

## ANALYTICKÉ METODY STUDIA CYTOKININŮ

PETR TARKOWSKI, KAREL DOLEŽAL  
a MIROSLAV STRNAD

Laboratoř růstových regulátorů, Univerzita Palackého  
a Ústav experimentální botaniky AV ČR, Šlechtitelů 11,  
783 71 Olomouc  
tarkowsp@aix.upol.cz

Došlo 18.7.03, přepracováno 9.1.04, přijato 18.3.04.

Klíčová slova: cytokininy, imunochemické metody, kapalinová chromatografie, plynová chromatografie, hmotnostní spektrometrie, biotest

## Obsah

1. Úvod
2. Extrakce a čištění
3. Biotesty
4. HPLC
5. HPLC/MS
6. GC/MS
7. Imunochemické metody
8. Ostatní metody
9. Závěr

## 1. Úvod

Cytokininy (CK) tvoří jednu z pěti hlavních skupin rostlinných hormonů (fytohormonů). Fytohormony regulují růstové a vývojové procesy rostlin. Cytokininy byly definovány jako látky, které v přítomnosti auxinu (rovněž fytohormon) stimulují buněčné dělení<sup>1,2</sup>. Mezi hlavní fyziologické účinky CK patří potlačování apikální dominance, indukce regenerace orgánů, zpomalení stárnutí, udržování vysoké metabolické aktivity rostlinných pletiv a další<sup>3</sup>.

Podle chemické struktury je můžeme rozdělit do dvou hlavních skupin: *a*) deriváty adeninu, *b*) deriváty močoviny a thiomčoviny. Tento článek je věnován přirozeně se vyskytujícím cytokininům adeninového typu. Do této skupiny spadají dvě základní podskupiny, jež jsou podle charakteru postranního řetězce označovány jako isoprenoidní a aromatické. Uvnitř těchto podskupin pak můžeme nalézt různé deriváty (metabolity) volných bází, ribosidů a nukleotidů, až po *N*-glukosidy, případně *O*-glukosidy a konjugáty s aminokyselinami. Strukturální odlišnost těchto metabolitů má za následek jejich různou biologickou aktivitu. Konkrétně cytokininové nukleotidy jsou považovány za prekurzory transportních forem (ribosidů) a vlastních aktivních CK (volných bází). Naproti tomu cytokininové

glukosidy jsou produkty deaktivčních metabolických drah. Volné báze a ribosidy vykazují vysokou biologickou aktivitu. Ostatní deriváty jsou buď zcela neúčinné (*N*-glukosidy) nebo dočasně neúčinné (*O*-glukosidy). Strukturální vzorce nejdůležitějších derivátů cytokininů jsou shrnuty v tabulce I.

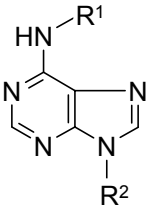
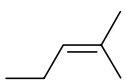
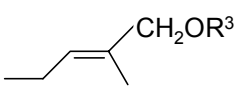
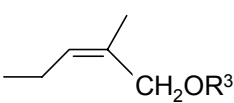
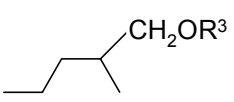
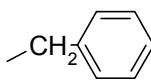
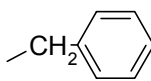
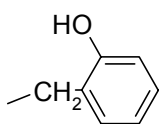
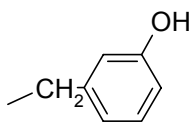
Rostlinné pletivo obsahuje vícesložkovou směs metabolitů, jež se vyskytují i v řádově odlišných hladinách. CK se v rostlinách, až na několik málo výjimek, vyskytují ve velmi nízkých koncentracích (fmol–pmol.g<sup>-1</sup> čerstvé hmoty). Obtíže spojené s analýzou CK v rostlinném extraktu jsou tedy značné zejména vzhledem k tomu, že je nutné odlišit studovanou látku od neobvykle velkého počtu nečistot. Vhodná analytická metoda pro studium CK v rostlinách proto vyžaduje spojení efektivního čistícího postupu a citlivé a dostatečně selektivní analytické koncovky. Požadavky kladené na analytickou metodu se pochopitelně dále liší podle momentálních potřeb biologů, druhu použitého pletiva či orgánu, metody studia a podle problémových otázek, které je třeba zodpovědět. Např. bude-li zapotřebí provést screening obsahu široké škály CK u několika kultivarů modelové rostliny *Arabidopsis thaliana* L., kde není k dispozici dostatečné množství výchozího rostlinného materiálu, měla by zvolená metoda být vysoce selektivní a výjimečně citlivá. Naopak půjde-li o pouhé sledování úbytku (spotřeby) jednoho syntetického cytokininu přidaného do kultivačního média, postačí metoda přiměřeně selektivní s průměrnou citlivostí. V druhém případě bude možno rovněž zjednodušit čistící postup, což v praxi znamená úsporu materiálu i času. S nástupem citlivých kombinovaných technik (HPLC/MS, GC/MS) narůstají možnosti studovat CK nejen na úrovni celé rostliny a jejích orgánů (listy, kořen, květ), ale i na úrovni nižších organizačních struktur (pletiva, buňky). Analytikovi je přitom kladena otázka, jaké nejmenší množství výchozího materiálu je ke spolehlivé identifikaci nebo stanovení postačující. Tam, kde bylo dříve při použití imunoanalytických nebo GC/MS technik zapotřebí jednotek až desítek gramů čerstvé hmoty, postačí při použití HPLC/MS několik set miligramů až gram.

V následujících odstavcích jsou shrnuty a porovnány všechny obecně používané analytické metody studia CK, a to podle jednotlivých analytických parametrů (citlivost, selektivita, časová a finanční náročnost, robustnost metody, možnost automatizace), pokud jsou v původních pracích tyto parametry uvedeny.

## 2. Extrakce a čištění

Úlohou extrakčních procesů je převedení látek, jež jsou předmětem našeho zájmu, do extrakčního činidla tak, aby v jejich průběhu nedošlo k degradaci látek (enzymatické, tepelné, světlem indukované, oxidativní)

Tabulka I  
Strukturní vzorce, názvy a zkratky některých cytokininů

	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	Název	Zkratka
		H	–	<i>N</i> <sup>6</sup> -isopentenyladenin	iP
		R	–	<i>N</i> <sup>6</sup> -isopentenyadenosin	iPR
		G	–	<i>N</i> <sup>6</sup> -isopentenyladenin-9-glukosid	iP9G
		RP	–	<i>N</i> <sup>6</sup> -isopentenyadenosin-5'-monofosfát	iPMP
		H	H	<i>trans</i> -zeatin	<i>tZ</i>
		R	H	<i>trans</i> -zeatin ribosid	<i>tZR</i>
		H	G	<i>trans</i> -zeatin- <i>O</i> -glukosid	<i>tZOG</i>
		R	G	<i>trans</i> -zeatinribosid- <i>O</i> -glukosid	<i>tZROG</i>
		RP	H	<i>trans</i> -zeatinribosid-5'-monofosfát	<i>tZMP</i>
		H	H	<i>cis</i> -zeatin	<i>cZ</i>
		R	H	<i>cis</i> -zeatinribosid	<i>cZR</i>
		H	G	<i>cis</i> -zeatin- <i>O</i> -glukosid	<i>cZOG</i>
		R	G	<i>cis</i> -zeatinribosid- <i>O</i> -glukosid	<i>cZROG</i>
		RP	H	<i>cis</i> -zeatinribosid-5'-monofosfát	<i>cZMP</i>
		H	H	dihydrozeatin	DHZ
		R	H	dihydrozeatinribosid	DHZR
		RP	H	dihydrozeatinribosid-5'-monofosfát	DHZMP
		H	G	dihydrozeatin- <i>O</i> -glukosid	DHZOG
		R	G	dihydrozeatinribosid- <i>O</i> -glukosid	DHZROG
		H	–	<i>N</i> <sup>6</sup> -(benzylamino)purin	BAP
		R	–	<i>N</i> <sup>6</sup> -(benzylamino)purinribosid	BAPR
		G	–	<i>N</i> <sup>6</sup> -(benzylamino)purin-9-glukosid	BAP9G
		H	–	<i>o</i> -topolin	<i>oT</i>
		R	–	<i>o</i> -topolinribosid	<i>oTR</i>
		G	–	<i>o</i> -topolin-9-glukosid	<i>oT9G</i>
		H	–	<i>m</i> -topolin	<i>mT</i>
		R	–	<i>m</i> -topolin ribosid	<i>mTR</i>
		G	–	<i>m</i> -topolin-9-glukosid	<i>mT9G</i>

H – vodík; R – β-D-ribofuranosyl; G – β-D-glukopyranosyl; RP – β-D-ribofuranosyl-5'-monofosfát

a aby byl extrakční výtěžek přijatelně vysoký pro požadované spektrum metabolitů – cytokininové nukleotidy, volné báze, ribosidy, *N*-glukosidy a *O*-glukosidy. Z těchto důvodů jsou obvykle pro extrakci volena rozpouštědla jako methanol, ethanol a aceton či vícesložkové extrakční soustavy, mezi nimiž má výsadní postavení extrakční směs podle Bieleeského<sup>4</sup>. Jedná se o směs methanol-chloroform-kyselina mravenčí-voda (12:3:1:4, v/v). Její složení bylo optimalizováno s ohledem na extrakční účinnost a schopnost inaktivovat rostlinné fosfatasy<sup>5</sup> (enzymy zodpovědné za vznik ribosidů odštěpením fosfátů z molekul cytokininových nukleotidů). Při použití HPLC/MS či GC/MS je možné působení fosfatas monitorovat za pomoci interních standardů, které jsou označeny různým počtem <sup>2</sup>H a <sup>15</sup>N atomů v molekule<sup>6</sup>. Preventivním opatřením proti degradaci CK je extrakce za snížené teploty, obvykle v rozmezí 4 °C až –20 °C (podle obsahu vodné složky v extrakčním činidle). Běžná doba účinné extrakce se podle druhu extrakce a rostlinného pletiva pohybuje mezi 4 až 24 hodinami.

Po extrakci a odstranění tuhých podílů centrifugací či filtrací následuje čistící proces. Podle typu analytické koncovky jsou na čištění kladeny různé nároky. Všechny tyto procesy však spojuje několik základních požadavků. Přechištění musí v první řadě rozdělit celé spektrum cytokininových metabolitů do podskupin – minimálně do 3 frakcí: nukleotidové, báze (volné báze, ribosidy, *N*-glukosidy) a *O*-glukosidové, pro něž (všechny společně) neexistuje univerzální analytická koncovka. Dále musí poskytnout dostatečný stupeň přechištění, přičemž by měla být zachována uspokojivá návratnost analytů. To znamená, že jednotlivé stupně by měly eliminovat z původního rostlinného extraktu všechny ostatní látky (sekundární metabolity, cukry, peptidy, aminokyseliny apod.). Přechištěný biologický materiál by pak obsahoval jen CK, případně látky, které následnou kvalitativní či kvantitativní analýzu neruší. Navíc by ideální metoda měla být natolik robustní, aby se odlišný metabolický profil rostlinného extraktu neodrážel v proměnlivé návratnosti. Toto je důležité např. při studiu CK v různých rostlinách či odběru stejného vzorku pletiva v jednotlivých vývojových stádiích rostliny. Běžné čistící postupy bývají sestaveny z několika stupňů, mezi nimiž je nutno provést zahuštění vzorku (na rotační vakuové odparce, odpařováním v proudu dusíku nebo lyofilizací) a převedení do roztoku jiného složení. Nejčastěji jde o kombinaci extrakce tuhou fází (SPE) s iontově výměnnou a imunoafinitní chromatografií (IEC, IAC, cit.<sup>4</sup>). Málkové metody koncové analýzy (RIA, ELISA, GC/MS, HPLC/MS) jsou schopny pracovat s intaktními nukleotidy a *O*-glukosidy. Proto je často nezbytné přeměnit nukleotidy na ribosidy alkalickou fosfatasou a *O*-glukosidy pak na odpovídající ribosidy či volné báze β-glukosidasou. Tak získáme nukleotidovou (NT) a *O*-glukosidovou frakci (OG), která obsahuje příslušné volné báze a ribosidy. Imunoafinitní chromatografie bývá často posledním čistícím stupněm. Protože imunoafinitní chromatografie je velmi významná čistící technika zejména pro svou vysokou selektivitu, je této problematice věnována zvláštní pozornost (viz kapitola 6).

Levnou, rychlou a účinnou alternativou je užití extrakce kapalina-kapalina<sup>7</sup>. Metoda je založena na rozdílné rozpustnosti CK ve vodě a butanolu při různém pH. Umožňuje oddělení balastních látek a současně frakcionaci bázi a nukleotidů, přičemž návratnost je relativně vysoká a stupeň přechištění uspokojivý. Nejnovějším přístupem je však extrakce tuhou fází (SPE) využívající hybridní sorbenty, které mají vlastnosti reverzní fáze a iontoměničce současně<sup>8</sup>. Takto lze výrazně zjednodušit celý čistící postup, neboť jedinou náplňovou kolonkou lze odstranit interferující látky z rostlinného extraktu a současně frakcionovat jednotlivé skupiny cytokininových metabolitů, ale i jiných fytohormonů. Zanedbatelná není ani úspora spotřebního materiálu, rozpouštědel, chemikálií a především času. Kromě použití nových hybridních sorbentů se pro další zkrácení celkové doby analýzy nabízí automatizace zpracování rostlinných extraktů. Tak lze zvýšit množství vzorků zpracovatelných za 24 hodin z pěti až osmi na několik desítek<sup>9</sup>.

### 3. Biotesty

Jak již bylo řečeno v úvodu, cytokiny ovlivňují celou škálu fyziologických procesů. Biotesty se hodnotí aktivita studovaného chemického individua v konkrétním biologickém procesu. Např. kalusovým biotestem se zjišťuje schopnost cytokininu stimulovat buněčné dělení za přítomnosti stálé koncentrace auxinu; senescenčním biotestem se zjišťuje schopnost cytokininu zpomalit degradaci chlorofylu<sup>10</sup>. Takto získané hodnoty jsou poté porovnávány s hodnotami známých vysoce aktivních derivátů (6-(benzylamino)purin, zeatin). Jednotlivé CK vykazují různou aktivitu v různých biotestech. Tyto charakteristiky vypovídají o tom, že i v rámci jedné skupiny rostlinných hormonů mohou různé deriváty ovlivňovat jednotlivé fyziologické procesy odlišným způsobem.

Má-li být otestována biologická aktivita neznámé látky izolované z rostlinného pletiva, je nutné rostlinný extrakt důkladně zahustit a frakcionovat (TLC, HPLC, cit.<sup>11,12</sup>). Pak je zajištěno, že výsledky získané v biotestu skutečně náležejí jedině sloučenině a nikoliv směsi CK. Testování biologické aktivity se uplatňuje jak při vývoji nových látek (např. pro účely zemědělství<sup>13</sup>), tak i při hledání dosud nepopsaných přirozeně se vyskytujících hormonů<sup>14,15</sup>.

### 4. HPLC

Stejně jako v jiných oborech (farmakologie, environmentální analýza) byly prvními chromatografickými metodami v analýze fytohormonů tenkovrstvá papírová chromatografie (TLC, PC, cit.<sup>11</sup>). TLC se používá dodnes jako levná a rychlá alternativa sofistikovanějších instrumentálních metod (HPLC, GC) pro stanovení, která nevyžadují vysokou separační účinnost a vysokou citlivost<sup>12</sup>. To platí zejména pro některé metabolické studie, kdy je rostlinám (příp. suspenzním kulturám rostlinných buněk) aplikován syntetický růstový regulátor buď v obrovském nadbytku,

anebo radioaktivně značený<sup>16</sup>. HPLC je dnes zřejmě nej-používanější separační technikou v oblasti kvalitativní i kvantitativní analýzy cytokininů. Vedle rychlosti a vysoké separační účinnosti je její velkou výhodou možnost snadného spojení s celou řadou technik finální analýzy: UV-spektrometrie, hmotnostní spektrometrie (MS), imunoanalýza (RIA, ELISA), biotest<sup>4</sup>. Díky tomu je možno kombinovat v jediném experimentu např. data z detektoru diodového pole s výsledky testu ELISA či je doplnit strukturní MS analýzou nebo biologickou aktivitou (biotest) jednotlivých HPLC frakcí. Systém normálních fází je využíván výhradně pro preparativní chromatografii cytokininů derivatizovaných pro GC. Většina autorů pak separuje CK v systému reverzních fází (RP), kde se cytokiny snadno dělí díky rozdílu v polaritě. Bez ohledu na analytickou koncovku jsou na účinnost separace kladeny vysoké nároky. V analyzované směsi mohou být přítomny *cis/trans* izomery zeatinových derivátů a polohové izomery topolinů či 3-, 7- a 9-glukosidy většiny CK. Nedokonalá separace může tedy způsobit nadhodnocení koncentrací při stanovení, nadhodnocení biologické aktivity v biotestu či znemožnit přesnou identifikaci.

## 5. HPLC/MS

Od počátku devadesátých let bylo spektrum metod používaných k analýze cytokininů rozšířeno o kombinaci kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (HPLC/MS). Dosud byly publikovány práce o použití různých typů ionizace, počínaje ionizací rychlými atomy (FAB), termosprejem (TSI) či chemickou ionizací za atmosférického tlaku (APCI) až po ionizaci elektrosprejem (ESI). První tři experimentální ionizační přístupy se zpočátku vyznačovaly nepřilíši vysokou citlivostí. Bylo nutno zpracovávat větší množství biologického materiálu nebo pracovat s transgenním materiálem, u něhož byly molekulárně-biologickými přístupy „indukovány“ vyšší hladiny CK. První práce v této oblasti popisuje užití HPLC/APCI-MS ke stanovení hladiny *tZR* v nádorech rostlin tabáku<sup>17</sup>. Hmotnostní spektra volných bází obsahovala jen kvazimolekulární ion a spektra ribosidů obsahovala navíc pouze protonovaný aglykon. Dosažený detekční limit (0,6 pmol pro *tZR*) dovoluje rutinní použití metody pro kvantitativní analýzu rostlinného materiálu s přirozeným obsahem cytokininů. Méně úspěšné bylo použití HPLC/TSI-MS/MS (cit.<sup>18</sup>). Hlavním omezením této metody je vysoká citlivost termospreje na změny ve složení mobilní fáze. Bez možnosti gradientové eluce musí být některé metabolity analyzovány odděleně (ZR, DHZR), což významně prodlužuje celkovou dobu analýzy a zvyšuje potřebné množství výchozího biologického materiálu. Dále byla ke studiu CK použita kapilární HPLC/frit-FAB-MS/MS (cit.<sup>19</sup>, frit-FAB, ionizace rychlými atomy na kovové fritě). Přestože obecně řadíme FAB mezi měkké ionizační techniky, hmotnostní spektra celé řady cytokininových metabolitů obsahovala značné množství fragmentů a byla srovnatelná s bohatostí spekter po klasické elektronové ionizaci (EI). Proti ESI-MS jsou FAB-MS/MS spektra, zejména u molekul obsa-

hujících cukerný zbytek, v průměru o jeden až dva fragmenty bohatší. Těto metody bylo s úspěchem použito k identifikaci a stanovení hladin isopentenyladenosinu v jehličí smrku. Detekční limity pro jednotlivé metabolity se pohybují od jednotek po desítky pmol<sup>19</sup>. Dále byla publikována metoda HPLC/ESI-MS/MS pro kvantifikaci 16 metabolitů cytokininů, s detekčními limity kolem 1 pmol (cit.<sup>20</sup>). Její hlavní předností je vysoká propustnost vzorků. Vzhledem ke čtyřminutové době jedné analýzy je možno zpracovat až 150 vzorků za den.

Následující práce stejného kolektivu autorů nabízí přehledné srovnání detekčních limitů a lineárních dynamických rozsahů při použití konvenčních (4,6 mm i.d.), mikro (2 mm, 1 mm i.d.) a kapilárních (0,3 mm i.d.) chromatografických kolon pro HPLC/ESI-MS/MS (cit.<sup>21</sup>). Prezentuje i srovnání chromatografické prekoncentrace analytu na předkolonce nebo přímo na analytické koloně. Tyto přístupy nacházejí uplatnění zejména při práci s biologickými vzorky. Umožňují nástřik relativně velkého objemu vzorku i na kolony menších průměrů (mikrokolony a kapilární kolony) a zakoncetrování analytu na stacionární fázi. Po této prekoncentraci následuje zvýšení eluční síly mobilní fáze a vlastní chromatografická separace na analytické koloně. Autoři uvádějí, že při použití kapilární chromatografické kolony v kombinaci se zkoncentrováním vzorku na předkolonce je možno dosáhnout femtomolárních detekčních limitů. Podobný přístup ke kvantitativní analýze zeatinových, dihydrozeatinových a isopentenyladenosinových derivátů byl nedávno publikován jinou skupinou (mez stanovitelnosti LOD 50–100 fmol, cit.<sup>22</sup>).

Všechny výše uvedené metody ESI byly založeny na částečné separaci vzorků na chromatografické koloně a hmotnostní detekci v selektivním modu – sledování produktu rozpadu iontu (multiple reaction monitoring, MRM). Takovýto způsob detekce umožňuje sledovat signál několika charakteristických fragmentací současně. Je tedy možné zjednodušit separaci a ušetřit čas. Komplikace nastávají v okamžiku, kdy je zapotřebí sledovat signál izomerů. Pokud u izomerů dochází ke shodné fragmentaci a vybraný přechod kvazimolekulární ion→fragment pro MRM je stejný (např. *tZR*: 352→220, *cZR*: 352→220), je chromatografická separace nezbytná. Jinak totiž není možno předejít smíšené odezvě izomerů. Další komplikací je přirozený výskyt derivátů dihydrozeatinu. Ty se liší od svých zeatinových analogů pouze o dvě hmotnostní jednotky. Při sledování signálu dihydrozeatinu je tudíž nutné počítat i s příspěvkem zeatinového izotopu M+2 apod. V oblasti analýzy HPLC/MS cytokininů je proto zapotřebí dokonalé chromatografické separace, a to nejen s ohledem na přirozený výskyt izomerů, ale rovněž s ohledem na možnost dokonalějšího odstranění nespecifického (chemického) šumu. Přestože je použito intenzivní předúpravy vzorků, důkladná chromatografická separace může výrazně napomoci získání lepšího signálu v hmotnostním detektoru. Poslední práce popisující použití ESI-MS nabízí možnost použít ke kvantitativní analýze CK hmotnostního detektoru s jedním kvadrupólovým analyzátozem<sup>23</sup>.

Proti výše uvedeným technikám MS/MS (tandemová hmotnostní spektrometrie) není možno u tohoto typu detektoru použít MRM. Selektivita hmotnostního detektoru je nahrazena úplnou chromatografickou separací. Skutečnost, že kombinací imunoafinitní chromatografie a HPLC/ESI-MS v SIM modu (sledování vybraného iontu, selected ion monitoring) bylo dosaženo dostatečné selektivity, byla prokázána současně provedeným testem HPLC/ELISA. Jde o první metodu analýzy cytokininů, která si všímá obou skupin CK – isoprenoidních i aromatických. Nabízí kvantifikaci devatenácti isoprenoidních CK a sledování přítomnosti dalších deseti aromatických CK.

Nový přístup představuje rovněž předkolumnová derivatizace CK pro metodu HPLC/frit-FAB-MS/MS (cit.<sup>6</sup>). Propionáty (estery) cytokininových nukleosidů a glukosidů a *N*-benzylderiváty volných bází poskytují vyšší signál kvazimolekulárních iontů. To je dáno zvýšením hydrofobního charakteru molekul, nárůstem jejich povrchové aktivity na fritě iontového zdroje a tím účinnější ionizaci. Důležité je rovněž zvýšení molekulové hmotnosti po derivatizaci, které posouvá signál jednotlivých iontů do oblasti o vyšším *m/z*, tedy do oblasti s nižším nespécifickým šumem. Spektra FAB jsou v porovnání se spektry nederivatizovaných molekul bohatší. Uvedená metoda již byla s úspěchem použita ke stanovení endogenních hladin deseti CK v *Arabidopsis thaliana* L. (cit.<sup>6</sup>) a identifikaci nových derivátů aromatických CK v rostlinách<sup>14,15</sup>. Limity detekce se pohybují ve femtomolární oblasti. Všechny uvedené výhody jsou však vykoupeny vyšší časovou náročností derivatizace. V neposlední řadě umožnila tato metodika i měření rychlosti biosyntézy CK (značení deuteriem *in vivo*)<sup>24</sup>. V takovém případě jsou rostliny pěstovány v kapalném kultivačním médiu, které obsahuje 30% podíl deuterované vody. Deuterium postupně nahrazuje vodík v nově syntetizovaných molekulách nejrůznějšího metabolického původu, tedy i CK. Podle stupně inkorporace deuteria se mění izotopový profil molekul nově syntetizovaných. Metoda umožnila objev alternativní dráhy biosyntézy zeatinových derivátů<sup>25</sup>.

## 6. GC/MS

Metoda plynové chromatografie s hmotnostní detekcí hrála od počátku nezastupitelnou roli zejména v kvalitativní analýze. Před zavedením HPLC/MS byla jedinou dostupnou identifikační metodou a výrazně usnadnila určení chemické struktury celé řady cytokininových metabolitů (např.<sup>26,27</sup>). CK nepatří mezi těkavé látky a pro analýzu plynovou chromatografií musí být derivatizovány. Nutnost derivatizovat tyto látky je hlavní nevýhodou GC/MS proti HPLC/MS. Samotná derivatizace je časově náročná a většinou ještě komplikovaná potřebou znovu přečistit vzorky po derivatizaci kapalinovou chromatografií. Trimethylsilylderiváty<sup>28,29</sup> a trifluoracetylderiváty<sup>30</sup> podléhají hydrolyze a *terc*-butyldimethylsilylace<sup>31</sup> jsou vhodné pouze k přípravě těkavých derivátů volných cytokininových bází (zeatinu, isopentenyladeninu apod.). Permethylace<sup>32,33</sup> poskytují stabilní produkty, avšak neprobíhají

kvantitativně a vzniká několik vícenásobných derivátů. Acetylace je snadná, produkty nepodléhají hydrolyze, ale některé deriváty jsou nestabilní v GC/MS systému<sup>34</sup>. Při pentafluorbenzylaci vzniká větší množství produktů<sup>35</sup>. Přes všechny tyto nevýhody se však GC/MS dlouhodobě používá k identifikaci a stanovení. Odlišným přístupem je hmotnostní spektrometrie s desorpční chemickou ionizací (DCI-MS). Jde o techniku, která umožňuje přímé zavedení vzorku bez kombinace s GC. Pomalým nárůstem teploty za přítomnosti amoniaku jako reakčního plynu se vzorek současně zplyní a ionizuje<sup>36</sup>. Je nesnadné přímo porovnat citlivost (příp. jiné obecné analytické parametry) GC/MS metod používaných ke stanovení CK. Autoři původních prací se zaměřili zejména na popis a výčet výhod té které derivatizace a ionizace (EI versus CI) ve vztahu k bohatosti MS spektra, či intenzitě molekulárních iontů. Obecně lze shrnout, že při stanovení různých metabolitů CK v rostlinách se při použití GC/MS detekční limity pohybují v jednotkách až stovkách pmol. Celkově nižší citlivost, nutnost derivatizace a složitější čištění vedly k potřebě většího množství výchozího biologického materiálu. Podle typu studovaného pletiva, počtu a typu sledovaných CK (báze, ribosidy, glukosidy) se výchozí množství materiálu pohybuje v jednotkách až desítkách gramů čerstvé hmoty.

## 7. Imunochemické metody

Imunochemické metody nalezy v oblasti analýzy CK široké uplatnění. Je to dáno zejména vysokou citlivostí těchto metod při nižších nárocích na přístrojové vybavení a nižších provozních nákladech v porovnání s HPLC/MS a GC/MS.

Základním principem imunoanalytických metod je vytvoření imunokomplexního páru antigen(analyt)-protilátka, který pak může být různým způsobem detegován a stanoven<sup>37</sup>. Pro detekci vzniklého imunokomplexu je důležité označení jednoho z reaktantů radioaktivním prvkem, enzymem, fluorescenční nebo chemiluminiscenční látkou. Většina prvních imunoanalýz byla založena na použití radioaktivně značených indikátorů [<sup>125</sup>I] a [<sup>3</sup>H], a to pro jednoduchost detekce<sup>38</sup>. Později bylo v imunotestech aplikováno enzymatické<sup>39</sup> nebo fluorescenční<sup>40</sup> značení, popř. i další speciální neradioaktivní značky. Pro stanovení nízkomolekulárních látek (jako jsou CK<sup>37</sup>) imunoanalytickými metodami se používá testů založených na kompetitivním uspořádání, tj. definované množství značeného indikátoru soutěží s různými koncentracemi neznačeného standardu o omezený počet volných vazebných míst protilátek. Jestliže je koncentrace protilátky a značeného antigenu konstantní, pak je poměr mezi značeným antigenem volným a vázaným funkcí koncentrace neznačeného antigenu (stanovovaného analytu) v roztoku. Porovnáním se standardní křivkou, získanou použitím známých koncentrací neznačeného antigenu, lze z poklesu vázané aktivity určit množství antigenu přítomného v neznámém vzorku.

CK jsou nízkomolekulární organické sloučeniny

a jako takové nevyvolávají v organismu imunitní odpověď. Vlastnosti antigenů nabývají až po navázání na vhodný makromolekulární nosič. Syntetické postupy používané při přípravě cytokininových konjugátů jsou založeny na reakci ribosidů oxidovaných jodistanem s aminoskupinami nosičové bílkoviny a následné redukci borohydridem (stabilizace vazby)<sup>41</sup>. Proto jsou po imunizaci tímto typem cytokininových konjugátů získávány protilátky, které se vyznačují vysokou citlivostí k purinové části molekuly, ale zároveň poskytují možnost společného stanovení cytokininových bází a cytokininů substituovaných v poloze  $N^9$  (např.<sup>41–43</sup>).

Jednou z důležitých charakteristik připravených protilátek je jejich křížová reaktivita. Protilátky obvykle neváží jen antigen, proti němuž byly připraveny, ale i látky strukturně podobné. Míra křížové reaktivity se vyjadřuje jako podíl koncentrace křížově reagující látky a antigenu nezbytné pro 50% nasycení vazebných míst protilátky. Pro zjednodušení se vyjadřuje v procentech. V některých případech je žádoucí, aby např. protilátky připravené proti cytokininovému ribosidu vykazovaly křížovou reaktivitu i k příslušným volným bázím či  $N^9$  glukosidům. Pak je totiž možné použít jedné protilátky ke stanovení hned tří metabolitů.

První polyklonální protilátky pro CK popsali Hacker a kolektiv<sup>44</sup>. Imunoanalytické stanovení CK v rostlinných pletivech bylo poprvé popsáno Brandonem<sup>45</sup>. Protilátky proti *tZR* však vykazovaly vysokou křížovou reaktivitu s *iPR*. Proti *iPR* byly připraveny první protilátky v rámci studia *tRNA*<sup>46</sup>. Antiséra proti *iPR* vykazovala pouze slabou křížovou reakci s CK ze skupiny 6-(benzylamino)-purinu a kinetinu (6-furfurylaminopurin). Obecně je vazba CK k odpovídající protilátce závislá na substituci na  $N^6$  a také na substituentu v pozici  $N^9$  či  $N^3$ . Z tohoto důvodu protilátky proti *iPR*, *tZR*, *diHZR*, *BAPR*, *oTR* a *mTR* nevykazují křížovou reaktivitu s adeninem nebo adenosinem, který není v  $N^6$  poloze substituován. S protilátkami proti cytokininovým nukleosidům byla křížová reaktivita volných bází asi 50 %,  $N^9$  glukosidů asi 30–100 %, nukleotidů v rozmezí 60–100 % a  $N^3$  glukosidů 20–70 %.  $N^7$  a *O*-glukosidy s těmito protilátkami obecně nereagují. Také první popsané monoklonální protilátky proti cytokininům vykazovaly různou křížovou reaktivitu. Například protilátky proti *tZR* charakterizované Trionem a kolektivem<sup>47</sup> vykazovaly křížovou reaktivitu s *iP*, která dosahovala až 20 %. Také Wang a kolektiv<sup>48</sup> zjistili značné rozdíly v křížové reaktivitě jejich *iPR* protilátek s různými CK. Vzhledem k významným křížovým reaktivitám protilátek připravených proti jednotlivým CK bylo nutné při použití imunoanalytických metod pro kvantitativní analýzu použít některé chromatografické metody pro frakcionaci vzorku, např. TLC nebo HPLC (cit.<sup>41,49</sup>). Frakcionace vzorku byla provedena pro oddělení jednotlivých křížově reagujících látek, které mohly být následně samostatně stanoveny.

Další technikou, která naopak vhodně využila vyšších křížových reaktivit připravených protilátek, byla imunoafinitní chromatografie (IAC). Imunoafinitní chromatografie je afinitní chromatografická metoda, ve které stacionární

fázi tvoří protilátka nebo protilátce příbuzné činidlo. Jejím principem je tedy interakce mezi protilátkou a antigenem. Tato technika se používá jako vysoce specifická čistící metoda ve spojení s dalšími analytickými technikami<sup>50</sup>. Morris a spol.<sup>51</sup> k tomuto účelu použili sloupec s navázanými protilátkami proti *tZR*. S tímto sorbentem bylo možno izolovat příslušné CK přímo ze surového extraktu, neboť protilátky imobilizované na sloupci celulosy zachytily pouze Z a jeho  $N^9$  substituované metabolity. Po imobilizaci protilátek připravených proti zeatinribosidu a isopentenyladenosinu<sup>48</sup> byl připraven nosič, který specificky v jednom stupni umožnil izolaci celé skupiny isoprenoidních cytokininů s jejich následným stanovením kapalinovou chromatografií s UV detekcí. Použitím IAC bylo dosaženo takového stupně přečištění vzorků, kterého lze jen stěží dosáhnout konvenčními chromatografickými technikami<sup>52</sup>. Uvedené metody umožnily rychlé a přesné stanovení CK metodou HPLC s detektorem diodového pole<sup>53</sup> nebo HPLC/RIA(ELISA)/MS (cit.<sup>23,51,54</sup>). Výhodou IAC je i vysoká návratnost při čištění, pohybující se okolo 85 %. Výsledky analýz CK v různých rostlinných materiálech získaných uvedenými technikami se dobře shodovaly s výsledky GC/MS analýz<sup>42</sup>. V poslední době se tedy IAC stále více uplatňuje při stanovení cytokininů v rostlinném materiálu. Přečištění imunoafinitní chromatografií umožnilo zjednodušit analýzy vzorků a snížit detekční limity pro jednotlivé analyty vlivem výrazného snížení obsahu balastních látek.

## 8. Ostatní metody

Ostatní analytické přístupy nenalezly doposud širší uplatnění v kvalitativní ani kvantitativní analýze CK. Kapilární zónové elektroforézy (CZE) bylo použito ke studiu interakcí CK s cyklodextriny. Přidávkem cyklodextrinu do základního elektrolytu bylo dosaženo uspokojivé separace<sup>55</sup>. Dále byly touto metodou stanoveny přesné disociační konstanty vybraných zástupců aromatických i isoprenoidních cytokininů<sup>56</sup>. Metoda je proti klasickým metodám stanovení disociačních konstant (UV-spektrometrie, diferenciální pulzní voltametrie) výhodnější hned z několika důvodů. Protože jde o separační techniku, je možné pracovat se vzorky nižší čistoty a stanovovat konstanty několika derivátů současně. Metoda je jednoduchá a snadno automatizovatelná<sup>57</sup>. Dosud jedinou aplikaci představuje práce Pacákové a spol.<sup>7</sup>, která je věnována použití CZE ke stanovení derivátů zeatinu, isopentenyladeninu a 6-(benzylamino)purinu v extraktech pšenice, řepy a tabáku. Jde bohužel pouze o pilotní studii, na kterou nebylo doposud navázáno.

První elektrochemické studie byly zaměřeny na popis elektrochemického chování CK (cit.<sup>58,59</sup>). Podrobné studování oxidačních i redukčních procesů, kterým cytokinin podléhá na uhlíkových a rtuťových elektrodách, umožnilo aplikaci těchto technik v oblasti kvantitativní analýzy<sup>60–62</sup>. Jejich autoři uvádějí, že po odstranění interferujících balastních látek přečištěním mohou být elektrochemicky analyzovány i endogenní hladiny CK v rostlin-

ném materiálu. Nalezené hladiny Z, DHZ a DHZR jsou však neobvykle vysoké. Je pravděpodobné, že byly nadhodnoceny nedostatečnou předseparací stanovovaných CK na TLC. Voltametrický signál tudíž odpovídá při daném potenciálu píku signálu směsi více metabolitů. Nedávno publikovaná práce našeho týmu popisuje možnosti využití voltametrických technik ke sledování spotřeby BAP v kultivačních médiích<sup>63</sup>.

## 9. Závěr

Metody kvalitativní a kvantitativní analýzy napomáhají objasnit úlohu CK v regulaci růstu a vývoje rostlin. Společně s klasickými fyziologickými, molekulárně-biologickými či genetickými postupy přispívají k odhalování molekulárních mechanismů účinku CK v rostlinách. Časově nejnáročnějším stupněm při analýze CK v biologickém materiálu byla a nadále zůstává extrakce a čištění. Nejlevnější, relativně rychlou a snadnou čistící metodou je extrakce kapalina-kapalina<sup>7</sup>. Nejvhodnější pro automatizaci se jeví extrakce tuhou fází při použití hybridních sorbentů<sup>8</sup>. S ohledem na pořizovací náklady zařízení potřebného k automatizaci a relativně vysoké provozní náklady, půjde však o metodu nejnákladnější. Zavedení kombinovaných technik GC/MS a zejména HPLC/MS umožňuje kvantifikovat cytokininy ve stále menším množství výchozího biologického materiálu (stovky miligramů čerstvé hmoty). Lineární dynamické rozsahy jsou srovnatelné. HPLC/MS je obecně citlivější, zvláště při použití kapilární HPLC v kombinaci s MS/MS. GC/MS je metodou časově náročnější (ve srovnání s HPLC/MS), vzhledem k nutnosti derivatizace analyzovaných CK. Mnohem levnější alternativou obou výše uvedených instrumentálních technik zůstávají imunochemické metody (RIA, ELISA). Jejich citlivost je postačující, pracuje-li se s gramovým množstvím biologického materiálu. Imunochemické metody nejsou náročné na přístrojové vybavení, pokud se nevyžaduje jejich úplná automatizace. Jejich nevýhodou je však časová náročnost. Biotesty (ve spojení s HPLC) jsou bezpochyby nejlevnějším přístupem k analýze cytokininů. Poskytují však jen orientační hodnoty přirozených hladin hormonů a jejich hlavní význam stále spočívá v ověřování biologické aktivity studovaných derivátů cytokininů.

Novým trendem v oblasti fytochemie je studium metabolického profilu (tzv. metabolic profiling<sup>64</sup>). Jde o sledování výskytu a hladin velkého množství (i stovky) složek rostlinných extraktů v průběhu jediné GC/MS/MS analýzy. Využívá se přitom extrakce do univerzálního extrakčního činidla, jednoduché (univerzální) nebo vícenásobné derivatizace a dokonalé chromatografické separace na kapilárních GC kolonách. Takto mohou být analyzovány produkty desítek metabolických drah současně. Je zřejmé, že při studiu fytohormonů je právě takovýto přístup velmi vhodný, např. pro sledování interakcí mezi jednotlivými skupinami hormonů<sup>65,66</sup>.

*Tato práce vznikla za podpory GA ČR (522/01/0275) a GA AV ČR (IBS4055304).*

## LITERATURA

1. Miller C. O., Skoog F., Von Saltza M. H., Strong F. M.: *J. Am. Chem. Soc.* 78, 1392 (1955).
2. Skoog F., Strong F. M., Miller C. O.: *Science* 148, 532 (1965).
3. Macháčková I., v knize: *Fyziologie rostlin* (Procházka S., Macháčková I., Krekule J., Šebánek J., ed.), kap. 8. Academia, Praha 1998.
4. Crozier A., Moritz T., v knize: *Biochemistry and Molecular Biology of Plant Hormones* (Hooykaas P. J. J., Hall M. A., Libbenga K. R., ed.) sv. 33, kap. 1. Elsevier, Amsterdam 1999.
5. Bielecki R. L.: *Anal. Biochem.* 9, 431 (1964).
6. Astot C., Doležal K., Moritz T., Sandberg G.: *J. Mass Spectrom.* 33, 892 (1998).
7. Pacáková V., Štulík K., Vlasáková V., Březinová A.: *J. Chromatogr., A* 764, 331 (1997).
8. Dobrev P. I., Kamínek M.: *J. Chromatogr., A* 950, 21 (2002).
9. Nordström A.: osobní sdělení.
10. Holub J., Hanuš J., Hanke D. E., Strnad M.: *Plant Growth Regul.* 26, 109 (1998).
11. Hewett E. W., Warening P. F.: *Planta* 114, 119 (1973).
12. Van Staden J., Upfold S. J., Drewes F. E.: *S. Afr. J. Bot.* 60, 293 (1994).
13. Hradecká D., Staszková L., Doležal K., Swaczyna P., Strnad M.: *International Symposium: Auxin and Cytokinin in Plant Development, Prague, 26–30 July 1999*, Book of Abstracts (Pospíšilová J., ed.), str. S84.
14. Doležal K., Astot C., Hanuš J., Holub J., Peters W., Beck E., Strnad M., Sandberg G.: *Plant Growth Regul.* 36, 181 (2002).
15. Tarkowská D., Doležal K., Tarkowski P., Astot C., Holub J., Fuksová K., Schülling T., Sandberg G., Strnad M.: *Physiol. Plant.* 117, 579 (2003).
16. Taverner E., Letham D. S., Wang J., Cornish E., Willcocks D. A.: *Phytochemistry* 51, 341 (1999).
17. Yang Y. Y., Yamaguchi I., Kato Y., Weiler E. W., Murofushi N., Takahashi N.: *J. Plant Growth Regul.* 12, 21 (1993).
18. Prinsen E., Redig P., Strnad M., Galis I., Van Dongen W., Van Onckelen H. v knize: *Methods in Molecular Biology, Agrobacterium Protocols* (Gertland K. M. A., Davey M. R., ed.) sv. 44, kap. 23. Humana Press, New Jersey 1995.
19. Imbault N., Moritz T., Nilsson O., Chen H. J., Bollmark M., Sandberg G.: *Biol. Mass Spectrom.* 22, 201 (1993).
20. Prinsen E., Redig P., Van Dongen W., Esmans E. L., Van Onckelen H. A.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 9, 948 (1995).
21. Prinsen E., Van Dongen W., Esmans E. L., Van Onckelen H. A.: *J. Chromatogr., A* 826, 25 (1998).
22. Van Rhijn J. A., Heskamp H. H., Davelaar E., Jordi W., Leloux M. S., Brinkman U. A. T.: *J. Chromatogr., A* 929, 31 (2001).

23. Novák O., Tarkowski P., Tarkowská D., Doležal K., Lenobel R., Strnad M.: *Anal. Chim. Acta* **480**, 207 (2003).
24. Astot C., Doležal K., Moritz T., Sandberg G.: *J. Mass Spectrom.* **35**, 13 (2000).
25. Astot C., Doležal K., Nordström A., Wang Q., Kunkel T., Moritz T., Chua N. H., Sandberg G.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 14778 (2000).
26. Morris R. O.: *Plant Physiol.* **59**, 1029 (1977).
27. Scott I. M., Horgan R., McGaw B. A.: *Planta* **149**, 472 (1980).
28. Most B. H., Williams J. C., Parker K. J.: *J. Chromatogr.* **38**, 136 (1968).
29. MacLeod J. K., Summons R. E., Letham D. S.: *J. Org. Chem.* **41**, 3959 (1976).
30. Ludewig M., Dörffling K., König W. A.: *J. Chromatogr.* **243**, 93 (1982).
31. Hocart C. H., Wong O. C., Letham D. S., Tay S. A. B., MacLeod J. K.: *Anal. Biochem.* **153**, 85 (1986).
32. Scott I. M., Horgan R.: *Planta* **161**, 345 (1984).
33. Horgan R., Scott I. M. v knize: *Principles and Practice of Plant Hormone Analysis* (Rivier L., Crozier A., ed.) sv. 2, kap. 5. Academic Press, London 1987.
34. Björkman P. O., Tillberg E.: *Phytochem. Anal.* **7**, 57 (1996).
35. Hocart C. H., Wang J., Letham D. S.: *J. Chromatogr., A* **811**, 246 (1998).
36. Tay S. A. B., MacLeod J. K., Palni L. M. S.: *J. Plant Biochem. Biotechnol.* **2**, 105 (1993).
37. Edwards R. (ed): *Immunoassay: An Introduction*. William Heinemann Medical Books, London 1985.
38. Weiler E. W.: *Annu. Rev. Plant Physiol.* **35**, 85 (1984).
39. Morris B. A., Clifford M. N., Jackman R. (ed.): *Immunoassays for Veterinary and Food Analysis*. Elsevier, London 1988.
40. Gosling J. P., Reen D. J. (ed.): *Immunotechnology*. Portland Press, London 1993.
41. Price C.P., Newmann D. J. (ed): *Principles and Practice of Immunoassay*. Stockton Press 1997.
42. Badenoch-Jones J., Letham D. S., Parker C. W., Rolfe B. G.: *Plant Physiol.* **75**, 1117 (1984).
43. Maldiney R., Leroux B., Sabbagh I., Sotta B., Sossountzov L., Miginiac E.: *J. Immunol. Methods* **90**, 151 (1986).
44. Hacker B., Van Vunakis H., Levine L.: *J. Immunol.* **6**, 1726 (1972).
45. Brandon D. L., Corse J., Higaki P. C., Zavala M. A.: *Plant Physiol.* **63**, 82 (1979).
46. Khan S. A., Humayn M. Z., Jacobs T. M.: *Anal. Biochem.* **83**, 632 (1977).
47. Trione E. J., Krygier B. B., Banowitz G. M., Katherin J. M.: *J. Plant Growth Regul.* **4**, 101 (1985).
48. Wang T. L., Cook S. K., Knox J. P.: *Phytochemistry* **26**, 2447 (1987).
49. MacDonald E. M. S., Akiyoshi D. E., Morris R. O.: *J. Chromatogr.* **214**, 101 (1981).
50. Hage D. S.: *Clin. Chem.* **45**, 593 (1999).
51. Morris R. O., Akiyoshi D. E., MacDonald E. M. S., Morris J. W., Zaerr J. B. v knize: *Plant Growth Substances 1982* (Wareing P. F., ed.) str. 175. Academic Press, London 1982.
52. Morris R. O., Jameson P. E., Laloue M., Morris J. W.: *Plant Physiol.* **95**, 1156 (1991).
53. Nicander B., Stahl U., Björkman P. O., Tillberg E.: *Planta* **189**, 312 (1993).
54. Ulvskov P., Nielsen T. H., Seiden P., Marcussen J.: *Planta* **188**, 70 (1992).
55. Barták P., Ševčík J., Adam T., Friedecký D., Lemr K., Stránský Z.: *J. Chromatogr., A* **818**, 231 (1998).
56. Barták P., Bednář P., Stránský Z., Boček P., Vespalec R.: *J. Chromatogr., A* **878**, 249 (2000).
57. Barták P., Pěchová D., Tarkowski P., Bednář P., Kotouček M., Stránský Z., Vespalec R.: *Anal. Chim. Acta* **421**, 221 (2000).
58. Janik B., Elving P. J.: *J. Electrochem. Soc.* **116**, 1087 (1969).
59. Smyth M. R., Kell D. B.: *J. Electroanal. Chem.* **122**, 363 (1981).
60. Hernández P., Paton F., Ballesteros Y., Hernández L.: *Electroanalysis* **9**, 235 (1997).
61. Blanco M. H., Quintana M. D., Hernández L.: *Electroanalysis* **12**, 147 (2000).
62. Blanco M. H., Quintana M. D., Hernández L.: *Fresenius' J. Anal. Chem.* **364**, 254 (1999).
63. Tarkowská D., Kotouček M., Doležal K.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* **68**, 1076 (2003).
64. Glassbrook N., Beecher C., Ryals J.: *Nat. Biotechnol.* **18**, 1142 (2000).
65. Müller A., Düchting P., Weiler E. W.: *Planta* **216**, 44 (2002).
66. Birkemeyer C., Kolasa A., Kopka J.: *J. Chromatogr., A* **993**, 89 (2003).

**P. Tarkowski, K. Doležal, and M. Strnad**  
(*Laboratory of Growth Regulators, Palacky University, Olomouc and Institute of Experimental Botany, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague*): **Analytical Methods in Cytokinin Research**

Cytokinins, a group of  $N^6$ -substituted adenine derivatives, are phytohormones that play an important role in plant growth and development. Plant tissue extracts are complex mixtures containing cytokinins in minute quantities. Therefore, sensitive and sufficiently selective analytical tools are required for determination and/or identification of cytokinins in plants. Main techniques (GC/MS, HPLC/MS) currently employed for qualitative and quantitative analyses of cytokinins as well as widely utilised extraction and purification procedures are discussed.