting*, 2018.
- [131] Evaporation Rate. <http://www.ilpi.com/msds/ref/evaporationrate.html>. (Accessed 10-20 2018)
- [132] N.B. Cech, C.G. Enke, Practical implications of some recent studies in electrospray ionization fundamentals, *Mass Spectrom. Rev.* 20(6) (2001) 362-387.
- [133] M.L. Peterson, R. Vince, Synthesis and Biological Evaluation of 4-Purinylypyrrolidine Nucleosides, *J. Med. Chem.* 34(9) (1991) 2787-2797.
- [134] K. Danzer, L.A. Currie, *Guidelines for calibration in analytical chemistry. Part I. Fundamentals and single component calibration (IUPAC Recommendations 1998)*, 1998.
- [135] FDA U.S. *Guidance for Industry: Bioanalytical method validation*, 2001.
- [136] F.C. Neidhardt, P.L. Bloch, D.F. Smith, Culture medium for enterobacteria, *J. Bacteriol.* 119(3) (1974) 736-747.

- [137] C.B. Prasannan, D. Jaiswal, R. Davis, P.P. Wangikar, An improved method for extraction of polar and charged metabolites from cyanobacteria, *PloS One* 13(10) (2018).
- [138] W.A. Haseltine, R. Block, Synthesis of guanosine tetra- and pentaphosphate requires the presence of a codon-specific, uncharged transfer ribonucleic acid in the acceptor site of ribosomes, *P. Natl. Acad. Sci. USA* 70(5) (1973) 1564-1568.
- [139] G. Middlebrook, M.L. Cohn, *Bacteriology of tuberculosis – Laboratory methods*, *Am. J. Public Health Nation Health* 48(7) (1958) 844-853.
- [140] ChemAxon, LogD predictor. <https://disco.chemaxon.com/apps/demos/logd/>. (Accessed 10-12 2018).

6 KOMENTÁŘE K OSTATNÍM PUBLIKACÍM:

Na publikacích 3 – 13 jsem se podílela jako analytický chemik. Práce označené tučně vznikly v rámci doktorského studia na Katedře analytické chemie PřF UK. Společným jmenovatelem všech publikací je využití techniky LC-MS. Analytická práce spočívala vždy ve vývoji metody pro danou skupinu látek. Tyto látky byly charakterizovány (3, 4, 5, 6, 8, 9, 11, 12, 13), popř. byla sledována změna nějakého parametru/ parametrů v závislosti na vnějších podmínkách (4, 6), nebo metoda sloužila jako detekční koncovka pro výstup enzymatické eseye (7, 10). Ve všech případech se jednalo o dosud necharakterizované látky, často s unikátní strukturou a problematickým chromatografickým nebo ionizačním chováním.

6.1 Seznam publikací:

1. **E. Zborníková, Z. Knejzlík, V. Hauryliuk, L. Krásný, D. Rejman, Analysis of nucleotide pools in bacteria using HPLC-MS in HILIC mode. bioRxiv 2019, 655258.**
2. **Y. Zhang , E. Zbornikova, D. Rejman, K. Gerdes, Novel (p)ppGpp binding and metabolizing proteins of Escherichia coli. mBio 9(2) (2018).**
3. D. T. Keough, D. Rejman, R. Pohl, E. Zbornikova, D. Hockova, T. Croll, et al. Design of Plasmodium vivax hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase inhibitors as potential antimalarial therapeutics. ACS Chem. Biol. 13(1) (2018) 82-90.
4. **G. Seydlova, R. Pohl, E. Zbornikova, M. Ehn, O. Simak, N. Panova, et al. Lipophosphonoxins II: Design, synthesis, and properties of novel broad spectrum antibacterial agents. J. Med. Chem. 60(14) (2017) 6098-118.**
5. K. Hercik, J. Kozak, M. Sala, M. Dejmek, H. Hrebabecky, E. Zbornikova, et al. Adenosine triphosphate analogs can efficiently inhibit the Zika virus RNA-dependent RNA polymerase. Antivir. Res. 137 (2017) 131-3.
6. M. Petrova, O. Pav, M. Budesinsky, E. Zbornikova, P. Novak, S. Rosenbergova, et al. Straightforward synthesis of purine 4 '-alkoxy-2 '-deoxynucleosides: First report of mixed purine-pyrimidine 4 '-alkoxyoligodeoxynucleotides as new RNA mimics. Org. Lett. 17(14) (2015) 3426-9.
7. N. Panova, E. Zbornikova, O. Simak, R. Pohl, M. Kolar, K. Bogdanova, et al. Insights into the mechanism of action of bactericidal lipophosphonoxins. Plos One 10(12) (2015).
8. **O. Pav, E. Zbornikova, M. Budesinsky, I. Rosenberg, A new class of phosphanucleosides containing a 3-hydroxy-1-hydroxymethylphospholane 1-oxide ring. Tetrahedron 69(43) (2013) 9120-9.**
9. M. Dvorakova, R. Nencka, M. Dejmek, E. Zbornikova, A. Brezinova, M. Pribylova, et al. Synthesis of alkylcarbonate analogs of O-acetyl-ADP-ribose. Org. Biomol. Chem. 11(34) (2013) 5702-13.
10. O. Pav, N. Panova, J. Snasel, E. Zbornikova, I. Rosenberg , Activation of human RNase L by 2 '- and 5 '-O-methylphosphonate- modified oligoadenylates. Bioorg. Med. Chem. Lett. 22(1) (2012) 181-5.
11. M. Dejmek, S. Kovackova, E. Zbornikova, H. Hrebabecky, M. Sala, M. Dracinsky, et al. One-pot build-up procedure for the synthesis of variously substituted purine derivatives. RSC Adv. 2(17) (2012) 6970-80.
12. D. Rejman, A. Rabatinova, A. R. Pombinho, S. Kovackova, R. Pohl, E. Zbornikova, et al. Lipophosphonoxins: new modular molecular structures with significant antibacterial properties. J. Med. Chem. 54(22) (2011) 7884-98.
13. M. Petrova, M. Budesinsky, E. Zbornikova, P. Fiedler, I. Rosenberg. A Ferrier-type allylic rearrangement of 3 '-deoxy-3 ',4 '-didehydronucleosides mediated by DMF

dimethyl acetal: Direct Access to 4'-alkoxy-2',3'-didehydro-2',3'-dideoxynucleosides. *Org. Lett.* 13(16) (2011) 4200-3.

6.2 Seznam patentů:

1. M. Dejmek, R. Nenecka, S. Kovackova, E. Zbornikova, inventors; Ustav organicke chemie a biochemie AV CR vvi, assignee. Method for preparing N-9 substituted purine compound to produce pharmaceutical product, involves reacting primary amine or diamine with reagent i.e. pyrimidine precursor, in presence of solvent or non-nucleophilic base by heating patent CZ201200054-A3.
2. D. Rejman, R. Pohl, E. Zbornikova, L. Krasny, T. Latal, M. Kolar, inventors; Mikrobiologicky ustav AV CR vvi, assignee. New substituted lipophosphonoxins, used e.g. as antibacterial agent against e.g. *Escherichia coli* and as active ingredients for disinfectants for other than therapeutic purposes and/or selective culture media for in vitro cultures patent CZ201600243-A3.

6.3 Seznam plakátových sdělení:

1. **Simple and robust method for identification and quantification of nucleotides in bacterial cells;** Eva Zborníková, Libor Krásný, Vallo Varik, Yuzuru Tozawa, Vasili Hauryliuk, Dominik Rejman. HPLC2017, Prague.
2. **Characterization of nucleotide pool in bacterial cells;** Eva Zborníková, Libor Krásný, Vallo Varik, Yuzuru Tozawa, Vasili Hauryliuk, Dominik Rejman. Dubaj, 2016.
3. **Physical and biochemical properties of bactericidal lipophosphonoxins;** Eva Zborníková, Natalya Panova, Eva Tloušťová, Milan Kolář, Kateřina Bogdanová, Renata Večeřová, Libor Krásný, Dominik Rejman. RICT2015, Avignon.
4. **Addressing the Localization of Novel Antibacterial Compounds Lipophosphonoxins in Bacillus subtilis cells;** Eva Zborníková, Natalya Panova, Libor Krasný, Dominik Rejman. RICT2013, Nice.

6.4 Seznam přednášek:

1. **Easy and robust method for identification and quantification of nucleotide pool in bacterial cells;** Eva Zborníková, Rožnov pod Radhoštěm 2017
2. **Easy and robust method for identification and quantification nucleotide pool in bacterial cells;** Eva Zbornikova, Nelijärve 2018

7 SEZNAM PŘÍLOH:

Příloha 1: Log D [140] a molární hmotnosti validovaných analytů.

Příloha 2: Analytické parametry **Publikace 2** [Y. Zhang , E. Zbornikova, D. Rejman, K. Gerdes, Novel (p)ppGpp binding and metabolizing proteins of Escherichia coli. mBio 9(2) (2018)].

Příloha 3: Manuscript **Publikace 1** [E. Zborníková, Z. Knejzlík, V. Hauryliuk, L. Krásný, D. Rejman, Analysis of nucleotide pools in bacteria using HPLC-MS in HILIC mode. bioRxiv 2019, 655258].

PŘÍLOHA 1:

Log D [140] a molární hmotnosti validovaných analytů.

Analyt	Log D		Molární hmotnost (Da)
	pH 5	pH 7	
pppGpp	-14,5	-16,2	602,96
NADP	-12,8	-15,2	743,08
ppGpp	-12,0	-13,5	682,92
NAD	-10,9	-11,3	663,12
NADPH	-10,7	-12,5	745,09
CTP	-10,0	-11,0	482,99
pGpp	-10,0	-11,5	522,99
GTP	-9,8	-11,1	522,99
ppGp	-9,8	-11,9	522,99
ATP	-9,7	-10,2	507,00
ITP	-9,5	-10,5	507,98
UTP	-9,5	-10,5	483,97
dCTP	-8,7	-10,0	466,99
dITP	-8,7	-9,9	491,99
dUTP	-8,7	-9,9	467,97
dGTP	-8,6	-10,0	507,00
dATP	-8,5	-9,6	491,00
dTTP	-8,0	-9,5	497,98
NADH	-8,0	-8,5	665,12
CDP	-7,4	-8,2	403,02
GDP	-7,4	-7,8	443,03
IDP	-7,3	-7,7	428,01
UDP	-7,2	-7,7	404,00
ADP	-7,0	-7,8	427,03
GMP	-5,2	-6,0	363,06
CMP	-5,0	-6,2	323,06
IMP	-5,0	-5,9	348,05
ProG	-4,8	-5,1	250,11
UMP	-4,8	-5,9	324,04
AMP	-4,6	-5,4	347,06

PŘÍLOHA 2

Analytické parametry **Publikace 2** [Y. Zhang , E. Zbornikova, D. Rejman, K. Gerdes, Novel (p)ppGpp binding and metabolizing proteins of Escherichia coli. mBio 9(2) (2018)].

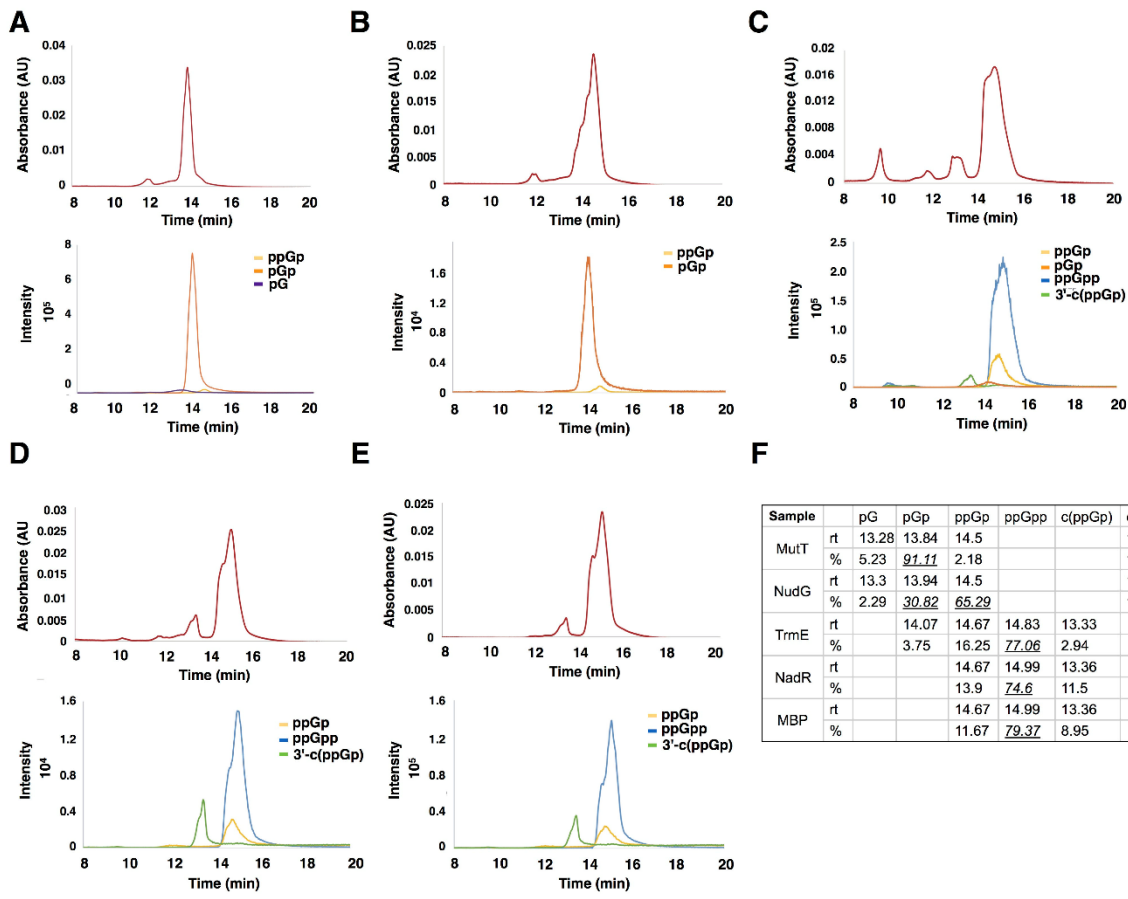
MATERIALS AND METHODS

UPLC-MS analysis of degradative products of ppGpp by MutT, NudG, NadR and TrmE. Twenty μM of each purified MutT, NudG, NadR, TrmE and MBP, as a negative control, were incubated with 100 μM ppGpp in buffer B (containing 40 mM Tris pH 7.5, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl_2) for 20 min at room temperature. Samples were snap frozen on dry ice and analysed with UPLC-MS afterwards. All samples and buffers were stored at $-80\text{ }^\circ\text{C}$, thawed on ice and kept at $4\text{ }^\circ\text{C}$ during analysis. For analysis UPLC- qTOF (Waters) were used. Analysis conditions were as follows: column zic-HILIC (Merck Milipore) 150 x 2.1 mm, 3.5 μm with gradient elution, flow rate set to 0.3 ml/min and mobile phase: A = 10 mM ammonium acetate, pH 5 and B = 90% acetonitrile with 10 mM ammonium acetate, pH5. Gradient was set up as follows: 0-2 min, 80% B, 2-16 min 80-50% B, hold till 20 min. Injection volume: 4 μL . Detection conditions were: PDA – 210-400 nm, evaluated at 260 nm. MS: ionisation: ESI+ scan 200-800 m/z with Lock mass correction. Analytes were identified by their accurate mass and retention time of known standard dissolved in used buffer (for the chemicals of the same nominal masses). These standards were either synthesized and their structures confirmed by NMR (for ppGp, pGpp, pGp) or purchased (ppGpp from Jena Bioscience, GTP from Sigma Aldrich).

Supplemental Material

FIG S7

Cleavage of ppGpp by MutT, NudG, NadR, and TrmE as analyzed by UPLC-MS. 20 μM each of (A) MutT, (B) NudG, (C) NadR, (D) TrmE, and (E) MBP was incubated with 100 μM ppGpp in buffer B (40 mM Tris [pH 7.5], 100 mM NaCl, 10 mM MgCl_2) for 20 min at room temperature. Samples were snap-frozen on dry ice and analyzed with UPLC-MS (see Materials and Methods for details). The UV data (260 nm wavelength absorption) and the MS chromatograms of the degradative species of ppGpp are shown in the upper and lower parts of each panel, respectively. (F) A table summarizing the relative abundances of the degradative species of ppGpp corresponding to each of the four proteins, with the major species underlined. rt, retention time (min); c(pGp), cyclic 3',5'-pGp; c(ppGp), cyclic 3',5'-ppGp.



PŘÍLOHA 3

Manuscript **Publikace 1** [E. Zborníková, Z. Knejzlík, V. Hauryliuk, L. Krásný, D. Rejman, Analysis of nucleotide pools in bacteria using HPLC-MS in HILIC mode. bioRxiv 2019, 655258].

Analysis of Nucleotide Pools in Bacteria Using HPLC-MS in HILIC Mode

Eva Zborníková^{1, 2}, Zdeněk Knejzlik¹, Vasili Hauryliuk^{3, 4}, Libor Krásný⁵, Dominik Rejman^{*1}

1. Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i., Flemingovonam. 2, CZ-166 10 Prague 6, Czech Republic

2. Charles University, Faculty of Science, Department of Analytical Chemistry, Hlavova 8, 128 43 Prague 2, Czech Republic.

3. Department of Molecular Biology, Umeå University, Building 6K, 6L University Hospital Area, SE-901 87 Umeå, Sweden

4. Laboratory for Molecular Infection Medicine Sweden (MIMS), Umeå University, Building 6K and 6L, University Hospital Area, 90187 Umeå, Sweden

5. Institute of Microbiology, Czech Academy of Sciences v.v.i., Vídeňská 1083, 142 20 Prague 4, Czech Republic

Abstract

Nucleotides, nucleosides and their derivatives are present in cells at varying concentrations that rapidly change with the nutritional, and energetic status of the cell. Knowledge of the concentration dynamics of these molecules is instrumental for understanding their regulatory effects. Determination of these concentrations is challenging due to the inherent instability of these molecules and, despite many decades of research, the reported values differ widely. Here, we present a comprehensive and easy-to-use approach to determine intracellular concentrations of >25 target molecular species. The approach uses rapid filtration and cold acidic extraction followed by high performance liquid chromatography (HPLC) in the hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) mode using zwitterionic columns coupled with UV and MS detectors. The method reliably detects and quantifies all the analytes expected to be observed in the bacterial cell and paves the way for future studies correlating their concentrations with biological effects.

Keywords: nucleotide, HPLC-MS, HILIC, ppGpp, stringent response, *Escherichia coli*

List of abbreviations

cyclic diadenylate (c-di-AMP), cyclic diguanylate (c-di-GMP), dinucleoside polyphosphates ApxN, guanosine pentaphosphate (pppGpp), guanosine tetraphosphate (ppGpp), lysogeny broth (LB), stringent response (SR), Adenylate Energy Charge (AEC).

Introduction

Nucleotides and their derivatives play crucial roles in many biological processes in bacterial cells. They serve for energy storage or as building blocks for the assembly of macromolecules such as nucleic acids or polysaccharides. Furthermore, nucleotides play important regulatory roles, e. g. functioning as second messengers and/or pleiotropic regulators: cyclic AMP (cAMP) [1], cyclic diadenylate (c-di-AMP), cyclic diguanylate (c-di-GMP) [2], dinucleoside polyphosphates ApxN [3], as well as guanosine pentaphosphate (pppGpp) and tetraphosphate (ppGpp), collectively referred to as (p)ppGpp [4, 5]. Rapid increase in (p)ppGpp concentration – ‘the stringent response’ – orchestrates a survival program leading to increased virulence and antibiotic tolerance [6]. In *Escherichia coli* the levels of (p)ppGpp are controlled by two related enzymes – RelA and SpoT, the namesakes of RelA SpoT Homolog (RSH) protein family – that sense numerous stress signals such as amino acid, fatty acid, carbon source limitation *etc.* [7]. The (p)ppGpp then functions as a pleiotropic regulator binding to, and affecting the activity of many *E. coli* targets, including RNA polymerase, GTPase enzymes involved in protein synthesis and ribosome assembly as well as nucleotide biosynthesis enzymes [8-11]. In addition

to (p)ppGpp, related pGpp and pGp nucleotides have been detected in cellular extracts, though their biological significance is not clear and analytic differentiation from GTP and GDP is not trivial [7].

Detection and quantitation of nucleotide pools in bacterial cells consists of three steps: (i) sample acquisition, (ii) extraction and (iii) analysis. During sample acquisition, it is advantageous to separate bacterial cells from the medium. Generally, the whole culture approach results in less sensitive analysis, since the samples are more diluted and include cultivation broth compounds, which results in high background noise. Cells-medium separation then can be done either by centrifugation or filtration. The centrifugation method has been used in metabolomic studies e.g.[12]. However, filtration is superior since it is faster and less prone to affecting the physiology of the cells, and therefore for nucleotide analysis centrifugation should be avoided since it dramatically perturbs the nucleotide pools [13].

The next step is extraction. It is done by cold or hot organic solvent (usually methanol or its mixture with water, acetonitrile or chloroform) [14, 15], acids (formic [16] or acetic [13]) or alkali [17, 18]. In the whole culture sampling approach, the extraction step is omitted, which can be beneficial for some highly labile analytes.

The third step – analysis – is the most challenging one. It was historically done on thin layer chromatography plates developed in two dimensions (2D-TLC) [16]. This method is relatively simple in terms of technical equipment but rather laborious and time-consuming. Moreover, the migration of standards and identified analytes could be misinterpreted, e.g. separation of nucleotide triphosphate from their deoxy counterparts. Finally, quantification of analytes by this method lacks precision. Alternatively, anion Exchange Liquid Chromatography (AEX) [13, 15, 19] and Ion-Pair Liquid Chromatography (IP-LC) [13, 15, 18, 20] have been widely used in nucleotide analysis for decades. Both approaches provide very good separation according to analyte charge and size and detection with UV detectors afford satisfactory quantification of many analytes based on comparison with known standards. However, all analytes have to be baseline-separated for proper quantification and co-eluting compounds that happen to absorb at the same wavelengths could lead to errors in quantification. This can be solved by coupling IP-LC to a mass spectrometry (MS) analysis [21-23]. This approach benefits from well separated analytes along with selective detection. However, using ion pair reagents (even volatile ones) decreases MS signal intensity [24] and renders the MS spectra more complex due to adduct formation. Furthermore, the need to frequently clean MS detectors when ion pair additives are used adds to the work required by this approach. Hence, hydrophilic Interaction Liquid Chromatography (HILIC) appears to be the method of choice for separation of small polar compounds. The major advantage over AEX or IP-LC is the possibility to use MS and thus obtain sensitive and selective detection outputs. AEX could be connected to an MS detector only by using electrolytic suppression [25]. The high organic content in HILIC MS simplifies electrospray evaporation and increases the MS signal intensity. Zwitterionic columns (ZIC-HILIC) represent one type of these columns, where either sulfoalkylbetaine functional groups are bonded to a silica gel support (ZIC-HILIC) or polymer support (ZIC-pHILIC), or where the oppositely charged phosphorylcholine functional groups are bonded to a silica gel support (ZIC-chILIC) (**Fig. 1**). In all cases, strong positive and negative charges are at the exact ratio of 1:1. The permanently charged stationary phase is not affected by the pH of the mobile phase, and thus the pH of the mobile phase influences only the charge of the analytes. Separation is achieved by hydrophilic partitioning combined with weak ionic interactions. HILIC-MS is mainly used in metabolomics studies [26, 27] but recently, this technique is becoming popular in nucleotide analysis [28-30]. In most cases, UV or tandem mass spectrometry (MS/MS)

quantification is used. However, only a few metabolomic studies reports describing the use of a single MS but they quantify only several selected nucleotides [31, 32].

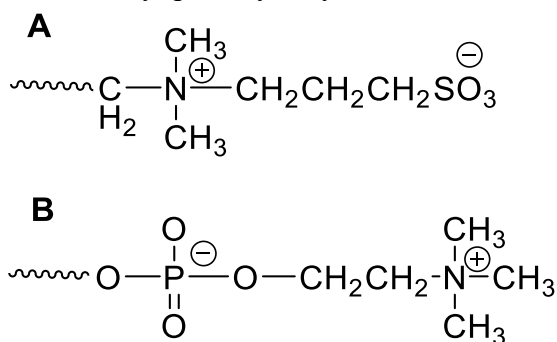


Figure 1. ZIC-HILIC (A) a ZIC-cHILIC (B) column chemistries.

In this study we present a comprehensive and easy-to-use optimized protocol for sensitive detection and quantification of nucleotides and their derivatives. It is based on rapid filtration of cells followed by acidic extraction and separation on high performance liquid chromatography (HPLC) using zwitterionic HILIC columns. Filtration times, six different stationary phases of HILIC columns, various gradients of the mobile phase and different additives and their concentrations and pH were extensively tested. The detection is achieved by a single MS detector – a simple yet powerful analytical tool, typically present in most laboratories. The final optimized and sensitive method yields highly reproducible data for >25 nucleotides and their derivatives, including pGpp and pGp.

Materials and methods

Chemicals

Mupirocin, MOPS, and tricine were purchased from Sigma-Aldrich (USA). Standards were purchased as solids from Sigma Aldrich (AMP, ADP, ATP, CMP, CDP, CTP, dCDP, GMP, GDP, cGMP, dGMP, UMP, UDP, IMP, IDP, ITP, NAD, NADH, NADP, NADPH, ¹³C-ATP) or as a aqueous solutions from Sigma Aldrich (dTTP, dCTP) or Jena Bioscience (dGTP, dITP, dATP, UTP, GTP, ppGpp and pppGpp). Unusual species were synthesized in our lab (ppGp, pGpp, pGp) [according to modified method of [33] as well as internal standard (IS) **ProG** (Fig. 2) [34]. HPLC grade solvents were purchased from VWR (Acetonitrile, Methanol), UPLC-MS grade solvents from Merck (Acetonitrile). Both HPLC and UPLC grade water was obtained via MilliQ filtration system (Merck) with appropriate filters.

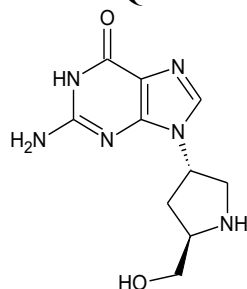


Figure 2. Structure of prolinol nucleoside analog **ProG** which was used as an internal standard. Calculated LogD₅ is -4.8 and logD₇ is -5.1 (as per Marvin calc).

Preparation of standard solutions

All standards were diluted in UPLC grade water to the stock concentration of 1 and 10 mmol/L and stored at -20 °C. NADH and NADPH are very labile and stock solution was used only for one week, after that fresh one was prepared from powder.

Standard mixtures were prepared from stock solutions. There were two standard mixtures: (I.) unstable compounds: NADH, NADPH, ppGpp and pppGpp; and (II.) stable compounds: AMP, ADP, ATP, CMP, CDP, CTP, dCDP, dCTP, GMP, GDP, cGMP, dGMP, UMP, UDP, IMP, IDP, ITP, NAD, NADP, dTTP, dGTP, dITP, dATP, UTP, GTP and pGp and pGpp. ppGp was not used for quantification, since we were not able to separate it properly from isomeric pGpp. These two standard mixtures were prepared at 8 concentration levels: 0.5, 1, 2, 5, 15, 30, 50 and 100 μ M. We have distributed lower part of calibration into more points (1, 3, 6, 10, 15 μ M) for proper determination of shape of calibration curve.

Quality control (QC) mixture was prepared based on published data [16], where defined concentrations were diluted ten to twenty times to mimic on column concentration in measured samples. QC composition is listed in **Tab. S1**.

IS was added into all standard and QC solutions, as well as to all measured samples, to final concentration of 25 mM. Final composition of all standard and QC solutions was 50% acetonitrile and 50% water.

Columns

Six tested HPLC HILIC stationary phases were: (I.) crosslinked diol (Luna HILIC diol, 100 x 4.6 mm, 5 μ m, 200 Å; Phenomenex), (II.) bare silica (Luna SiOH, 100 x 4.6 mm, 5 μ m, 100 Å; Phenomenex), (III.) monolithic amino (Chromolith NH₂, 100 x 4.6 mm, 2 μ m, 130 Å; Merck) and two zwitterionic functional groups – sulfoalkylbetaine bonded to (IV.) polymer support (ZIC-pHILIC, 100 x 4.6 mm, 5 μ m; Merck) or (V.) silica gel support (ZIC-HILIC, 150 x 4.6 mm, 3.5 μ m, 100 Å; 150 x 2.1 mm, 3.5 μ m, 100 Å and 250 x 2.1 mm, 3.5 μ m, 100 Å; Merck) and (VI.) phosphorylcholine bonded to silica support (ZIC-cHILIC, 150 x 2.1 mm, 3 μ m, 100 Å; Merck) (**Fig. 1**).

Instrumentation

Method was developed on HPLC system with binary solvent gradient LC-20AD with single quadrupole mass spectrometer LC-MS 2020 and photodiode array (PDA) detector SPD-M20A (Shimadzu) and optimized on Acquity H-Class UPLC system with hybrid quadrupole-time-of-flight mass spectrometer (qTOF) Xevo G2-XS QToF and Acquity PDA detectors (Waters). Data evaluation was performed using MassLynx software with TargetLynx application manager (Waters).

Analytical parameters

Analysis of *E. coli* extracts were performed on ZIC-HILIC columns (150 x 4.6 mm, 150 x 2.1 mm and 250 x 2.1 mm) with flow rates 0.5 ml/min, 0.3 ml/min and 0.15 ml/min, respectively. Mobile phase A was 10 mM ammonium acetate (NH₄Ac) with pH adjusted to 5 with acetic acid and B was 90% acetonitrile with 10% of 100 mM acidified ammonium acetate pH 5. Induced stringent response was monitored on ZIC-cHILIC columns to separate pppGpp and ppGpp and to improve their MS signal. ZIC-cHILIC column (150 x 2.1 mm) ran at flow rate 0.15 ml/min with mobile phase A = 25 mM NH₄Ac and B = 75% acetonitrile with 25% 100 mM NH₄Ac.

MS quantification was performed by negative electrospray ionization with following parameters: capillary voltage = 2 kV, cone voltage = 20 V, source temperature = 120 °C, desolvation temperature = 400 °C, desolvation gas flow = 400 L/h, cone gas flow = 30 L/h.

Harvesting of bacterial cells and extraction of nucleotides

E. coli K12 strain was grown on lysogeny broth (LB) agar media prior the experiment at 37 °C. Bacterial cultivation and sample processing were adapted from [13]. To prepare *E. coli* inoculum, a fresh bacterial colony on LB agar media was transferred to 2 ml of MOPS medium (40 mM MOPS / 4 mM Tricine adjusted to pH 7.4 with KOH, 1 mM glucose, 9.5 mM NH₄Cl, 0.27 mM K₂SO₄, 1.3 mM K₂HPO₄, 0.52 mM MgCl₂, 50 mM NaCl, 10 μM FeSO₄, 0.002 μM (NH₄)₆Mo₇O₂₄, 0.4 μM H₃BO₃, 0.03 μM CoCl₂, 0.009 μM CuSO₄, 0.08 μM MnCl₂, 0.001 μM ZnSO₄) and incubated 16 hours at 37 °C and 220 rpm. 50 ml of the MOPS medium in 250 ml Erlenmeyer cultivation flask was next inoculated to initial OD₆₀₀ 0.005 and bacterial suspension was cultivated at 250 rpm at 37 °C and until reaching of exponential phase, which was determined by OD₆₀₀ time dependence in the interval of 0.05 to 0.7. To induce the RelA-mediated stringent response the cells were challenged by 20 or 150 μg/ml mupirocin for 5 to 35 min prior the sample collection. In dependence of type of experiment 5 to 8 ml cell suspension was quickly collected from cultivation flask which was quickly vacuum filtered thorough 25 mm 0.45 μm cellulose acetate filter. Membrane with detained bacteria was immediately transferred to 1 ml ice-cold 1M acetic acid in 1.5 ml microtube and frozen in liquid nitrogen. Samples exceeding the time of both filtration and freezing more than 15 s were discarded. For each point of analysis three to five parallel samples were collected to estimate precision of the process extraction. For recovery estimation 1 M acetic acid was spiked by 5 μM ¹³C₁₀-ATP as internal standard. Samples were next slowly thawed on ice and after completing thawing they were next incubated for 30 min on ice with short vortexing in 5 min intervals. Crude bacterial lysate was separated from cellulose acetate filter by short centrifugation (4,000 x g, 30 s) through pinhole at bottom of 1.5 ml microtube assembled with 2 ml collection tube. Lysate was quickly frozen in liquid nitrogen, lyophilized and material was then resuspended in 200 μl of ice-cold deionized water and 30 min incubated on ice. Insoluble material was removed by 20 min centrifugation at 22,000 x g at 4 °C. Clear aqueous bacterial extract was collected and stored at -80 °C to further analysis. For each point we have prepared three to five parallels to estimate precision. Extraction recovery was determined by adding fully isotopically labeled ATP-¹³C₁₀ into extraction media of 1 M acetic acid to final (i.e. in sample) concentration of 25 mmol/L.

Cell volume calculation

Based on the published data [13, 35] we approximated cell number of *E. coli* exponentially growing in liquid LB media at OD₆₀₀ = 0.45 to 3.9 × 10⁸ and cell volume to 1 × 10⁻¹⁵ l.

Validation parameters

Method was validated using ZIC-cHILIC column, 150 x 2.1 mm and ZIC-HILIC column 250 x 2.1 mm according to the guidelines defined in U.S. Pharmacopeia [36] and advises for application in bioanalytical method validation [37].

Selectivity

First, each standard was injected separately to estimate its RT. Next, mixtures of standards with different mobilities were prepared at four concentration levels – 2, 5, 20 and 50 μM . Mixtures 1-7 were composed of: 1) AMP, ADP, ATP, dATP, NAD; 2) GTP, GDP, GMP, dGTP, dGMP, cGMP; 3) CTP, CDP, CMP; 4) UMP, UDP, UTP, dTTP; 5) ITP, IDP, IMP, dITP; 6) pGp, pGpp, ppGpp, NADP; and 7) pppGpp, NADH, NADPH. Standards were distributed to ensure all analytes would be baseline separated and their peak purity was monitored both by MS and UV. Finally, both standard mixtures, as described in *Preparation of standard solutions*, were injected at four concentration levels - 2, 5, 20 and 50 μM , to ensure that the method is capable to properly identify every analyte at various possible concentration level.

Linearity, Limit of Detection, Limit of Quantification

Standard solutions were prepared as described in *Preparation of standard solutions* section. Primarily each standard was analyzed separately to obtain limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ) and also upper limit of quantification, when detector was saturated. LOD was determined as signal to noise ratio (S/N) equals 3 and LOQ as S/N equals 10. Thus, we obtained “quantification area” for these standards. We diluted stock solutions into mixed standard solutions at eight different concentration levels, that were distributed among this area. From the working solutions calibration curve for each standard was plotted as a ratio between analyte response and IS response to IS concentration. We have used linear regression for nucleoside monophosphates and quadratic regression for nucleoside di- and triphosphates with weighting $1/x$.

Accuracy and Precision

We estimated method accuracy on the QC mixture and on standard mixtures at three concentration levels [37], that we have prepared as described in *Preparation of standard solutions*. We determined precision in the terms of repeatability both for biological samples and artificial pool mixtures. Intermediate precision was determined only on QC mixture, since there was serious concern for bacterial extract stability during long-term storage.

Robustness

We tested the influence of temperature, composition of mobile phase (concentration of buffer and its pH), injection volume and composition of injection solvent with keeping the other parameters constant on QC sample. Each point was measured three times. Influence of mobile phase composition was examined only on ZIC-chILIC column.

- 1) Temperature: We heated the column to 30 $^{\circ}\text{C}$, 35 $^{\circ}\text{C}$ and 40 $^{\circ}\text{C}$ and compared the separation to the analyses without heating.
- 2) Buffer concentration: We tested three concentration levels: 20 mM, 23 mM and 25 mM.
- 3) Buffer pH: We compared 100 mM NH_4Ac buffer without pH modification (pH = 6.91) with acidified buffer with acetic acid (pH = 6.65) and alkalinized buffer with ammonia (pH = 7.15). Gradient was as follow: 0% A, 75% B, 25% C for 3 min, 20% A, 55% B, 25% C in 20 min, hold till 25 min. A = water, B = acetonitrile, C = 100 mM NH_4Ac .
- 4) Injection volume and composition of injection solvent: We compared three injection volumes: 1 μL , 2 μL and 3 μL . For each injection volume three compositions of injection solvent were tested – 25% acetonitrile, 50% acetonitrile and 75% acetonitrile.

Matrix effects

Matrix effects (ME) were evaluated through comparing IS response of addition into standard mixture in 50% acetonitrile at various concentration levels with IS response in bacterial growth

medium and bacterial extract and calculated matrix effects as: $ME (\%) = B/A \times 100$ [38]; where A is peak area in standard solution and B is peak area of the standard spiked after extraction. We also compared the ratio of MS response to UV response of synthesized IS added after extraction with the same ratio of isotopically labeled ATP ($^{13}\text{C}_{10}$ -ATP) added into extraction solution. We made this juxtaposition for standard mixtures, extracted MOPs medium and bacterial extracts.

Results

Method development

We started developing the method by preparing a defined mixture of nucleosides and nucleotides and a suitable internal standard (IS) that is essential for quantification of the analytes (see Materials and Methods). The most important requirement for the choice of IS is its natural absence in the sample. The IS should be stable enough and mimic ionization properties of the majority of analytes. IS should absorb in the same region as the analytes for quantity control and its retention time (RT) must differ from RTs of the other analytes. We decided to use non-isotopically labeled IS due to its manipulation ease and cost considerations. As we were focusing mainly on guanosine phosphates, we chose IS with the guanine nucleobase. After evaluation of three different compounds as IS we finally selected the synthetic nucleoside analog **ProG (Fig. 2)** due to its best ionization properties. We always added IS to the sample after extraction and its function was to minimize systematic error and signal fluctuation due to random changes.

Then, we tested resolution of the nucleoside and nucleotide mixtures (including IS) under 12 mobile phase conditions (four different pH levels (3, 5, 7 and 9) combined with three different solvent additives (ammonium formate, ammonium acetate, and ammonium bicarbonate)) on six different, commonly used HILIC columns (see Materials and Methods), yielding a total of 72 combinations.

This systematic screen identified two columns and conditions for the best resolution of complex mixtures of neutral, slightly polar, and very polar compounds. These two columns were the zwitterionic ZIC-HILIC and ZIC-cHILIC columns. These two columns have opposite charges on their surfaces, and, therefore, the separation mechanisms vary. On the negatively charged ZIC-HILIC column, partitioning is aided by electrostatic repulsion (ERLIC) [39] whereas on the positively charged surface of ZIC-cHILIC, partitioning is combined with electrostatic interactions. Therefore, the retention behaviors of these two columns slightly differed. Interestingly, the elution order of the majority of the analytes remained unchanged (see **Tab S2** and **S3**). The most pronounced difference in the elution order (characterized by the mobility of the analyte) was observed for IS, which eluted with the shortest RT at the ZIC-cHILIC stationary phase and with the longest RT on ZIC-HILIC. In both cases it eluted before or after the region where all UV-absorbing species eluted. Hence, the detection of any analyte of interest was not compromised.

The mobile phase affected the resolution and peak shapes of the analytes, depending on the column used. For ZIC-HILIC, slightly acidic conditions (pH 5) improved peak shapes but also decreased the MS signal level, especially in the negative ionization mode as analytes were less charged under these conditions. This phenomenon was more significant for analytes bearing more phosphate groups. Unfortunately, ppGpp and pppGpp were only marginally resolved under these conditions.

To the contrary, the ZIC-cHILIC column was able to separate well pGpp/ppGp, ppGpp and pppGpp under the slightly acidic conditions described above. Nevertheless, pH adjustment of the mobile phase to pH 7 markedly improved their MS signal. To avoid split peaks at neutral conditions for some analytes (mainly AMP or NAD) and to increase the separation factor, higher salt concentration was used (25 mM ammonium acetate instead of 10 mM) (**Fig. 3**). Ammonium ions served as weak ion pair reagents and improved reproducibility. Nevertheless, the higher salt concentration that was used prolonged the equilibration time and also resulted in more frequent MS source cleaning. This is consistent with the literature, where it was reported that the application of volatile strong ion pair reagents in analysis of polar metabolites improves separation efficiency and peak shape [38] but causes signal suppression [28].

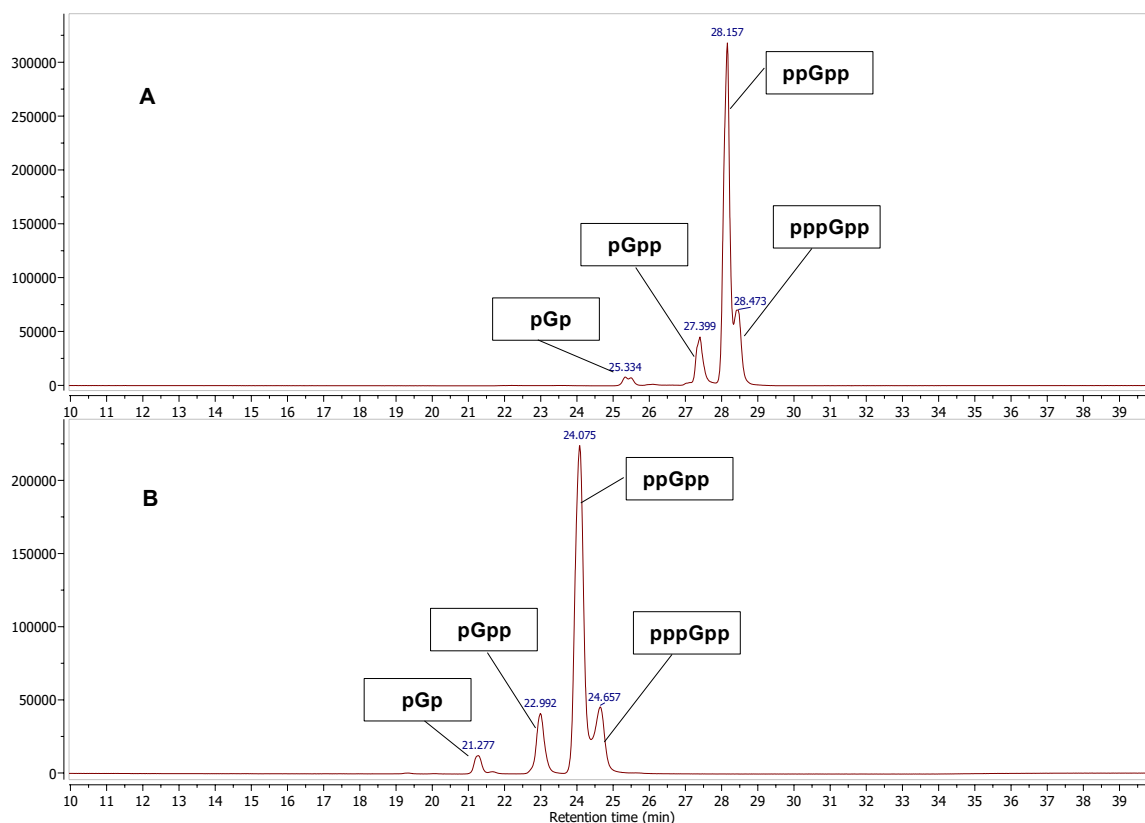


Figure 3. Separation of different guanosine phosphates on ZIC-cHILIC column. Column: ZIC-cHILIC, 150 x 2.1 mm, 3.5 μ m. Gradient condition: (A) 15% A, 75% B, 10% C for 3 min, 25% A, 65% B, 10% C in 20 min, 35% A, 55% B, 10% C in 25 min; (B) 5% A, 75% B, 20% C for 3 min, 25% A, 55% B, 20% C in 20 min, hold till 25 min. A = water, B = acetonitrile, C = 100 mM NH_4Ac .

Using the HILIC mode of separation allowed us to avoid strong ion pair reagents. Although ammonium acetate also caused signal suppression, this suppression was more pronounced for multiply-charged analytes [24]. For singly charged analytes, such as nucleotide species, no significant signal suppression with higher ammonium acetate concentration was observed, especially in the negative ionization mode.

To conclude this part, for resolution of nucleotides and nucleosides, and especially of the stringent response alarmones (p)ppGpp, the ZIC-cHILIC column performed the best. A comparison of the performance of ZIC-HILIC and ZIC-cHILIC columns for 29 analytes is shown in **Tab. S2** and **S3**. The next part validates the ZIC-cHILIC column performance.

Method validation

Selectivity

As our detection method of choice, we selected a single MS detector, a common equipment in most laboratories. Compared to UV, it is more sensitive; compared to MS/MS, it is more user-friendly, not requiring highly trained personnel.

The use of MS detection required that analytes of the same nominal mass did not co-elute (e.g. isomers of guanosine triphosphates or diphosphates, adenosine phosphates with deoxyguanosine phosphate) and that co-eluting substances did not affect their ionization. Furthermore, separation of species with the same nucleobase was also critical as phosphate loss may occur during the ionization process in the source, resulting in e.g. the concomitant presence of triphosphate, di-, and monophosphate in the spectrum (**Fig. 4**). Thus, mono- and diphosphates could be overestimated if they had the same retention time as the triphosphate. This phenomenon is even more pronounced with highly phosphorylated species as (p)ppGpp, where the signal of the species without one phosphate could be even stronger than the parent ion. In the positive ionization mode (ESI⁺), these effects are less significant.

Tab. S4 shows the selectivity performance for selected pairs of analytes mentioned above. We baseline-separated almost all of the tested species except for ppGp and pGpp that eluted at the same time. In the case of ppGpp and pppGpp, a minor overlap was observed after ≈ 100 injections, due to the column aging.

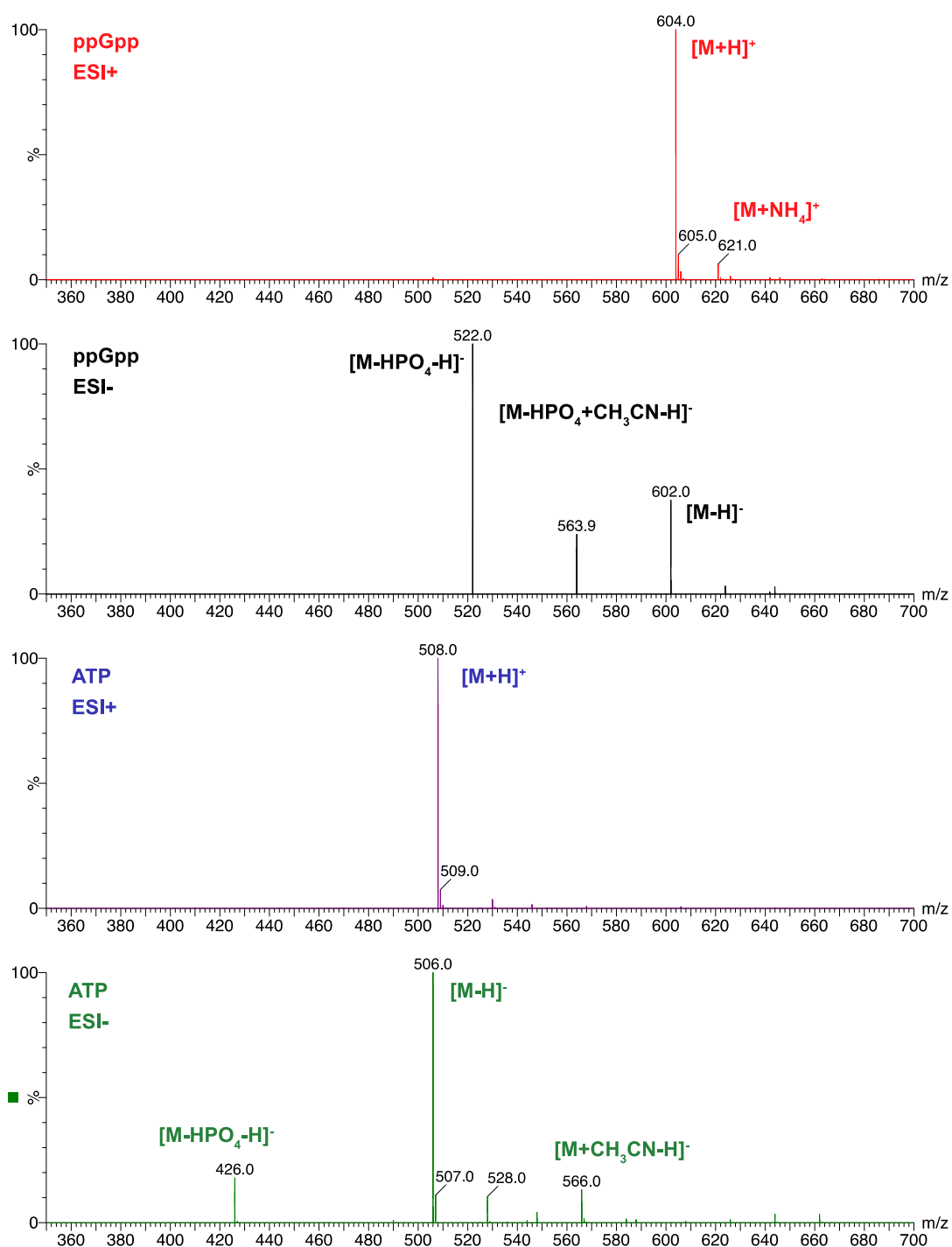


Figure 4. Ionization pattern of ppGpp and ATP in positive and negative ionization mode. In source phosphate loss increase with higher phosphate groups in molecule (ATP vs. ppGpp) and with applied ionization mode, where ESI+ induce phosphate loss in much less extent. Electrospray ionization with following parameters was used: capillary voltage = 2 kV, cone voltage = 20 V, source temperature = 120 °C, desolvation temperature = 400 °C, desolvation gas flow = 400 L/h, cone gas flow = 30 L/h.

Limit of Detection, Limit of Quantification, and Linearity,

Limit of detection (LOD) in solution drifted from 0.2 μM to 2 μM . This corresponded to 0.4 to 4 pmol on the column. Limit of quantitation (LOQ) was approx. 2-5 times higher than LOD. Values for LOD, LOQ are listed in **Tab. S2 and S3**.

Linearity was validated with the calibration curve response. Not every analyte fitted the linear regression within the whole area. However, as extensively reported [40-42], it is not necessary to force the calibration data to a linear curve. In ESI-, the linear range for nucleotide di- and triphosphates is quite narrow. Therefore, using a quadratic function for these analytes covers the entire expected concentration range and provides good reproducibility. Coefficient of determination (R^2) was in all cases > 0.98 and for the majority of analytes even > 0.99 . Further discussion is in the *Calibration curve* section.

Precision and Accuracy

The obtained data were highly precise both in inter-day and intra-day measurements and the relative standard deviation (σ) was lower than 5%, indicating that no significant systematic error had occurred. In the case of accuracy, variance in measured value and true value (expressed as bias) increased at low concentration levels close to LOD. Nevertheless, the values were within the acceptable range according to FDA guidelines [43]. The results are listed in **Tab. S1**.

Robustness

The influence of temperature (**Fig. 5**), buffer concentration (**Fig. 6**), buffer pH (**Fig. 7**), injection volume and composition of injection solvent were tested.

Small increases in both temperature or buffer concentration led to negligibly broader analyte regions, i.e. the first analyte (in our case IS) eluted earlier and the last analyte (in our case pppGpp) eluted later. In the case of temperature this phenomenon was constant for a wide temperature range [44] whereas for buffer concentration it was apparent only above certain concentration value. At lower concentration levels the retention factor decreased with increasing buffer concentration, whereas at higher concentration levels the retention factor increased with increasing buffer concentration [45] (compare **Fig. 3**).

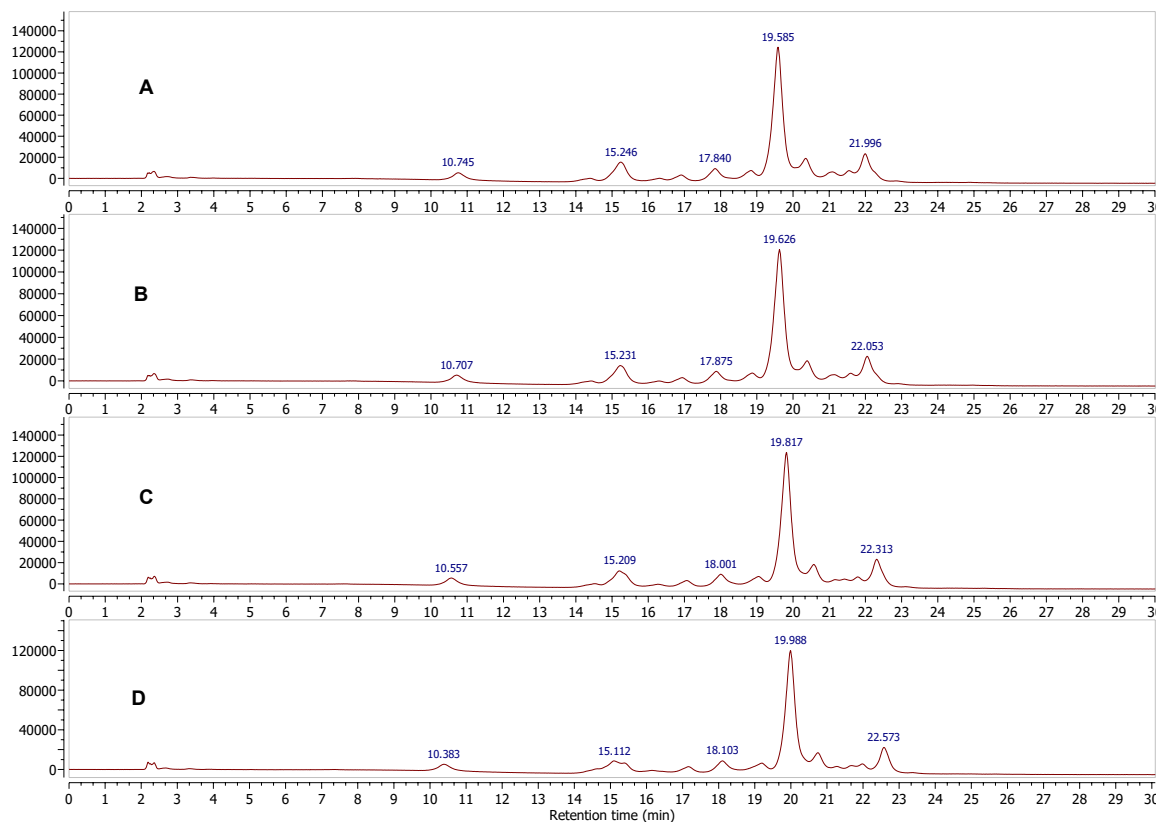


Figure 5. Effect of the temperature on QC sample. Column ZIC-cHILIC, 150 x 2.1 mm, 3 μ m; (A) room temperature, (B) 30 $^{\circ}$ C, (C) 35 $^{\circ}$ C and (D) 40 $^{\circ}$ C.

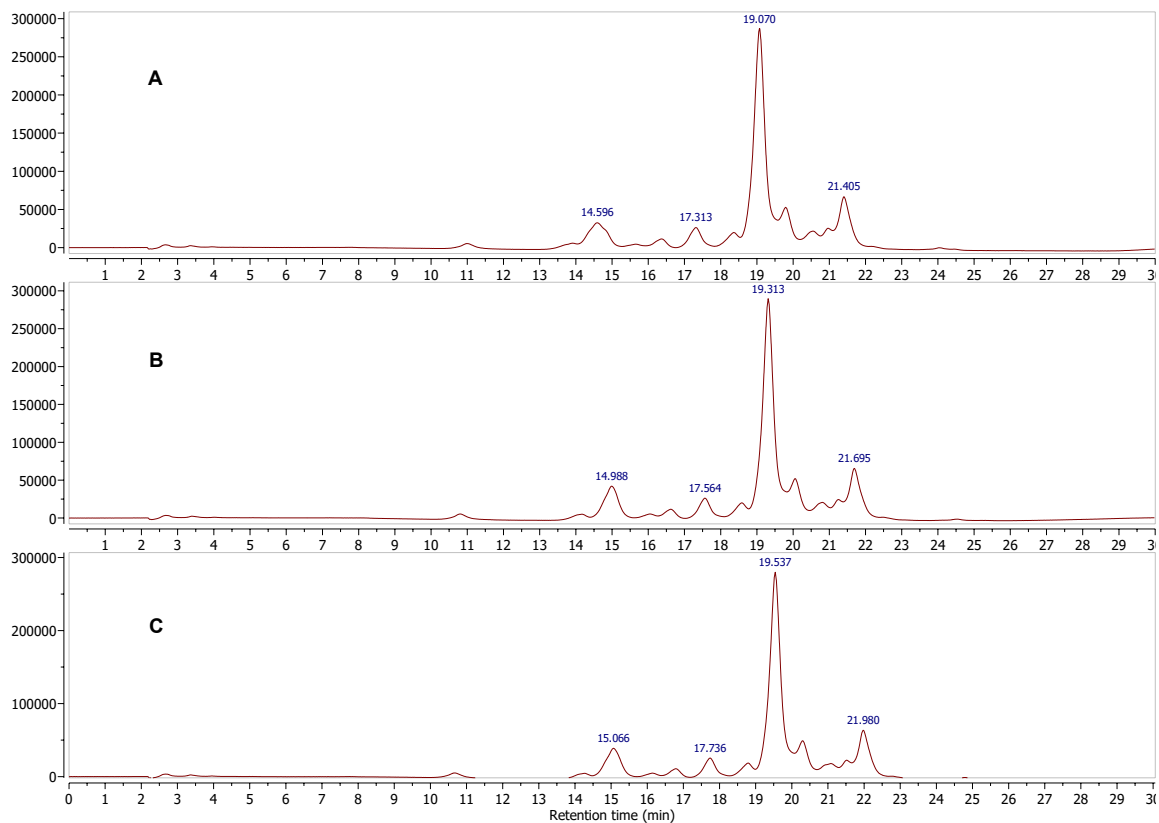


Figure 6. Effect of buffer concentration on QC sample. Column ZIC-cHILIC, 150 x 2.1 mm, 3 μ m. (A) $c(\text{NH}_4\text{Ac}) = 20$ mM. (B) $c(\text{NH}_4\text{Ac}) = 23$ mM. (C) $c(\text{NH}_4\text{Ac}) = 25$ mM.

Small pH changes (0.2 – 0.3 units) around neutral pH resulted in virtually no changes in analyte mobility as shown on **Fig. 8**.

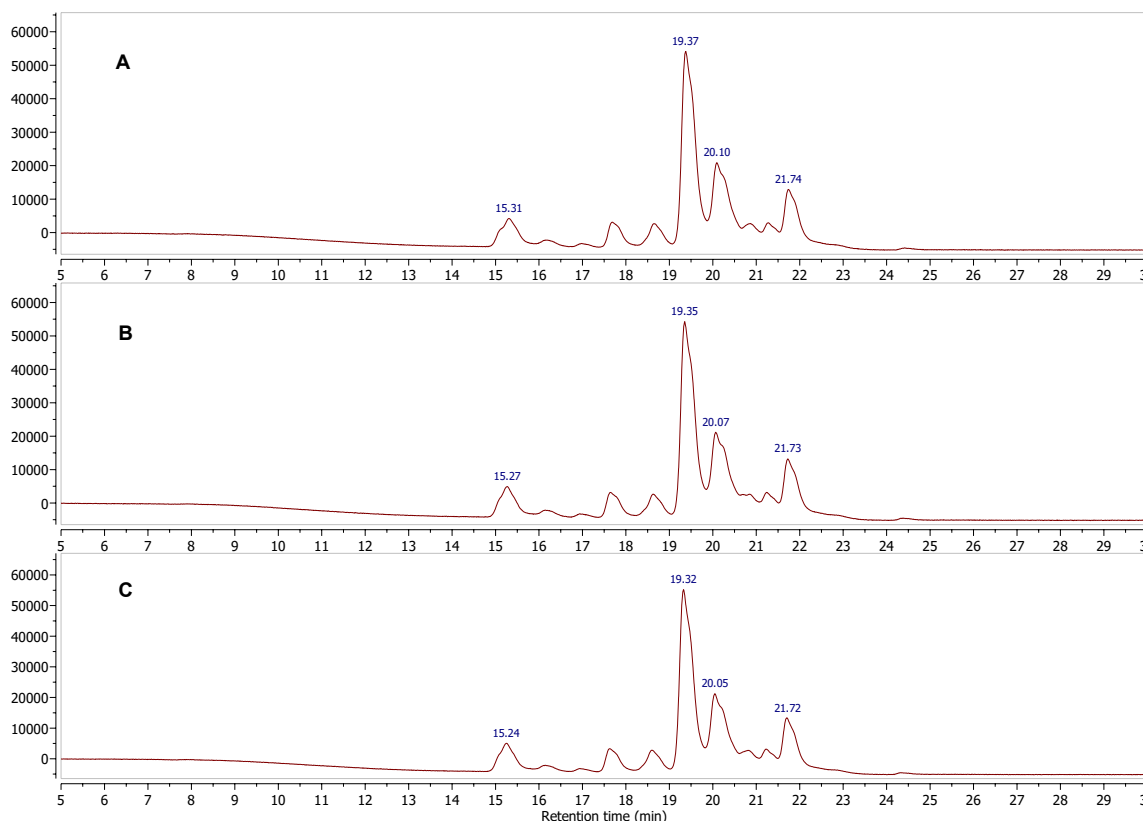


Figure 7. Effect of buffer pH on QC sample. Column ZIC-cHILIC, 150 x 2.1 mm, 3 μ m. (A) pH 6.64. (B) pH 6.91; C) pH 7.11.

The composition of injection solvent and injection volume [46, 47] are known to affect separation in the HILIC mode. We tested different injection volumes and various percentages of acetonitrile (25%, 50% and 75%) with two column sizes (ZIC HILIC 150 mm, 250 mm) and two column types (ZIC-HILIC and ZIC-cHILIC). The results showed, that the smaller injection volume and the higher organic content, the better peak shape is obtained, as was expected. But another finding is connected to polarity of analyte, column dimension and concentration of buffer in mobile phase. The latter the compound eluted, the less affected peak shape is. Buffer content has the same effect, i.e. higher buffer content improved peak shape regardless of the injection solvent composition. More detailed discussion about this phenomenon is in *Injection solvent and volume section*.

Matrix effects

Matrix effects (ME) are present in every complex sample, especially when it contains biological matrices [37]. Therefore, it is necessary to estimate the degree of ME on the obtained results. As the applied extraction method (1 M acetic acid) provided a clean extract without interfering peaks, we did not struggle with severe signal suppression. To prove this, we followed the

recommended protocol [37] and evaluated ME on a standard mixture in 50% acetonitrile, blank growth medium and bacterial extract (see Materials and Methods). The difference between all three conditions in the estimated amount of IS was less than 5% and ME calculated according to *Material and methods* was calculated to 100.5%, i.e. only a negligible signal enhancement was present. For ESI+ we determined ME as 89%, i.e. a moderate signal suppression had occurred. These results are in good agreement with the known characteristic of negative and positive ionization modes: negative ionization mode is known to cause signal suppression to a lower extent than positive ionization [48].

Application of the method to bacterial extracts

As an indicator of the correctness of the obtained results, we used the Adenylate Energy Charge (AEC) ratio (Equation 1) [49], a key parameter that should remain about 0.8-0.9 for viable cells. Low AEC is a strong indicator of sample degradation.

$$\text{AEC} = ([\text{ATP}] + 0.5 [\text{ADP}])/([\text{ATP}] + [\text{ADP}] + [\text{AMP}]) \quad (1)$$

To evaluate the method on biological samples, we used cells of the well characterized *E. coli* K12 strain, using two physiological states: (i) non-stressed exponential phase cultures and (ii) mupirocin-challenged stringent cultures acutely starved for amino acid isoleucine and accumulating high levels of (p)ppGpp. The cells were filter-harvested and extracted as described in *Harvesting and extraction of bacterial cells*. Next, we determined the extraction efficiency using isotopically labeled $^{13}\text{C}_{10}$ -ATP as 64%. The apparent concentrations of analytes were then adjusted by this coefficient. This value was similar to Buckstein [20] who harvested the cells with formic acid and extracted nucleotides by vortexing followed by spinning and gel filtration, and who had estimated the overall recovery to be 71%. Our experimental results of nucleotide pools in exponentially growing *E. coli* in liquid LB media at OD_{600} 0.45 are presented in **Tab. 1** and plotted in **Fig. 8**. Comparison of intracellular concentration of published data with our results could be found in **Table S5** in the Supplementary material. It is evident, that there are substantial differences in absolute numbers amongst the individual reports, but relative distribution of particular nucleotides is significantly more similar (**Tab. S6**), with a few exceptions (e.g. the dTTP estimate by Bennett *et al.* [27]). The discrepancy in absolute numbers could be caused mainly by recalculation to volume of bacterial cell. For estimation of cell number it is possible to use flow cytometry [27] or plate counting [13]. In this report we used our previously published estimates for cell number and volume for *E. coli* exponentially growing in liquid LB media (see *Cell volume calculation* section and [13]).

Table 1. Intracellular concentration of 28 (deoxy)nucleotides in exponentially growing *E. coli* with (mupirocin +) and without (mupirocin -) induced stringent response. Concentration of mupirocin for induction of the stringent response was 150 μ M. Based on the published data [13, 35] we approximated cell number for *E. coli* growing in LB media at the $OD_{600} = 0.45$ to 3.9×10^8 and the cell volume to 1×10^{-15} l. AEC stands for Adenylate Energy Charge.

compound	Intracellular concentration (μ M)	
	Mupirocin -	Mupirocin +
ATP	2024.5	1303.1
ADP	494.4	454.2
AMP	61.7	80.5
GTP	755.0	278.8
GDP	301.6	158.9
GMP	47.7	34.1
cGMP	2.5	4.4
CTP	520.2	340.6
CDP	411.7	526.4
CMP	117.0	172.2
UTP	242.7	162.0
UDP	230.2	244.1
UMP	< LOQ	< LOQ
ITP	871.1	495.8
IDP	126.6	111.4
IMP	115.6	21.1
NAD	698.0	1092.3
NADH	56.1	80.2
NADP	< LOD	< LOD
NADPH	126.9	109.5
dATP	121.7	78.9
dAMP	0.0	0.0
dGTP	88.3	28.0
dGMP	< LOD	< LOD
dCTP	111.3	61.6
dCDP	6.1	8.4
dTTP	553.4	988.1
ppGpp	< LOQ	793.8
pppGpp	< LOQ	459.8
AEC	0.88	0.83

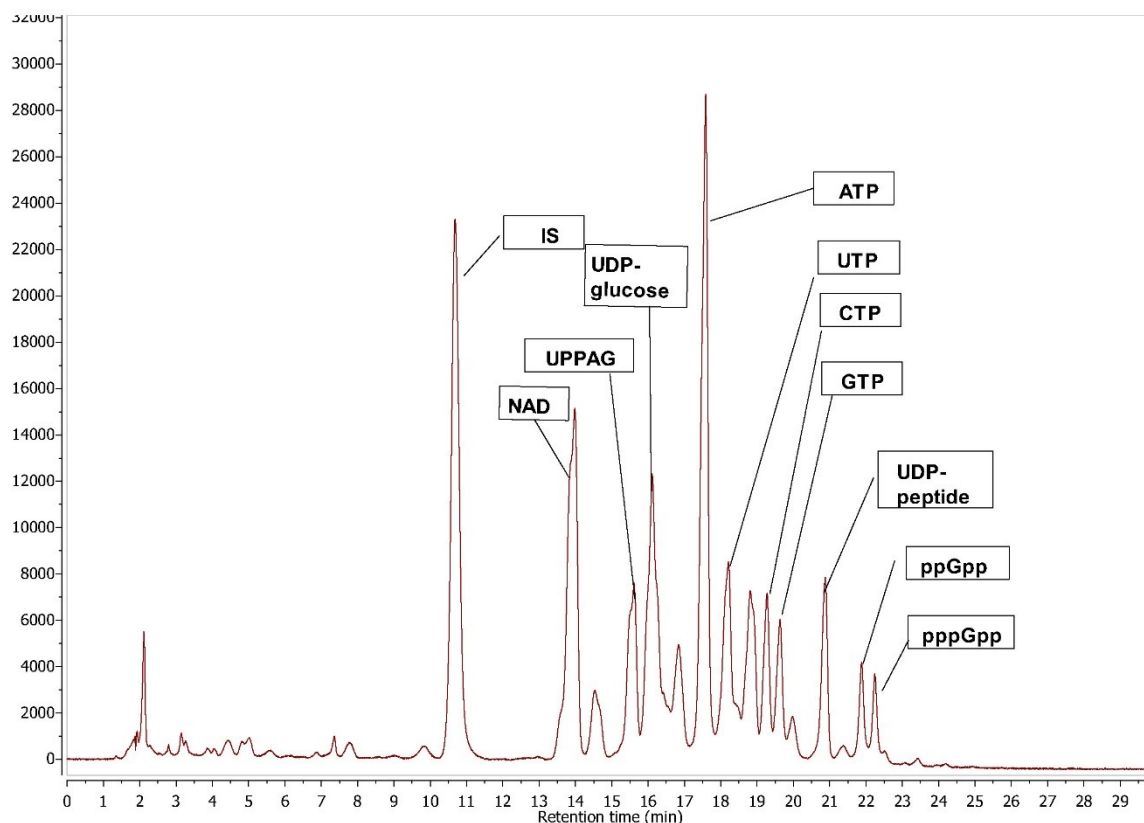


Figure 8. Chromatogram of the *E. coli* K12 extract after induction of acute amino acid starvation by 150 $\mu\text{g/ml}$ mupirocin. Column ZIC-cHILIC, 150 x 2.1 mm, 3 μm . UDP-peptide = UDP-*N*-acetylmuramoyl-L-alanyl-D-glutamyl-6-carboxy-L-lysyl-D-alanyl-D-alanine, UPPAG = UDP- α -*N*-acetyl-D-glucosamine. Analytical parameters: see Materials and Methods section.

Discussion

We developed a reproducible and versatile method for determining nucleotide pools in bacterial cells using HPLC-single MS in the HILIC mode. To our best knowledge, this is the first application of this methodology to analysis of bacterial nucleotide pools. The primary analytical setup consisted of HPLC system coupled with a single quadrupole mass spectrometer and PDA detector. The key aspects of the protocol, especially those requiring extensive optimization, are discussed below.

Injection solvent and volume

Composition of injection solvent and injection volume are critical factors that could cause significant decrease of separation efficiency [46, 47, 50]. Good practice in RP chromatography is to inject sample in solvent close to the initial mobile phase composition. However, highly polar analytes, separated on HILIC, are poorly soluble in high acetonitrile content. For some analytes, mainly for those with adenine base, a double peak was observed when injected in pure water. Acetonitrile or salt addition suppressed this splitting. 50% of acetonitrile appeared to be sufficient to obtain well-defined peak shapes for all tested compounds. Even higher organic content did not improve either the peak shape or the recovery. These findings are in contrast to a study on unmodified Ethylene Bridged Hybrid (BEH) column [46] where relative strength of the injection solvent was reported crucial. The difference is likely due to differences in prior separation steps, stemming from the preferential role of the partitioning mechanism for unmodified BEH particles, and the contribution of weak electrostatic interactions to ZIC-HILIC [51].

Furthermore, and importantly, total volume of injected water should be kept as low as possible. Higher injection volumes affect peak shapes at zwitterionic columns more than composition of the injection solvent does. This is in agreement with published studies [46, 47, 50]. Nevertheless, these studies do not mention that the degree to which the peak is affected depends also on the mobile phase composition and stationary phase chemistry. Peak shapes of well-retained compounds, (those eluted by up to 50% of water) are almost unaffected, regardless of the stationary phase used. However, peaks of early eluted compounds could broaden readily or show severe tailing.

Finally, we investigated the effect of injection solvent and its volume in dependence on the column size and chemistry. Our investigation on three columns (ZIC-HILIC 150 x 2.1 mm, 250 x 2.1 mm and ZIC-cHILIC 150 x 2.1 mm) revealed that the volume of injected water in respect to column void volume and concentration of the used buffer was the most crucial parameter. Higher void volume resulted in higher retention times and thus injection solvent affected less the peak shapes whereas higher buffer concentrations easily reduced the negative impact of added water. Dependencies of retention time on these parameters for ATP, ADP, AMP and pppGpp are shown in **Tab. 3**. RT of AMP strongly depended on injection solvent and higher amounts of water in the injection solvent often led to broad and split peaks. On the other hand, even at the ZIC-HILIC column (150 x 2.1 mm) the last eluted peak of pppGpp remained unaffected by solvent composition.

Table 3. Comparison of chromatographic behavior of selected analytes on different column chemistries and dimension. *c* (NH₄Ac) concentration of ammonium acetate buffer in MF; *V*₀ = column void volume, calculated based on retention time of unretained compound (toluene) and flow rate.

	Analyte	ZIC-HILIC, 250 x 2.1 mm	ZIC-HILIC, 150 x 2.1 mm	ZIC-cHILIC, 150 x 2.1 mm
Reduced retention time (min)	ATP	14.05	11.72	16.94
	ADP	12.07	11.04	15.27
	AMP	8.76	8.11	12.88
	pppGpp	20.01	14.61	21.33
<i>c</i> (NH ₄ Ac) (mM)	10	10	25	
<i>V</i> ₀ (ml)	0.436	0.296	0.296	

Irreproducible retention times

Irreproducible retention times were mainly caused by insufficient column equilibration. We strongly recommend that before starting gradient elution with a new column or mobile phase composition, at least ten gradient full-time programs should be performed [50].

Another cause of irreproducible retention times between analyses could stem from different mobile phase composition as zwitterionic phase is highly sensitive to buffer pH and salt concentration. Moreover, HILIC is generally sensitive to water content and even a small variance in water volume can lead to unequal retention times mainly for early eluting compounds. This may cause problems if a binary gradient pump is used because in this case it is necessary to keep exact composition of the organic mobile phase. To maintain the same ionic strength during the entire separation process, and thus overcome corrupted peak shapes in the first part of the analysis, acetonitrile has to be diluted. This dilution has to reach at least 10% of water content for 10 mM acetate buffers, and 20% of water content for >20 mM acetate buffers. Ammonium acetate is insoluble in aprotic solvents and its insufficient solubility can lead to its precipitation during analysis and may damage the (U)HPLC system.

On-column phosphate loss

During evaluation of the $^{13}\text{C}_{10}$ -ATP experiment, which addressed extraction recovery, we observed also the signal of $^{13}\text{C}_{10}$ -ADP at the intensity of one tenth of the intensity of $^{13}\text{C}_{10}$ -ATP. The cleavage of the γ -phosphate took place on the column and its extent depended on buffer concentration and type of the stationary phase.

As shown on **Fig. 9**, the higher salt concentration the stronger decomposition occurred. Triphosphate decomposition on the negatively charged surface of the ZIC-HILIC column was more concentration dependent than on the positively charged surface of ZIC-cHILIC. The γ -phosphate cleavage was not specific only for ATP but for other triphosphates and (p)ppGpp. The determined concentrations of diphosphates using the ZIC-cHILIC column were thus overestimated by 5-10% when compared to published data (**Tab. S5 and S6**).

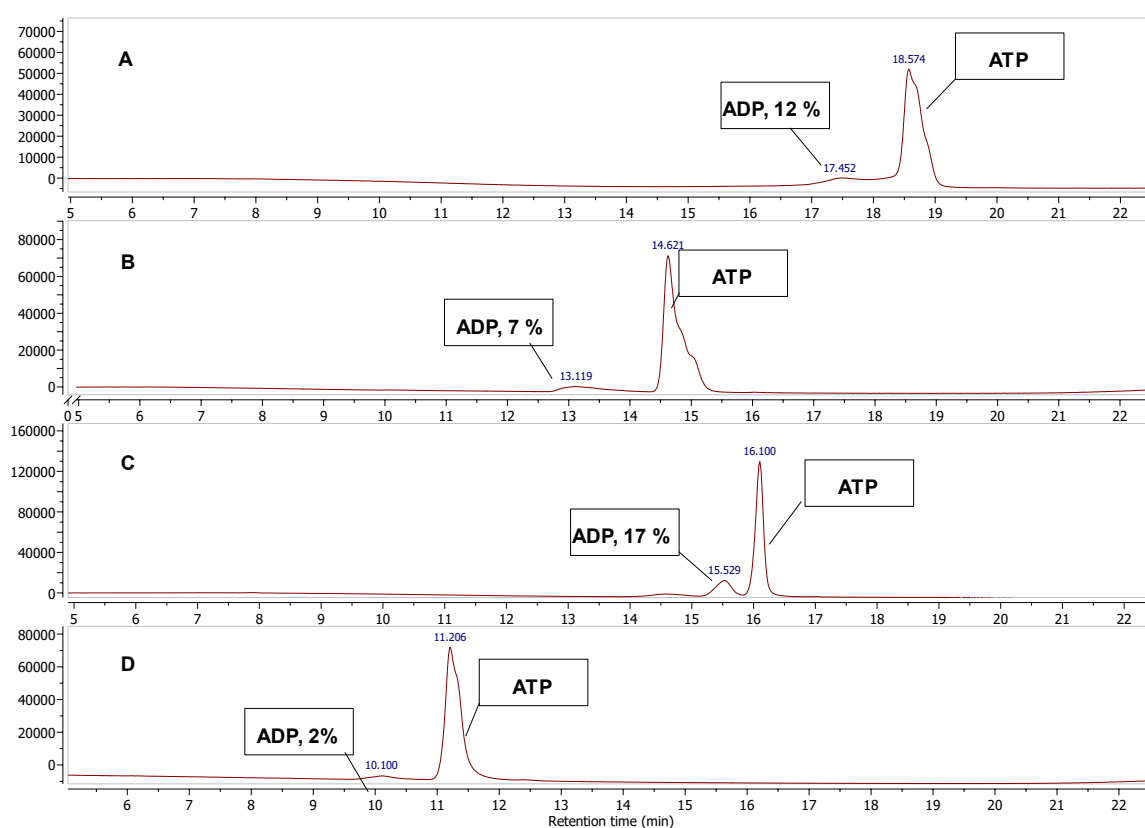


Figure 9 On column decomposition of adenosine triphosphate on two columns at two different buffer concentration. (A) ZIC –cHILIC column, 25 mM NH_4Ac , gradient 1. (B) ZIC –cHILIC column, 10 mM NH_4Ac , gradient 2. (C) ZIC –HILIC column, 25 mM NH_4Ac , gradient 1. (D) ZIC –cHILIC column, 25 mM NH_4Ac , gradient 2. All columns dimension: 150 x 2.1 mm, flow rate: 0,15 mL/min, injection volume: 2 μm . Gradient 1 = 0-2 min 20% B, 20-40% B in 17 min; Gradient 2= 0-3 min 100% B, 100-70% B in 20 min, hold till 25 min; flow rates = 150 $\mu\text{l}/\text{min}$. Column and MF specifications in Materials and Method section.

Drifting MS signal intensity

Drifting MS signal intensity is a poorly understood phenomenon. Usually, the increase in the MS signal for the same compound and the same MS settings over a time period indicate that there is something wrong with the MS detector condition, such as room temperature, vacuum level *etc.* In some experiments with older column (during both standard and biological sample

measurements) we observed continual increase in the MS response without any difference in internal or external conditions. As the MS signal of IS increased as well, the corrected response remained constant. Washing columns with pure solvents without buffer could decrease the signal drifting for a couple of injections, but on the other hand, it could also cause asymmetrical peaks since the active sites of the column were not saturated yet. Replacing an older column with a new one solves this issue. Why the MS signal is drifting for older columns over the time is not clear yet but using a well selected internal standard eliminates incorrect results.

Calibration curve

The calibration curve is usually calculated with a linear regression model, which provides the best fits for the majority of obtained data, especially for those from a UV detector. However, the MS signal does not exhibit linear behavior, especially at higher concentrations close to the detector saturation limit or when adducts are formed in dependence on analyte concentration. There are two other most common possibilities how to interpolate the calibration points – quadratic function or linear log-log function. In our case, the former is suitable for triphosphates or polyphosphates ionized in ESI- (**Fig. 10**) whereas the latter for monophosphates ionized in ESI+.

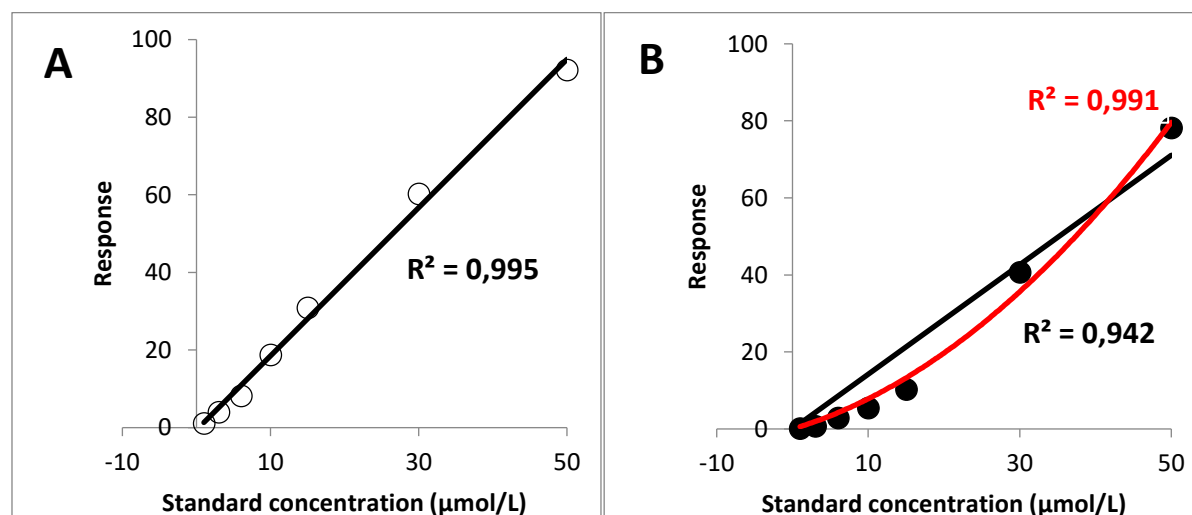


Figure 10: Regression model for calibration curve with appropriate coefficient of determination. (A) Linear regression for AMP; (B) Linear (black line) and quadratic (red line) regression for ATP.

Conclusions

We have developed and validated a simple, fast and versatile method for determination of nucleotide concentrations in bacterial cell samples using a zwitterionic column with single MS detection. The method relies on a positively charged ZIC-chILIC column that proved to be most efficient for complex nucleotide screening and was able to distinguish even between stringent response alarmones ppGpp and pppGpp. A major advantage of this method is the use of single MS detection that is currently a standard equipment in many laboratories. It allows for precise identification of analytes of interest without special knowledge about the instrumentation. The usage of broad range of isotopically labeled standards, as is common in metabolomic analysis, is not necessary here – a single IS is sufficient. Finally, the sensitivity of this method is higher compared to methods using only simple UV detection. Due to its

simplicity and versatility, this ZIC-cHILIC-MS method promises to be applicable to screening nucleotide pools in various bacterial species and be of broad interest to researchers studying cellular metabolism.

Acknowledgements

This work was supported by Czech ministry of health (Grant No.17-29680A to D.R. and L.K.) Czech Science Foundation grant number (grant No. 15-11711S to D.R.), EU and Czech ministry of Education and Sport via JPIAMR (grant No. 8F19006 to D.R. and V.H.), Swedish Research council (grant 2017-03783 to VH) and Charles University, Department of Analytical Chemistry – Specific University Research No. SVV260440 to E.Z.

References

- [1] J. Mukhopadhyay, R. Sur, P. Parrack, Functional roles of the two cyclic AMP-dependent forms of cyclic AMP receptor protein from *Escherichia coli*, *FEBS Lett.* 453(1-2) (1999) 215-218.
- [2] J.R. Tuckerman, G. Gonzalez, M.A. Gilles-Gonzalez, Cyclic di-GMP Activation of Polynucleotide Phosphorylase Signal-Dependent RNA Processing, *J. Mol. Biol.* 407(5) (2011) 633-639.
- [3] A. Guranowski, Specific and nonspecific enzymes involved in the catabolism of mononucleoside and dinucleoside polyphosphates, *Pharmacol. Ther.* 87(2-3) (2000) 117-139.
- [4] C. Pesavento, R. Hengge, Bacterial nucleotide-based second messengers, *Curr. Opin. Microbiol.* 12(2) (2009) 170-176.
- [5] A. Srivatsan, J.D. Wang, Control of bacterial transcription, translation and replication by (p)ppGpp, *Curr. Opin. Microbiol.* 11(2) (2008) 100-105.
- [6] Z.D. Dalebroux, S.L. Svensson, E.C. Gaynor, M.S. Swanson, ppGpp Conjures Bacterial Virulence, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 74(2) (2010) 171-+.
- [7] A.O. Gaca, P. Kudrin, C. Colomer-Winter, J. Beljantseva, K.Q. Liu, B. Anderson, J.D. Wang, D. Rejman, K. Potrykus, M. Cashel, V. Haurlyuk, J.A. Lemos, From (p)ppGpp to (pp)pGpp: Characterization of Regulatory Effects of pGpp Synthesized by the Small Alarmone Synthetase of *Enterococcus faecalis*, *J Bacteriol* 197(18) (2015) 2908-2919.
- [8] W.A. Haseltine, R. Block, SYNTHESIS OF GUANOSINE TETRAPHOSPHATE AND PENTAPHOSPHATE REQUIRES PRESENCE OF A CODON-SPECIFIC, UNCHARGED TRANSFER RIBONUCLEIC-ACID IN ACCEPTOR SITE OF RIBOSOMES - (STRINGENT CONTROL PPGPP (MSI) AND PPPGPP (MSII) PROTEIN SYNTHESIS *ESCHERICHIA-COLI*), *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 70(5) (1973) 1564-1568.
- [9] M. Cashel, Inhibition of Rna Polymerase by Ppgpp, a Nucleotide Accumulated during Stringent Response to Amino Acid Starvation in *E-Coli*, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 35 (1970) 407-+.
- [10] C.C. Boutte, S. Crosson, Bacterial lifestyle shapes stringent response activation, *Trends Microbiol.* 21(4) (2013) 174-180.
- [11] Y. Zhang, E. Zbornikova, D. Rejman, K. Gerdes, Novel (p)ppGpp Binding and Metabolizing Proteins of *Escherichia coli*, *mBio* 9(2) (2018).
- [12] D. Oursel, C. Loutelier-Bourhis, N. Orange, S. Chevalier, V. Norris, C.M. Lange, Identification and relative quantification of fatty acids in *Escherichia coli* membranes by gas chromatography/mass spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 21(20) (2007) 3229-3233.
- [13] V. Varik, S.R.A. Oliveira, V. Haurlyuk, T. Tenson, HPLC-based quantification of bacterial housekeeping nucleotides and alarmone messengers ppGpp and pppGpp, *Sci. Rep.* 7 (2017).
- [14] H. Meyer, M. Liebeke, M. Lalk, A protocol for the investigation of the intracellular *Staphylococcus aureus* metabolome, *Anal. Biochem.* 401(2) (2010) 250-259.
- [15] C.J. Bolten, P. Kiefer, F. Letisse, J.C. Portais, C. Wittmann, Sampling for metabolome analysis of microorganisms, *Anal. Chem.* 79(10) (2007) 3843-3849.
- [16] B.R. Bochner, B.N. Ames, Complete Analysis of Cellular Nucleotides by Two-Dimensional Thin-Layer Chromatography, *J. Biol. Chem.* 257(16) (1982) 9759-9769.
- [17] A. Lundin, A. Thore, COMPARISON OF METHODS FOR EXTRACTION OF BACTERIAL ADENINE-NUCLEOTIDES DETERMINED BY FIREFLY ASSAY, *Applied Microbiology* 30(5) (1975) 713-721.

- [18] R. Little, H. Bremer, QUANTITATION OF GUANOSINE 5'3'-BISDIPHOSPHATE IN EXTRACTS FROM BACTERIAL-CELLS BY ION-PAIR REVERSE-PHASE HIGH-PERFORMANCE LIQUID-CHROMATOGRAPHY, *Anal Biochem* 126(2) (1982) 381-388.
- [19] K. Ochi, J.C. Kandala, E. Freese, INITIATION OF BACILLUS-SUBTILIS SPORULATION BY THE STRINGENT RESPONSE TO PARTIAL AMINO-ACID DEPRIVATION, *J. Biol. Chem.* 256(13) (1981) 6866-6875.
- [20] M.H. Buckstein, J. He, H. Rubin, Characterization of nucleotide pools as a function of physiological state in *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.* 190(2) (2008) 718-726.
- [21] F.F. Ji, Y. Shen, L.H. Tang, Z.W. Cai, Determination of intracellular metabolites concentrations in *Escherichia coli* under nutrition stress using liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Talanta* 189 (2018) 1-7.
- [22] X. Qin, X. Wang, Quantification of nucleotides and their sugar conjugates in biological samples: Purposes, instruments and applications, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 158 (2018) 280-287.
- [23] R.M. Seifar, C. Ras, A.T. Deshmukh, K.M. Bekers, C.A. Suarez-Mendez, A.L.B. da Cruz, W.M. van Gulik, J.J. Heijnen, Quantitative analysis of intracellular coenzymes in *Saccharomyces cerevisiae* using ion pair reversed phase ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1311 (2013) 115-120.
- [24] M. Holcapek, K. Volna, P. Jandera, L. Kolarova, K. Lemr, M. Exner, A. Cirkva, Effects of ion-pairing reagents on the electrospray signal suppression of sulphonated dyes and intermediates, *J. Mass Spectrom.* 39(1) (2004) 43-50.
- [25] L.F. Leo Jinyuan Wang, Yinsheng Wang, Hongxia (Jessica) Wang, Bill Schnute and Guifeng Jiang, Quantitative Profiling of Nucleotides Using Capillary IC-MS/MS, Thermo Fischer Scientific, 2012.
- [26] W. Lu, B.D. Bennett, J.D. Rabinowitz, Analytical strategies for LC-MS-based targeted metabolomics, *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 871(2) (2008) 236-242.
- [27] B.D. Bennett, J. Yuan, E.H. Kimball, J.D. Rabinowitz, Absolute quantitation of intracellular metabolite concentrations by an isotope ratio-based approach, *Nat. Protoc.* 3(8) (2008) 1299-1311.
- [28] M.G. Kokotou, N.S. Thomaidis, Characterization of the Retention of Artificial Sweeteners by Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography, *Anal. Lett.* 51(1-2) (2018) 49-72.
- [29] M. Cortese, C. Delporte, D. Dufour, C. Noyon, M. Chaumont, B. De Becker, F. Reye, A. Rousseau, E. Omer, J. Neve, M. Piagnerelli, K.Z. Boudjeltia, B. Robaye, P. Van Antwerpen, Validation of a LC/MSMS method for simultaneous quantification of 9 nucleotides in biological matrices, *Talanta* 193 (2019) 206-214.
- [30] Z. Kong, S. Jia, A.L. Chabes, P. Appelblad, R. Lundmark, T. Moritz, A. Chabes, Simultaneous determination of ribonucleoside and deoxyribonucleoside triphosphates in biological samples by hydrophilic interaction liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry, *Nucleic acids research* 46(11) (2018) e66.
- [31] J. Hiller, E. Franco-Lara, D. Weuster-Botz, Metabolic profiling of *Escherichia coli* cultivations: evaluation of extraction and metabolite analysis procedures, *Biotechnol. Lett.* 29(8) (2007) 1169-1178.
- [32] P. Kiefer, J.C. Portais, J.A. Vorholt, Quantitative metabolome analysis using liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry, *Anal Biochem* 382(2) (2008) 94-100.
- [33] C. Schattenkerk, C.T.J. Wreesmann, G.A. Vandermarel, J.H. Vanboom, SYNTHESIS OF RIBOGUANOSINE PENTAPHOSPHATE PPPGPP (MAGIC SPOT-II) VIA A PHOSPHOTRIESTER APPROACH, *Nucleic Acids Res* 13(10) (1985) 3635-3649.
- [34] M.L. Peterson, R. Vince, SYNTHESIS AND BIOLOGICAL EVALUATION OF 4-PURINYLPYRROLIDINE NUCLEOSIDES, *J. Med. Chem.* 34(9) (1991) 2787-2797.
- [35] B. Volkmer, M. Heinemann, Condition-Dependent Cell Volume and Concentration of *Escherichia coli* to Facilitate Data Conversion for Systems Biology Modeling, *PLoS One* 6(7) (2011) 6.
- [36] U.S. Pharmacopeia, Validation of compendial procedures <1225>, in: U.S.P. Convention (Ed.) 40, 2016.
- [37] O. Gonzalez, M.E. Blanco, G. Iriarte, L. Bartolome, M.I. Maguregui, R.M. Alonso, Bioanalytical chromatographic method validation according to current regulations, with a special focus on the non-

- well defined parameters limit of quantification, robustness and matrix effect, *J. Chromatogr. A* 1353 (2014) 10-27.
- [38] F. Gosetti, E. Mazzucco, D. Zampieri, M.C. Gennaro, Signal suppression/enhancement in high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1217(25) (2010) 3929-3937.
- [39] A.J. Alpert, Electrostatic repulsion hydrophilic interaction chromatography for isocratic separation of charged solutes and selective isolation of phosphopeptides, *Anal. Chem.* 80(1) (2008) 62-76.
- [40] I.C.o.H.o.T.R.f.r.o.p.f.h. use, R1: Validation of Analytical procedures, Geneva, 2005.
- [41] E. Rozet, A. Ceccato, C. Hubert, E. Ziemons, R. Oprean, S. Rudaz, B. Boulanger, P. Hubert, Analysis of recent pharmaceutical regulatory documents on analytical method validation, *J. Chromatogr. A* 1158(1-2) (2007) 111-125.
- [42] J.W. Lee, V. Devanarayan, Y.C. Barrett, R. Weiner, J. Allinson, S. Fountain, S. Keller, I. Weinryb, M. Green, L. Duan, J.A. Rogers, R. Millham, P.J. O'Brien, J. Sailstad, M. Khan, C. Ray, J.A. Wagner, Fit-for-purpose method development and validation for successful biomarker measurement, *Pharm. Res.* 23(2) (2006) 312-328.
- [43] F.a.D.A. U.S. Department of Health and Human Services, Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation, 2013.
- [44] E. Johnsen, S.R. Wilson, I. Odsbu, A. Krapp, H. Malerod, K. Skarstad, E. Lundanes, Hydrophilic interaction chromatography of nucleoside triphosphates with temperature as a separation parameter, *J. Chromatogr. A* 1218(35) (2011) 5981-5986.
- [45] A.J. Alpert, Effect of salts on retention in hydrophilic interaction chromatography, *J. Chromatogr. A* 1538 (2018) 45-53.
- [46] J.C. Heaton, D.V. McCalley, Some factors that can lead to poor peak shape in hydrophilic interaction chromatography, and possibilities for their remediation, *J. Chromatogr. A* 1427 (2016) 37-44.
- [47] A. Technologies, Hydrophilic Interaction Chromatography Method Development Troubelshooting, 2018.
- [48] J.M. Marin, E. Gracia-Lor, J.V. Sancho, F.J. Lopez, F. Hernandez, Application of ultra-high-pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry to the determination of multi-class pesticides in environmental and wastewater samples Study of matrix effects, *J. Chromatogr. A* 1216(9) (2009) 1410-1420.
- [49] D.E. Atkinson, Energy Charge of Adenylate Pool as a Regulatory Parameter . Interaction with Feedback Modifiers, *Biochemistry* 7(11) (1968) 4030-&.
- [50] R. Corporation, How To Avoid Common Problems with HILIC Method Development, 2017.
- [51] D. Garcia-Gomez, E. Rodriguez-Gonzalo, R. Carabias-Martinez, Stationary phases for separation of nucleosides and nucleotides by hydrophilic interaction liquid chromatography, *Trac-Trends Anal. Chem.* 47 (2013) 111-128.

Supplementary

Table S1: QC mixture composition and measured intermediate precision with standard deviation (n=3). Column ZIC-CHILIC, 150 x 2.1 mm.

Compound	In vitro concentration (μmol/L)	Measured concentration (μmol/L)	bias (%)
ATP	150	143	8%
ADP	25	45	13%
AMP	10	26	5%
dATP	17.5	22	6%
GTP	60	53.5	1%
GDP	10	7.5	9%
GMP	0.2	0.5	16%
dGTP	12	13.5	5%
CTP	50	44.5	2%
UTP	50	54.5	1%
UDP	9	11	0%
NAD	30	28	5%
NADH	15	8.4	20%
NADP	10	11.6	24%
NADPH	10	6.9	27%
ppGpp	3	3.5	35%
pppGpp	2	3.0	36%

Table S2: Validation parameters for ZIC-HILIC column. (250 x 2.1 mm, 3.5 μm ; flow rate = 0.15 mL/min). LOD = Limit of detection, LOQ = Limit of quantification, N.D. = Not determined.

Analyte	[M-H] ⁻	LOD ($\mu\text{mol/L}$)	LOQ ($\mu\text{mol/L}$)	Tf	As	r.t. (min)
cGMP	344.05	<1	1	1.17	1.35	7.65
NADH	644.11	2	5	1.11	1.21	8.33
AMP	346.05	1	2	0.81	0.63	10.92
dGMP	346.06	1	2	1.15	1.28	11.30
NAD	662.09	2	5	1.26	1.55	12.51
UMP	323.04	1	2	0.84	0.68	13.25
IMP	347.04	2	3	1.12	1.23	13.93
ADP	426.02	3	5	1.17	1.32	13.94
dTTP	480.98	3	5	1.00	1.01	14.68
dATP	489.99	5	10	1.11	1.20	14.98
UDP	402.99	2	3	1.06	1.11	15.33
NADPH	744.08	3	10	1.02	1.04	15.53
ATP	505.99	3	5	1.37	0.59	15.82
CMP	322.05	1	2	1.12	1.41	16.30
IDP	427.00	5	10	0.95	0.89	16.48
GMP	362.05	1	2	1.17	1.34	16.61
dITP	490.97	3	5	1.33	1.67	16.64
UTP	482.97	3	5	1.78	2.58	17.01
CDP	402.01	3	5	0.96	0.92	17.30
ITP	506.99	5	10	1.26	1.52	17.50
NADP	742.06	3	10	1.28	1.52	18.11
GDP	442.02	3	5	1.14	1.58	18.25
dGTP	505.99	5	10	1.30	1.60	18.30
CTP	481.97	3	5	1.43	1.85	18.83
pGp	426.02	5	10	1.47	1.95	19.46
GTP	521.98	5	10	1.73	2.38	19.47
pGpp	521.98	5	10	1.06	1.11	21.25
ppGpp	601.97	10	30	1.28	1.59	21.80
pppGpp	681.97	10	30	1.26	1.48	22.05
IS250	249.11	N.D.	N.D.	1.12	1.22	22.65

Table S3: Validation parameters for ZIC-cHILIC column (150 x 2.1 mm, 3 μ m; flow rate 0.15 mL/min).
 LOD = Limit of detection, LOQ = Limit of quantification, N.D. = Not determined.

Analyte	[M-H] ⁻	LOD (μ mol/L)	LOQ (μ mol/L)	Tf	As	r.t. (min)
cGMP	344.05	<0.2	0.2	0.80	0.61	<i>9.61</i>
IS250	249.11	N.D.	N.D.	1.18	1.35	<i>11.35</i>
NADH	644.11	0.6	1	1.18	1.36	<i>13.79</i>
AMP	346.05	<0.2	0.2	1.08	1.17	<i>14.82</i>
NAD	662.09	0.2	0.6	0.97	0.93	<i>14.97</i>
UMP	323.04	0.2	0.6	0.97	0.91	<i>15.77</i>
IMP	347.04	0.2	0.6	0.97	0.93	<i>16.50</i>
dGMP	346.06	0.2	1	0.90	0.79	<i>16.75</i>
ADP	426.02	0.2	0.6	1.06	1.12	<i>17.13</i>
dTTP	480.98	0.6	2	0.98	0.90	<i>17.44</i>
CMP	322.05	<0.2	0.2	0.96	0.93	<i>17.68</i>
UDP	402.99	0.6	2	1.14	1.29	<i>17.82</i>
NADPH	744.08	2.5	5	0.96	0.94	<i>17.89</i>
GMP	362.05	<0.2	0.2	1.05	1.11	<i>17.92</i>
ITP	506.99	0.6	2	1.18	1.36	<i>18.02</i>
dATP	489.99	0.2	1	1.05	1.08	<i>18.11</i>
IDP	427.00	0.6	2	0.96	0.93	<i>18.37</i>
ATP	505.99	0.2	1	1.20	1.38	<i>18.74</i>
CDP	402.01	0.2	3	1.13	1.24	<i>19.09</i>
dITP	490.97	0.2	1	1.15	1.30	<i>19.15</i>
UTP	482.97	0.6	2	1.03	1.05	<i>19.32</i>
GDP	442.02	0.2	1	0.98	0.97	<i>19.46</i>
dGTP	505.99	0.6	2	1.00	1.00	<i>20.05</i>
NADP	742.06	0.6	1	1.01	1.02	<i>20.39</i>
CTP	481.97	0.6	3	1.13	1.25	<i>20.40</i>
GTP	521.98	0.6	2	0.98	0.98	<i>20.78</i>
pGp	442.02	0.2	1	1.21	1.42	<i>21.13</i>
pGpp	521.98	0.6	2	1.00	0.99	<i>21.95</i>
ppGpp	601.97	2	5	1.07	1.13	<i>22.66</i>
pppGpp	681.97	2	5	1.32	1.66	<i>23.37</i>

Table S4: Retention factor (k_A), separation factor (α) and resolution (R_s) of critical pair of analytes

Analyte	[M-H] ⁻	r.t. (min)	k_A	α	R_s
ATP	505.99	18.74	8.51	1.08	2.18
dGTP	505.99	20.05	9.18		
AMP	346.05	14.82	6.52	1.15	1.74
dGMP	346.06	16.75	7.50		
dATP	489.99	18.11	8.19	1.06	1.53
dITP	490.97	19.15	8.72		
CTP	481.97	20.4	9.36	1.06	1.79
UTP	482.97	19.32	8.81		
pppGpp	681.97	23.37	10.86	1.09	1.62
ppGpp	601.97	21.66	9.99		
GTP	521.98	20.78	9.55	1.06	2.55
pGpp	521.98	21.95	10.14		
GDP	442.017	19.46	8.88	1.10	1.99
pGp	442.017	21.13	9.73		
NADH	664.11	13.79	6.00	1.10	1.38
NAD	662.09	14.97	6.60		
NADPH	744.08	17.89	8.08	1.16	1.10
NADP	742.06	20.39	9.35		

Table S5: Comparison of intracellular concentration of published data with our results.

compound	Intracellular concentration ($\mu\text{mol/L}$)					
	<i>S. enterica</i> , Bochner, 1982	<i>E.coli</i> , Buckstein, 2007	<i>E. coli</i> , Varik, 2017	<i>E. coli</i> , Bennett, 2009	<i>E. Coli</i> , No mupirocine	<i>E. Coli</i> , Mupirocine (150 $\mu\text{g/mL}$)
ATP	3000	3560	2200	9600	2024.5	1303.1
ADP	250	116	430	560	494.4	454.2
AMP	100		88	280	61.7	80.5
dATP	175	181		16	121.7	78.9
dAMP				9	0.0	0.0
GTP	900	1660	900	4900	755.0	278.8
GDP	125	203	160	680	301.6	158.9
GMP	20		58	24	47.7	34.1
dGTP	120	92			88.3	28.0
dGMP				51	< LOD	< LOD
IMP	160			270	115.6	21.1
CTP	500	325	570	2700	520.2	340.6
CDP	80				411.7	526.4
CMP				360	117.0	172.2
dCTP	60	184		35	111.3	61.6
UTP	900	667	970	8300	242.7	162.0
UDP	90	54		1800	230.2	244.1
UMP	140				< LOQ	< LOQ
dTTP	80	256		4600	553.4	988.1
NAD	300			2600	698.0	1092.3
NADH				83	56.1	80.2
NADP	200			2	< LOD	< LOD
NADPH				12	126.9	109.5
ppGpp	30		120		< LOQ	793.8
pppGpp	20				< LOQ	459.8
ITP					871.1	495.8
IDP					126.6	111.4
cGMP					2.5	4.4
dCDP					6.1	8.4
AEC	0.93	0.98	0.88	0.95	0.88	0.83

Table S6: Comparison of relative intracellular concentration of published data with our results; ATP = 100 %.

compound	Intracellular concentration ($\mu\text{mol/L}$)					
	<i>S. enterica</i> , Bochner, 1982[1]	<i>E.coli</i> , Buckstein, 2007[2]	<i>E. coli</i> , Varik, 2017[3]	<i>E. coli</i> , Bennett, 2009[4]	<i>E. Coli</i> , No mupirocine	<i>E. Coli</i> , Mupirocine (150 ug/mL)
ATP	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
ADP	8.3%	3.3%	19.5%	5.8%	24.4%	34.9%
AMP	3.3%		4.0%	2.9%	3.0%	6.2%
dATP	5.8%	5.1%		0.2%	6.0%	6.1%
dAMP				0.1%		
GTP	30.0%	46.6%	40.9%	51.0%	37.3%	21.4%
GDP	4.2%	5.7%	7.3%	7.1%	14.9%	12.2%
GMP	0.7%		2.6%	0.3%	2.4%	2.6%
dGTP	4.0%	2.6%			4.4%	2.1%
dGMP				0.5%	0.0%	0.0%
IMP	5.3%			2.8%	5.7%	1.6%
CTP	16.7%	9.1%	25.9%	28.1%	25.7%	26.1%
CDP	2.7%				20.3%	40.4%
CMP				3.8%	5.8%	13.2%
dCTP	2.0%	5.2%		0.4%		
UTP	30.0%	18.7%	44.1%	86.5%	12.0%	12.4%
UDP	3.0%	1.5%		18.8%	11.4%	18.7%
UMP	4.7%					
dTTP	2.7%	7.2%		47.9%	27.3%	75.8%
NAD	10.0%			27.1%	34.5%	83.8%
NADH				0.9%	2.8%	6.2%
NADP	6.7%			0.02%		
NADPH				0.1%	6.3%	8.4%
ppGpp	1.0%		5.5%			60.9%
pppGpp	0.7%					35.3%
ITP					43.0%	38.0%
IDP					6.3%	8.5%

- [1] B.R. Bochner, B.N. Ames, Complete Analysis of Cellular Nucleotides by Two-Dimensional Thin-Layer Chromatography, *Journal of Biological Chemistry* 257(16) (1982) 9759-9769.
- [2] M.H. Buckstein, J. He, H. Rubin, Characterization of nucleotide pools as a function of physiological state in *Escherichia coli*, *Journal of Bacteriology* 190(2) (2008) 718-726.
- [3] V. Varik, S.R.A. Oliveira, V. Haurlyuk, T. Tenson, HPLC-based quantification of bacterial housekeeping nucleotides and alarmone messengers ppGpp and pppGpp, *Scientific Reports* 7 (2017).
- [4] B.D. Bennett, E.H. Kimball, M. Gao, R. Osterhout, S.J. Van Dien, J.D. Rabinowitz, Absolute metabolite concentrations and implied enzyme active site occupancy in *Escherichia coli*, *Nature Chemical Biology* 5(8) (2009) 593-599.