

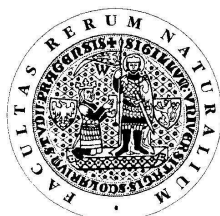
UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

---

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Chemie v přírodních vědách



Martina Černá

ANALÝZA ADENOSINTRIFOSFÁTU

A ADENOSINDIFOSFÁTU POMOCÍ HPLC-MS/MS

Analysis of adenosine triphosphate and adenosine diphosphate by  
HPLC-MS/MS

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: doc. RNDr. Pavel Coufal, Ph.D.

Praha 2011

## **Prohlášení**

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

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

V Praze dne 27. května 2011

Martina Černá

## **Abstrakt**

V této bakalářské práci byly analyzovány a detekovány vzorky adenosindifosfátu a adenosintrifosfátu pomocí metody HPLC-MS/MS. V rámci tohoto bakalářského projektu byly nalezeny orientační limity detekce (LOD) studovaných látek a tyto hodnoty byly porovnány s LOD zjištěnými v literatuře při použití stejných metod a velmi podobných experimentálních podmínek. Stanovené limity detekce nukleotidů byly srovnatelné s limity detekce v literatuře. Analýza pomocí hmotnostní spektrometrie byla prováděna při mnohonásobném reakčním monitorování v pozitivním i negativním módu a k ionizaci analytů došlo elektrosprejem. Optimálních podmínek pro analýzu ADP a ATP pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie bylo dosaženo použitím kolony ZIC - HILIC s mobilní fází o složení 75:25 (v/v) acetonitril / 10 mM octan amonný. Octan amonný měl pH nastavené na hodnotu 7,15 a dělení probíhalo při izokratické eluci.

## **Abstract**

In this bachelor thesis, ADP and ATP samples were analysed and detected with HPLC-MS/MS method. Approximate limit of detection (LOD) for these particular substances were found and their values were compared with the LOD values published in the literature obtained via the same methods and under very similar experimental conditions. Our limits of detection for nucleotides were comparable with the limits described in the literature. Mass spectrometry analysis was performed in the positive and the negative mode of multiple reaction monitoring analysis and electrospray was used for the analyte ionization. The optimal conditions for high performance liquid chromatography of ATP and ADP analysis were acquired on a ZIC - HILIC column with the mobile phase of 75:25 (v/v) acetonitrile / 10 mM ammonium acetate. Ammonium acetate buffer was adjusted to pH of 7.15 and the separation was done under the isocratic elution.

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

### **Poděkování**

Ráda bych poděkovala svému školiteli doc. RNDr. Pavlu Coufalovi, Ph.D. za odborné a trpělivé vedení a poskytnuté rady. Dále bych ráda poděkovala Mgr. Petru Kozlíkovi za pomoc s experimentální částí mé práce. Také velmi děkuji své rodině a blízkým za podporu.

**Předmětová hesla:** analytická chemie, separační metody

**Klíčová slova:** vysokoúčinná kapalinová chromatografie, hmotnostní spektrometrie, nukleotidy

## Obsah

Seznam zkratk.....	7
<b>1. Teorie.....</b>	<b>8</b>
1.1 Studované látky.....	8
1.1.1 Společné vlastnosti.....	8
1.1.2 Adenosindifosfát (ADP).....	9
1.1.3 Adenosintrifosfát (ATP).....	9
1.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie.....	9
1.2.1 LC-MS.....	10
1.2.2 Metody HPLC používané k analýze nukleotidů .....	12
1.3 Kolona ZIC - HILIC.....	13
1.4 Různé techniky separace na ZIC - HILIC koloně.....	13
1.4.1 Stanovení ATP a jeho metabolitů pomocí HILIC chromatografie.....	13
1.4.2 Vývoj a použití LC-MS/MS při měření dalších nukleotidů.....	14
<b>2. Cíl práce.....</b>	<b>16</b>
<b>3. Experimentální část.....</b>	<b>16</b>
3.1 Vzorky a chemikálie.....	16
3.2 Příprava mobilní fáze.....	16
3.3 Přístroje.....	17
3.4 Podmínky analýzy.....	17
<b>4. Výsledky a diskuze.....</b>	<b>18</b>
4.1 Kvalitativní analýza.....	18
4.2 Optimalizace hmotnostní spektrometrie.....	22
4.3 Optimalizace vysokoúčinné kapalinové chromatografie.....	23
4.4 Limit detekce analytů.....	26
<b>5. Závěr.....</b>	<b>30</b>
<b>6. Literatura.....</b>	<b>31</b>

## Seznam zkratek

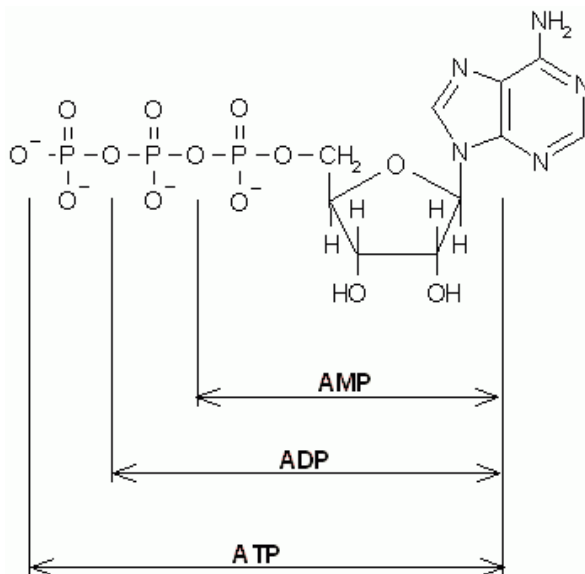
°C	stupeň Celsia, jednotka teploty
μl	mikrolitr, jednotka objemu
AMP	adenosinmonofosfát
ADP	adenosindifosfát
ATP	adenosintrifosfát
C18	oktadecylová stacionární fáze
CI	chemická ionizace
Da	Dalton, jednotka molekulové hmotnosti
DAD	detektor diodového pole
EI	ionizace elektronem
ESI	elektrosprej
GC	plynová chromatografie
HILIC	hydrofilní interakce
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	hydrogenfosfátový ion
kV	kilovolt, jednotka napětí
l·min <sup>-1</sup>	litr za minutu, jednotka průtoku
LC	kapalinová chromatografie
LC-MS	kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní detekcí
LOD	limit detekce
m/z	poměr molekulové hmotnosti a nábojového čísla
min	minuta, jednotka času
ml	mililitr, jednotka objemu
mM	milimolární, jednotka koncentrace
MRM	mnohonásobné reakční monitorování
MS	hmotnostní spektrometrie
nM	nanomolární, jednotka koncentrace
QQQ-MS	triple kvadrupólový hmotnostní analyzátor
RP	chromatografie s obrácenými fázemi
RSM	odmocnina průměrných čtverců (charakteristika šumu)

# 1. Teorie

## 1.1 Studované látky

### 1.1.1 Společné vlastnosti

Adenosindifosfát a adenosin trifosfát jsou nukleotidy (tj. fosforečné estery nukleosidů, anhydridy kyseliny fosforečné neboli adenosinfosfáty) [1]. Jejich struktura je uvedena na **obrázku 1**. Obsahují strukturální fragment  $-PO-O-PO-$  [2]. Jde o kyselé a polární látky. Mají makroergické fosfátové vazby, které svým štěpením poskytují systému energii [1]. Jsou to také koenzymy transferas. Anhydridy kyseliny fosforečné reakcí s alkoholy a za štěpení vazby P-O poskytují estery kyseliny fosforečné,  $ROPO_3^{2-}$ . Adenosinfosfáty slouží též jako významné efektoři aktivity regulačních enzymů; ATP je inhibátorem katabolických drah (zejména citrátového cyklu a glykolýzy), ADP a AMP bývají naopak aktivátory těchto drah [3]. Význam adenosinfosfátů pro energetické poměry je do té míry zásadní, že energetický stav buňky se vyjadřuje tzv. energetickým nábojem, který lze vypočítat z aktuálních intracelulárních koncentrací ATP, ADP a AMP. Většina metabolických drah je alespoň zčásti regulována hladinou nukleotidů [4].



**Obrázek 1** Struktura ADP a ATP (převzato z [3]).



### 1.1.2 Adenosindifosfát (ADP)

Přechod AMP na ADP katalysuje enzym adenylátkinasa (**rovnice 1**) [3]. Hydrolyza ATP na ADP při glykolýze vede k uvolnění energie, která slouží pro mnoho procesů, jako jsou například kontrakce svalu nebo transport iontů proti koncentračnímu gradientu [4]. ADP se spolu s hydrogenfosfátovým iontem ( $\text{HPO}_4^{2-}$ ) příkonem energie dodané světlem (fotosyntézou) nebo oxidací substrátu sloučí na ATP [1].



### 1.1.3 Adenosintrifosfát (ATP)

Přechod ADP na ATP se děje reakcemi, při kterých se uvolňuje energie (například glykolýzou či oxidační fosforylací) [4]. Vznik ATP fosforylační reakcí katalyzuje enzym adenylátkinasa. ATP vzniká v elektronovém transportním řetězci (respiračním) díky velkému množství energie, uvolněné během citrátového cyklu [2]. Jeho štěpením (nejčastěji transferasami ze skupiny kinas, hydrolasami ze skupiny ATPas a ligasami) vzniká ADP nebo AMP [3]. Jako koenzym přenáší ATP nejčastěji  $\text{HPO}_4^{2-}$ , méně často pak pyrofosfátový zbytek (přenos na alkoholické skupiny, acyly, amidy), adenosylfosfátový a adenosylový zbytek [1]. ATP je nejdůležitější látkou, která zajišťuje skladování a přenos volné chemické energie v buňce [3]. Katabolické reakce ukládají energii do ATP tak, že ho syntetizují z ADP a  $\text{HPO}_4^{2-}$  [2]. Anabolické reakce spotřebovávají ATP tím, že přenášejí  $\text{HPO}_4^{2-}$  na jinou molekulu a regenerují tak ADP. Produkce a využívání energie v organismu tak probíhá na základě vzájemné přeměny (**rovnice 2**). ATP „pohání“ fosforylační reakci glukosy. Významnou a užitečnou sloučeninu dělá z ATP schopnost pohánět jinak nevýhodné fosforylační reakce.



## 1.2 Vysokoučinná kapalinová chromatografie

Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC) zahrnuje soubor metod založených na různém mechanismu separace [5]. Jejich společným pojítkem je použití kapalně mobilní fáze, vysokotlaké techniky a účinných kolon pro rychlou analýzu. Jako první chromatografickou metodu objevil Cvět na začátku 20. století kapalinovou chromatografii (LC). HPLC byla vyvinuta až v 70. letech 20. století. Vedle technického

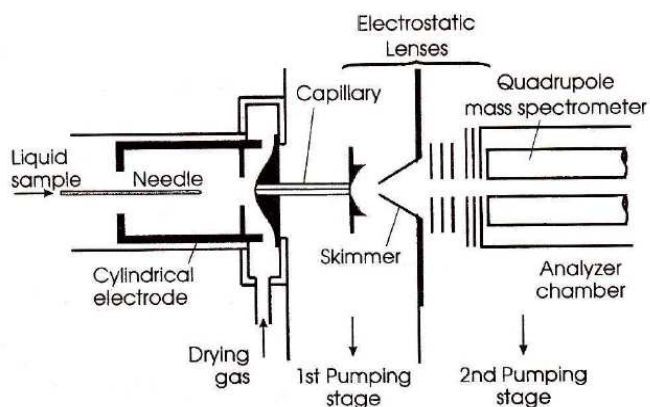
pokroku umožnily rozvoj vysokoúčinné kapalinové chromatografie i poznatky z teorie plynové chromatografie (GC), které objasnily podstatu pochodů v koloně a jejich souvislost s účinností chromatografického procesu. Velice významným průlomem bylo i zavedení náplní kolon s chemicky vázanými fázemi, umožňující vysoce selektivní separaci s dobrou reprodukovatelností. Zvýšením průtoku mobilní fáze pomocí přetlakových systémů bylo dosaženo podstatného zkrácení doby analýzy [6]. HPLC doplňuje aplikační možnosti plynové chromatografie, zejména v oblasti dělení látek netěkavých nebo nestálých za vyšší teploty.

Mezi výhody HPLC patří zejména její univerzální použití [7]. Lze takto analyzovat látky polární, nepolární, málo těkavé, tepelně nestabilní, látky o velké molekulové hmotnosti nebo molekuly s nábojem. Další výhodou je možnost rychle měnit složení mobilní fáze a tím zlepšit separaci. Nevýhodami HPLC je složitá instrumentace i mechanismus separace. Díky tomu, že se zde používají čistá rozpouštědla, je to metoda drahá. HPLC je oproti plynové chromatografii pomalejší.

Složení mobilní fáze je během izokratické eluce konstantní po celou dobu analýzy [7]. Naopak při gradientové eluci se složení mobilní fáze postupně mění dle nastaveného programu. Chromatografie s normálními fázemi zahrnuje nepolární mobilní fázi, zatímco stacionární fáze je polární. U reverzní chromatografie (RP) je tomu naopak a mobilní fáze je tedy polární a stacionární je nepolární. Záznamem z HPLC je chromatogram. Je to závislost odezvy detektoru na čase. Počet píků odpovídá počtu separovaných látek. HPLC se používá k analytickým separacím, ale je vhodná i k preparacím. Dnešní trend směřuje k miniaturizaci aparatury, zejména kolon.

### ***1.2.1 LC-MS***

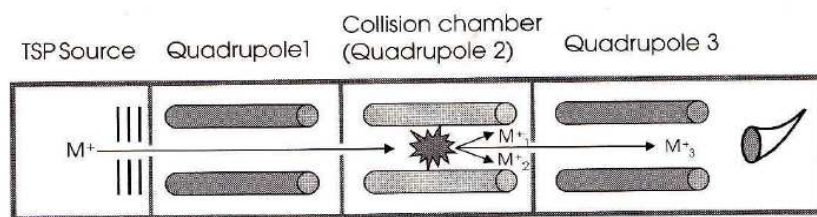
Základním předpokladem úspěšného spojení kapalinového chromatografu a hmotnostního spektrometru je účinné odstranění složek mobilní fáze před vlastní ionizací [7]. K tomuto účelu byla vyvinuta specializovaná zařízení - ve spojení s EI/CI (ionizací elektronem / chemickou ionizací) iontovými zdroji bylo používáno tzv. rozhraní s pohybujícím se kovovým páskem. Dnes se používají hlavně sprejové ionizační techniky (například elektrosprej), které během práce odvádějí většinu těkavých složek mimo prostor hmotnostního spektrometru. Schéma elektrospreje (ESI) je uvedeno na **obrázku 3**. Ionizace molekul elektrosprejem probíhá tak, že se analyt nejprve rozpustí ve vhodném eluentu a pak je přiveden kovovou kapilárou do iontového zdroje [8]. Na



**Obrázek 3** Schéma elektrospreje (převzato z [9])

kapiláru je vloženo vysoké napětí (3-5 kV). Po rozprášení analytu na výstupu z kapiláry vznikají kapičky za pomoci přiváděného dusíku jako zamlžujícího plynu. Vzniklé kapičky nesou na svém povrchu elektrostatický náboj, jehož povrchová hustota postupně vzrůstá s dalším odpařováním rozpouštědla z povrchu kapiček a tím i zmenšujícím se objemem a povrchem malých kapiček. Jakmile hustota povrchového náboje dosáhne určité kritické hodnoty, dojde k tzv. Coulombické explozi. Jde o rozpad nabitě kapičky na řadu menších kapiček nesoucích náboj. Tento proces se opakuje tak dlouho, až je kapička dostatečně malá a může dojít k uvolnění protonové a deprotonované molekuly z jejího povrchu. Uvolnění molekul z povrchu se děje desorpcí a jedná se o tzv. vypařování iontů. Metodou ESI-LC-MS je možné analyzovat proteiny o relativní molekulové hmotnosti větší než 100 000 Da [9].

Nejčastěji používaný hmotnostní spektrometr je kvadrupólový hmotnostní analyzátor. Schéma triplekvadrupólového analyzátoru (QQQ-MS) je na **obrázku 4**. QQQ-MS je univerzální, citlivý, rychlý a také levný oproti jiným hmotnostním analyzátorům [7]. U triplekvadrupólového hmotnostního spektrometru slouží první kvadrupól k výběru prekurzorového iontu. Do druhého kvadrupólu se přivádí pod vhodným tlakem inertní plyn a slouží jako kolizní cela pro řízenou fragmentaci prekurzorového iontu. Skenováním třetího kvadrupólu se rozdělí vzniklé produktové ionty. Použití QQQ-MS poskytuje spolehlivou identifikaci vzorků díky relativní molekulové hmotnosti a specifickým hmotnostním fragmentům [10]. Záznamem z hmotnostního spektrometru je hmotnostní spektrum. Je to závislost relativní intenzity jednotlivých fragmentů molekuly na  $m/z$  (poměr molekulové hmotnosti a nábojového čísla). Jednotlivé píky v čárové formě odpovídají fragmentům molekuly.



**Obrázek 4** Schéma triplekvadrupólového hmotnostního spektrometru (MS/MS, QQQ-MS). První a třetí kvadrupól snímá ionty. Druhý kvadrupól slouží jako kolizní cela, kde dochází k fragmentaci iontů díky kolizím molekulárního iontu s dusíkem či argonem při relativně vyšším tlaku (převzato z [9]).

### 1.2.2 Metody HPLC používané k analýze nukleotidů

Všechny fosforylované metabolity obecně vykazují lepší píky při pH mobilní fáze o velikosti 8-9 než za kyselých podmínek [10]. Použitá kolona a složení mobilní fáze má vliv na retenční čas a odezvu kapalinového chromatogramu [11]. Nukleotidy jsou velmi polární sloučeniny, a proto se separace obvykle provádí za použití aniontově-výměnné chromatografie [12]. Při této metodě však není složení mobilní fáze vhodné pro LC-MS/MS. Další metodou stanovení nukleotidů je chromatografie s obrácenými fázemi (RP). Polární sloučeniny (nukleotidy) jsou ale během této techniky málo zadržovány na koloně, a proto je nutný přídavek iontově párového činidla. Pro kyselé analyty (nukleotidy) jsou jako iontově párová činidla vhodné alkylaminy [13]. Iontově párové činidlo pro kyselé nukleotidy hraje úlohu protiiontu, čímž se usnadní eluce nukleotidů z kolony s dobrými píky. Vhodné iontově párové činidlo může rušit stanovení tím, že zdroj hmotnostního spektrometru kontaminuje. Hexylamin jako iontově párové činidlo může mít nízkou koncentraci a díky němu dochází k dobrému zadržení polárních sloučenin a k minimální kontaminaci zdroje hmotnostního spektrometru. Literatura ukazuje, že pro separaci nukleotidů lze také použít kolonu C18 bez použití těkavého iontově párového činidla [12]. Během této metody však dochází k nedostatečné separaci nukleotidů. K tomu, aby došlo ke kvantitativní analýze nukleotidů, je nutné následně použít vhodný hmotnostní spektrometr operující v MRM módu (mnohonásobné reakční monitorování). Pro stanovení nukleotidů nemá tato metoda požadovanou citlivost. Nejlépe lze nukleotidy stanovit pomocí neutrální HILIC metody [10]. Námi nalezená nejlepší metoda pro separaci nukleotidů je tedy HPLC s použitím ZIC - HILIC kolony.

### 1.3 Kolona ZIC - HILIC

Kapalinová chromatografie využívající hydrofilní interakce (HILIC) je nová technika, která umí separovat malé polární sloučeniny [11]. Tato metoda je proto stále populárnější v měření intermediátů centrálního uhlíkového metabolismu. Jako všestranná separační technika kapalinové chromatografie umožňuje simultánní analýzu různých tříd důležitých metabolitů, například detekci mnoha netěkavých a těkavých sloučenin v jednom běhu. Pro mnoho fyzikálně-chemických vlastností a koncentrací metabolitů s nízkou relativní molekulovou hmotností (např. některých nukleotidů) je však výhodnější stanovení v jednom stupni. Koncentrace soli v mobilní fázi a její pH ovlivňují ionizaci analytu a mají tedy velký vliv na retenci analytu a selektivitu separace. Při měření v HILIC podmínkách je nezbytné přidat do vzorku organické rozpouštědlo (například acetonitril). Tento přídavek vede ke snížení polaritě rozpouštědla, a tím k vylepšení tvaru píků [14]. Vyšší podíl organického rozpouštědla v mobilní fázi vede k většímu zadržení analytu na koloně, ale k jeho nižší rozpustnosti. Naopak převažující množství vody v elučním rozpouštědle snižuje retenci analytu.

Kolona ZIC - HILIC je vhodná volba pro separaci polárních a hydrofilních sloučenin [15]. Analyty jako aminokyseliny, peptidy, sacharidy, rostlinné extrakty a různé polární sloučeniny mají obecně na této koloně silnou retenci. Stacionární fáze je pevně zakotvená na pórovitém oxidu křemičitém. Separace je dosaženo hydrofilním dělícím mechanismem, znásobeným slabými elektrostatickými interakcemi. Typická mobilní fáze obsahuje vysoký podíl organických rozpouštědel (například acetonitrilu) smísených s pufrům.

### 1.4 Různé metody separace na ZIC - HILIC koloně

#### *1.4.1 Stanovení ATP a jeho metabolitů pomocí HILIC chromatografie*

Mora a kolektiv [14] provedli analýzu s koncentracemi vzorků 0,1; 0,15; 0,05; 0,16; 1,72 a 0,15  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Vhodná kolona pro separaci byla kolona ZIC - HILIC (4,6 x 150 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) SeQuant, Švédsko [14]. Analyty byly nejprve rozpuštěny a deprotonovány v acetonitrilu a centrifugovány při 4 °C po dobu 10 minut. Do systému bylo dávkováno 20  $\mu\text{L}$  vzorku. Teplota kolony byla nastavena na hodnotu 28 °C. Mobilní fáze se skládala z octanu amonného, acetonitrilu a vody. Průtok mobilní fáze byl 0,5  $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ . Detekce probíhala pomocí detektoru diodového pole (DAD) při 254 nm. Acetonitril v mobilní fázi zajistil dostatečnou rozpustnost analytů a delší zadržování analytů než při použití

**Tabulka 1** Eluční gradient v objemových procentech. Použitá kolona ZIC - HILIC 150 x 4,6 mm, 3,5  $\mu\text{m}$ , 100 Å, Peek HPLC kolona, SeQuant. Teplota kolony 28 °C. Průtok mobilní fáze 0,5 ml·min<sup>-1</sup>.

Čas (min)	Octan amonný 150 mM, pH = 3,5 (obj. %)	Octan amonný 100 mM, pH = 7,0 (obj. %)	Acetonitril (obj. %)	Redestilovaná voda (obj. %)
0	15	0	80	5
3	0	25	70	5
15	0	25	70	5
25	0	50	40	10
35	0	50	40	10

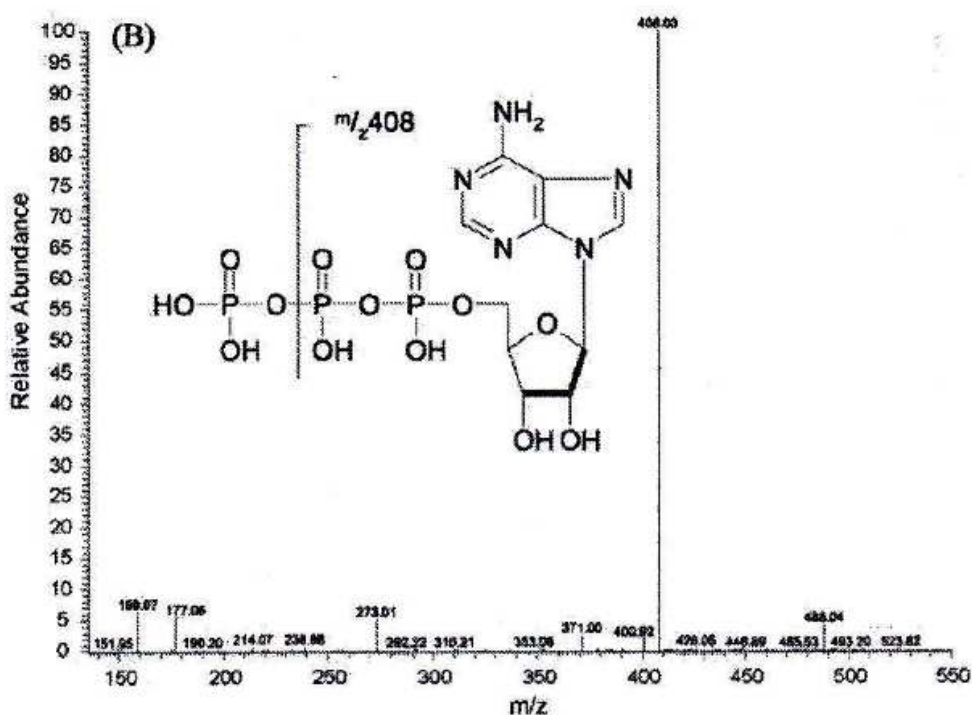
methanolu, který má větší eluční sílu. Gradient použité eluce je v **tabulce 1**. Na počátku analýzy bylo použito větší objemové množství acetonitrilu. S klesáním objemových procent acetonitrilu došlo ke zkrácení chromatogramu a zlepšení tvaru píků. Optimální solí právě pro pufrování se jevil octan amonný, jelikož poskytuje reprodukovatelné a selektivní výsledky. Octan amonný byl do mobilní fáze také vybrán pro svoji rozpustnost a schopnost interakce s analytem. Tato sůl dosahuje skvělé rozpustnosti i při velkých koncentracích organického rozpouštědla a je velmi těkavá. Jeho těkavosti se využívá v hmotnostní spektrometrii při metodě HPLC-MS. Nejlepších výsledků separace bylo dosaženo použitím octanu amonného o koncentraci 83 mM a pH 7. Vhodný roztok pro rozpouštění vzorku byl 50:50 (v/v) acetonitril / 0,6 M kyselina chloristá. Analyty se dobře rozpouštěly i při použití většího množství acetonitrilu, ale nukleotidy v něm byly málo stabilní.

#### ***1.4.2 Vývoj a použití LC-MS/MS při měření dalších nukleotidů***

Goutier a kolektiv [12] skladovali vzorky při teplotě 4 °C a každý den měření z nich připravili čerstvé roztoky [12]. Tento vědecký tým nepozoroval snižování koncentrace analytů při měření v různých dnech. Pro separaci byla použita ZIC - HILIC kolona (5  $\mu\text{m}$ , 150 x 4,6) SeQuant, Švédsko. Použití této kolony zabránilo nutnosti přidávat iontově párová činidla. Mobilní fáze A se skládala z 10 mM pufru bikarbonátu amonného o pH 9,4 a 20 % acetonitrilu ředěného HPLC grade vodou. Bikarbonát amonný měl pH nastavené pomocí hydroxidu amonného. Mobilní fáze B se skládala ze

100 % acetonitrilu. Lineárním gradientem eluce kleslo objemové množství mobilní fáze B z 53,7 % na 0 % B za 1 minutu. Toto složení mobilní fáze zůstalo neměnné po dobu 1 minuty a nakonec během 3,5 minut došlo k ustavení rovnováhy mezi mobilní a stacionární fází. Teplota kolony byla nastavena na hodnotu 35 °C. Průtok mobilní fáze byl 0,5 ml·min<sup>-1</sup>. Injektor měl teplotu 4 °C a do systému bylo dávkováno 10 μL vzorku.

Po nastavení počátečních podmínek byla metoda optimalizována [12]. Zkoumal se vliv průtoku mobilní fáze, pH mobilní fáze, síly pufru a teploty kolony na separaci. Pro analýzu pak byly použity optimalizované podmínky. Vhodný průtok mobilní fáze byl 0,5 ml·min<sup>-1</sup> jako kompromis mezi výsledkem separace a dobou analýzy. Rozmezí pH o velikosti 8-10 mobilní fáze vedlo k zadržení ATP na koloně po dobu asi 4 minut. Síla pufru byla zkoumána u bikarbonátu amonného o pH 9,4 při koncentraci 1 až 100 mM. Lepší výsledky vykazovaly píky při větší iontové síle pufru. Větší iontová síla pufru však vedla k iontovému potlačení, a proto byl do mobilní fáze vybrán pufr o koncentraci 10 mM. Změna teploty kolony neměla na retenční čas analytů vliv. Goutier a kolektiv [12] zjistili, že analýza byla nejcitlivější při měření v negativním módu. Ztráta fosfátu u vzorku ATP, a tedy pík o velikosti 408 m/z, je znázorněn na **obrázku 5**. V literatuře [12] byl jako prekurzorový ion ATP zjištěn ion v negativním módu o velikosti 506 m/z.



**Obrázek 5** Hmotnostní spektrum ATP. Pík s největší intenzitou při hodnotě m/z 408. Struktura ATP s předpokládanou fragmentací z 506 m/z na 408 m/z (převzato z [12]).

## 2.Cíl práce

Cílem této práce byla analýza a detekce vzorků adenosindifosfátu a adenosintrifosfátu pomocí metody HPLC-MS/MS. Dalším úkolem bylo nalezení orientačních limitů detekce (LOD) studovaných látek a jejich porovnání s LOD nalezenými v literatuře při použití stejných metod a velmi podobných experimentálních podmínek.

## 3.Experimentální část

### 3.1 Vzorky a chemikálie

Pro analýzu byly použity vzorky ATP a ADP (sodné soli nukleotidů z bakteriálního zdroje, čistota 97 %, Sigma Aldrich). Vzorek adenosindifosfátu byl bílý a měl pevnou „gumovitou“ strukturu. Ve vodě byl rozpustný, i když obtížněji než ATP. Naopak v čistém acetonitrilu nebyl rozpustný ani při použití ultrazvuku. Adenosintrifosfát byla za laboratorních podmínek bílá krystalická látka. Dobře se rozpouštěla ve vodě i v acetonitrilu. ADP a ATP byly přes noc skladovány v mrazáku. Každý den měření byly připraveny nové roztoky vzorků, aby nedocházelo k rozkladu analytů. Pevné ATP a ADP byly rozpuštěny ve vodě (koncentrace analytů byla  $1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ). Roztoky vzorků o nižších molárních koncentracích byly připraveny přesným ředěním 50 % acetonitrem.

Další použité chemikálie byly čistý acetonitril (Sigma Aldrich), redestilovaná voda a 10 mM octan amonný o  $\text{pH} = 7,15$ . Octan amonný byl připraven z  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (99,7 %, A.C.S. reagent Sigma Aldrich) a  $\text{NH}_4\text{OH}$  (25 %, Lachner).

### 3.2 Příprava mobilní fáze

Octan amonný byl připravený z kyseliny octové a hydroxidu amonného. Nejprve se vypočetlo množství  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (hustota =  $1,049 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ ), které bylo potřebné k dosažení výsledné koncentrace roztoku 10 mM a celkového objemu 200 ml. Vypočítané množství kyseliny ( $V = 114 \text{ ml}$ ) se vpravilo do kádinky a roztok se titroval  $\text{NH}_4\text{OH}$ , dokud  $\text{pH}$  roztoku nedosáhlo hodnot kolem 7 (tj. 7,15). Měření  $\text{pH}$  probíhalo



pomocí pH-metru. Roztok bylo nutné doplnit destilovanou vodou na celkový objem 200 ml. Tento roztok se následně použil do mobilní fáze.

### 3.3 Přístroje

Hmotnostním spektrometrem byl Agilent Technologies 6460 Triple Quad LC/MS. Spektrometr pracoval v triplekvadrupólovém módu a byl vybaven elektrosprejem. Napětí elektrospreje bylo 4000 V při analýze v pozitivním módu a 3000 V při měření v negativním módu. Teplota iontového zdroje byla 350 °C. Jako atomizér, ohřívač a ochranný plyn byl použit dusík ( $p = 60$  psi). Analýza pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie byla prováděna na přístroji Agilent Technologies 1260 Infinity.

### 3.4 Podmínky analýzy

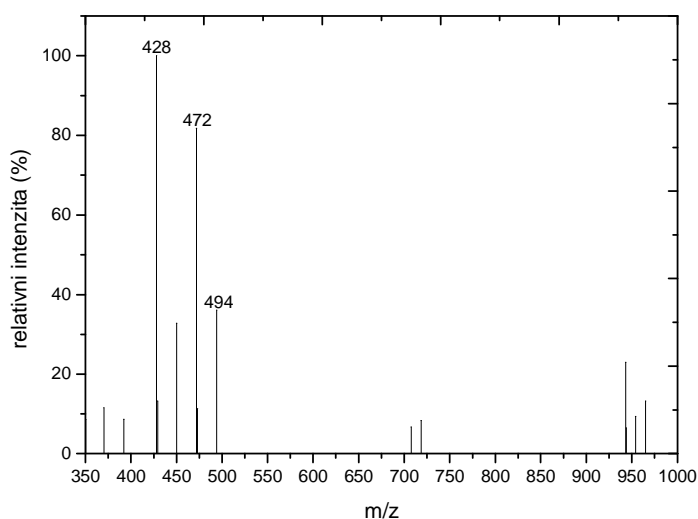
Specifické parametry hmotnostní spektrometrie byly optimalizovány pro jednotlivé vzorky individuálně. Hledaly se vhodné podmínky pro optimální poměr signál/šum. Pro tyto účely se vzorky dávkovaly do přístroje přímým vstříkem. Měření probíhalo v pozitivním i negativním módu při MRM. Analýza byla prováděna při fragmentační energii 20-180 V a v rozmezí kolizní energie 15-110 V. Nejintenzivnější přechod ADP byl z 428 na 136  $m/z$  v pozitivním módu. Dělení ADP probíhalo při fragmentační energii o velikosti 120 V, která odpovídá fragmentační energii nejintenzivnějšího přechodu ADP. Nejintenzivnější přechod ATP byl v pozitivním módu, a to přechod z 508 na 136  $m/z$ . ATP byl analyzován při fragmentační energii o hodnotě 115 V. Tato energie odpovídá fragmentační energii nejintenzivnějšího přechodu ATP.

Separace adenosindifosfátu a adenosintrifosfátu probíhala na koloně ZIC - HILIC 150 x 4,6 mm, 3,5  $\mu\text{m}$ , 100 Å, Peek HPLC kolona, SeQuant. Kolonou protékala mobilní fáze o složení 75:25 (v/v) acetonitril / 10 mM octan amonný. Octan amonný měl pH nastavené na hodnotu 7,15. Průtok mobilní fáze byl 0,5  $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ . Do systému bylo dávkováno 10  $\mu\text{l}$  vzorku. Teplota kolony byla nastavena na 20 °C. Dělení probíhalo při izokratické eluci. Separace byla prováděna u analytů o koncentraci  $1\cdot 10^{-3}$   $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ , což odpovídá koncentraci 2,34  $\mu\text{M}$  pro vzorek ADP a 1,98  $\mu\text{M}$  pro ATP. Stanovení limitu detekce probíhalo se vzorky ADP o koncentracích  $1\cdot 10^{-4}$  až  $1\cdot 10^{-8}$   $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  a vzorky ATP o koncentracích  $1\cdot 10^{-3}$  až  $1\cdot 10^{-8}$   $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ .

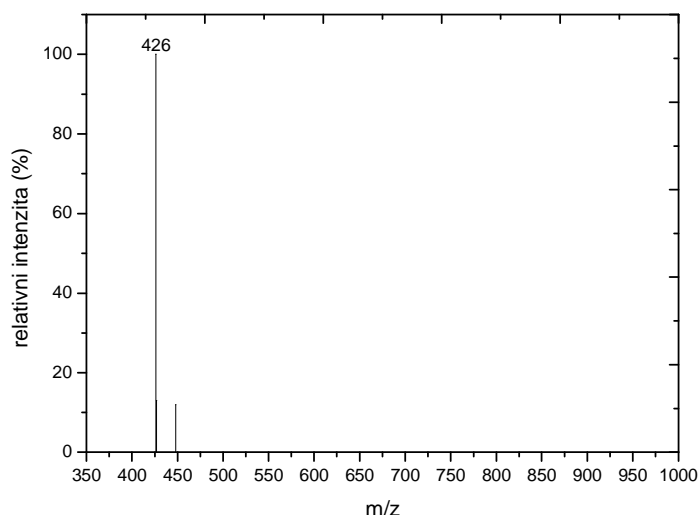
## 4. Výsledky a diskuze

### 4.1 Kvalitativní analýza

Nejprve byly analyzovány jednotlivé vzorky rozpuštěné ve vodě. Oba analyty byly měřeny v pozitivním i negativním módu a měly koncentraci  $1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Analýza ADP byla prováděna v rozmezí 350-1000 m/z. Při měření ATP ve stejném rozmezí hodnot m/z se ve spektru objevil pík o m/z 428 odpovídající pravděpodobně ADP (vznikl rozkladem ATP). Z tohoto důvodu došlo k omezení rozmezí hmotnostního spektra na 450-800 m/z, aby pík odpovídající ADP nerušil stanovení. Z výsledků měření byly zjištěny prekurzorové ionty ADP a ATP. Prekurzorový ion ADP v pozitivním módu byl při hodnotě 428 m/z (**obrázek 6**). Píky o hodnotě 472 m/z a 494 m/z v hmotnostním spektru (**obrázek 6**) odpovídají pravděpodobně aduktům ADP se sodnými ionty, které se na nukleotid navázaly při přípravě vzorku ze sodných solí. Prekurzorový ion ADP při



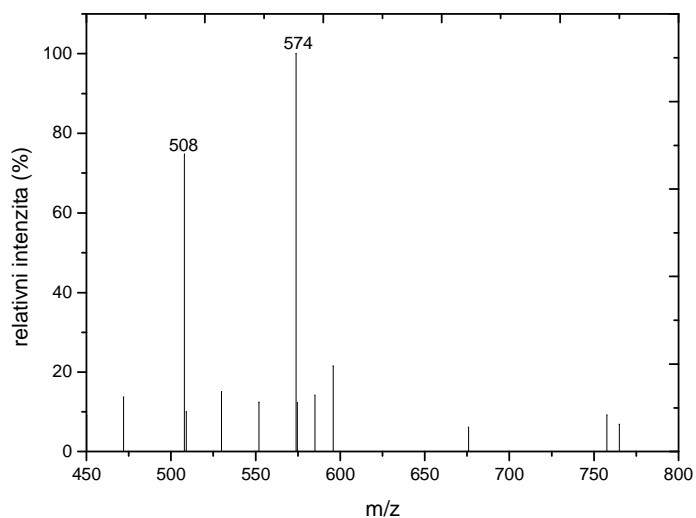
**Obrázek 6** Hmotnostní spektrum ADP v pozitivním módu. Koncentrace analytu  $1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Rozmezí 350-1000 m/z. Prekurzorový ion (m/z s největší intenzitou) je při hodnotě 428 m/z a odpovídá  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .



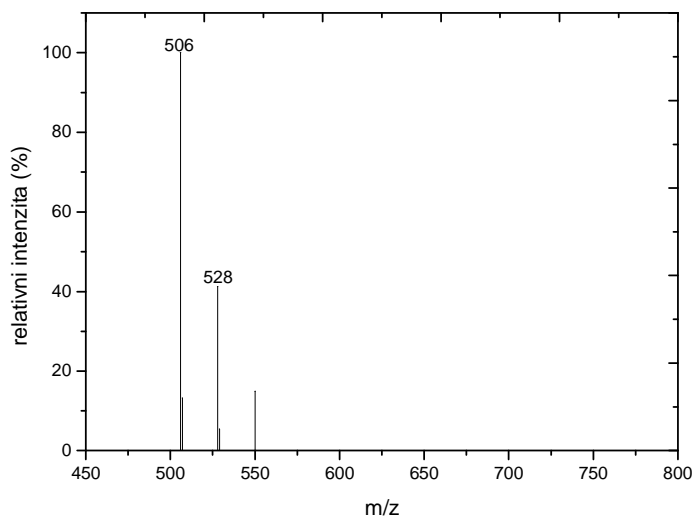
**Obrázek 7** Hmotnostní spektrum ADP v negativním módu. Koncentrace analytu  $1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Rozmezí 350-1000 m/z. Prekurzorový ion (m/z s největší intenzitou) je při hodnotě 426 m/z a odpovídá  $[\text{M-H}]^-$ .

měření v negativním módu byl 426 m/z (**obrázek 7**). Během analýzy ATP byl stanoven prekurzorový ion v pozitivním módu jako 508 m/z (**obrázek 8**). Nejintenzivnější pík o velikosti 574 m/z na **obrázku 8** odpovídá pravděpodobně ATP se sodnými ionty, které mohly vzniknout při přípravě vzorků. V negativním módu byl určen prekurzorový ion ATP při hodnotě 506 m/z (**obrázek 9**). Na **obrázku 9** se vyskytuje pík o velikosti 528 m/z. Tento pík nejspíše odpovídá aduktu ATP se sodnými ionty a vznikl během přípravy vzorků. Nalezené prekurzorové ionty odpovídají iontům v literatuře.

Dále bylo zjišťováno, jak se ionty fragmentují, tj. jaké jsou produktové ionty v obou módech při postupném zvyšování kolizní energie. Měření se provádělo v rozmezí 100 - 1000 m/z a 350 - 1000 m/z. Produktové ionty, vzniklé štěpením analytů, jsou uvedeny v **tabulkách 2 a 3**. Takto byly zjištěny přechody pro ADP a ATP. Výsledky jsou uvedeny v **tabulkách 4 a 5**.



**Obrázek 8** Hmotnostní spektrum ATP v pozitivním módu. Koncentrace analytu  $1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Rozmezí 450-800 m/z. Nejintenzivnější pík o velikosti 574 m/z odpovídá aduktu ATP se sodnými ionty, tedy  $[\text{M}-2\text{H}+3\text{Na}]^+$ . Prekurzorový ion je při hodnotě 508 m/z a odpovídá  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .



**Obrázek 9** Hmotnostní spektrum ATP v negativním módu. Koncentrace analytu  $1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Rozmezí 450-800 m/z. Prekurzorový ion je při hodnotě 506 m/z a odpovídá  $[\text{M}-\text{H}]^-$ .

**Tabulka 2** Fragmentace ADP o koncentraci  $1 \cdot 10^{-3}$  mg·ml<sup>-1</sup>. Analýza v pozitivním i negativním módu. Rozsah kolizní energie 15-90 V.

Kolizní energie (V)	Prekurzorový ion (m/z)	Produktový ion (m/z)	Mód
15	426	134	Negativní
15	426	159	Negativní
<b>15</b>	<b>428</b>	<b>136</b>	<b>Pozitivní</b>
30	426	134	Negativní
30	426	79	Negativní
30	426	159	Negativní
<b>30</b>	<b>428</b>	<b>136</b>	<b>Pozitivní</b>
45	426	79	Negativní
45	426	134	Negativní
45	426	159	Negativní
<b>45</b>	<b>428</b>	<b>136</b>	<b>Pozitivní</b>
60	426	79	Negativní
<b>60</b>	<b>428</b>	<b>136</b>	<b>Pozitivní</b>
90	426	79	Negativní
<b>90</b>	<b>428</b>	<b>119</b>	<b>Pozitivní</b>

**Tabulka 3** Fragmentace ATP o koncentraci  $1 \cdot 10^{-3}$  mg·ml<sup>-1</sup> v pozitivním a negativním módu. Rozsah kolizní energie 15-90 V.

Kolizní energie (V)	Prekurzorový ion (m/z)	Produktový ion (m/z)	Mód
15	506	159	Negativní
<b>15</b>	<b>508</b>	<b>136</b>	<b>Pozitivní</b>
30	506	159	Negativní
<b>30</b>	<b>508</b>	<b>136</b>	<b>Pozitivní</b>
60	506	79	Negativní
<b>60</b>	<b>508</b>	<b>136</b>	<b>Pozitivní</b>
90	506	79	Negativní
<b>90</b>	<b>508</b>	<b>119</b>	<b>Pozitivní</b>

## 4.2 Optimalizace hmotnostní spektrometrie

V rámci optimalizace byly hledány instrumentální parametry hmotnostní spektrometrie, a to jak fragmentační energie, tak především kolizní energie. Přibližné hodnoty kolizních energií, při kterých se ionty fragmentovaly, byly známy z předchozího měření. Optimalizace se prováděla pomocí programu změnou nastavení fragmentační a kolizní energie. Sledovaly se změny velikosti píků v hmotnostním spektru, dokud nebyly nalezeny optimální parametry. Výsledky jsou uvedeny v **tabulkách 4 a 5**.

**Tabulka 4** Přejchody ADP o koncentraci  $1 \cdot 10^{-3} \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  v pozitivním i negativním módu. Včetně optimálních podmínek MS (kolizní a fragmentační energie). Rozsah kolizní energie 15-110 V, fragmentační energie 20-180 V.

Mód	Prekurzorový ion (m/z)	Produktový ion (m/z)	Fragmentační energie (V)	Kolizní energie (V)
Pozitivní	428	136	120	24
Pozitivní	428	119	105	82
Negativní	426	159	135	26
Negativní	426	134	130	20
Negativní	426	79	105	65

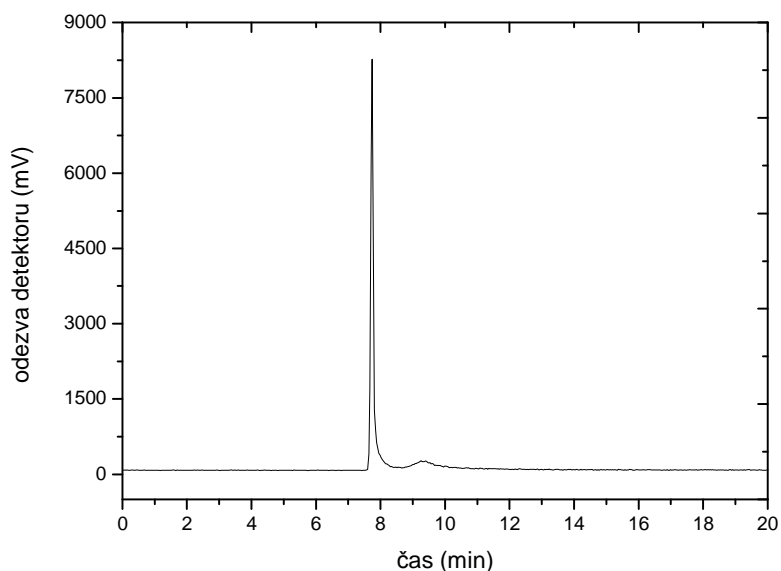
**Tabulka 5** Přejchody ATP o koncentraci  $1 \cdot 10^{-3} \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  v pozitivním i negativním módu. Včetně optimálních podmínek MS (kolizní a fragmentační energie). Rozsah kolizní energie 15-110 V, fragmentační energie 20-180 V.

Mód	Prekurzorový ion (m/z)	Produktový ion (m/z)	Fragmentační energie (V)	Kolizní energie (V)
Pozitivní	508	136	115	36
Pozitivní	508	119	115	102
Negativní	506	159	145	36
Negativní	506	79	143	98

### 4.3 Optimalizace vysokoúčinné kapalinové chromatografie

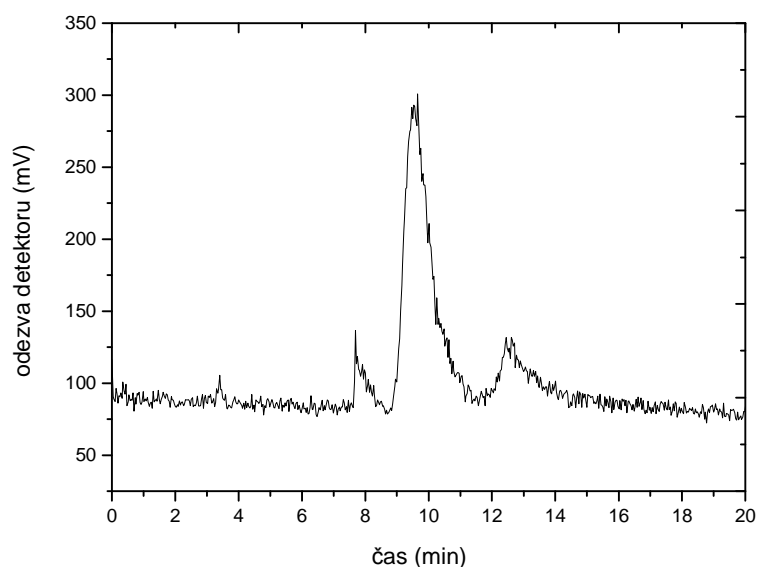
Analýza nukleotidů probíhala v HILIC módu, a proto byla použita mobilní fáze, ve které převládá organický modifikátor (tj. 75 % zastoupení acetonitrilu). K úpravě pH mobilní fáze sloužil octan amonný. Z literatury vyplývá, že nukleotidy se nejlépe dělí při neutrálním pH mobilní fáze, a proto bylo pH soli nastaveno na hodnotu 7,15. Před vlastním měřením bylo nutné ustavit rovnováhu mezi stacionární a mobilní fází. Z tohoto důvodu se kolona nechala přes noc promývat mobilní fází o průtoku  $0,01 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ .

Analýza byla prováděna na koloně ZIC - HILIC. Nejprve byla použita mobilní fáze o složení 70:30 (v/v) acetonitril / 10 mM octan amonný. Tato mobilní fáze však poskytovala dlouhé retenční časy (cca 60 min), a proto došlo k její úpravě. Použitím mobilní fáze o složení 75:25 (v/v) acetonitril / 10 mM octan amonný došlo ke zkrácení retenčních časů na 7 až 15 minut. Vhodné podmínky separace byly stanoveny podle experimentálních podmínek v literatuře [14]. Pro dělení nebyl použit eluční gradient, ale měření bylo, na rozdíl od citace [14], prováděno za izokratických podmínek. Tato úprava sice mírně prodloužila dobu analýzy, ale vzhledem ke složení mobilní fáze byly zjištěné retenční časy nízké. Pro dělení byly využity přechody získané při kvalitativní analýze.



**Obrázek 10** Chromatogram ADP o koncentraci  $1\cdot 10^{-3} \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Použitá kolona ZIC - HILIC 150 x 4,6 mm, 3,5  $\mu\text{m}$ , 100 Å, Peek HPLC kolona, SeQuant. Mobilní fáze 75:25 (v/v) acetonitril / 10 mM octan amonný. Průtok mobilní fáze  $0,5 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ . Teplota kolony 20 °C. Pro analýzu byl použit přechod MRM v pozitivním módu, kde prekurzorový ion měl hodnotu 428 m/z a produktový ion 136 m/z.

Tyto přechody jsou uvedeny v **tabulkách 4 a 5**. V literatuře [12] byl uveden přechod pro ATP z 506 na 408 m/z. Zahnutí tohoto přechodu do analýzy nemělo na dělení ATP vliv (výsledky zde nejsou uvedeny). Výsledný chromatogram ADP je na **obrázku 10**. Nepodařilo se bohužel zabránit chvostování u vzorku ADP (**obrázek 10**). Záznam signálu pro ATP je na chromatogramu na **obrázku 11**. V chromatogramu ATP (**obrázek 11**) jsou tři píky, značící dělení tří látek ve vzorku ATP. V rámci této bakalářské práce nebylo zjištěno, jakým látkám píky odpovídají a proč se tyto píky v chromatogramu vyskytují.

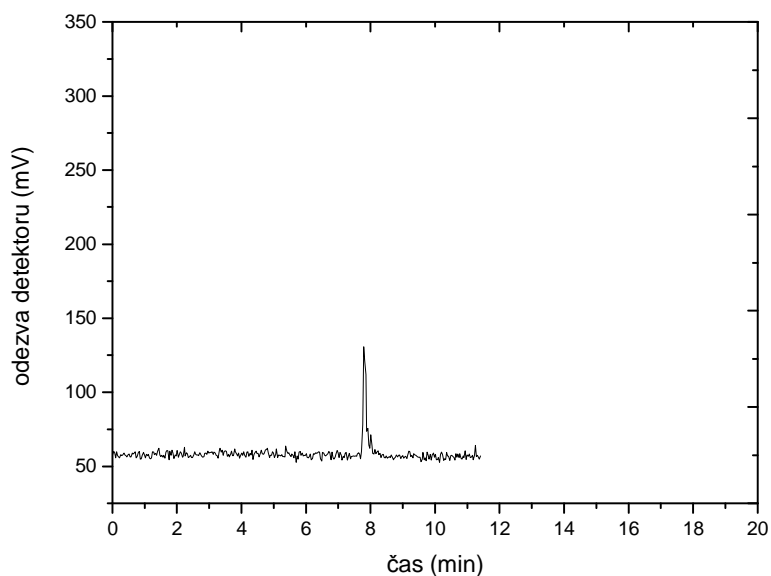


**Obrázek 11** Chromatogram ATP o koncentraci  $1 \cdot 10^{-3} \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ . Použitá kolona ZIC - HILIC 150 x 4,6 mm, 3,5  $\mu\text{m}$ , 100 Å, Peek HPLC kolona, SeQuant. Mobilní fáze 75:25 (v/v) acetonitril / 10 mM octan amonný. Průtok mobilní fáze  $0,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ . Teplota kolony 20 °C. Pro analýzu byl použit přechod MRM v pozitivním módu, kde prekurzorový ion měl hodnotu 508 m/z a produktový ion 136 m/z.



**Tabulka 6** Eluční gradient v objemových procentech pro promývání kolony přes noc. Použitá kolona ZIC - HILIC 150 x 4,6 mm, 3,5  $\mu\text{m}$ , 100  $\text{\AA}$ , Peek HPLC kolona, SeQuant. Průtok mobilní fáze 0,1 ml·min<sup>-1</sup>. Teplota kolony 20 °C.

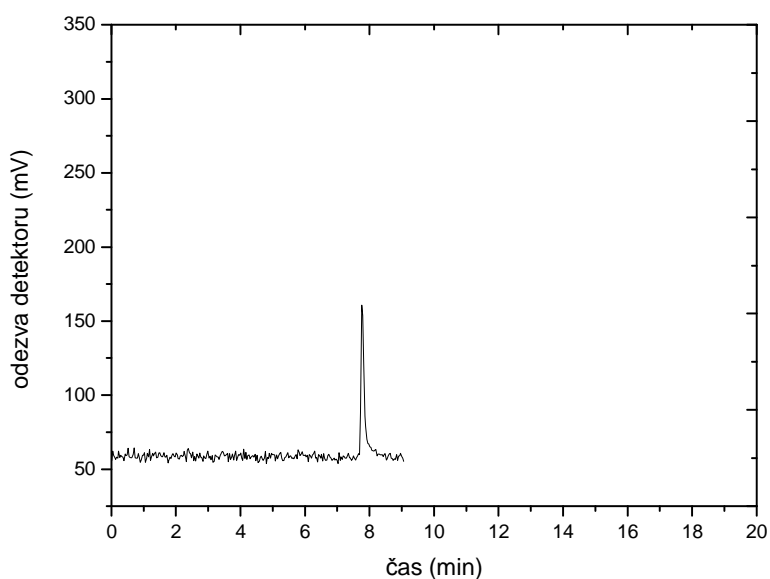
Čas (min)	Acetonitril (obj. %)	Octan amonný (obj. %)
0	75	25
30	50	50
60	75	25
90	50	50
120	75	25
150	50	50
180	75	25
210	50	50
240	75	25



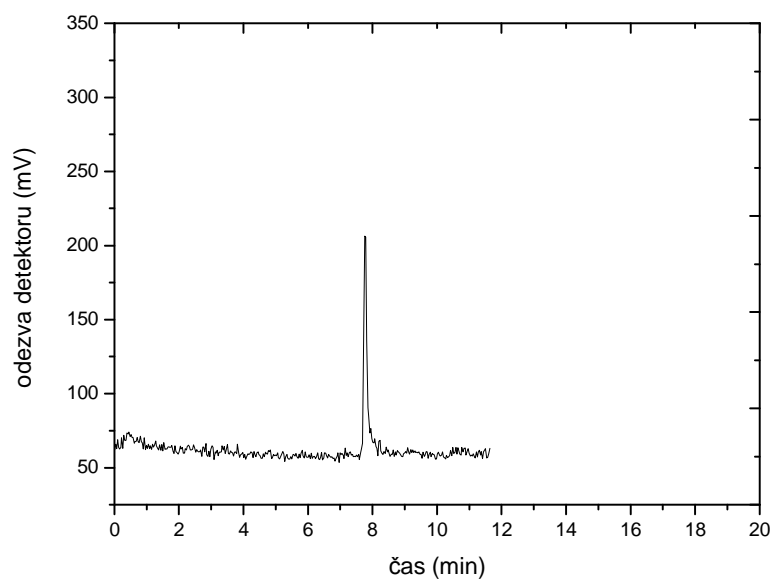
**Obrázek 12** Chromatogram čistého rozpouštědla (50 % acetonitrilu) pro stanovení limitu detekce u ADP. Signál odpovídá zadrženému ADP na koloně a tedy šumu. Použitá kolona ZIC - HILIC 150 x 4,6 mm, 3,5  $\mu\text{m}$ , 100  $\text{\AA}$ , Peek HPLC kolona, SeQuant. Mobilní fáze 75:25 (v/v) acetonitril / 10 mM octan amonný. Průtok mobilní fáze 0,5 ml·min<sup>-1</sup>. Teplota kolony 20 °C. Pro stanovení byl použit přechod MRM v pozitivním módu, kde prekurzorový ion měl hodnotu 428 m/z a produktový ion 136 m/z.

#### 4.4 Limit detekce analytů

Stanovení limitu detekce bylo nejprve provedeno u vzorků ADP o vyšších koncentracích. Analyt měl koncentraci  $1 \cdot 10^{-4}$  až  $1 \cdot 10^{-8}$   $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ . Na koloně však bylo zadržováno ADP o vyšších koncentracích. Kolona se proto nechala přes noc promývat mobilní fází s elučním gradientem. Gradient eluce pro promývání přes noc je uveden v **tabulce 6**. Promýváním kolony došlo k částečnému vymytí analytu. Přetrvávající zadržení ADP bylo ověřeno proměřením čistého rozpouštědla. Signál čistého rozpouštědla (50 % acetonitrilu) poskytoval pík o velikosti plochy  $570 \text{ mm}^2$ . Chromatogram 50 % acetonitrilu je uveden na **obrázku 12**. ADP o koncentraci  $1 \cdot 10^{-7}$  a  $1 \cdot 10^{-8}$   $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  poskytoval píky srovnatelné svojí plochou s píky rozpouštědla. Z tohoto důvodu byly píky analytu o koncentraci  $1 \cdot 10^{-7}$  a  $1 \cdot 10^{-8}$   $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  považovány za šum. Chromatogram ADP o koncentraci  $1 \cdot 10^{-7}$   $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ , v němž pík odpovídá šumu, je znázorněn na **obrázku 13**. Při měření ADP o koncentraci  $1 \cdot 10^{-5}$   $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  plocha píku výrazně vzrostla. Adenosindifosfát o koncentraci  $1 \cdot 10^{-5}$   $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  (tato koncentrace odpovídá 23 nM) byl tedy označen za limit detekce ADP. Chromatogram ADP o koncentraci  $1 \cdot 10^{-5}$   $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  je uveden na **obrázku 14**.

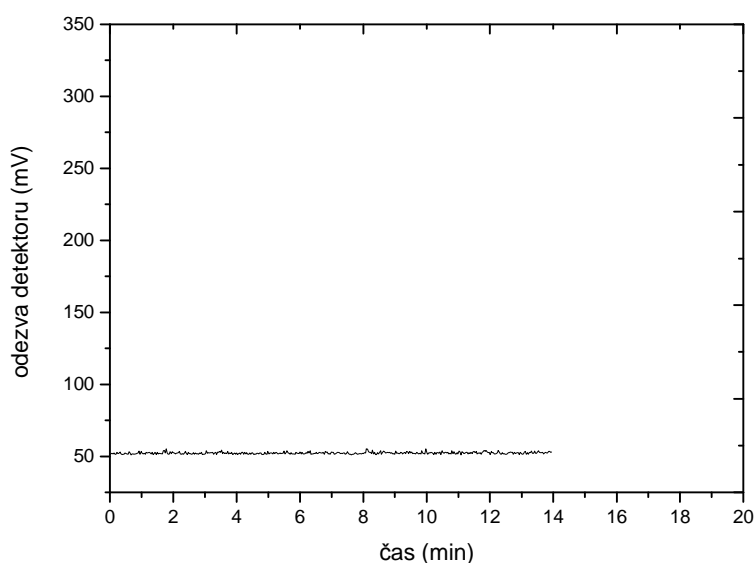


**Obrázek 13** Chromatogram ADP o koncentraci  $1 \cdot 10^{-7}$   $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  pro stanovení limitu detekce u ADP. Signál odpovídá velikosti zadrženému ADP na koloně, tedy šumu. Použitá kolona ZIC - HILIC 150 x 4,6 mm, 3,5  $\mu\text{m}$ , 100 Å, Peek HPLC kolona, SeQuant. Mobilní fáze 75:25 (v/v) acetonitril / 10 mM octan amonný. Průtok mobilní fáze  $0,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ . Teplota kolony  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ . Použitý přechod: prekurzorový ion 428 m/z a produktový ion 136 m/z.

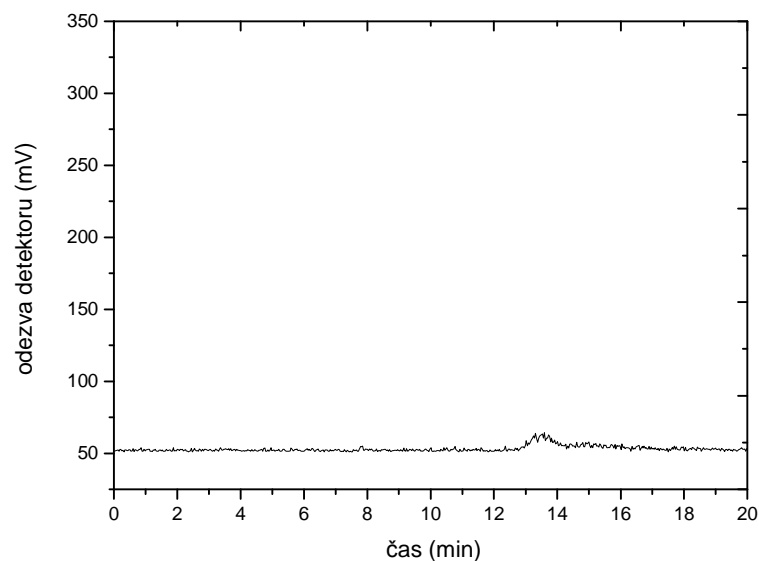


**Obrázek 14** Chromatogram ADP o koncentraci  $1 \cdot 10^{-5} \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  pro stanovení limitu detekce u ADP. Koncentrace ADP o velikosti  $1 \cdot 10^{-5} \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  (23 nM) odpovídá LOD. Použitá kolona ZIC - HILIC 150 x 4,6 mm, 3,5  $\mu\text{m}$ , 100  $\text{\AA}$ , Peek HPLC kolona, SeQuant. Mobilní fáze 75:25 (v/v) acetonitril / 10 mM octan amonný. Průtok mobilní fáze 0,5  $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$ . Teplota kolony 20  $^{\circ}\text{C}$ . Použitý přechod: prekurzorový ion 428 m/z a produktový ion 136 m/z.

Při určování limitu detekce ATP byl použit analyt o koncentraci  $1 \cdot 10^{-3}$  až  $1 \cdot 10^{-8}$   $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ . Měření bylo prováděno nejprve s nižšími koncentracemi, a proto se ATP na koloně nezadržovalo. Měření ATP o koncentraci  $1 \cdot 10^{-5}$   $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  nepřineslo žádný pík, jak je patrné z **obrázku 15**. Adenosintrifosfát o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4}$   $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  poskytoval první viditelný pík, a proto byla tato koncentrace označena za limit detekce ATP (koncentrace odpovídá 198 nM). Chromatogram ATP o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4}$   $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  pro stanovení LOD u vzorku ATP je na **obrázku 16**. Plochy píku analytů, stejně jako retenční časy analytů a jejich RMS (odmocnina průměrných čtverců, charakterizuje šum), jsou uvedeny v **tabulkách 7 a 8**.



**Obrázek 15** Chromatogram ATP o koncentraci  $1 \cdot 10^{-5}$   $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  pro stanovení limitu detekce u ATP. ATP neposkytuje žádný pík, jedná se tedy pouze o šum. Použitá kolona ZIC - HILIC 150 x 4,6 mm, 3,5  $\mu\text{m}$ , 100 Å, Peek HPLC kolona, SeQuant. Mobilní fáze 75:25 (v/v) acetonitril / 10 mM octan amonný. Průtok mobilní fáze 0,5  $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$ . Teplota kolony 20 °C. Pro analýzu byl použit přechod MRM v pozitivním módu, při kterém měl prekurzorový ion hodnotu 508 m/z a produktový ion 136 m/z.



**Obrázek 16** Chromatogram ATP o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  pro stanovení limitu detekce u ATP. Koncentrace ATP o velikosti  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  (198 nM) odpovídá LOD. Použitá kolona ZIC - HILIC 150 x 4,6 mm, 3,5  $\mu\text{m}$ , 100 Å, Peek HPLC kolona, SeQuant. Mobilní fáze 75:25 (v/v) acetonitril / 10 mM octan amonný. Průtok mobilní fáze  $0,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ . Teplota kolony 20 °C. Pro stanovení byl použit přechod MRM v pozitivním módu, kde prekurzorový ion měl hodnotu 508 m/z a produktový ion 136 m/z.

**Tabulka 7** Stanovení limitu detekce ADP. Koncentrace analytu  $1 \cdot 10^{-4}$  až  $1 \cdot 10^{-8} \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ . Vzorokly o koncentraci  $1 \cdot 10^{-8}$  a  $1 \cdot 10^{-7} \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  poskytují signály, které odpovídají velikostí zadrženému ADP na koloně, tedy šumu. Tučně označený řádek odpovídá limitu detekce ADP, tedy koncentraci analytu  $1 \cdot 10^{-5} \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ . RMS je tzv. odmocnina průměrných čtverců a charakterizuje šum.

Koncentrace ( $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ )	Retenční čas (min)	Plocha píku ( $\text{mm}^2$ )	Šířka píku (mm)	Výška píku (mm)	RMS
$1 \cdot 10^{-8}$	7,820	611	0,508	80	1,91
$1 \cdot 10^{-7}$	7,757	759	0,603	102	2,08
<b><math>1 \cdot 10^{-5}</math></b>	<b>7,757</b>	<b>1183</b>	<b>0,603</b>	<b>152</b>	<b>1,93</b>
$1 \cdot 10^{-4}$	7,757	5927	0,699	740	2,12

**Tabulka 8** Stanovení limitu detekce ATP. Koncentrace analytu  $1 \cdot 10^{-3}$  až  $1 \cdot 10^{-8}$   $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ . Tučně označený řádek odpovídá limitu detekce ATP, tedy koncentraci vzorku o velikosti  $1 \cdot 10^{-4}$   $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ . RMS je tzv. odmocnina průměrných čtverců a charakterizuje šum.

<b>Koncentrace</b> <b>(<math>\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}</math>)</b>	<b>Retenční čas</b> <b>(min)</b>	<b>Plocha píku</b> <b>(<math>\text{mm}^2</math>)</b>	<b>Šířka píku</b> <b>(mm)</b>	<b>Výška píku</b> <b>(mm)</b>	<b>RMS</b>
$1 \cdot 10^{-8}$	-	-	-	-	-
$1 \cdot 10^{-7}$	-	-	-	-	-
$1 \cdot 10^{-6}$	-	-	-	-	-
$1 \cdot 10^{-5}$	-	-	-	-	-
<b><math>1 \cdot 10^{-4}</math></b>	<b>13,594</b>	<b>416</b>	<b>1398</b>	<b>11</b>	<b>0,68</b>
$1 \cdot 10^{-3}$	13,213	6099	1,906	138	0,60

## 5. Závěr

V této bakalářské práci se podařilo analyzovat a detekovat vzorky ADP a ATP pomocí metody HPLC-MS/MS. Určení přechodů v pozitivním i negativním módu a určení hodnot kolizní energie vedly k zajištění vhodných podmínek pro provedení hmotnostní spektrometrie. Jako optimální podmínky separace pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie byly shledány analýza na stacionární fázi ZIC - HILIC s mobilní fází 75:25 (v/v) acetonitril / 10 mM octan amonný a s průtokem mobilní fáze o velikosti  $0,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ .

Limit detekce adenosindifosfátu a adenosintrifosfátu byl stanoven za použití optimalizovaných podmínek HPLC-MS/MS. Limit detekce ADP byl určen pro hodnotu koncentrace  $1 \cdot 10^{-5}$   $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  (což odpovídá koncentraci 23 nM). Mora a kolektiv [14] zjistili jako limit detekce ADP koncentraci  $15 \cdot 10^{-5}$   $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ . Dále byl stanoven LOD pro ATP, a to při koncentraci analytu o velikosti  $1 \cdot 10^{-4}$   $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  (odpovídá koncentraci 198 nM). Limit detekce ATP v literatuře [14] byl zjištěn při koncentraci analytu  $1 \cdot 10^{-4}$   $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ . Goutier a kolektiv [12] stanovili LOD pro ATP na hodnotu koncentrace 200 nM. Námi stanovené limity detekce nukleotidů jsou tedy srovnatelné s limity detekce v literatuře, měřeními pomocí stejných metod za velmi podobných experimentálních podmínek.

## 6. Literatura

1. Košťtíř J.: *Biochemie*. Avicenum, Praha 1974.
2. McMurry J.: *Organická chemie*. VUTIUM, Brno 2007.
3. [http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid\\_es-002\\_v1/hesla/adenosinfosfaty.html](http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002_v1/hesla/adenosinfosfaty.html) (31. 3. 2011).
4. Voet D., Voetová J.: *Biochemie*. Victoria publishing, Praha 1995.
5. Churáček J. a kol.: *Analytická separace látek*. SNTL, Praha 1990.
6. Zýka J. a kol.: *Analytická příručka 1*. SNTL, Praha 1979.
7. Štulík K. a kol.: *Analytické separační metody*. Nakladatelství Karolinum, Praha 2004.
8. Štícha M.: *Přednášky z hmotnostní spektrometrie* (<http://moodle.orgchem.cz/course>, 6. 4. 2011).
9. Kellner R., Mermet J-M., Otto M., Valcárcel M., Widmer H.M. : *Analytical chemistry*, druhé vydání. Wiley-vch 2004.
10. Preinerstorfer B., Schiesel S., Lämmerhofer M., Lindner W.: *Metabolic profiling of intracellular metabolites in fermentation broth from  $\beta$ -lactam antibiotics production by LC-tandem MS methods*. Journal of Chromatography A 2010, 1217, 312-328.
11. Yang S., Sadilek M., Synovec R., Lidstrom M.: *Liquid chromatography-tandem mass quadrupole mass spektrometry and comprehensive two-dimensional gas chromatography-time-of-flight mass spektrometry measurement of targeted metabolites of *Methylobacterium extorquens* AM1 grown on two different carbon sources*. Journal of Chromatography A 2009, 1216, 3280-3289.
12. Goutier W., Spaans P.A., Van der Neut M.A.W., McCreary A.C., Reinders J.H.: *Development and application of an LC-MS/MS method for measuring the effect of (partial) agonist on cAMP accumulation in vitro*. Journal of Neuroscience Methods 2010, 188, 24-31.
13. Coulier L., Bas R. Jespersion S., Verheij E. Van der Werf M., Hankemeier T: *Simultaneous quantitative analysis of metabolites using ion-pair chromatography-electrosprey ionization mass spektrometry*. Analytical Chemistry 2006, 78, 6573-6582.
14. Mora L., Hernández-Cázares A.S., Aristoy M-C., Toldrá F.: *Hydrophilic interaction chromatographic determination of adenosine triphosphate and its metabolites*. Food Chemistry 2010, 123, 1282-1288.
15. Žáková P., Sklenářová H., Havlíková L., Matysová L., Šatínský D.: *Optimalizace HPLC stanovení klotrimazolu*. Chemické listy 2009, 103, 251-255.