

## LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

### NOVÉ POSTUPY DIAGNOSTIKY DĚDIČNÝCH PORUCH PURINOVÉHO A PYRIMIDINOVÉHO METABOLISMU POMOCÍ KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZY\*

DAVID FRIEDECKÝ<sup>a</sup>, TOMÁŠ ADAM<sup>b,c</sup>,  
JURAJ ŠEVČÍK<sup>a,c</sup> a PETR BARTÁK<sup>a,c</sup>

<sup>a</sup>Katedra analytické chemie, Univerzita Palackého, Třída Svobody 8, 771 46 Olomouc, <sup>b</sup>Laboratoř dědičných metabolických poruch, Ústav klinické biochemie, Fakultní nemocnice, I. P. Pavlova 6, 775 20 Olomouc, <sup>c</sup>Centrum analytické chemie molekulárních struktur, Univerzita Palackého, Třída Svobody 8, 771 46, Olomouc

Došlo dne 17.II.1999

**Klíčová slova:** kapilární elektroforéza, metabolismus, puriny, pyrimidiny

### Úvod

Metabolismu purinů a pyrimidinů se účastní asi 50 známých enzymů. Dosud je známo 20 enzymových defektů a jejich klinické souvislosti<sup>1</sup>. Důsledkem poruchy enzymu je akumulace látek (substrátů, vedlejších produktů) v krvi, odkud jsou efektivně eliminovány ledvinami. Analýza purinů a pyrimidinů v moči je tedy základem screeningu těchto onemocnění.

Pro správnou diagnostiku je nezbytné, aby metody byly dostatečně robustní, jednoduché, rychlé při identifikaci purinů a pyrimidinů, finančně dostupné a schopné detegovat všechny známé poruchy. Z analytického hlediska by mělo být dosaženo optimální rozlišení všech purinů a pyrimidinů od hlavních konstituentů moči. V současné době se používá tenkovrstevná chromatografie<sup>1</sup> a vysoce účinná kapalinová chromatografie<sup>2</sup>. Experimentálně byla testována také izotachoforéza<sup>3</sup>. I výše uvedené rutinní metody se však potýkají s časovou náročností, vysokými provozními náklady a problematickou identifikací.

Použití kapilární elektroforézy přináší nové možnosti v identifikaci purinových a pyrimidinových látek<sup>4-6</sup>. V práci jsou popsány dva přístupy, tzv. aniontový a kationtový mód pro screening defektů purinového a pyrimidinového metabolismu. Metody byly testovány na zdravých jedincích i na pacientech s vrozenými metabolickými poruchami.

### Experimentální podmínky

Chemikálie: kyselina boritá, kyselina fosforečná, hydroxid sodný, methanol, acetonitril a  $\gamma$ -cyklodextrin (Merck, Darmstadt, Německo), báze, nukleosidy, dodecylsulfát sodný (SDS),

kyselina 3-(cyklohexylamino)-1-propansulfonová (CAPS),  $\alpha$ -cyklodextrin,  $\beta$ -cyklodextrin, heptakis-(2,6-di-O-methyl)- $\beta$ -cyklodextrin (Sigma, St. Louis, USA), sulfatovaný P-cyklodextrin (Aldrich, Steinheim, Německo), vše analytické čistoty. Pro přípravu všech roztoků byla použita deionizovaná voda (18 M $\Omega$ .cm<sup>-1</sup>).

Kapilární elektroforéza: Experimenty byly prováděny na přístroji P/ACE 5510 s detektorem s diodovým polem (Beckman Instruments, Fullerton, USA). Látky byly separovány v nepokryté křemenné kapiláře o vnitřním průměru 75  $\mu$ m a vnějším průměru 375  $\mu$ m (Polymicro Technologies, Phoenix, USA). Kapilára měřila 47 cm a její efektivní délka byla 40 cm. Pro snadnou identifikaci byla detekce prováděna v UV oblasti v rozmezí 190-300 nm. Vzorky byly dávkovány hydrodynamicky (tlak 4,2 kPa, čas 1-15 s). Analýzy byly prováděny při konstantním napětí (15-30 kV) s náběhovou rampou 0,5 min.

Každý den před započítáním experimentů byla kapilára promyta vodou, 0,1 mol.l<sup>-1</sup> NaOH, poté opět vodou a základním elektrolytem, vždy 5 minut. Mezi experimenty byla kapilára promývána 0,5 min 0,1 mol.l<sup>-1</sup> NaOH a 1 min základním elektrolytem. Před analýzou byly vzorky 15 minut sonifikovány v ultrazvukové lázni a odstředěny 5 minut při 3000 g.

Vysoce účinná kapalinová chromatografie: Experimenty byly prováděny na přístroji Milipore-Waters s UV detektorem snímajícím současně dvě vlnové délky (250 a 280 nm). Pro separace byla použita analytická kolona Hichrom spherisorb 5  $\mu$ m ODS-2 o délce 12,5 cm a vnitřním průměru 4,6 mm.

### Výsledky a diskuse

Chemickou povahou jsou všechny puriny slabými kyselinami. Imidazolový proton (v pozici 9) je deprotonizován  $pK_a$  okolo 10. Analogickou disociací lze vypočítat v případě pyrimidinů. Většina diagnosticky významných látek může být také za velmi nízkých pH protonizována. Pro analýzu purinů a pyrimidinů lze tedy aplikovat dvojí přístup: alkalické prostředí (aniontový mód) a kyselé prostředí (kationtový mód).

#### Aniontový mód

Pro alkalickou oblast pH byla postupně na standardní směsi a směsi močí optimalizována řada parametrů (tab. I). Cílem bylo dosažení úplné separace diagnosticky významných metabolitů a majoritních složek moči a maximální separační kapacity pro reálné vzorky moče (co největší počet separovaných píků). Z této optimalizace byl jako nejvhodnější vybrán systém: 0,015 mol.l<sup>-1</sup> tetraboritan sodný + 0,080 mol.l<sup>-1</sup> SDS, pH 9,5 při napětí 15 kV (obr. 1a). Za těchto podmínek bylo dosaženo separace více než 60 složek moči. Separační účinnost se pro sledované analyty pohybuje okolo 230 000 teoretických pater. Reprodukovatelnost migračních časů okolo 1 % poskytuje dobré předpoklady pro identifikaci jednotlivých analytů.

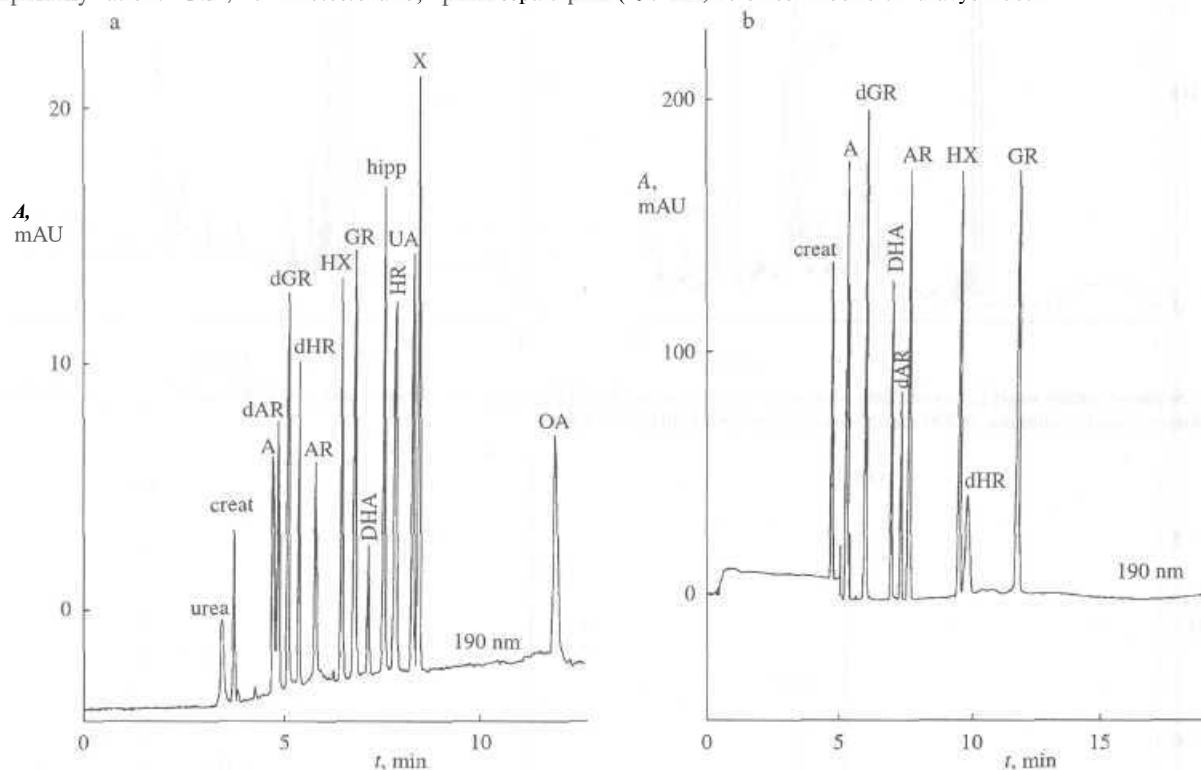
Mimo obecně známých separačních principů se v boráto-

\* Tato práce získala 1. cenu v soutěži odborných prací studentů analytické chemie 20. listopadu 1998 na VŠCHT v Praze

Tabulka I  
Optimalizace aniontového módu

Složení pufru <sup>a</sup>	pH	Aditiva	Separace <sup>b</sup>		Sep. účinnost <sup>b</sup> (TP), pro HX	Reprod. <sup>b</sup> $t_m$
			analytů	moče <sup>c</sup>		
Fosforečnan, boritan	7-9,0	SDS, CD...	ne	<b>e</b>	<b>e</b>	0
Boritan	9,5	-	ne	<b>e</b>	0	0
Boritan	9,5	0,08 M-SDS	ano	<b>65</b>	290 000	1,0%
Boritan	9,5	0,08 M-SDS + 0,01 M-CD( $\alpha,\beta,\gamma$ )	ano	<b>66</b>	230 000	2,0%
Boritan	9,5	0,08 M-SDS + 10 % MeOH, AcCN	ne	<b>e</b>	G	0
CAPS	9,5	-	ne	<b>e</b>	<b>e</b>	0

<sup>a</sup> Společný kationt - Na<sup>+</sup>, <sup>b</sup> 0 = netestováno, <sup>c</sup> počet separ. píků (190 nm) ve směsi močí 6-ti zdravých dětí



Obr. 1. Separace standardní směsi purinů a pyrimidinů, a) aniontový mód, podmínky: 0,015 mol.l<sup>-1</sup> tetraboritan sodný + 0,080 mol.l<sup>-1</sup> SDS, pH 9,5, 15 kV, b) kationtový mód, podmínky: 0,200 mol.l<sup>-1</sup> fosforečnan sodný, pH 1,8, 18,5 kV

vém pufru uplatňuje také komplexace analytů obsahujících cis-diolové seskupení, což umožňuje oddělení ribonukleosidů od deoxyribonukleosidů nebo samotných bází. Použití SDS zvyšuje počet separovaných píků v moči (nenabité analyty v moči se separují na základě agregace do micel), avšak nepodílí se na mechanismech separace purinů a pyrimidinů.

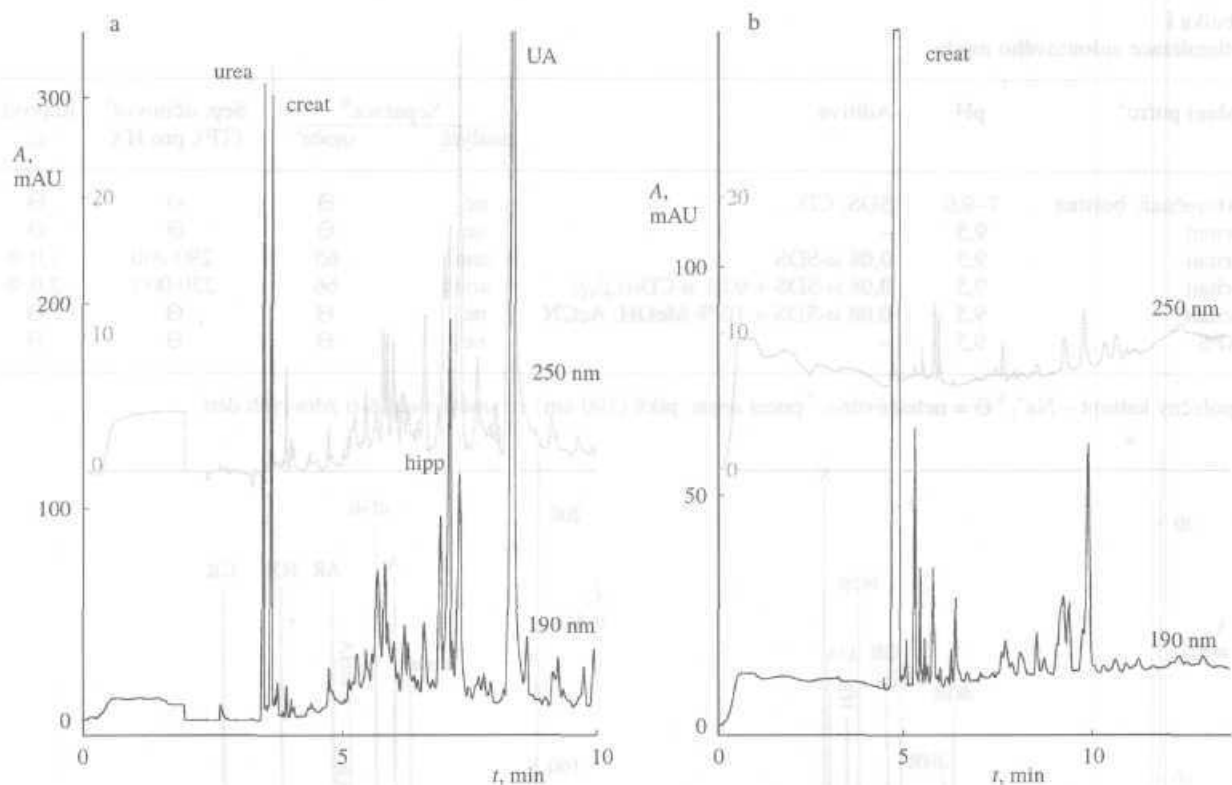
#### Kationtový mód

Druhou možností analýzy purinů a pyrimidinů jsou separace v kyselém prostředí. Byla provedena optimalizace pH fosfátového pufru a přidavku aditiv (tab. II). Jako optimální systém byl zvolen 0,200 mol.l<sup>-1</sup> fosforečnan sodný při extrémně nízkém pH 1,8 a napětí 18,5 kV (obr. 1b). Separáčn

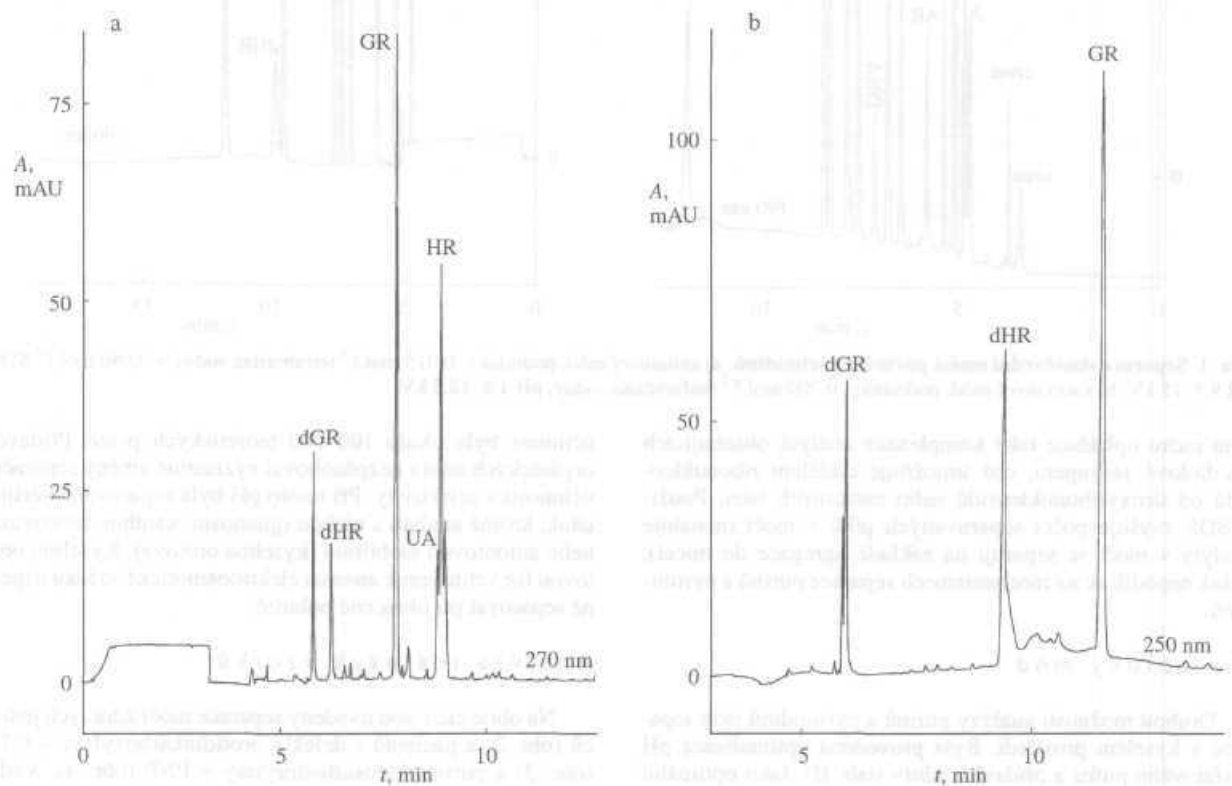
účinnost byla okolo 100 000 teoretických pater. Přidavek organických aditiv nezpůsoboval významné změny separační účinnosti a selektivity. Při tomto pH byla separována většina látek, kromě analytů s nízkou (guanosin, xanthin, močovina) nebo aniontovou mobilitou (kyselina orotová). Kyselinu orotovou lze vzhledem k absenci elektroosmotického toku úspěšně separovat při obrácené polaritě.

#### Analýza reálných vzorků

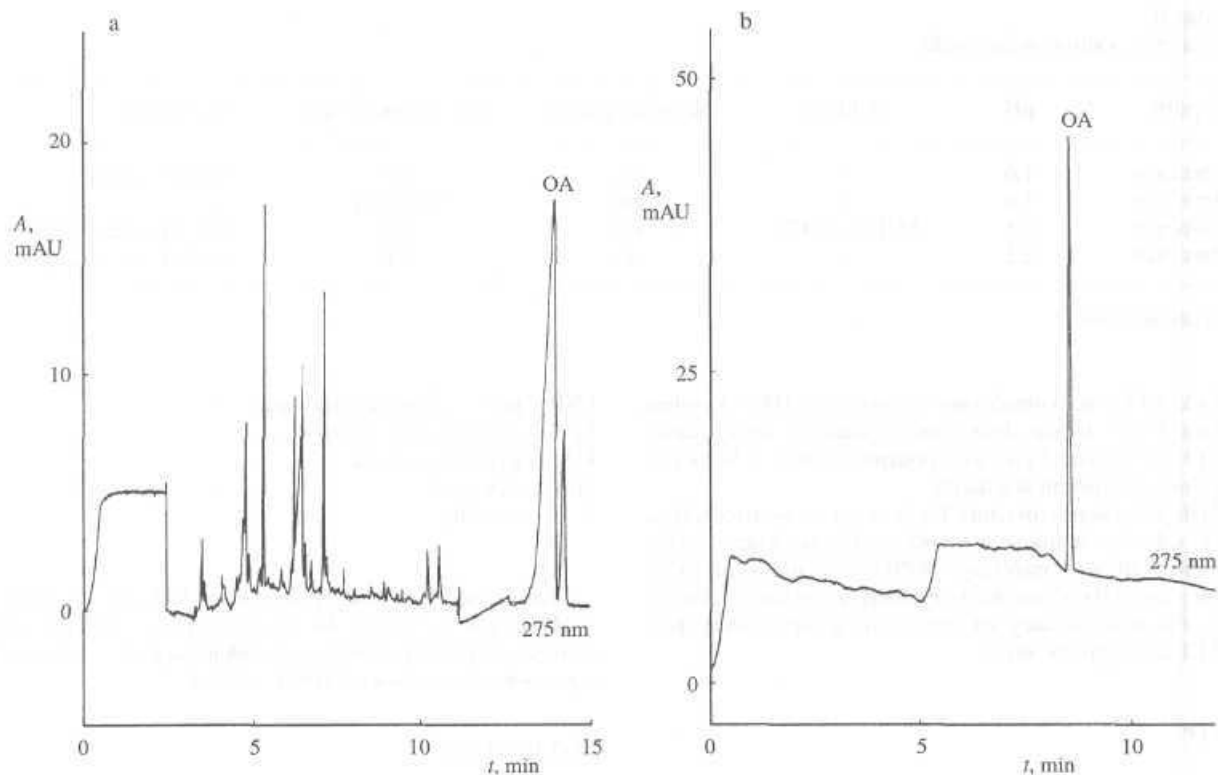
Na obrázcích jsou uvedeny separace močí zdravých jedinců (obr. 2) a pacientů s defekty orotidinkarboxylasy - OTC (obr. 3) a purinnukleosidfosforylasy - PNP (obr. 4). Vedle sebe jsou vždy srovnány separace v aniontovém a kationtovém módu. Z elektroferogramů lze jednoznačně podle migračních



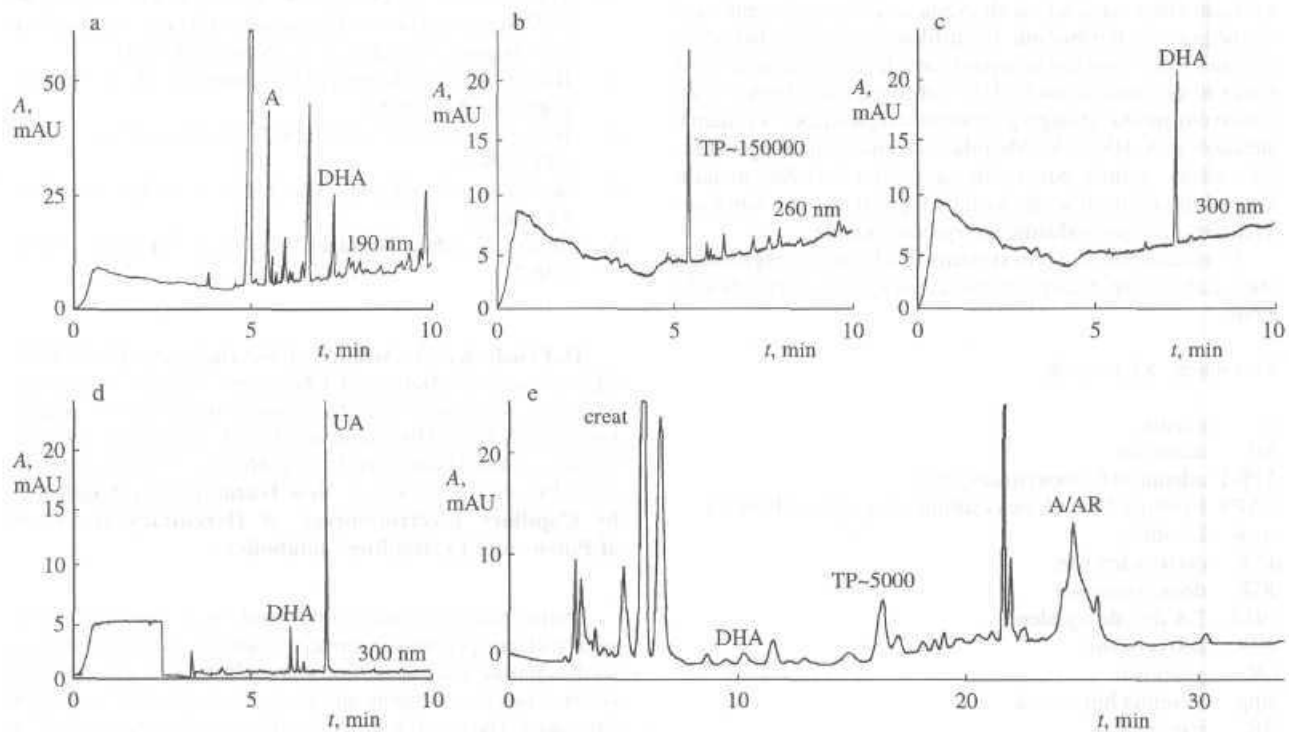
**Obr. 2.** Separace směsi močí zdravých dětí, a) aniontový mód, podmínky:  $0,015 \text{ mol.l}^{-1}$  tetraboritan sodný +  $0,080 \text{ mol.l}^{-1}$  SDS, pH 9,5, 15 kV, b) kationtový mód, podmínky:  $0,200 \text{ mol.l}^{-1}$  fosforečnan sodný, pH 1,8, 18,5 kV



**Obr. 3.** Separace vzorku pacienta s deficitem OTC a) aniontový mód, podmínky:  $0,015 \text{ mol.l}^{-1}$  tetraboritan sodný +  $0,080 \text{ mol.l}^{-1}$  SDS, pH 9,5, 15 kV, b) kationtový mód, podmínky:  $0,200 \text{ mol.l}^{-1}$  fosforečnan sodný, pH 1,8, 18,5 kV



Obr. 4. Separace vzorku pacienta s deficitem PNP a) aniontový mód, podmínky:  $0,015 \text{ mol.l}^{-1}$  tetraboritan sodný +  $0,080 \text{ mol.l}^{-1}$  SDS, pH 9,5, 15 kV, b) kationtový mód, podmínky:  $0,200 \text{ mol.l}^{-1}$  fosforečnan sodný, pH 1,8, 18,5 kV



Obr. 5. Separace vzorku pacienta s deficitem APRT a) b) c) kationtový mód, podmínky:  $0,200 \text{ mol.l}^{-1}$  fosforečnan sodný, pH 1,8, 18,5 kV - 190, 260 a 300 nm, d) aniontový mód, podmínky:  $0,015 \text{ mol.l}^{-1}$  tetraboritan sodný +  $0,080 \text{ mol.l}^{-1}$  SDS, pH 9,5, 15 kV, e) HPLC analýza, podmínky: mobilní fáze - pufr tetrabutylamonium ( $0,005 \text{ mol.l}^{-1}$ ) + octan ( $0,040 \text{ mol.l}^{-1}$ ), pH 2,75, průtok  $1 \text{ ml.min}^{-1}$ , detekce při 250 nm

Tabulka II  
Optimalizace kationtového módu

Slož. pufru	pH	Aditiva	Separace analytů	Sep. účinnost <sup>a</sup> (TP)	Poznámka
Fosforečnan	1,6	–	ano	⊖	vysoký proud
Fosforečnan	1,8	–	ano	108 000	–
Fosforečnan	1,8	MeOH, AcCN	ano	G	nevýznamné změny
Fosforečnan	≥2	–	ne	⊕	nedost. ionizace (GR...)

<sup>a</sup> ⊕ = netestováno

časů identifikovat akumulované metabolity (OTC - kyselina orotová, PNP - inosin, deoxyinosin, guanosin, deoxyguanosin). Při identifikaci byla navíc použita databáze UV spekter vytvořených z měření standardů.

Dále je uvedeno srovnání CE s dnes používanou technikou HPLC (obr. 5). Jedná se o tentýž vzorek pacienta s vadou adeninfosforibosyltransferasy - APRT. Z analýz vyplývá, že HPCE je asi 300x účinnější, 3x rychlejší a podstatně selektivnější. Finanční náklady na provedení jedné analýzy jsou u HPCE také výrazně nižší.

## Závěr

Kombinací obou módů lze dosáhnout spolehlivého určení přítomnosti metabolitů ve vzorcích močí, což je nezbytné pro diagnostiku dědičných metabolických poruch. Aniontový mód umožňuje separaci všech významných konstituentů moči včetně purinů a pyrimidinů. Identifikace však může být někdy ztížena širokým spektrem separovaných látek (běžně je v jednom vzorku separováno 50 UV - absorptivních látek). V kationtovém módu nemigrují některé diagnosticky významné metabolity (X, HR, UA). Metoda však umožňuje diagnostikovat většinu poruch purinového a pyrimidinového metabolismu. Jejím předností je, že dochází k podstatně menším interferencím, což zjednodušuje interpretaci analýz.

V současnosti jsou tyto systémy využívány v diagnostické praxi Laboratoře dědičných metabolických poruch FN Olomouc.

## Seznam zkratk

A	adenin
AR	adenosin
APRT	adeninfosforibosyltransferasa
CAPS	kyselina 3-(cyklohexylamino)-l-propansulfonová
creat	kreatinin
dAR	deoxyadenosin
dGR	deoxyguanosin
DHA	2,8-dihydroxyadenin
dHR	deoxyinosin
GR	guanosin
hipp	kyselina hippurová
HR	inosin
HX	hypoxanthin
OA	kyselina orotová
OTC	orotidinkarboxylasa

PNP	purinnukleosidfosforylaza
SDS	dodecylsulfát sodný
UA	kyselina močová
urea	močovina
X	xanthin

*Tato práce byla podpořena granty IGA MZ ČR 3439-3 a MŠMT ČR VŠ 96021. Autoři děkují Dr. L. D. Fairbanks (Purine Research Laboratory, London) za poskytnutí vzorků a provedení srovnávacích HPLC měření.*

## LITERATURA

1. Van Gennip A. H., Van Noordeburg-Huistra D. Y., De Bree P. K., Wadman S. K.: *Clin. Chim. Acta* 86, 7 (1978).
2. Simmonds H. A., Duley J. A., Davies P. M.: *Techniques in Diagnostic Human Biochemical Genetics: A Laboratory Manual*. Hommes F. A., New York 1991.
3. Bruchelt G., Niethammer D., Schmidt K. H.: *J. Chromatogr.* 618, 57 (1993).
4. Bory C, Chantin C, Bouliou R.: *J. Chromatogr. A* 730, 329 (1996).
5. Ševčík J., Adam T., Mazáčová H.: *Clin. Chim. Acta* 245, 85 (1996).
6. Ševčík J., Adam T., Sázal V.: *Clin. Chim. Acta* 259, 73 (1997).

**D. Friedecký<sup>a</sup>, T. Adam<sup>b,c</sup>, J. Ševčík<sup>a,c</sup>, and P. Barták<sup>a,c</sup>**  
*(<sup>a</sup>Department of Analytical Chemistry, Palacký University, Olomouc, <sup>b</sup>Laboratory of Hereditary Metabolic Disorders, Institute of Clinical Biochemistry, Faculty Hospital, Olomouc, <sup>c</sup>Centre of Analytical Chemistry of Molecular Structures, Palacký University, Olomouc): New Techniques in Diagnostics by Capillary Electrophoresis of Hereditary Disorders of Purine and Pyrimidine Metabolism*

Purine and pyrimidine compounds were analyzed by capillary electrophoresis in urine of patients with inherited disorders purine and pyrimidine metabolism. Two separation of systems (alkaline-anionic and acid-cationic mode) have been compared. The use of a strongly acidic background electrolyte (pH 1.8) improves the selectivity and informative pithiness of the method. A combination of both anionic and cationic modes increases the reliability of diagnosis in hereditary disorders.