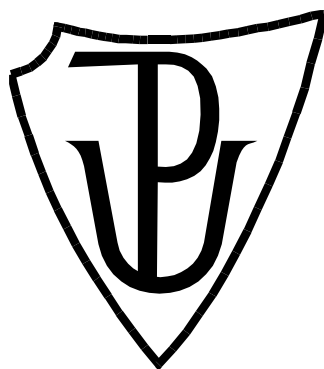


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátůř



Testování molekulárně imprintovaných polymerů na
magnetických nanočásticích

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor: **Bc. Petra Kocmáňková**

Studijní program: N1501 Biologie

Studijní obor: Experimentální biologie

Forma studia: Prezenční

Vedoucí práce: Mgr. Lenka Plačková, Ph.D.

Termín odevzdání práce: 2022

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora:	Bc. Petra Kocmánková
Název práce:	Testování molekulárně imprintovaných polymerů na magnetických nanočásticích
Typ práce:	Diplomová
Pracoviště:	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce:	Mgr. Lenka Plačková, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2022
Abstrakt:	<p>Magnetické molekulárně imprintované polymery, nebo také MMIP, jsou syntetické látky používané v analytice zejména jako sorbenty. Tyto sorbenty kombinují vlastnosti molekulárně imprintovaných polymerů, zejména jejich selektivitu a afinitu k danému analytu, a extrakční účinnost magnetických částic. Tato diplomová práce se zabývá testováním nového imprintovaného polymerního materiálu navázaného na magnetických nanočásticích vytvořeného k analýze množství cytokininových hormonů v rostlinném materiálu. Nejprve bylo provedeno čištění připraveného imprintovaného polymerního materiálu s následným měřením jeho čistoty. Optimalizace metody umožňující využití tohoto materiálu byla testována pomocí cytokininových standardů. K analýze cytokininů ve vzorcích byla využita metoda vysoce účinné kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií.</p>
Klíčová slova:	Cytokinin, molekulárně imprintované polymery, magnetické nanočástice, BAP, HPLC-MS/MS
Počet stran:	71
Počet příloh:	0
Jazyk:	český

Bibliographical identification:

Author's first name and surname:	Bc. Petra Kocmánková
Title of thesis:	Testing of molecularly imprinted polymers binded to magnetic nanoparticles
Type of thesis:	Master
Department:	Laboratory of Growth regulators
Supervisor:	Mgr. Lenka Plačková, Ph.D.
The year of presentation:	2022
Abstract:	<p>Magnetic molecularly imprinted polymers, or MMIPs, are synthetic substances used in analytics, especially as sorbents. These sorbents combine the properties of molecularly imprinted polymers, in particular their selectivity and affinity for given analyte, and the extraction efficiency of magnetic particles. This thesis deals with the testing of a new imprinted polymeric material bound to magnetic nanoparticles created to analyze the amount of cytokinin hormones in plant material. First, the prepared imprinted polymeric material was cleaned, followed by measuring its purity. Optimization of the method enabling the use of this material was tested using cytokinin standard. The method of high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry was used for the analysis of cytokinins in the samples.</p>
Keywords:	cytokinin, molecularly imprinted polymers, magnetic nanoparticles, BAP, HPLC-MS/MS
Number of pages:	71
Number of appendices:	0
Language:	Czech

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury.

V Olomouci dne.....

.....

Bc. Petra Kocmánková

Poděkování

Tato diplomová práce byla realizována s podporou Interní grantové agentury Univerzity Palackého (IGA_PrF_2022_016). Tímto bych chtěla poděkovat zejména vedoucí mé diplomové práce, Mgr. Lence Plačkové, Ph.D. za její ochotu a pomoc při vypracování, jak teoretické, tak praktické části. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Kateřině Roháčové za přípravu testovaného materiálu.

Obsah

Seznam zkratk	8
1 Úvod a cíle práce	11
2 Teoretická část	12
2.1 Molekulárně imprintované polymery	12
2.1.1 Historie MIP	12
2.1.2 Příprava MIP	13
2.1.2.1 Typy polymerace	13
2.1.2.2 Syntéza	14
2.1.2.3 Měkká litografie	16
2.1.2.4 Fázová inverze	16
2.1.3 Využití MIP	16
2.1.4 Magnetické molekulárně imprintované polymery	18
2.2 Objev a historie cytokininů	19
2.2.1 Chemická struktura	20
2.2.2 Biosyntéza cytokininů	23
2.2.3 Metabolismus cytokininů	25
2.2.4 Funkce cytokininů	26
2.2.4.1 Regulace buněčného cyklu	27
2.2.4.2 Regenerace orgánů	27
2.2.4.3 Apikální dominance	28
2.2.4.4 Regulace růstu	28
2.2.5 Aromatické cytokininy a jejich využití	29
2.2.6 Purifikace cytokininů	30
3 Experimentální část	32
3.1 Chemikálie	32
3.2 Přístroje	33
3.3 Materiál	34
3.4 Přechištění materiálu	34
3.5 Optimalizace purifikačního protokolu	35
3.6 Testování koncentračního rozsahu	38
3.7 Stanovení hladin	39

4 Výsledky a diskuse	40
4.1 Přechištění materiálu	40
4.2 Purifikační protokol	41
4.3 Koncentrační rozsah	48
5 Závěr	61
6 Zdroje.....	62

Seznam zkratek

ADP	adenosindifosfát
AMP	adenosinmonofosfát
ARCK	aromatické cytokininy
ATP	adenosintrifosfát
BAP	benzylaminopurin
BAP9G	benzylaminopurin-9-glukosid
BAPR	benzylaminopurinribosid
CDK	cyklin-dependentní kinasa
CK	cytokininy
CKX	cytokininoxidasa/dehydrogenasa
<i>cZ</i>	<i>cis</i> -zeatin
<i>cZ9G</i>	<i>cis</i> -zeatin-9-glukosid
<i>cZR</i>	<i>cis</i> -zeatinribosid
DHZ	dihydrozeatin
DHZ9G	dihydrozeatin-9-glukosid
DHZR	dihydrozeatinribosid
DMAPP	dimethylalylldifosfát
DSPE	disperzní extrakce na pevné fázi
EGDMA	ethylenglykoldimetakrylát
ESI	ionizace elektrosprejem
FRP	volná radikálová polymerace (<i>free radical polymerization</i>)
HMBDP	hydroxymethyldibutenyldifosfát
iP	isopentenyldenin
iP9G	isopentenyldenin-9-glukosid
iPR	isopentenyldeninribosid
iPRDP	isopentenyldeninribosiddifosfát
iPRMP	isopentenyldeninribosidmonofosfát
iPRTP	isopentenyldeninribosidtrifosfát
IPT	isopentenytransferasa
K	kinetin
K9G	kinetin-9-glukosid
KR	kinetinribosid

LC	kapalinová chromatografie
LOG	„lonely guy“
MAA	methakrylová kyselina
MMA	methakrylát
MEP	methylerythritolfosfátová dráha
MIP	molekulárně imprintované polymery
MISPE	molekulárně imprintovaná extrakce na pevné fázi
MMIP	magnetické molekulárně imprintované polymery
MNP	magnetické nanočástice
MRM	selektivní záznam více iontových reakcí
MS	hmotnostní spektrometrie
<i>mT</i>	<i>meta</i> -topolin
<i>mTR</i>	<i>meta</i> -topolinribosid
<i>mT9G</i>	<i>meta</i> -topolin-9-glukosid
MVA	mevalonová dráha
n.d.	nedetekováno
<i>oT</i>	<i>ortho</i> -topolin
<i>oTR</i>	<i>ortho</i> -topolinribosid
<i>pT</i>	<i>para</i> -topolin
<i>pTR</i>	<i>para</i> -topolinribosid
QCM	mikrováha s křemenným krystalem (<i>quartz crystal microbalance</i>)
RAM	kořenový apikální meristém
SAM	stonkový apikální meristém
SPE	extrakce na pevné fázi
SPME	mikroextrakce na pevné fázi
STD	standard
TDPG	uridin trifosfátglukosa
<i>tZ</i>	<i>trans</i> -zeatin
<i>tZ9G</i>	<i>trans</i> -zeatin-9-glukosid
<i>tZR</i>	<i>trans</i> -zeatin ribosid
UDPG	uridindifosfátglukosa
UDPX	uridindifosfátxylosa

UHPLC-MS/MS

ultra-vysoce účinná kapalinová chromatografie ve spojení
s tandemovou hmotnostní spektrometrií

Z

zeatin

1 Úvod a cíle práce

Rozpoznávání specifických molekul je důležitou součástí řady procesů v živých organismech. Příkladem jsou receptory, enzymy a protilátky, které jsou známé pro svou vysokou selektivitu vůči daným molekulám. Díky těmto vlastnostem jsou tyto biomolekuly využívány v řadě analytických metod pro účinnou purifikaci a monitorování analytů. Nevýhodou biomolekul je jejich vysoká cena a nízká stabilita. Tyto problémy daly podnět pro vznik syntetických materiálů se stejnými selektivními vlastnostmi. Molekulární imprintování se stalo jednou z nejefektivnějších metod pro tvorbu syntetických polymerních materiálů o vysoké selektivitě a stabilitě i za extrémních podmínek (Mattiasson & Ye, 2015).

Rostlinné hormony, jako jsou cytokininy, auxiny a gibereliny, jsou organické látky podílející se na množství fyziologických procesů v rostlinách. Benzylaminopurin je aromatický cytokinin schopný stimulovat růst rostlin, který je využíván v biotechnologiích zejména jako součást růstových médií pro mikropropagaci biotechnologicky a medicínsky významných rostlin (Plíhalová et al., 2016).

Tato diplomová práce se zaměřuje na testování nového molekulárně imprintovaného materiálu navázaného na magnetických nanočásticích, vytvořeného pro analýzu hladin benzylaminopurinu v biologickém materiálu. Mezi cíle práce patří vypracování rešerše se zaměřením na molekulární imprinting a cytokininy. Součástí experimentální části je testování čistoty dodaného materiálu a jeho dočištění. Schopnost vazby cytokininů do MMIP byla testována křížovými reakcemi cytokininových standardů a následně byla provedena optimalizace a validace metody. Pro stanovení cytokininových hladin byla použita metoda ultra-vysoce účinné kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (UHPLC-MS/MS).

2 Teoretická část

2.1 Molekulárně imprintované polymery

Molekulárně imprintované polymery (MIP) jsou syntetické látky, které lze popsat jako syntetické analogy přirozeně se vyskytujících protilátek (Belbruno, 2019). Mezi hlavní výhody MIP patří jejich vysoká selektivita a afinita k cílové molekule použité při jejich syntéze. Oproti biosystémům mají větší robustnost, lépe odolávají vysokým teplotám a tlaku, jejich syntéza je cenově méně náročná a lze je lépe skladovat (Vasapollo et al., 2011).

2.1.1 Historie MIP

Technika molekulárního imprintování byla poprvé představena roku 1931. Sovětský chemik Polyakov provedl sérii testů na křemenném materiálu k použití v chromatografii (Polyakov, 1931), kdy u tohoto materiálu pozoroval nezvyklé adsorpční vlastnosti (Chen et al., 2011). Ovšem použití technologie jak jí známe dnes, tedy využití organických polymerů, začalo až v 70. letech minulého století (Andersson & Nicholls, 2001).

V 70. a 80. letech se poprvé začaly objevovat studie o imprintovaných polymerech. O tuto problematiku se zajímaly zejména dvě na sobě nezávislé výzkumné skupiny, a to skupiny kolem G. Wullfa a K. Mosbacha. Obě skupiny se zabývaly jinými aspekty molekulárně imprintovaných polymerů. Mosbach se soustředil na nekovalentní interakce mezi polymerem a cílovou molekulou, oproti tomu Wullf využíval kovalentních vazeb pro syntézu imprintu. Termín molekulárně imprintovaný senzor byl poprvé použit S. Piletskym roku 1992. Od 90. let se výzkum soustředí zejména na aplikaci této technologie (Belbruno, 2019).

2.1.2 Příprava MIP

Cílem molekulárního imprintingu je vytvořit vysoce zesíťované polymery, které jsou schopné selektivně rozpoznat a zachytit danou molekulu (Vasapollo et al., 2011). Pro přípravu MIP se používá více různých metod, díky kterým vznikají polymery s různými vlastnostmi. Jde například o syntézu monomeru při účasti templátu, fázovou inverzi nebo měkkou litografii (Belbruno, 2019). Dále jsou také využívány různé typy polymerace.

2.1.2.1 Typy polymerace

Mechanismy tvorby MIP můžeme obecně rozdělit na volné radikálové polymerace (free radical polymerization, FRP) a na „*sol-gel*“ proces, kdy FRP je využívána nejčastěji (El-Schich et al., 2020).

Volná radikálová polymerace probíhá ve třech stupních: iniciace, při které dochází ke vzniku radikálů, propagace, při které narůstá řetězec, a terminace, která ukončuje reakci (Colombani, 1997). Výhody FRP metod spočívají v tom, že tyto reakce je možné provádět za mírných podmínek, jako je běžná teplota a atmosférický tlak a jsou velmi tolerantní k funkčním skupinám monomerů a nečistotám v systému. Díky tomu jsou FRP častou volbou při přípravě MIP (Cormack & Elorza, 2004).

Hromadná polymerace („*bulk polymerization*“) je díky své rychlosti, jednoduchosti a čistotě produkovaných MIP jednou z nejoblíbenějších typů polymerace. Monolitický polymer, který tímto typem polymerace vznikne je ovšem potřeba rozbít a rozmělnit na požadovanou velikost, což bývá časově náročné. Při rozměňování dochází ke vzniku heterogenních částic s různou velikostí, tvarem a počtem vazebných míst, což omezuje jejich využití jako sorbenty (Chen et al., 2011). K překonání těchto nedostatků byly vyvinuty další typy polymerace, jako je suspenzní, emulzní, nebo precipitační polymerace (El-Schich et al., 2020).

„*Sol-gel*“ proces zahrnuje přeměnu koloidního roztoku („*sol*“) na pevnou gelovou fázi. K přípravě se běžně využívají anorganické soli kovů nebo organické sloučeniny jako metalické alkoxidy. Nejčastěji používanými prekurzory jsou tetramethyl-*o*-silikát a tetraethyl-*o*-silikát. Katalyzátorem reakce může být jak kyselina, tak zásada. Dochází k hydrolyzaci a kondenzaci, čímž z prekurzorů vzniká koloidní roztok, ze kterého následně vzniká gel. Dalším zpracováním koloidního roztoku je možné vytvořit různé typy materiálů, například tenké filmy na substrátu, vlákna, gely a další (Gupta & Kumar, 2008).

2.1.2.2 Syntéza

Syntéza MIP z monomerů je nejčastěji používanou metodou pro jejich přípravu. Funkční monomer v tomto případě interaguje s roztokem obsahujícím templát a vzniká síť kovalentně nebo nekovalentně vázaných komplexů (Belbruno, 2019). K syntéze MIP je tedy potřeba templát, funkční monomer, zesíťovadlo, iniciátor polymerace a rozpouštědlo (Chen et al., 2016). Zjednodušené schéma syntézy MIP je zobrazeno na obr. 1.

U molekulárního imprintování jsou dvě hlavní metody syntézy. První využívá reverzibilní kovalentní vazby a druhá nekovalentní interakce mezi templátem a funkčním monomerem (Chen et al., 2011). V případě kovalentního přístupu se templát váže k monomeru reverzibilní kovalentní vazbou, po polymeraci je tato vazba chemicky rozštěpena a templát je z polymeru odstraněn (Yan & Kyung, 2006). Díky stabilitě kovalentní vazby vznikají v případě kovalentního přístupu MIP s homogenními vazebnými místy. Na druhou stranu je tato metoda limitována malým množstvím vhodných templátů a monomerů (Chen et al., 2011). Nekovalentní přístup je výhodný díky jeho jednoduchosti. U nekovalentní metody dochází k vytvoření vazebných míst při „samosestavení“ templátu a monomeru, poté následuje polymerace (Yan & Kyung, 2006). Komplexy templátu a monomeru vznikají na základě nekovalentních interakcí, jako jsou van der Waalsovy síly, vodíkové vazby nebo iontové interakce. Nekovalentní přístup syntézy MIP je momentálně nejčastěji využívaným přístupem molekulárního imprintingu (Chen et al., 2011).

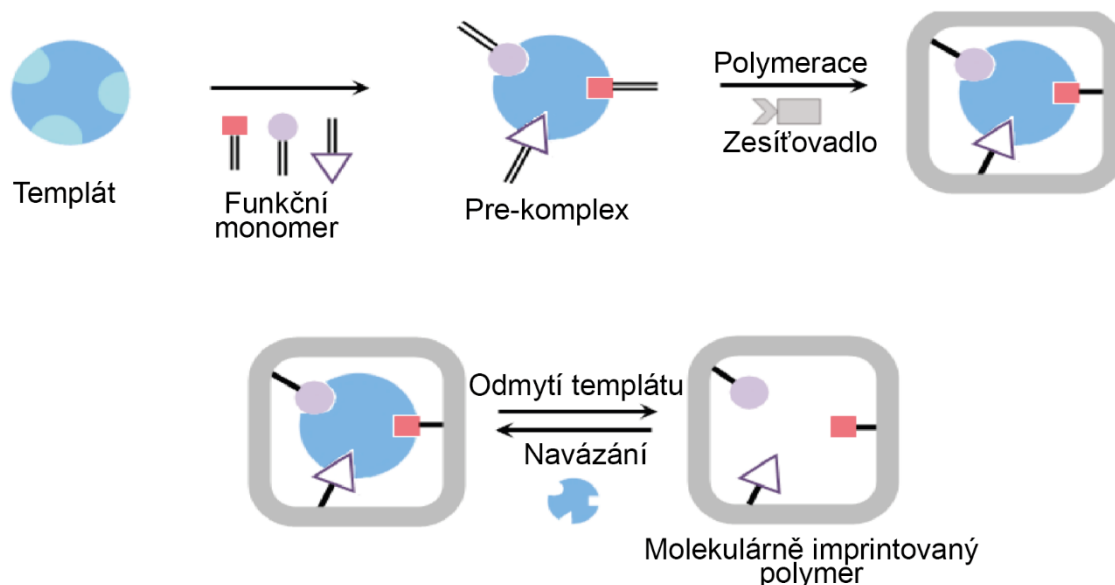
Templátem je cílová molekula, proti které se MIP vytváří. Ideální templát by měl splňovat tři podmínky: měl by obsahovat takové funkční skupiny, které nebudou bránit polymerizaci, měl by být dostatečně stabilní a obsahovat funkční skupiny schopné tvořit komplex s monomerem (Chen et al., 2011).

Monomer poskytuje své vlastní funkční skupiny, aby mohlo dojít k tvorbě pre-polymerizačního komplexu. Obecně monomery obsahují dvě důležité části, rozpoznávací část a část schopná polymerizovat. Mezi typické monomery patří např. akrylová kyselina, methakrylová kyselina (MAA), methakrylát (MMA), 4-vinylbenzaldehyd a další (Chen et al., 2016). Z těchto monomerů bývá jako univerzální funkční monomer využívána zejména MAA díky své schopnosti tvořit vodíkové vazby, a také díky schopnosti vytvářet dimery, což zvyšuje efekt imprintování (Zhang et al., 2010). Množství monomerů využitelných v molekulárním imprintingu je limitován, a proto se vynakládá snaha o syntézu nových monomerů (Chen et al., 2016).

Zesíťovadlo fixuje monomery kolem templátové molekuly při procesu polymerace, díky čemuž se následně vytváří vysoce zesíťovaný polymer, který zachovává vzniklý tvar i po odstranění templátové molekuly. Typ a množství zesíťovadla ovlivňuje selektivitu a vazebnou kapacitu vzniklých MIP. V případě příliš malého množství zesíťovadla nemá vzniklý polymer dostatečnou stabilitu, oproti tomu příliš velké množství zesíťovadla může snížit počet vzniklých vazebných míst. Mezi používané zesíťovadla patří ethylenglykoldimethakrylát (EGDMA), divinylbenzen, N,N'-methylendiakrylamid a další.

V závislosti na použitém typu polymerace se využívají různé iniciátory polymerace. Polymerace může být zahájena změnou teploty, fotochemicky, nebo určitými sloučeninami, mezi které patří například Azobisisobutyronitril nebo azobisdimethylvaleronitril (Chen et al., 2016).

Při syntéze MIP je velmi důležité zvolit správný postup, ať už jde o volbu polymerační techniky nebo o zvolené roztoky, abychom byli schopni produkovat MIP s žádanými vlastnostmi (Chen et al., 2016).



Obr. 1: Schéma syntézy MIP (převzato a upraveno ze Saylan et al. (2019): Mezi templátem a funkčním monomery dochází k tvorbě pre-komplexu. Po přidání zesíťovadla je spuštěna polymerace a vzniká polymer s navázaným templátem, který je poté vymyt a v polymeru tak dojde ke vzniku specifického vazebního místa.

2.1.2.3 Měkká litografie

Měkká litografie je metoda, při které dochází k tvorbě povrchově imprintovaných materiálů a je využívána zejména u větších molekul (Belbruno, 2019), například u bakterií (Poller et al., 2017) nebo u proteinů (Kryscio & Peppas, 2012).

V této metodě dochází nejprve k vytvoření „razítka“, které nese na svém povrchu templát, a které je následně přiloženo k částečně polymerizovanému filmu. Razítko se poté nechá přiložené do doby, než film plně zpolymerizuje kolem templátu. Při odstraňování razítka dochází k vymytí templátu a na povrchu filmu zůstávají pouze vazebná místa (Belbruno, 2019).

2.1.2.4 Fázová inverze

Fázová inverze je jednoduchá metoda vytvoření MIP, při které se využívá již plně polymerizovaný materiál. Využívá se například při tvorbě molekulárně imprintovaných membrán. Při této metodě je nutné zvolit vhodný roztok, ve kterém bude rozpuštěn jak polymer, tak templát. Smícháním následně dojde ke vzniku polymer-templátových komplexů. Roztok je následně nanesen například na skleněnou desku a je přidán koagulační roztok. V neposlední řadě dojde k vymytí templátu (Wang et al., 1996). Další možností místo precipitace roztoku je umožnění jeho vypaření. Tento postup umožňuje tvorbu tenké vrstvy filmu (Belbruno, 2019).

2.1.3 Využití MIP

Množství různých syntéz MIP a jejich selektivní vlastnosti umožňují širokou škálu možných aplikací. Mezi ně patří analytické separace a purifikace, senzory a biosenzory (Vasapollo et al., 2011), nebo jejich využití jako syntetické protilátky (Wackerlig & Schirhagl, 2016).

Využití MIP v separačních metodách, ať už jde o extrakce ze vzorku nebo o chromatografii, je jedním z nejčastějších využití MIP v analytické chemii. V případě chromatografických metod se MIP využívají jako náplně do chromatografických kolon, zejména u kapalinové chromatografie (LC) (Vasapollo et al., 2011). Nejběžněji jde o MIP vzniklé hromadnou polymerací, materiál je rozmělněn a jsou jím naplněny kolony.

Při mechanickém rozmělnění ovšem dochází ke vzniku různě velkých částic, čímž vznikají kolony s nereprodukovatelnou kvalitou. Z tohoto důvodu jsou připravovány nové metody přípravy molekulárně imprintovaných kolon, jako je příprava monolitických MIP polymerovaných přímo v koloně (Haginaka, 2009).

V posledních letech se zvyšuje zájem o spojení MIP s různými technikami přípravy vzorku. Jde například o spojení s extrakcí na pevné fázi (SPE), mikroextrakcí na pevné fázi (SPME), nebo spojení s magnetickými částicemi. SPE je jednou z nejvyužívanějších technik pro přípravu vzorku díky své jednoduchosti a všestrannosti. Propojením MIP a SPE vzniká technika zvaná molekulárně imprintovaná extrakce na pevné fázi (MISPE). V této technice figuruje MIP jako sorbent, díky čemuž je možné specificky vychytávat analyt z komplexního vzorku bez toho, aby se zadržovaly další sloučeniny (Hu et al., 2013). MISPE je využíváno pro separaci analytů z různých matric v odvětvích jako je bioanalytika, farmacie, potravinářství nebo environmentální obory (Chen et al., 2011).

Imprintované polymery jsou využívány také jako senzory v biotechnologiích nebo v medicíně díky své stabilitě, specificitě a jednoduchosti jejich přípravy i miniaturizace (Selvolini & Marrazza, 2017). Senzory mohou být optické, elektrochemické nebo piezoelektrické. V analytice jsou nejčastěji využívány elektrochemické senzory, následované optickými. Elektrochemický senzor přeměňuje interakci analytu s MIP receptorem navázaným na povrchu elektrody na analytický signál. Běžně využívané elektroanalytické techniky jsou voltametrie, amperometrie, nebo potenciometrie. Nejvíce využívané jsou amperometrické senzory (Ahmad et al., 2019). V případě optických MIP senzorů dochází k detekovatelné optické změně v průběhu navázání analytu na polymer a tato změna je přeměněna na elektrický signál. Optické senzory jsou děleny do dvou skupin. První skupinu tvoří MIP-afinitní senzory, které váží analyty s optickými vlastnostmi, jako je refrakční index nebo absorbance. Po navázání se měří změna v těchto vlastnostech analytu. Druhou skupinou jsou optoelektronické senzory, které závisí na monomerech s optickými vlastnostmi, které jsou schopny zachytit změny v prostředí a reagovat na přítomnost analytu (Ahmad et al., 2019). Zástupcem piezoelektrických senzorů je senzor obsahující mikrováhu s křemenným krystalem („*quartz crystal microbalance*“, QCM). QCM senzor monitoruje interakce mezi oscilujícím krystalem a biomolekulami imobilizovanými na povrchu. Vazebná reakce je spojena s nárůstem hmotnosti, která má za následek snížení oscilační frekvence (Saylan et al., 2019). MIP senzory jsou využívány například ve farmacii, k monitorování hladin léků ve vodách (Altintas et al., 2015), stanovení rakovinných biomarkerů (Selvolini & Marrazza, 2017) a další.

Relativně nová metoda využití MIP spočívá v jejich využití jako syntetické protilátky. MIP jsou stejně jako protilátky schopny rozpoznávat specifickou molekulu a vázat ji pomocí slabých interakcí (Wackerlig & Schirhagl, 2016). Díky tomu je možné využít MIP jako přímou náhradu za přirozené protilátky v různých aplikacích, jako je ELISA (Chianella et al., 2013). Druhým přístupem jak využít MIP je okopírování struktury přirozených protilátek (Hoshino et al., 2008).

2.1.4 Magnetické molekulárně imprintované polymery

Magnetické molekulárně imprintované polymery (MMIP) v sobě kombinují vysokou selektivitu MIP s jednoduchou separací magnetických částic pomocí vnějšího magnetického pole, díky čemuž jsou výhodné pro využití v separačních metodách při přípravě vzorku (Huang et al., 2018).

MMIP mohou být syntetizovány několika metodami, nejběžnější postup se dělí na čtyři kroky. Prvním krokem je příprava magnetických nanočástic (MNP) (Chen & Li, 2012). K syntéze MNP může být využito několik různých materiálů, například nikl, oxid železitý, oxid železnato-železitý nebo oxid nikelnatý. Nejběžněji využívaný je oxid železnato-železitý díky své nízké toxicitě, jednoduché přípravě (Huang et al., 2018) a množství hydroxylů, které umožňují následnou modifikaci (Xie et al., 2014). Modifikace MNP je běžně prováděna dvěma metodami, silanizací nebo využitím povrchově aktivních látek, jako je ethylenglykol nebo kyselina olejová. Třetí krok zahrnuje polymeraci MIP na povrchu MNP za účasti templátu, monomeru a zesilovače. Posledním krokem je vymytí templátu ze vzniklého polymeru (Chen & Li, 2012). V analytické chemii jsou MMIP nejvíce využívány jako sorbenty pro disperzní SPE (DSPE). Díky svým magnetickým vlastnostem mohou být volně rozptýleny ve vzorku a po extrakci či eluci jednoduše sesbírány pomocí vnějšího magnetického pole, což může nahradit kroky jako centrifugaci nebo filtraci, snížit potřebu rozpouštědel a zjednodušit postup extrakce analytu ze vzorku (Ríos et al., 2013). MMIP mohou být uplatněny v environmentálním a potravinářském odvětví, biologických a rostlinných analýzách (Chen & Li, 2012).

Zejména v rostlinné kvalitativní i kvantitativní analýze je nutná extrakce, která je důkladná, rychlá, snadná a selektivní (Chen & Li, 2012). MMIP jsou využívány i v případě analýzy různých rostlinných hormonů, které jsou klíčové pro růst a vývoj rostliny. Vzhledem k jejich nízké koncentraci v rostlinách a velkému množství interferujících látek je jejich extrakce a přesné stanovení stále velmi obtížné. ²Zhang et al. (2010) vytvořili novou metodu pro purifikaci auxinů na základě MMIP vytvořených suspenzní polymerací zahájenou mikrovlnným zahřátím. Vyšší vazebné kapacity bylo docíleno použitím binárních funkčních monomerů složených z 4-vinylpyridinu a β -cyclodextrinu. Podobná metoda byla využita také při syntéze MMIP pro vychytávání giberelinové kyseliny, kdy byl jako funkční monomer zvolen akrylamid (Zhang et al., 2012). V nejnovější studii byly představeny také MMIP pro vychytávání 6-benzylaminopurinu. MMIP byly syntetizovány koprecipitační metodou za použití bifunkčního monomeru kombinujícím MAA a p-styrensulfonyl sodný (Xiong et al., 2022).

2.2 Objev a historie cytokininů

Cytokiny (CK) tvoří třídu rostlinných hormonů nezbytných pro regulaci řady procesů v rostlinách, jako je buněčné dělení, apikální dominance, senescence, reakce na stres a další (Kieber & Schaller, 2014).

První hypotézu o existenci faktoru indukujícího buněčné dělení vyslovil Gottlieb Haberlandt roku 1913, který po svých pokusech formuloval myšlenku, že ve floému je přítomna látka hormonální povahy schopná iniciovat dělení buněk (Kamínek, 2015). První CK, nazvaný kinetin, byl objeven o 42 let později roku 1955 dvojicí Carlos Miller a Folke Skoog (Miller et al., 1955). Kinetin byl nejprve považován pouze za syntetický CK, jako produkt oxidace DNA (Miller et al., 1956). V dalších letech se ovšem začaly objevovat důkazy i o jeho přirozeném výskytu, byl objeven například v kořenech rostliny *Casuarina equisetifolia* infikované bakterií *Frankia*, v kokosovém mléce, nebo v mozkové a jaterní tkáni transgenních myší (Strnad, 2021).

Po objevu kinetinu následovalo období intenzivního syntetizování nových CK, během kterého byl jako první CK se substituovaným aromatickým kruhem syntetizován 6-benzylaminopurin (BAP) (Okumura et al., 1957). Jen o tři roky později byl objeven 6-(3-hydroxybenzylamino)purine, *meta*-topolin, kdy Okumura s kolegy syntetizovali nové deriváty BAP nesoucí různé funkční skupiny na ortho-, meta- a para- pozicích aromatického

kruhu (Okumura et al., 1959).

První přirozeně se vyskytující isoprenoidní CK objevil David S. Letham, kterému se při svých experimentech s endospermem kukuřice podařilo izolovat látku v krystalické formě s aktivitou podobou kinetinu. Tuto látku následně pojmenoval zeatin (Letham, 1973). Díky rozsáhlému výzkumu CK bylo objeveno množství informací o jejich významu, funkcích, biosyntéze i signalizaci. I přes tento pokrok je stále mnoho problémů, které nejsou vyřešeny a je tedy potřeba dalších studií k jejich objasnění (Li et al., 2021).

2.2.1 Chemická struktura

Z chemického hlediska jsou CK charakterizované jako N^6 -adeninové deriváty (Skoog et al., 1965). Přirozené CK se v organismech vyskytují ve velmi nízkých koncentracích, v rozsahu fmol – pmol na gram čerstvé hmoty (Davies, 2010). Podmínkou jejich biologické aktivity je konfigurace navázaného postranního řetězce (Procházka et al., 1998). V závislosti na postranním řetězci dělíme CK na isoprenoidní a aromatické, ty s isoprenoidním řetězcem se dále dělí na CK s nasyceným a nenasyceným řetězcem. Struktura CK je zobrazena na obr. 2. CK mohou být zastoupeny v různých formách, například jako volné báze, nukleotidy, nukleosidy a konjugáty s glukosou, xylosou nebo zbytky aminokyselin, jako je alanin (Spíchal, 2012). Podle těchto metabolitů můžeme CK dělit na aktivní, translokační, zásobní a inaktivované formy (Davies, 2010). Mezi aktivní formy jsou řazeny volné báze. Nukleosidy, díky jejich velkému výskytu ve floému a xylému, jsou považovány za translokační formy. Sacharidové konjugáty jsou brány za zásobní CK (Sakakibara, 2010).

Mezi isoprenoidní CK řadíme *trans*-zeatin (*tZ*), *cis*-zeatin (*cZ*), dihydrozeatin (DHZ) a isopentenyladenin (*iP*) s jejich příslušnými metabolity (Sakakibara, 2010). Isoprenoidní CK mají na adeninu navázaný isopentenylový řetězec, jehož hydroxylací vzniká zeatin, který se vyskytuje ve dvou izoformách, *trans* a *cis* (Mok & Mok, 2001). I když *trans* konfigurace má vyšší biologickou aktivitu, tak i *cis* konfigurace hraje důležitou roli v rostlinách (Taiz & Zeiger, 2006). Redukcí dvojně vazby isoprenoidního řetězce dochází ke vzniku nasyceného DHZ, popř. jeho metabolitů (Mok & Mok, 2001).

V případě aromatických CK (ARCK) zde řadíme kinetin (K), 6-benzylaminopurin (BAP), topoliny a jejich příslušné metabolity. Topoliny jsou deriváty BAP nesoucí hydroxylovou skupinu na aromatickém kruhu v poloze *ortho*-, *meta*- nebo *para*-.

Z výše uvedených ARCK vykazuje nejvyšší biologickou aktivitu *meta*-topolin (*mT*) (Procházka et al., 1998). I když byly ARCK nejdříve považovány za čistě syntetické CK, v průběhu let byly detekovány a identifikovány i v řadě rostlinných tkání, například v kornoutici africké (*Zantedeschia aethiopica*) (Chaves Das Neves & Pais, 1980) nebo v topolu (Strnad et al., 1997).

Kromě přirozeně se vyskytujících adeninových derivátů jsou známé i synteticky připravené deriváty fenylmočoviny s cytokininovou aktivitou. Mezi ně patří například N-fenyl-N'-[2-chloro-4-pyridyl]urea nebo thidiazuron. Tyto syntetické CK mají biologickou aktivitu srovnatelnou se zeatinem a jsou vysoce stabilní. U derivátů fenylmočoviny neexistuje žádný důkaz o jejich přirozeném výskytu v rostlinách (Mok & Mok, 2001).

General structure of CKs	R ₁	R ₂	R ₃	Compound	Abbreviation
	H	-	H	<i>N</i> -isopentenyladenine	iP
	N ₉ -R	-	H	<i>N</i> ^β -isopentenyladenosine	iPR
	N ₇ -G	-	H	<i>N</i> ^β -isopentenyladenine-7-glucoside	iP7G
	N ₉ -G	-	H	<i>N</i> ^β -isopentenyladenine-9-glucoside	iP9G
	N ₉ -RP	-	H	<i>N</i> ^β -isopentenyladenosine-5'-monophosphate	iPMP
	H	H	H	<i>trans</i> -zeatin	tZ
	N ₉ -R	H	H	<i>trans</i> -zeatin riboside	tZR
	N ₇ -G	H	H	<i>trans</i> -zeatin-7-glucoside	tZ7G
	N ₉ -G	H	H	<i>trans</i> -zeatin-9-glucoside	tZ9G
	H	G	H	<i>trans</i> -zeatin <i>O</i> -glucoside	tZOG
	N ₉ -R	G	H	<i>trans</i> -zeatin riboside <i>O</i> -glucoside	tZROG
	N ₉ -RP	H	H	<i>trans</i> -zeatin riboside-5'-monophosphate	tZMP
	H	H	H	<i>cis</i> -zeatin	cZ
	R	H	H	<i>cis</i> -zeatin riboside	cZR
	N ₉ -G	H	H	<i>cis</i> -zeatin-9-glucoside	cZ9G
	H	G	H	<i>cis</i> -zeatin <i>O</i> -glucoside	cZOG
	N ₉ -R	G	H	<i>cis</i> -zeatin riboside <i>O</i> -glucoside	cZROG
	N ₉ -RP	H	H	<i>cis</i> -zeatin riboside-5'-monophosphate	cZMP
	H	H	H	dihydrozeatin	DHZ
	N ₉ -R	H	H	dihydrozeatin riboside	DHZR
	N ₉ -G	H	H	dihydrozeatin-9-glucoside	DHZ9G
	H	G	H	dihydrozeatin <i>O</i> -glucoside	DHZOG
	N ₉ -R	G	H	dihydrozeatin riboside <i>O</i> -glucoside	DHZROG
	N ₉ -RP	H	H	dihydrozeatin riboside-5'-monophosphate	DHZMP
	H	-	H	<i>N</i> ^β -benzyladenine	BA
	N ₉ -R	-	H	<i>N</i> ^β -benzyladenosine	BAR
	N ₃ -G	-	H	<i>N</i> ^β -benzyladenine-3-glucoside	BA3G
	N ₇ -G	-	H	<i>N</i> ^β -benzyladenine-7-glucoside	BA7G
	N ₉ -G	-	H	<i>N</i> ^β -benzyladenine-9-glucoside	BA9G
	N ₉ -RP	-	H	<i>N</i> ^β -benzyladenosine-5'-monophosphate	BAMP
	H	-	H	<i>ortho</i> -topolin	oT
	N ₉ -R	-	H	<i>ortho</i> -topolin riboside	oTR
	N ₉ -G	-	H	<i>ortho</i> -topolin-9-glucoside	oT9G
		H	-	H	<i>meta</i> -topolin
N ₉ -R		-	H	<i>meta</i> -topolin riboside	mTR
N ₉ -G		-	H	<i>meta</i> -topolin-9-glucoside	mT9G
	H	-	H	<i>para</i> -topolin	pT
	N ₉ -R	-	H	<i>para</i> -topolin riboside	pTR
	N ₉ -G	-	H	<i>para</i> -topolin-9-glucoside	pT9G
	H	-	H	kinetin	K
	N ₉ -R	-	H	kinetin riboside	KR
	N ₉ -G	-	H	kinetin-9-glucoside	K9G

Obr. 2: Struktura isoprenoidních a aromatických cytokininů. Převzato a upraveno z: Svačinová et al. (2012)

H = vodík, R = β -D-ribofuranosyl, G = β -D-glukopyranosyl, RP = β -D-ribofuranosyl-5-monofosfát.

2.2.2 Biosyntéza cytokininů

Za hlavní místo syntézy CK je považována kořenová špička, ale v menší míře se syntetizují i v dalších částech rostliny (Kakimoto, 2003). Syntéza CK probíhá dvěma dráhami. U první, přímé dráhy, dochází k syntéze CK *de novo*. V případě druhé dráhy vznikají CK nepřímo z tRNA (Sakakibara, 2006). Zjednodušené schéma biosyntézy je zobrazeno na obr. 3.

Prvním krokem *de novo* syntézy je připojení isopentenylového zbytku z dimethylallyldifosfátu (DMAPP) nebo hydroxymethyldibutenyldifosfátu (HMBDP) na N^6 -pozici adenosintrifosfátu (ATP), adenosindifosfátu (ADP) nebo adenosinmonofosfátu (AMP). HMBDP i DMAPP vznikají v průběhu methylerythritolfosfátové (MEP) dráhy, která probíhá zejména v plastidech. DMAPP navíc vzniká také mevalonovou (MVA) dráhou, která běžně probíhá v cytosolu eukaryot. Tento přenos je katalyzován enzymem isopentenyltransferasou (IPT) (Sakakibara, 2006).

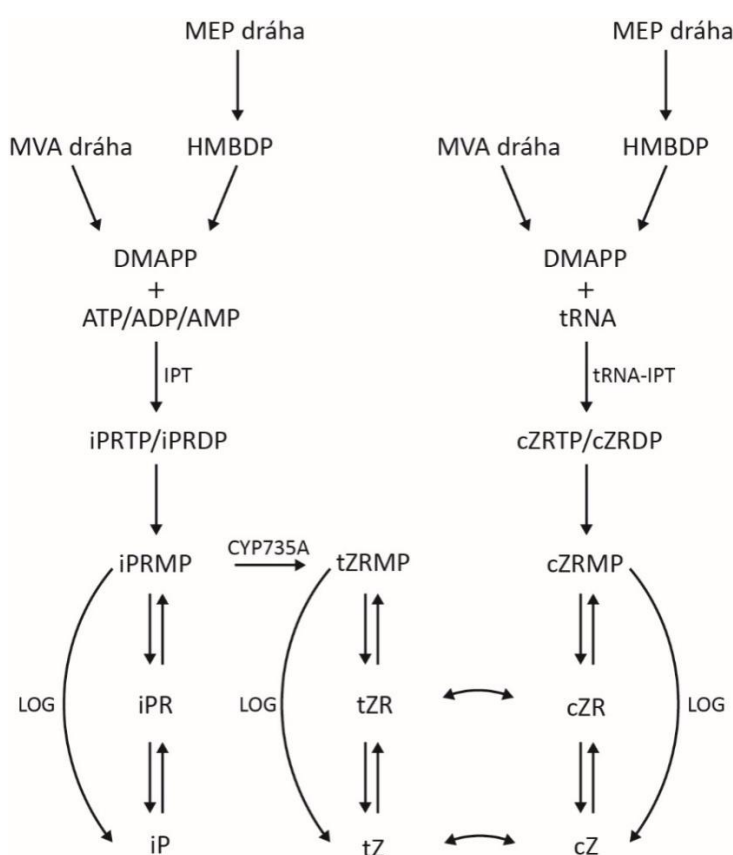
Isopentenyltransferasy byly identifikovány ve vyšších rostlinách (Kakimoto, 2001) i některých fytopatogenních bakteriích, jako *Agrobacterium tumefaciens* (Akiyoshi et al., 1984). IPT vyskytující se v rostlinách a účastníci se produkce cytokininů se dělí na dva typy, adenylát:IPT a tRNA:IPT (Frébort et al., 2011). Geny kódující rostlinné IPT byly poprvé objeveny v rostlině *Arabidopsis thaliana* dvěma na sobě nezávislými skupinami. Takei et al. (2001) a Kakimoto (2001) identifikovali devět rozdílných genů označených *AtIPT1* – *AtIPT9*. Geny *AtIPT2* a *AtIPT9* kódují tRNA:IPT, zbylé geny kódují adenylát:IPT. Bylo dokázáno, že rostlinné IPT využívají pro produkci CK zejména ATP a ADP (Kakimoto, 2001).

Navázáním isopentenylového zbytku na ATP/ADP/AMP dochází ke vzniku isopentenylfosfátu (iPRTP, iPRDP a iPRMP), který může být následně přeměněn na *tZ*-ribotid hydroxylací postranního řetězce P450 cytochromoxidasou CYP735A (Kieber & Schaller, 2014). U *A. thaliana* se vyskytují dva typy enzymu, CYP735A1 a CYP735A2. Enzymy katalyzují přeměnu iP-ribotidů, preferenčně iPRMP a iPRDP (Takei et al., 2004).

Přeměna CK ribotidů na jejich aktivní formy, volné báze, je primárně zprostředkována enzymem patřícím do rodiny LONELY GUY (LOG). Jedná se o jednostupňovou dráhu, kdy dochází k přímé přeměně ribotidu na volnou bázi. Druhá, dvoustupňová dráha, je založena na postupné hydrolýze nukleotidů (Feng et al., 2017).

V případě nepřímého vzniku CK z tRNA dochází nejprve k připojení isopentenylového zbytku z DMAPP na N⁶ pozici nukleotidu navázaného na 3' konec antikodonu tRNA. Následně dochází ke vzniku CK stejně jako u *de novo* syntézy. V případě tRNA dráhy dochází zejména ke vzniku *cis* forem CK (Feng et al., 2017).

Průběh biosyntézy ARCK není doposud znám, ovšem přítomnost volných bází, nukleosidů, nukleotidů a glukosidů naznačuje, že alespoň část jejich metabolické dráhy je podobná s isoprenoidními CK (Feng et al., 2017). Přítomnost aromatického kruhu dává předpoklad, že syntéza ARCK má původ v metabolismu fenolů (Strnad, 1997).



Obr. 3: Zjednodušené schéma biosyntézy CK (upraveno dle Spíchal (2012): Přímá dráha – isopentenylový zbytek z DMAPP vzniklý v MEP/MVA dráze je navázán na ATP/ADP/AMP enzymem isopentenyltransferasou (IPT). Ze vzniklých ribotidů je následně odštěpena fosfátová skupina za vzniku iPRMP. Ten je následně přeměněn primárně jednostupňovou dráhou na iP enzymem LONELY GUY (LOG), případně probíhá přeměna dvoustupňovou dráhou hydrolyzací nukleotidů. iPRMP je enzymem P450 ccytochromoxidasou CYP735A přeměněn na tZRMP. Ten je dále přeměňován analogicky s iPRMP. Nepřímá dráha – isopentenylový zbytek z DMAPP je navázán na tRNA enzymem tRNA-isopentenyltransferasou a dráha pokračuje analogicky s přímou dráhou. Do procesu může být zapojen enzym zeatinizomerasa, který zajišťuje přeměnu mezi tZ a cZ.

2.2.3 Metabolismus cytokininů

Metabolické přeměny CK mohou probíhat jak na molekule adeninu tak i na postranním řetězci. Tyto modifikace vedou k reverzibilní nebo ireverzibilní ztrátě aktivity a tedy k regulaci CK v rostlině. Mezi modifikace na adeninu řadíme ribosylaci, fosforibosylaci, *N*-glukosylaci a *N*-alanylaci. Postranní řetězec je modifikován *O*-glukosylací a hydroxylací (Spíchal, 2012).

Objev nového přirozeného CK bývá doprovázen naleznutím jeho nukleotidu a nukleosidu. Přeměny mezi bází, nukleotidem a nukleosidem jsou zajišťovány enzymy běžnými pro metabolismus purinu, jedná se například o 5' nukleotidasu, adenosin nukleotidasu nebo adenosin kinasu (Mok & Mok, 2001). Tyto enzymy mají ovšem obvykle vyšší afinitu vůči adeninovým metabolitům než vůči CK (Chen, 1997).

Dalšími modifikacemi adeninové molekuly jsou *N*-alanylace a *N*-glukosylace. *N*-alanylace probíhá za aktivity enzymu transferasy, která na *N*⁹-pozici adeninu váže alanylacilový řetězec, jehož donorem je *O*-acetylserin, a vzniká kyselina lupinová (Entsch et al., 1983). Během této modifikace dochází k inaktivaci molekuly CK (Mok & Mok, 2001).

N-glukosylace probíhá na adeninu na pozicích *N*³, *N*⁷ a *N*⁹. Glukosylace na pozici *N*⁷ a *N*⁹ je zprostředkována enzymem *N*-glukosyltransferasou, která jako donor glukosy využívá uridindifosfátglukosu (UDPG) a uridintrifosfátglukosu (TDPG) (Spíchal, 2012). Přednostně dochází ke glukosylaci na pozici *N*⁷, ovšem poměr mezi *N*⁷ a *N*⁹ se může lišit v závislosti na daném CK. *N*⁷ a *N*⁹-glukosylace jsou považovány za ireverzibilní modifikaci CK, kdy tyto glukosidy nevykazují téměř žádnou biologickou aktivitu v bioesejích (Mok & Mok, 2001). Oproti tomu *N*³-glukosidy mohou být přeměněny na volné báze enzymem β -glukosidasou (Brzobohatý et al., 1993).

Nejvýznamnější modifikace CK probíhají na *N*⁶-postranním řetězci, kdy i malá změna má efekt na aktivitu CK (Mok & Mok, 2001). Po navázání sacharidu, glukosy nebo xylosy, na hydroxylovou skupinu postranního řetězce CK dochází ke vzniku *O*-glukosidů. Zatím byly izolovány dva typy glukosyltransferas, *O*-glukosyltransferasa a *O*-xylosyltransferasa, kdy tyto typy využívají různé CK substráty a různé donory sacharidu. *O*-glukosyltransferasa využívá jako donor UDPG a uridindifosfátxylosu (UDPX), oproti tomu *O*-xylosyltransferasa využívá pouze UDPX. Oba typy enzymu jsou vysoce specifické pro daný substrát, kdy substrátem je *tZ* a DHZ. Vysoká specifita enzymu nasvědčuje, že *O*-glukosylace je přesně regulovaný proces (Spíchal, 2012).

Díky rezistenci *O*-glukosidů k cytokininoxidase a možnosti jejich přeměny na aktivní volné báze β -glukosidasou jsou *O*-glukosidy považovány za zásobní formy CK a hrají velkou roli v regulaci hladiny aktivních CK (Mok & Mok, 2001).

Mezi významné modifikace postranního řetězce patří hydroxylace isopentenylového řetězce. Tato modifikace je důležitou součástí biosyntézy *tZ* a je katalyzována enzymem CYP735A. Dvojná vazba v postranním řetězci *tZ* může být redukována pomocí enzymu zeatinreduktasy a vzniká tak DHZ. Izomerace mezi *cZ* a *tZ* je katalyzována enzymem zeatinisomerasou (Spíchal, 2012).

Posledním krokem metabolismu CK je jejich degradace. Volné báze a nukleosidy s nenasyceným *N*⁶-postranním řetězcem jsou ireverzibilně degradovány enzymem cytokininoxidasa (CKX) (Haberer & Kieber, 2002). Tento enzym byl poprvé detekován u tabáku, kdy bylo demonstrováno oxidativní štěpení isopentenyladenosinu na adenosin (Pačes et al., 1971). CKX katalyzuje odštěpení postranního řetězce za vzniku adeninu. Během reakce odebírá elektronový akceptor dva elektrony z flavinového kofaktoru a reakce pokračuje dehydrogenací CK na iminový meziprodukt, ze kterého následnou hydrolyzou vzniká adenin. Molekulární kyslík byl nejprve považován za nezbytný pro aktivitu CKX, ovšem byly objeveny další elektronové akceptory s lepší účinností, zejména chinony. Proto byl posléze enzym reklasifikován z oxidasy na dehydrogenasu (Frébort et al., 2011). Substrátem pro CKX jsou iP, zeatiny a jejich *N*-glukosidy (Procházka et al., 1998). Bylo dokázáno, že ARCK jsou pomocí CKX také oxidovány, ovšem podstatně méně. U ARCK je pro aktivitu enzymu potřeba molekulární kyslík (Frébortová et al., 2004). *O*-glukosidy a CK s nasyceným řetězcem jsou vůči CKX rezistentní (Procházka et al., 1998).

2.2.4 Funkce cytokininů

Cytokininy regulují množství různých aspektů růstu a vývoje rostliny. Nejprve se výzkum jejich aktivity zaměřoval zejména na analýzu efektů exogenně aplikovaných CK, ovšem není vždy jasné, zda exogenně aplikovaný hormon je ukazatelem skutečné fyziologické funkce. Díky novým studiím byly získány obsáhlé znalosti ohledně genů zapojených do metabolismu a signalizaci CK. Tyto vědomosti byly dále využity ke vzniku mutantních rostlin, které byly použity k dalším studiím CK aktivit. Díky tomu bylo objeveno množství nových rolí CK v rostlinném růstu a vývoji (Kieber & Schaller, 2014).

Mezi funkce CK patří například regulace buněčného dělení, diferenciace, apikální dominance, senescence listů nebo reakce na stres (Taiz & Zeiger, 2006).

2.2.4.1 Regulace buněčného cyklu

Mezi hlavní účinky CK patří stimulace buněčného dělení. Vysoké hladiny CK byly zjištěny v mitoticky aktivních tkáních, jako je meristém stonku a kořene, oproti tomu velmi nízké hodnoty byly zjištěny v místech, kde je buněčný cyklus zastaven (Kieber & Schaller, 2014). Aplikace exogenních CK do míst, kde je běžně nízká hladina tohoto hormonu, zde indukovala buněčné dělení (D'Agostino & Kieber, 1999). Zvýšenou expresí genů pro cytokininoxidasy v tabáku bylo způsobeno snížení hladin endogenních CK a následně k porušení vývoje stonku z důvodu redukce buněčného dělení v apikálním meristému (Werner et al., 2001). Všechny tyto výsledky podporují myšlenku, že CK regulují buněčné dělení *in vivo*.

Buněčný cyklus eukaryotních buněk je řízen pomocí enzymů cyklin-dependentních kinas (CDK) a jejich regulačních podjednotek, cyklinů. CK se společně s auxiny podílí na regulaci buněčného cyklu tak, že kontrolují aktivitu CDK. Exprese genu kódujícího hlavní CDK, *Cdc2*, je regulována auxinem. Tato CDK je ovšem enzymaticky inaktivní. K aktivaci enzymu je potřeba odstranit fosfátovou skupinu enzymem fosfatasou *Cdc25*, kdy aktivace tohoto enzymu je spojená s aktivitou CK. CK takto ve spolupráci s auxiny řídí buněčný cyklus (Taiz & Zeiger, 2006).

2.2.4.2 Regenerace orgánů

Spolupráce auxinů a CK je nezbytná pro růst tkáňových kultur a je základem regeneračních procesů (Procházka et al., 1998). V závislosti na poměru těchto dvou hormonů dochází k růstu různých částí rostliny. Při vyrovnaném poměru auxinu a CK dochází k tvorbě nediferenciovaného pletiva, kalusu. Při vyšší hladině CK dochází k růstu zejména nadzemní části rostliny, oproti tomu při vyšší hladině auxinu dochází k růstu kořenů (Skoog & Miller, 1957). Efekt různých poměrů koncentrací CK je možné pozorovat u nádorů vyvolaných mutantní *Agrobacterium tumefaciens*. V případě mutace v genu pro biosyntézu CK dochází ke zvýšení koncentrace auxinů a k proliferaci kořenů. V případě mutace genu pro biosyntézu auxinu naopak dochází k proliferaci nadzemní části (Taiz & Zeiger, 2006).

2.2.4.3 Apikální dominance

Apikální dominance je v rostlinách řízena zejména auxiny. CK v tomto případě fungují jako jejich antagonisté, potlačují apikální dominanci, stimulují větvení stonku a růst a vývoj laterálních pupenů (Procházka et al., 1998). Tato myšlenka byla potvrzena u mutantních rostlin s nadprodukcí CK, kteří byli více rozvětvení (Taiz & Zeiger, 2006).

Při pokusech na hrachu bylo zjištěno, že auxiny potlačují expresi IPT genu a negativně regulují biosyntézu CK v úžlabních pupenech. V případě dekapitace stonku dochází k uvolnění inhibice biosyntézy CK a k růstu laterálních pupenů. Posléze dochází v novém stonkovém vrcholu ke zvýšení hladiny auxinu, který opět inhibuje biosyntézu CK (Tanaka et al., 2006).

2.2.4.4 Regulace růstu

K růstu rostliny dochází v meristemických dělivých pletivech. U rostlin se vyskytují dva apikální meristémy, kořenový (root apical meristem - RAM) a stonkový (shoot apical meristem - SAM), kdy u obou hrají CK významnou roli. U mutantních CK-deficientních rostlin dochází ke zmenšení SAM. To ukazuje, že CK funguje jako pozitivní regulátor aktivity SAM, kdy zde stimuluje proliferaci buněk (Werner et al., 2003). Pro vytvoření a udržení SAM jsou nezbytné KNOTTED-LIKE transkripční faktory, které jsou schopny regulovat jeho funkci kontrolou relativních hladin CK a giberelinů (Kieber & Schaller, 2014).

Již od objevu CK byla známá jejich inhibiční aktivita k růstu a vývoji kořenového systému (Skoog & Miller, 1957). Auxin a CK působí antagonisticky v kořenech při regulaci velikosti RAM. CK regulují velikost RAM stimulací diferenciací buněk v elongační zóně. Oproti tomu auxiny stimuluje proliferaci buněk. Velikost RAM tedy závisí na souhře mezi auxiny a CK (Kieber & Schaller, 2014).

2.2.5 Aromatické cytokininy a jejich využití

Výzkum CK se dlouhou dobu soustředil pouze na isoprenoidní CK. ARCK nebylo věnováno dostatek pozornosti, protože byly zprvu považovány za čistě syntetické. Až později byly objeveny přirozeně se vyskytující CK s aromatickým kruhem v různých rostlinných tkáních, což podnítilo myšlenku, že ARCK musí být více rozšířené, než se původně předpokládalo (Strnad, 1997). Jak již bylo popsáno výše, mezi ARCK je řazen kinetin (K), 6-benzylaminopurin (BAP) a topoliny, konkrétně *meta*-topolin (*mT*), *ortho*-topolin (*oT*) a *para*-topolin (*pT*).

ARCK a isoprenoidní CK se liší nejen chemicky, ale i v biologické aktivitě. Isoprenoidní CK vykazují vyšší efekt zejména na růstové procesy a regulaci buněčného cyklu, oproti tomu ARCK ovlivňují zejména vývojové procesy, jako je morfogeneze a senescence (Holub et al., 1998).

Kamínek et al. (1987) provedli studii porovnávající aktivity ribosidů topolinů (*mTR*, *oTR*, *pTR*) s BAP ribosidem (BAPR) ve čtyřech různých biotestech. Bylo zjištěno, že biologická aktivita klesá v pořadí *mTR*>BAPR>*oTR*>*pTR* (Kamínek et al., 1987). Holub et al. (1998) provedli rozsáhlejší studii porovnávající aktivity volných bází, ribosidů a *N*⁹-glukosidů ARCK s isoprenoidním zeatinem (Z), který je považován za přirozený CK s nejvyšší biologickou aktivitou. Aktivita byla testována třemi různými biotesty: kalusovým, amarantovým a senescenčním. Výsledky se v biotestech lišily. V případě kalusového a senescenčního testu vykazoval *mT* srovnatelnou aktivitu se Z, zatímco aktivita BAP byla nižší. Oproti tomu v amarantovém testu byla aktivita *mT* výrazně nižší než Z a BAP. Hydroxylace na *ortho*-pozici BAP výrazně snížila jeho aktivitu, což naznačuje, že hydroxylace specifické pozice benzenového kruhu výrazně ovlivňuje aktivitu CK. *N*⁹-glukosidy všech CK byly inaktivní (Holub et al., 1998).

Význam ARCK je zejména v jejich využití v mikropropagačních technikách pro produkci zemědělsky i lékařsky významných rostlin (Plíhalová et al., 2016). Pro mikropropagaci je pro svou aktivitu, dostupnost a nízkou cenu hojně používán BAP. Jeho použití je ovšem doprovázeno i negativními účinky, kdy aplikace BAP má inhibiční účinky na růst kořenů (Podlešáková et al., 2012). Inhibice je způsobena akumulací neaktivních *N*⁹-glukosidů, což bylo prokázáno při experimentech na *Spatiphyllum floribundum* (Werbrouck et al., 1996). Vhodnou alternativou za BAP jsou deriváty obsahující kyslík, díky kterému mohou být CK deaktivovány *O*-glukosylací a hromadění inhibičního *N*⁹-glukosidů je tak nižší (Podlešáková et al., 2012).

2.2.6 Purifikace cytokininů

Cytokininy se obvykle vyskytují v rostlinných tkáních ve velmi nízkých koncentracích (pg/g čerstvé hmoty), zatímco interferující látky jsou ve vzorcích v mnohem větším množství. Tento poměr CK s interferujícími látkami, společně s obsahem enzymů katalyzujících jejich metabolickou přeměnu, komplikuje jejich purifikaci a stanovení. S rozšířením využití hmotnostní spektrometrie (MS) pro stanovení širokého spektra CK a jejich metabolitů jsou nezbytné spolehlivé extrakční a purifikační techniky zabráňující metabolickým přeměnám v průběhu přípravy vzorku a poskytující vzorky s vhodnou čistotou pro MS analýzu (Hoyerová et al., 2006).

Pro správnou extrakci a purifikaci CK je nutné znát jejich chemické vlastnosti. Všechny CK jsou schopné se ionizovat při změně pH. Aminoskupina na pozici N^6 purinového kruhu dává CK kladný náboj při $\text{pH} < 3$. Na druhou stranu, NH-skupina na pozici N^9 dodává CK záporný náboj v prostředí s $\text{pH} > 11$. Vedlejší řetězec zajišťuje CK hydrofobní charakter (Dobrev & Kamínek, 2002). Různé metabolity CK mají ovšem různé chemické vlastnosti, na které musí být brán ohled při analýze. Například nukleotidy při $\text{pH} < 3$ nezískávají náboj, oproti tomu báze a ribosidy jsou kladně nabitě. Také polarita a hydrofobní charakter se liší, kdy nukleotidy jsou více polární a tím pádem méně hydrofobní než glukosidy, které jsou zase více polární než báze a ribosidy (Tarkowská et al., 2014).

Pro purifikaci CK bylo již použito množství různých purifikačních technik, jako SPE (Dobrev & Kamínek, 2002), imunoafinitní chromatografie (Novák et al., 2003, Novák et al., 2008), polymerní monolitická mikroextrakce (Liu et al., 2010). Pro CK je nejběžněji využívána metoda SPE, využívající kationtově výměnné sorbenty a sorbenty s reverzní fází (Dobrev & Kamínek, 2002). Rychlým vývojem hmotnostních spektrometrů bylo umožněno detekovat analyty i z miligramových množství biologického materiálu (Ljung et al., 2010), díky čemuž došlo k rozvoji miniaturizovaných purifikačních metod. Takovou metodou je například metoda StageTip, využívající pro purifikaci CK pipetovací špičky naplněné sorbentem (Svačinová et al., 2012).

Metoda magnetické SPE získává v poslední době stále více pozornosti pro použití v přípravě vzorku. Magnetické sorbenty není potřeba plnit do kolon, místo toho jsou volně rozptýleny v roztoku a sorbent lze jednoduše sesbírat pomocí magnetu. Tato metoda byla použita i pro zakoncentrování a purifikaci CK (Liu et al., 2012).

Spojení techniky s magnetickými částicemi a monoklonálních protilátek dalo vzniknout účinné purifikační metodě pro analýzu CK.

Tato miniaturizovaná metoda vyžaduje pouze mg množství biologického materiálu a kombinuje v sobě jednoduchost purifikace s vysokou senzitivitou k CK (Plačková et al., 2017).

V posledních letech dochází k vývoji techniky spojující magnetické částice s MIP a jejich využití k analýze rostlinných hormonů, jako jsou auxiny, gibereliny i CK (Zhang et al., 2010; Zhang et al., 2012; Xiong et al., 2022). MIP jsou stejně jako protilátky schopny specifického vyláčení dané molekuly. Jejich výhodou oproti biologickým systémům je vysoká robustnost, rezistence k extrémním podmínkám, levná syntéza a dlouhá životnost (Vassapollo, 2011).

3 Experimentální část

3.1 Chemikálie

- Redestilovaná voda z MilliporeSimplicity™
- Kyselina mravenčí ($\geq 98\%$), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Německo)
- 2-propanol ChromasoIV™ PLUS For HPLC, Honeywell Speciality ChemicalsSeelzeGmbH (Seelze, Německo)
- Hydroxid amonný 25% Suprapur®, Merck (Darmstadt, Německo)
- Methanol ($\geq 99,9\%$) gradient grade for liquid chromatography, LiChrosolv, MerckKGaA (Darmstadt, Německo)
- Kyselina octová ($\geq 99,8\%$), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Německo)
- Isotopicky značené a neznačené cytokininové standardy, Laboratoř růstových regulátorů Univerzity Palackého (Olomouc, Česká republika)

Neznačené CK: BAP, BAPR, BAP9G, *mT*, *oT*, *pT*, *mTR*, *oTR*, *pTR*, *mT9G*,
K, KR, K9G, *cZ*, *tZ*, *tZR*, *cZR*, *cZ9G*, *tZ9G*, DHZ, DHZR, DHZ9G, *iP*, *iPR*,
iP9G

Značené CK: [²H₇]BAP, [¹⁵N₄]mT

Roztoky

- Modifikovaný Bielecki pufr (75 % metanol + 5 % kyselina mravenčí + 20 % redestilovaná voda – 750 ml/l metanolu + 50 ml/l kyselina mravenčí + 200 ml redestilované vody)
- 15 mM mravenčan amonný (pH 3,4) (0,566 ml/l kyseliny mravenčí, pH upraveno 25% roztokem hydroxidu amonného)
- 10% methanol (1 ml/10 ml methanolu + 9 ml/10 ml redestilované vody)
- 1% kyselina mravenčí v 100% isopropanolu (2,5 ml/250 ml kyselina mravenčí + 247,5 ml/250 ml isopropanolu)
- 1% hydroxid amonný v 100% isopropanolu (10 ml/250 ml 25% hydroxid amonný + 240 ml/250 ml isopropanol)
- 1% hydroxid amonný v 60% isopropanolu (10 ml/250 ml 25% hydroxid amonný + 150 ml/250 ml isopropanol + 90 ml/250 ml redestilovaná voda)
- 0,5 M hydroxid amonný v 60% methanolu (3,88 ml/50 ml 25% hydroxid amonný + 30 ml methanol + 16,12 ml redestilovaná voda)

- 0,5 M hydroxid amonný v 60% isopropanolu (3,88 ml/50 ml 25% hydroxid amonný + 30 ml isopropanol + 16,12 ml redestilovaná voda)
- 5% kyselina octová v methanolu (2,5 ml/50 ml kyselina octová + 47,5 ml methanol)
- 5% kyselina octová v isopropanolu (2,5 ml/50 ml kyselina octová + 47,5 ml isopropanol)
- 0,75 M hydroxid amonný v 60% methanolu (5,81 ml/50 ml 25% hydroxid amonný + 30 ml methanol + 14,19 ml redestilovaná voda)
- 0,75 M hydroxid amonný v 60% isopropanolu (5,81 ml/50 ml 25% hydroxid amonný + 30 ml isopropanol + 14,19 ml redestilovaná voda)
- 5% kyselina octová (2,5 ml/50 ml kyselina octová + 47,5 ml redestilovaná voda)
- 10% kyselina octová (5 ml/50 ml kyselina octová + 45 ml redestilovaná voda)
- 20% kyselina octová (10 ml/50 ml kyselina octová + 40 ml redestilovaná voda)
- 25% kyselina octová (12,5 ml/50 ml kyselina octová + 37,5 ml redestilovaná voda)
- 50% kyselina octová (25 ml/50 ml kyselina octová + 25 ml redestilovaná voda)

kolony pro kapalinovou chromatografii a filtry:

- Acquity UPLC® BEH C18 (1,7 µm: 2,1 × 50 mm), Waters (Milford, MA, USA)
- WatersSymmetry C18 (5 µm: 2,1 x 150 mm), Waters (UK)
- Centrifugační filtry MicroSpin, Nylon, 0,2µm (dodavatel Chromservis)

3.2 Přístroje

- Míchačka mini rotátor Bio RS-24, Biosan (Riga, Lotyšsko)
- Ultrazvuková lázeň Transsonic T310, ELMA®SchmidbauerGmbH (Singen, Německo)
- Vakuová rotační odparka Trigon-plus® RCT1010, ThermoElectronCorporation – k 2006 ThermoFisherScientific (Waltham, MA, USA)
- MilliporeSimplicity™waterpurificationsystem, MiliporeCorp (Billerica, MA, USA)
- pH metr CyberScan 500, Oakton® (VernonHills, IL, USA)
- Mixer Vortex typ Wizard, VelpScientifica (Usmate, MB, Itálie)
- CentrifugaMiniSpin®Eppendorf (Hamburg, Německo)
- Koncentrátor magnetických částic MPC-S, Dynal (Oslo, Norsko)

- Acquity UPLC[®] I-class systém (Waters, Milford, MA, USA) v zapojení s Xevo[™] TQ-S MS (Waters MS Technologies, Manchester, UK) vybavený ionizací elektrosprejem ESI. Data zpracována MassLynx[™] software s TargetLynx[™] programem (verze 4.2, Waters, Milford, MA, USA)
- Acquity UPLC[®] H-class systém (Waters, Milford, MA, USA) v zapojení s QDa MS (Waters MS Technologies, Manchester, UK) vybavený ionizací elektrosprejem ESI. Data zpracována MassLynx[™] software s TargetLynx[™] programem (verze 4.2, Waters, Milford, MA, USA)
- Schémata byla vytvořena v programu AdobeIllustrator[®]

3.3 Materiál

Polymerní materiál byl syntetizován a dodán Mgr. Roháčovou Kateřinou z pracoviště CATRIN – Regionální centrum pokročilých technologií a materiálů, Olomouc. Částice jsou tvořeny magnetickým oxidem železnato-železitým, na jehož povrchu je navázán polymer. Pro syntézu polymeru byla použita MAA jako monomer. Dodané MMIP byly přechovávány v lednici ve 100% isopropanolu.

3.4 Přechištění materiálu

Dodané MMIP byly nejprve přechištěny kvůli přetrvávající kontaminaci BAP. Přechišťovány byly tři typy vzorků: a) první várka syntetizovaných MMIP (1. MMIP) b) druhá várka syntetizovaných MMIP (2. MMIP), která byla více přechištěna již při syntéze, a c) MMIP použity při předexperimentu (3. MMIP). Vzorky byly nejprve promývány různými testovanými roztoky. 1. MMIP byly promývány 1% kyselinou mravenčí v isopropanolu, 2. MMIP 1% hydroxidem amonným v isopropanolu a 3. MMIP 1% hydroxidem amonným v 60% isopropanolu. Čištění MMIP probíhalo ve čtyřech cyklech. Během cyklu byl do mikrozkušavky s MMIP nanesen 1 ml promývacího roztoku, vzorek byl promíchán a poté inkubován po dobu 30 minut na mini rotátoru. Roztok byl poté odpipetován. Tento postup byl v každém cyklu opakován sedmkrát. V každém cyklu byl po poslední inkubaci sesbírána vzorek do čisté zkumavky a odpařen do sucha ve vakuové rotační odparce. Odpařené vzorky byly rozpuštěny v 60 μ l 10% methanolu a na 3 minuty vloženy do ultrazvukové lázně. Následně byly vzorky filtrovány pomocí Microspin filtrů, centrifugovány (5 min., 8 000 rpm) a přeneseny do 2ml vialek se 100 μ l inzertem pro

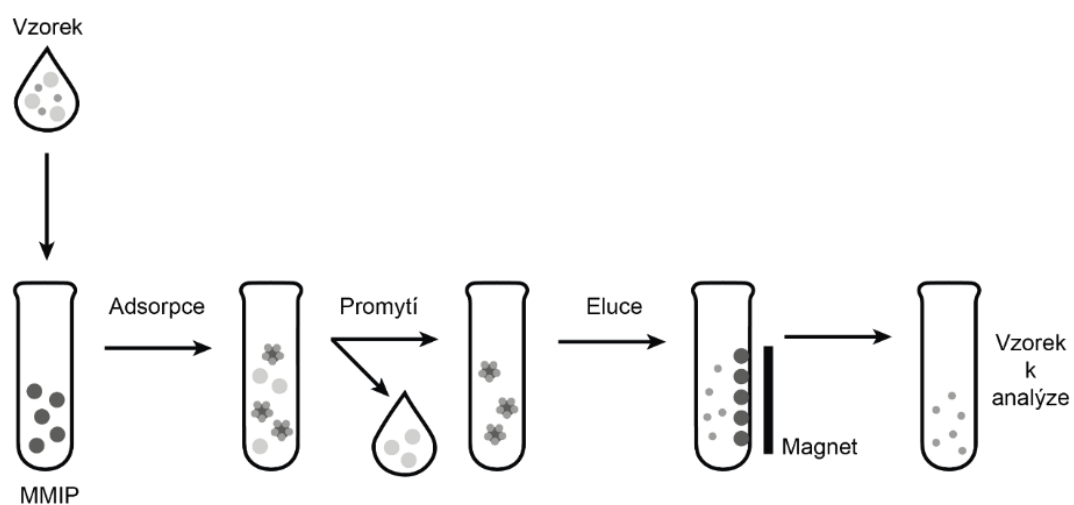
UHPLC-MS měření. V posledním cyklu byl na všechny vzorky MMIP nanesen stejný promývací roztok, tj. 1% hydroxid amonný v 60% isopropanolu, který byl zvolen na základě předchozích měření (viz výsledky obr. 5).

3.5 Optimalizace purifikačního protokolu

Pro optimalizaci purifikačního protokolu bylo zvoleno osm experimentů s různými roztoky v purifikačních krocích, jednotlivé experimenty jsou vypsány v tab. 1. Optimalizace byla prováděna na jednom technickém replikátu z každého typu MMIP. Roztoky původních tří typů MMIP v 1 ml 100% isopropanolu byly rozděleny na vzorek a blank tak, že zkumavka s roztokem byla zamíchána na vortexu a poté bylo odpipetováno 0,5 ml roztoku MMIP do nové zkumavky, než došlo k poklesu MMIP na dno. Takto byl připraven monoplikát a blank z každého typu MMIP. Při optimalizaci purifikačního protokolu byly MMIP s daným roztokem inkubovány po dobu 3 minut na stolním rotátoru. V případě nanesení vzorku byl inkubační čas prodloužen na 30 minut. Postup purifikačního protokolu byl zvolen následující: před nanesením vzorku byly MMIP technicky promyty redestilovanou vodou a modifikovaným Bieleškého pufrem. Následně byl na zregenerované MMIP nanesen vzorek obsahující 1 ml Bieleškého pufru s přidanými 10 µl cytokininového standardu (STD) BAP o koncentraci 100 pmol. Po 30minutové inkubaci poté následovalo promytí a eluce CK pomocí zvoleného elučního roztoku. Pro měření byly sbírány všechny tři frakce, nanesení, promytí a eluce. Vzorky byly sesbírány do čisté zkumavky a odpařeny do sucha ve vakuové rotační odparce. Odpařené vzorky byly rozpuštěny ve 100 µl 10% methanolu a vloženy na 3 minuty do ultrazvukové lázně. Následně byly přeneseny na Mikrospin filtry a centrifugovány (5 min., 8 000 rpm). Po centrifugaci byly vzorky přeneseny do 2 ml vialek se 100µl inzertem pro měření na UHPLC -MS/MS. Zjednodušené schéma purifikačního protokolu je zobrazeno na obr. 4.

Po eluci vzorku následovala regenerace MMIP, která se skládala z nanesení 1 ml redestilované vody a dvakrát se opakujícího nanesení 1 ml 1% hydroxidu amonného v 60% isopropanolu.

Pro optimalizaci purifikačních kroků byly provedeny další experimenty. Byla testována různá koncentrace hydroxidu amonného v 60% metanolu a v 60% isopropanolu jako elučního činidla, a také různé koncentrace kyseliny octové jako technického promytí. Jednotlivé podmínky navazujících experimentů jsou zobrazeny v tab. 2.



Obr. 4: Schéma purifikačního protokolu: Do mikroskopavky s regenerovanými MMIP byl nanesen vzorek s CK. Po 30minutové inkubaci bylo provedeno promytí a následná eluce CK. Pomocí silného magnetu byly MMIP přitaženy ke stěně mikroskopavky, což umožnilo snadné odebrání příslušného roztoku

Tab. 1: Soupis zvolených roztoků pro jednotlivé experimenty (1. – 8.) pro optimalizaci purifikačního protokolu (technické promytí - nanesení - promytí - eluce)

Experiment	Technické promytí	Nanesení vzorku	Promytí	Eluce
1.	H ₂ O + Modifikovaný Bieleski	10 µl STD + 1 ml modifikovaný Bieleski	H ₂ O	0,5 M NH ₄ OH + 60% MetOH
2.	H ₂ O + Modifikovaný Bieleski	10 µl STD + 1 ml modifikovaný Bieleski	H ₂ O	0,5 M NH ₄ OH + 60% isopropanolu
3.	H ₂ O + Modifikovaný Bieleski	10 µl STD + 1 ml modifikovaný Bieleski	H ₂ O	5% AcA v MetOH
4.	H ₂ O + Modifikovaný Bieleski	10 µl STD + 1 ml modifikovaný Bieleski	H ₂ O	5% AcA v isopropanolu
5.	H ₂ O + Modifikovaný Bieleski	10 µl STD + 1 ml modifikovaný Bieleski	10% MetOH	0,5 M NH ₄ OH + 60% MetOH
6.	H ₂ O + Modifikovaný Bieleski	10 µl STD + 1 ml modifikovaný Bieleski	10% MetOH	0,5 M NH ₄ OH + 60% isopropanolu
7.	5% AcA v H ₂ O + modifikovaný Bieleski	10 µl STD + 1 ml modifikovaný Bieleski	H ₂ O	0,5 M NH ₄ OH + 60% MetOH
8.	5% AcA v H ₂ O + modifikovaný Bieleski	10 µl STD + 1 ml modifikovaný Bieleski	H ₂ O	0,5 M NH ₄ OH + 60% isopropanolu

Tab. 2: Soupis zvolených roztoků pro navazující experimenty (9 – 17) pro optimalizaci purifikačních kroků – eluční činidlo, technické promytí

Experiment	Technické promytí	Nanesení vzorku	Promytí	Eluce
9.	5% AcA v H ₂ O + modifikovaný Bieleski	10 µl STD + 1 ml modifikovaný Bieleski	H ₂ O	0,5 M NH ₄ OH + 60% MetOH
10.	10% AcA v H ₂ O + modifikovaný Bieleski	10 µl STD + 1 ml modifikovaný Bieleski	H ₂ O	0,5 M NH ₄ OH + 60% MetOH
11.	20% AcA v H ₂ O + modifikovaný Bieleski	10 µl STD + 1 ml modifikovaný Bieleski	H ₂ O	0,5 M NH ₄ OH + 60% MetOH
12.	25% AcA v H ₂ O + modifikovaný Bieleski	10 µl STD + 1 ml modifikovaný Bieleski	H ₂ O	0,5 M NH ₄ OH + 60% MetOH
13.	50% AcA v H ₂ O + modifikovaný Bieleski	10 µl STD + 1 ml modifikovaný Bieleski	H ₂ O	0,5 M NH ₄ OH + 60% MetOH
14.	5% AcA v H ₂ O + modifikovaný Bieleski	10 µl STD + 1 ml modifikovaný Bieleski	H ₂ O	0,5 M NH ₄ OH + 60% MetOH
15.	5% AcA v H ₂ O + modifikovaný Bieleski	10 µl STD + 1 ml modifikovaný Bieleski	H ₂ O	0,5 M NH ₄ OH + 60% isopropanolu
16.	5% AcA v H ₂ O + modifikovaný Bieleski	10 µl STD + 1 ml modifikovaný Bieleski	H ₂ O	0,75 M NH ₄ OH + 60% MetOH
17.	5% AcA v H ₂ O + modifikovaný Bieleski	10 µl STD + 1 ml modifikovaný Bieleski	H ₂ O	0,75 M NH ₄ OH + 60% isopropanolu

3.6 Testování koncentračního rozsahu

Po optimalizaci purifikačního protokolu bylo provedeno testování koncentračního rozsahu. Testy byly provedeny na 1. MMIP a 2. MMIP. 3. MMIP byly vyloučeny z experimentů v důsledku nedostatečného množství MMIP materiálu. Z původního monoplíkátu a blanku byly pro další experimenty vytvořeny tři technické replikáty a blank pro každý typ MMIP. Jednotlivá technická opakování byla připravena odpipetováním 0,5 ml MMIP roztoku do nové mikrozkuhavky se stejným množstvím MMIP. Pro testování koncentračního rozsahu byly použity roztoky STD (BAP, *mT* a jejich interní standardy [²H₇]BAP, [¹⁵N₄]*mT*) o koncentracích 0,1 pmol, 1 pmol, 10 pmol a 100 pmol. Jako nejvhodnější postup purifikačního protokolu se dle získaných výsledků jevil experiment č. 1 (tab. 1). MMIP byly nejprve technicky promyty 1 ml redestilované vody a 1 ml modifikovaného Bieleeského pufru. Následně byl nanesen vzorek 10 µl STD o dané koncentraci rozpuštěných v 1 ml modifikovaného Bieleeského pufru, který se nechal inkubovat s MMIP po dobu 30 minut. Nakonec byly MMIP promyty redestilovanou vodou a eluovány roztokem 1% hydroxidu amonného v 60% methanolu. Vzorky byly odpařeny do sucha a připraveny pro měření na UHPLC-MS/MS.

Dalším experimentem provedeným na MMIP bylo testování koncentračního rozsahu pro 25 CK STD (benzylaminopurin BAP, benzylaminopurinribosid BAPR, benzylaminopurin-9-glukosid BAP9G, *meta*-topolin *mT*, *ortho*-topolin *oT*, *para*-topolin *pT*, *meta*-topolinribosid *mTR*, *ortho*-topolinribosid *oTR*, *para*-topolinribosid *pTR*, *meta*-topolin-9-glukosid *mT9G*, kinetin K, kinetinribosid KR, kinetin-9-glukosid K9G, *cis*-zeatin *cZ*, *trans*-zeatin *tZ*, *trans*-zeatinribosid *tZR*, *cis*-zeatinribosid *cZR*, *cis*-zeatin-9-glukosid *cZ9G*, *trans*-zeatin-9-glukosid *tZ9G*, dihydrozeatin DHZ, dihydrozeatin ribosid DHZR, dihydrozeatin-9-glukosid DHZ9G, isopentenyladenin iP, isopentenyladeninribosid iPR, isopentenyladenin-9-glukosid iP9G) o koncentracích 0,1 pmol, 0,5 pmol, 1 pmol, 5 pmol, 10 pmol a 50 pmol. Byly použity dva purifikační protokoly: a) protokol dle experimentu 1 v tab. 1; b) protokol dle experimentu 7 v tab. 1. Vyeluované vzorky byly odpařeny do sucha, rozpuštěny ve 40 µl 10% methanolu, vloženy na 3 minuty do ultrazvukové lázně, přefiltrovány přes Mikrospin filtry, centrifugovány (5 min., 8000 rpm) a následně převedeny do 2ml vialek s 100 µl inzertem. Měřeny byly pomocí UHPLC-MS/MS.

3.7 Stanovení hladin

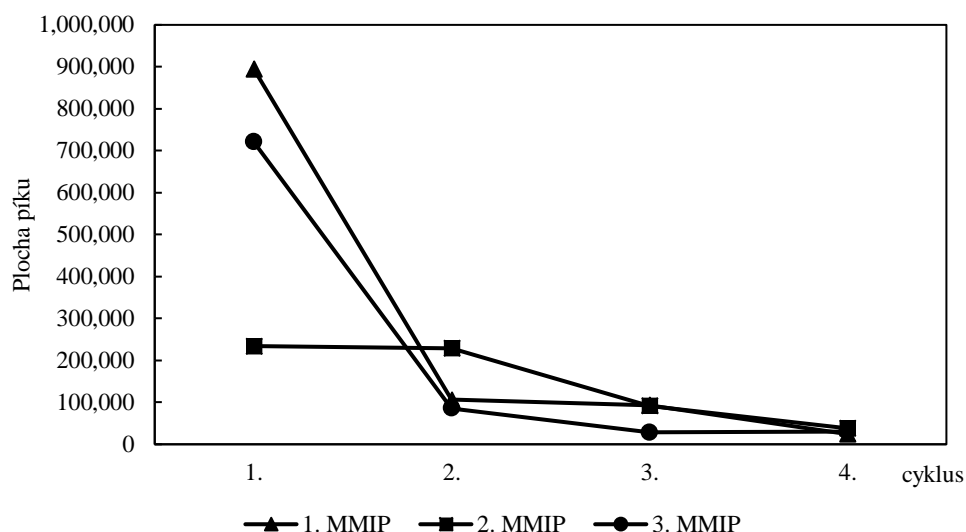
Pro stanovení čistoty polymerního materiálu byla použita ultra-vysoce účinná kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (UHPLC-MS). Hmotnostní spektrometr byl vybaven jednoduchým kvadrupólem s elektrosprejem. Vzorky o objemu 10 μ l byly nastříknuty a separovány na koloně s reverzní fází Symmetry C18 (5 μ m, 2,1 \times 150 mm, Waters). Eluce probíhala za použití lineárního gradientu s použitím 100% methanolu (A) a 15 mM mravenčanu amonného (pH 4; B) jako mobilní fáze při rychlosti průtoku 0,2 ml/min a teploty kolony 40 °C. Byla použita gradientová eluce 0 – 90% A, 25 – 10% A, 35 – 10% A, 45 – 90% A. Separované CK byly analyzovány pomocí MS, ionizovány elektrosprejem v režimu ESI+. Parametry pro analýzu byly nastaveny následovně: teplota zdroje 120 °C, napětí v kapiláře 15 V. Detekce probíhala ve FULLSCAN módu v rozsahu 50 – 1000 m/z. Výsledky byly vyhodnocovány pomocí softwaru MassLynx.

Pro stanovení hladin CK u optimalizace purifikačního protokolu a testování koncentračního rozsahu byla použita ultra-vysoce účinná kapalinová chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (UHPLC-MS/MS). Hmotnostní spektrometr byl vybaven trojitým kvadrupólem a elektrosprejem. Separace probíhala dle podmínek Plačková et al. (2015). Vzorky o objemu 10 μ l byly nastříknuty a separovány na koloně s reverzní fází Acquity UPLC[®] BEH C18 (1,7 μ m, 2,1 \times 50 mm, Waters). Eluce probíhala za použití lineárního gradientu s použitím 100% methanolu (A) a 15 mM mravenčanu amonného (pH 4; B) jako mobilní fáze při rychlosti průtoku 0,5 ml/min a teploty kolony 40 °C. Byl použit následující lineární gradient: 10:90 (A:B) - 0 – 0,50 min, 10:90 (A:B) - 0,50 min, 43:57 (A:B) – 3,80 min, 100:0 (A:B) – 3,90 min, 10:90 (A:B) – 4,10 min, 10:90 (A:B) – 5 min. Retenční časy separovaných CK a jejich metabolitů byly sledovány ve čtyřech retenčních oknech v rozmezí: 1,4-2,60 min, 2,37-3,12 min, 2,95-3,76 min, 3,70-4,30 min. CK byly ionizovány elektrosprejem v režimu ESI+ a analyzovány trojitým kvadrupólem. Stanovení CK bylo provedeno pomocí sledování více iontových reakcí (MRM – multiplereaction monitoring). Parametry pro analýzu byly nastaveny následovně: teplota zdroje 150 °C; teplota desolvatačního plynu 600 °C; průtok desolvatačního plynu 600 l/h; napětí v kapiláře 0,75 kV (Novák et al., 2008). Výsledky byly vyhodnocovány pomocí softwaru MassLynx.

4 Výsledky a diskuse

4.1 Přečištění materiálu

Vzhledem ke kontaminaci BAP u polymerního materiálu, která byla zjištěna při měření předexperimetu, bylo nejprve provedeno jeho přečištění. Pro přečištění byly zvoleny tři roztoky, 1% kyselina mravenčí v isopropanolu, 1% hydroxid amonný v isopropanolu a 1% hydroxid amonný v 60% isopropanolu. Na obr. 5 je zobrazeno postupné snižování kontaminace BAP v průběhu několika cyklů, kdy nejvýraznější snížení pozorujeme u vzorku 3. MMIP, které byly přečišťovány roztokem 1% hydroxidu amonného v 60% methanolu. Na základě výsledků byl nakonec tento roztok zvolen jako nejvhodnější a v posledním přečišťovacím cyklu byl použit na všechny vzorky MMIP. 1% hydroxid amonný v 60% isopropanolu byl dále také použit pro regeneraci MMIP v purifikačním protokolu.



Obr 5: Snižování kontaminace BAP po přečištění zvolenými roztoky. 1. MMIP – čištěny 1% kyselinou mravenčí v isopropanolu, 2. MMIP – čištěny 1% hydroxidem amonným v isopropanolu, 3. MMIP – čištěny 1% hydroxidem amonným v 60% isopropanolu. 4. cyklus – všechny vzorky přečištěny 1% hydroxidem amonným v 60% isopropanolu. Jeden cyklus – 7x inkubace 30 min v daném roztoku

4.2 Purifikační protokol

Po přečištění materiálu byl optimalizován purifikační protokol. Experimenty se zvolenými roztoky pro technické promytí, nanesení, promytí a eluci vzorku jsou vypsány výše v tabulce 1 a 2. Stanovené účinnosti těchto experimentů pro purifikaci CK jsou uvedeny v tabulce 3 a 4.

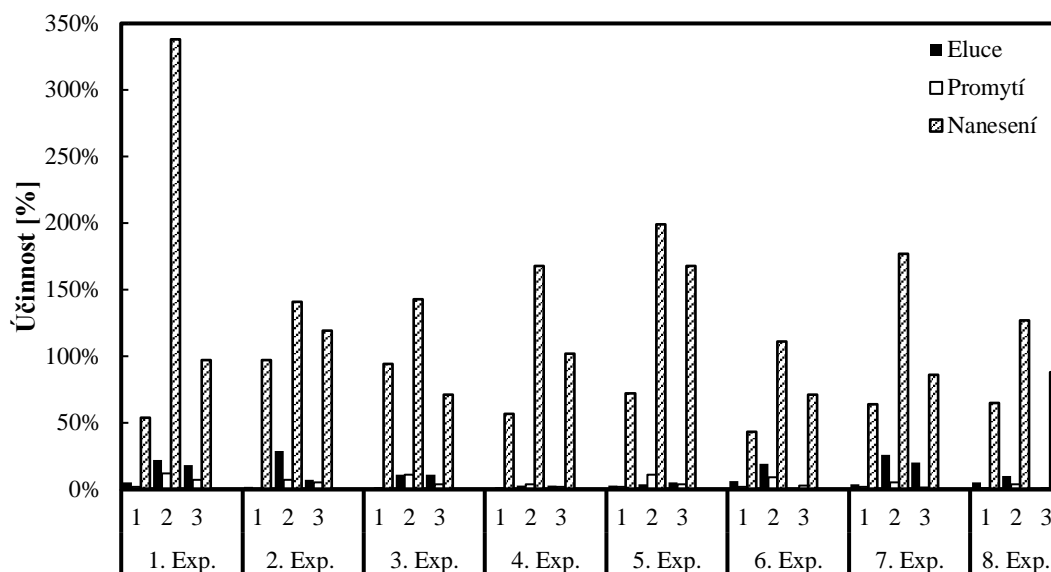
Tab 3: Stanovená účinnost [%] tří frakcí (nanesení, promytí, eluce) MMIP u experimentů 1 – 8 (viz tab. 1) pro optimalizaci purifikačního protokolu při nanesení 100 pmol STD BAP; n = 1; n.d. = nedetekováno

TYP CK	FRAKCE	EXPERIMENT								
		1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	
	MMIP	ÚČINNOST [%]								
	NANESENÍ	1.	54	97	94	57	72	43	64	65
		2.	338	141	143	168	199	111	177	127
		3.	97	119	71	102	168	71	86	88
BAP	PROMYTÍ	1.	2	n.d.	1	1	2	2	2	1
		2.	12	7	11	4	11	9	5	4
		3.	7	5	4	2	4	3	2	1
	ELUCE	1.	5	2	n.d.	1	3	6	4	5
		2.	22	29	11	3	4	19	26	10
		3.	18	7	11	3	5	n.d.	20	n.d.

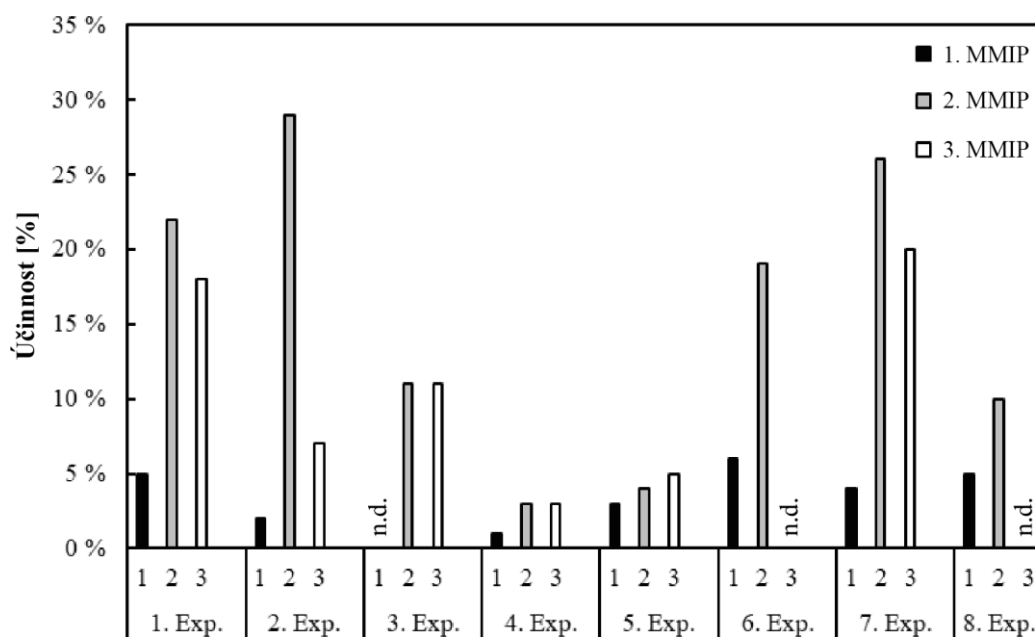
Tab 4: Stanovená účinnost [%] tří frakcí (nanesení, promytí, eluce) MMIP u navazujících experimentů 9 – 17 (viz tab. 2) pro optimalizaci purifikačních kroků (eluční činidlo, technické promytí) při nanesení 100 pmol STD BAP; n = 1; n.d. = nedetekováno

TYP CK	FRAKCE	EXPERIMENT														
		9.	10.	11.	12.	13.	14.	15.	16.	17.						
	MMIP	ÚČINNOST [%]														
	NANESENÍ	1.	13	92	62	66	54	43	64	65	77					
		2.	95	72	89	110	n.d.	102	132	100	115					
		3.	82	79	74	80	n.d.	75	77	94	77					
BAP	PROMYTÍ	1.	1	1	n.d.	1	1	1	1	2	1					
		2.	4	3	5	2	12	4	4	4	3					
		3.	3	2	3	2	2	2	2	2	2					
	ELUCE	1.	4	4	1	4	5	3	2	3	2					
		2.	13	3	10	10	7	16	8	11	6					
		3.	10	19	5	7	6	6	6	7	4					

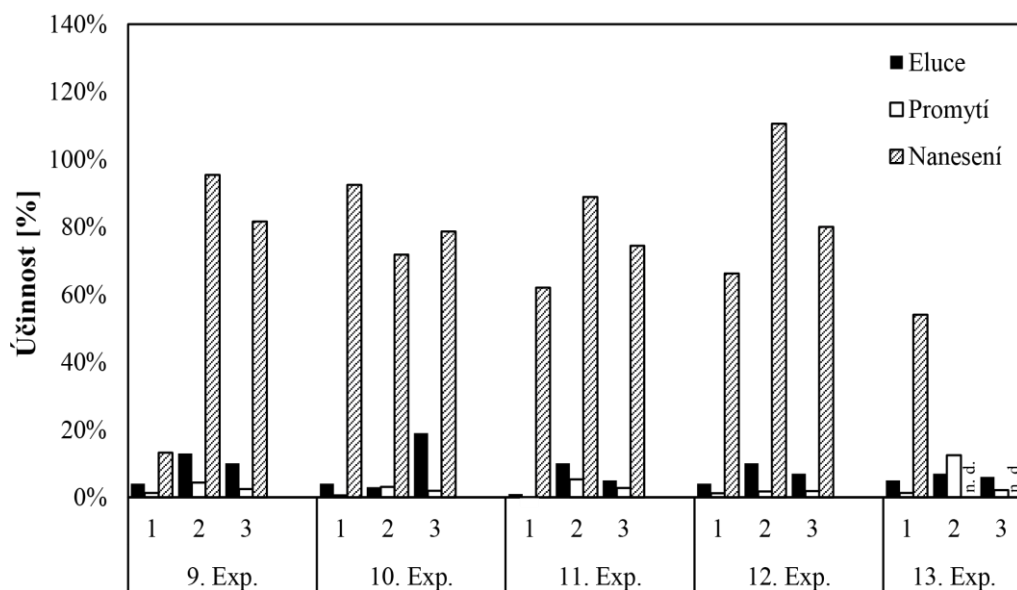
Na obr. 6 jsou zobrazeny účinnosti MMIP v 8 různých experimentech pro tři frakce, nanesení, promytí a eluci. Účinnosti jsou ve všech případech nejvyšší pro frakci nanesení, tedy MMIP po inkubaci dostatečně nezachytávají BAP a ten prochází již v prvním kroku purifikačního protokolu. Účinnosti přes 100 % jsou pravděpodobně způsobeny stále přítomnou kontaminací ze syntézy. Podobné hodnoty je možné vidět i u navazujících experimentů na obr. 8 a 10. Obr. 7 znázorňuje pouze eluční frakci pro experimenty 1.-8. Nejvyšší účinnosti, 29 %, dosahoval vzorek 2. MMIP v případě 2. experimentu, kdy byl jako eluční roztok použit 0,5 M hydroxid amonný v 60% isopropanolu. Oproti tomu v 1. a 3. MMIP byla jejich účinnost velmi nízká, pouze 2 a 7 %. Nejlepší účinnost pro všechny tři vzorky vykazuje 1. experiment, kdy byl jako eluční roztok použit 0,5 M hydroxid amonný v 60% methanolu. Zde je účinnost 5 % pro 1. MMIP, 22% pro 2. MMIP a 18 % pro 3. MMIP. Jako další vhodný postup se jeví experiment 7, u kterého se používá stejný eluční roztok, ale MMIP jsou nejprve technicky promyty a okyseleny 5% kyselinou octovou. Zde je účinnost 4, 26 a 20 % (1. MMIP, 2. MMIP, 3. MMIP). V návaznosti na toto zjištění byly ještě provedeny experimenty s různou koncentrací kyseliny octové, účinnost pro všechny tři frakce je zobrazena na obr. 8, účinnost eluce je ještě zobrazena na obr. 9. V rámci optimalizace byly provedeny také experimenty pro různé koncentrace hydroxidu amonného jako elučního činidla (obr. 10 a 11).



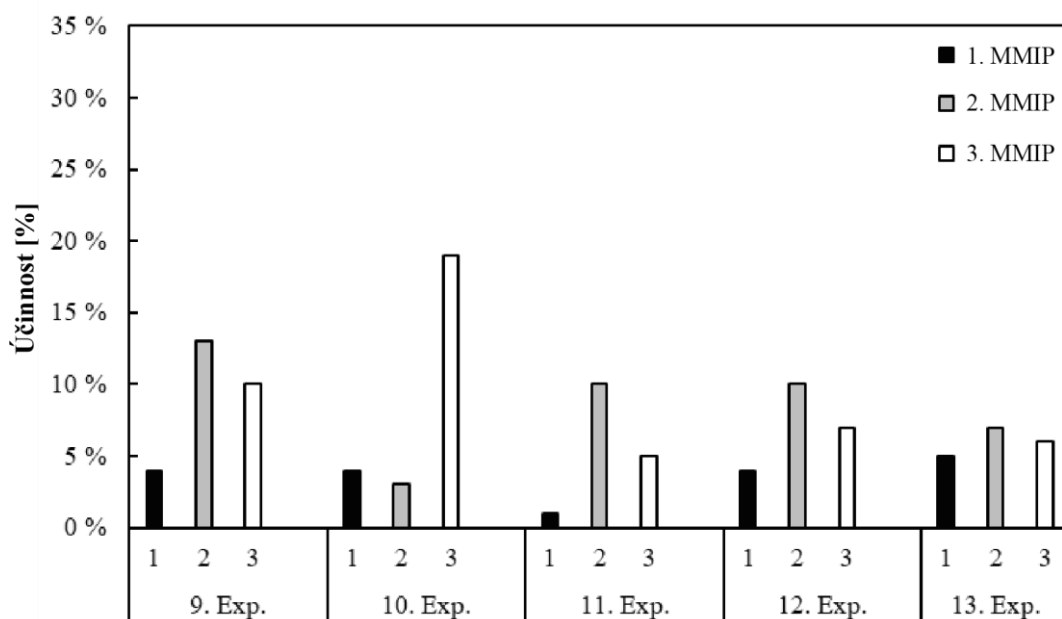
Obr. 6: Optimalizace purifikačního protokolu: Účinnost [%] MMIP u 3 frakcí (nanesení, promytí, eluce) po nanesení STD BAP o koncentraci 100 pmol v případě experimentů 1. – 8. při použití různých purifikačních protokolů lišících se použitými roztoky, experimenty vypsány v tab. 1; 1 = 1. MMIP, 2 = 2. MMIP, 3 = 3. MMMIP; 1. Exp. = 1. experiment, obdobně 2. Exp. – 8. Exp.; n = 1



Obr. 7: Optimalizace purifikačního protokolu: Účinnost [%] MMIP eluční frakce po nanesení STD BAP o koncentraci 100 pmol v případě experimentů 1. – 8. při použití různých purifikačních protokolů lišících se použitými roztoky, experimenty vypsány v tab. 1; 1. Exp. = 1. experiment, obdobně 2. Exp. – 8. Exp.; n = 1

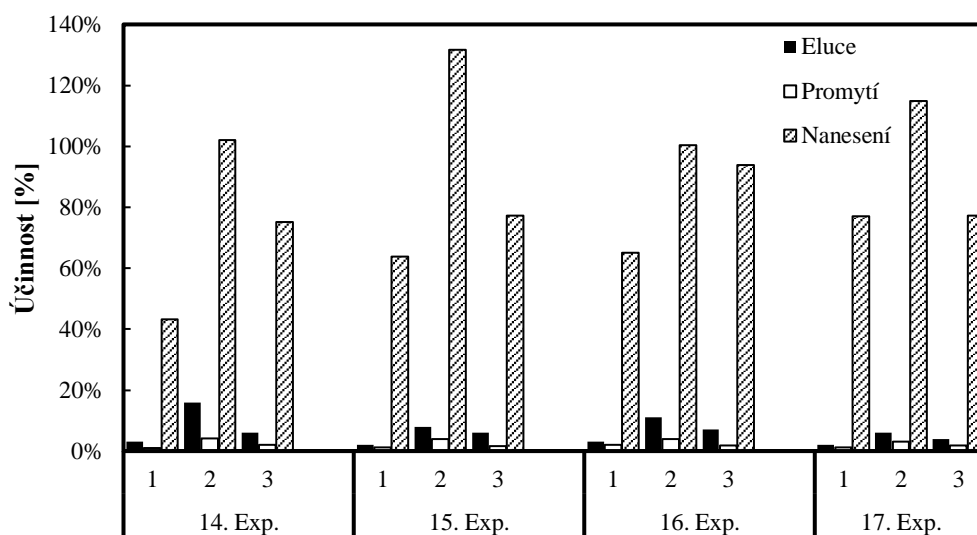


Obr. 8: Optimalizace technického promytí: Účinnost [%] MMIP u 3 frakcí (nanesení, promytí, eluce) při technickém promytí kyselinou octovou se zvyšující se koncentrací (5, 10, 20, 25 a 50 %), experimenty (9 – 13) vypsány v tab. 2; 1 = 1. MMIP, 2 = 2. MMIP, 3 = 3. MMIP; 9. Exp. = 9. experiment, obdobně 10. Exp. – 13. Exp.; n = 1

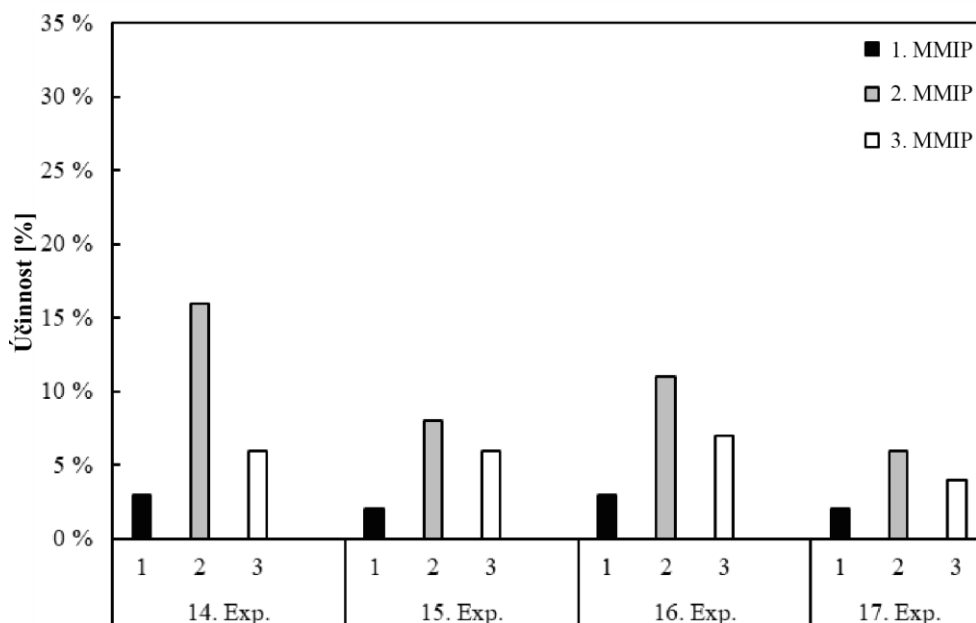


Obr. 9: Optimalizace technického promytí: Účinnost [%] MMIP eluční frakce při technickém promytí kyselinou octovou se zvyšující se koncentrací (5, 10, 20, 25 a 50 %), experimenty (9 – 13) vypsány v tab. 2; 9. Exp. = 9. experiment, obdobně 10. Exp. – 13. Exp.; n = 1

Na obr. 8 jsou zobrazeny účinnosti MMIP pro všechny tři frakce (nanesení, promytí, eluce) a na obr. 9 pouze eluční frakce účinnosti MMIP v případě použití technického promytí kyselinou octovou s její zvyšující se koncentrací (5, 10, 20, 25, 50 %). Je zde možné vidět, že se zvyšující se koncentrací kyseliny dochází k mírnému poklesu účinnosti eluční frakce MMIP, a tedy zvýšení koncentrace kyseliny octové má negativní vliv na účinnost MMIP.



Obr. 10: Optimalizace elučního roztoku: Účinnost [%] MMIP u 3 frakcí (nanesení, promytí, eluce) při technickém promytí 5% kyselinou octovou, eluční roztok použit 0,5 M (exp. 14)/0,75 M (exp. 16) hydroxid amonný v 60% methanolu a 0,5 M (exp. 15)/0,75 M (exp. 17) hydroxid amonný v 60% isopropanolu. Experimenty jsou vypsány v tab. 2; 1 = 1. MMIP, 2 = 2. MMIP, 3 = 3. MMIP; 14. Exp. = 14. experiment, obdobně 15. Exp. – 17. Exp.; použito jedno opakování n = 1



Obr. 11: Optimalizace elučního roztoku: Účinnost [%] MMIP při technickém promytí 5% kyselinou octovou, eluční roztok použit 0,5 M (exp. 14)/0,75 M (exp. 16) hydroxid amonný v 60% methanolu a 0,5 M (exp. 15)/0,75 M (exp. 17) hydroxid amonný v 60% isopropanolu. Experimenty jsou vypsány v tab. 2, 1 = 1. MMIP, 2 = 2. MMIP, 3 = 3. MMIP; 9. Exp. = 9. experiment, obdobně 10. Exp. – 13. Exp.; použito jedno opakování n = 1

Obr. 10 a 11 zobrazuje účinnosti MMIP při použití různých koncentrací hydroxidu amonného v 60% methanolu a v 60% isopropanolu jako elučního činidla. V případě zvýšení koncentrace hydroxidu amonného v 60% methanolu došlo ke snížení účinnosti 2. MMIP ze 16 % na 11%, u 3. MMIP došlo k mírnému zvýšení ze 6 % na 7 %, účinnost 1. MMIP zůstala nezměněna na 3 %. V případě zvýšení koncentrace hydroxidu amonného v 60% isopropanolu došlo u 2. a 3. MMIP k mírnému snížení, 1. MMIP zůstaly beze změny. Vyšší koncentrace hydroxidu amonného tedy nemá zásadní vliv na zvýšení účinnosti MMIP. Z výsledků je patrné, že vyšších účinností purifikačního protokolu dosahoval eluční roztok obsahující 60% methanol, než roztok obsahující 60% isopropanol.

Dle výše uvedených výsledků byly jako nejvhodnější purifikační protokoly pro další testování zvoleny tyto:

- 1. experiment - technické promytí redestilovanou vodou a modifikovaným Bieleškého puřrem - nanesení vzorku – promytí redestilovanou vodou – eluce 0,5M hydroxidem amonným v 60% methanolu,
- 7. experiment - technické promytí 5% kyselinou octovou a modifikovaným Bieleškého puřrem – nanesení vzorku – promytí redestilovanou vodou – eluce 0,5M hydroxidem amonným v 60% methanolu.

4.3 Koncentrační rozsah

K ověření koncentračního rozsahu metody byl zvolen rozsah od 0,1 pmol do 100 pmol cytokininových STD. Rozsah byl testován na vzorcích 1. MMIP a 2. MMIP, ze kterých byly připraveny technické tetraplikáty, triplikát s STD a monoplíkát jako blank. Vzorek 3. MMIP byl z testování vyřazen z důvodu nedostatku materiálu. Testovací roztok STD obsahoval BAP, *mT* a jejich značené standardy ($[^2\text{H}_7]\text{BAP}$, $[^{15}\text{N}_4]\text{mT}$). Pro grafické znázornění účinnosti MMIP u koncentračního rozsahu (obr. 12) byly již použity jen hodnoty elučních frakcí, uvedeny v tab. 5. Frakce nanesení vzorku a promytí byly také změřeny, obdobně jak bylo popsáno výše dosahovala nejvyšších hodnot frakce nanesení vzorku.

Tab. 5: Stanovené účinnosti [%] MMIP u koncentračního rozsahu 0,1 – 100 pmol STD (BAP, *mT*, $[^2\text{H}_7]\text{BAP}$, $[^{15}\text{N}_4]\text{mT}$), eluční činidlo 0,5M hydroxid amonný v 60% methanolu; hodnoty jsou ve tvaru průměr ± směrodatná odchylka, n = 3; n.d. = nedetekováno; 1.= 1. MMIP, 2. = 2. MMIP

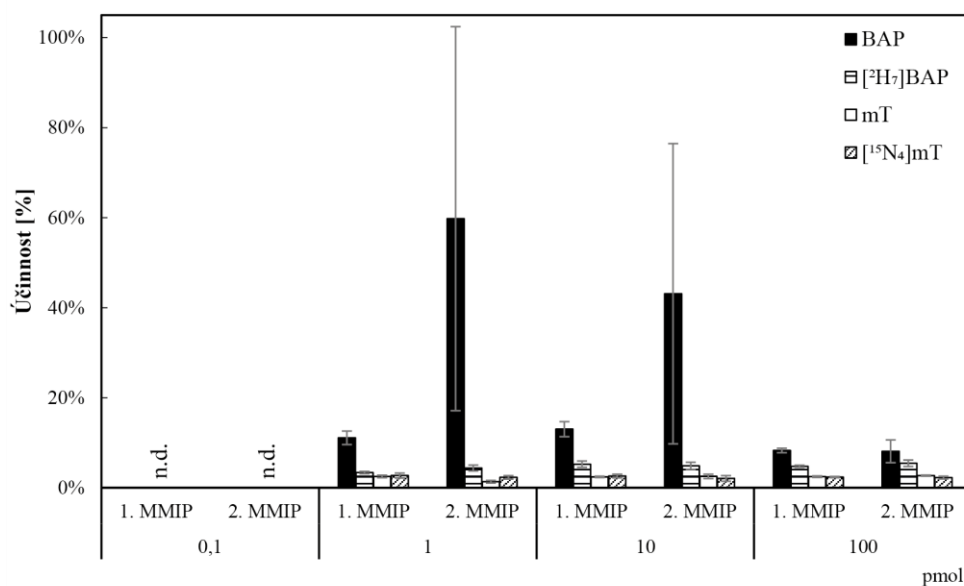
		KONCENTRACE [pmol]			
		0,1	1	10	100
TYP CYTOKININU	VZOREK MMIP	ÚČINNOST [%]			
BAP	1.	n.d.	11,1 ± 1,5	13,0 ± 1,7	8,3 ± 0,5
	2.	n.d.	59,8 ± 42,7	43,1 ± 33,3	8,1 ± 2,5
$[^2\text{H}_7]\text{BAP}$	1.	n.d.	3,4 ± 0,3	5,2 ± 0,7	4,7 ± 0,3
	2.	n.d.	4,4 ± 0,7	4,9 ± 0,8	5,4 ± 0,7
<i>mT</i>	1.	n.d.	2,5 ± 0,3	2,4 ± 0,1	2,5 ± 0,2
	2.	n.d.	1,3 ± 0,3	2,5 ± 0,5	2,7 ± 0,1
$[^{15}\text{N}_4]\text{mT}$	1.	n.d.	2,7 ± 0,5	2,6 ± 0,4	2,4 ± 0,1
	2.	n.d.	2,3 ± 0,4	2,1 ± 0,6	2,3 ± 0,3

Účinnost MMIP pro vychytávání BAP, *mT* a jejich interních standardů v koncentračním rozsahu 0,1 – 100 pmol je zobrazena na obr. 12. Při použití roztoku STD o nízké koncentraci, tj 0,1 pmol nebyl detekován žádný typ CK. V případě BAP dosahovaly nejvyšší účinnosti (59,8 %) 2. MMIP u koncentrace 1 pmol. Zde je ovšem vidět velký rozptyl získaných účinností v daném triplikátu. Tato variabilita výsledků může být vysvětlena několika hypotézami. První hypotézou je stálá přítomnost kontaminace BAP u těchto MMIP, kdy přítomnost BAP byla stále detekována i ve vzorku bez STD, čili v blanku. Druhou hypotézou je rozdílné množství MMIP v daných replikátech, způsobené jejich rozdělováním pomocí pipety. MMIP tak nebyly přesně rozváženy, byly rozděleny v roztoku a jejich přibližné množství v replikátech bylo určeno jejich porovnáním.

V případě 1. MMIP bylo nejvyšší účinnosti dosaženo při koncentraci 10 pmol, a to 13 %, jen mírně nižší účinnosti 11 % bylo dosaženo u koncentrace 1 pmol. U obou typů MMIP byl při vysokých koncentracích vidět výrazný pokles účinnosti.

Na obr. 12 je dále zobrazena účinnost MMIP proti izotopicky značenému standardu BAP, [²H₇]BAP. Interní standardy se přidávají v průběhu purifikace ke vzorku a umožňují sledovat případné ztráty v průběhu purifikačního protokolu. Zároveň umožňují kvantitativní stanovení endogenních hladin CK (Ljung et al., 2010). Účinnost obou typů MMIP je v tomto případě podobná, u všech koncentrací se pohybuje v konstantní hladině kolem 5 % účinnosti. CK byl opět detekován až od 1 pmol.

Vzhledem k nízkým účinnostem MMIP proti BAP byla testována také jejich účinnost na vychytávání *mT* a jeho interního standardu, izotopicky značeného [¹⁵N₄]*mT*. *Meta*-topolin má oproti BAP výhodu hydroxylové skupiny, díky které by se mohl lépe zachytávat. Účinnost MMIP je v obou případech velmi nízká, pohybuje se konstantně kolem 3 % v průběhu celého koncentračního rozsahu.



Obr. 12: Koncentrační rozsah: Účinnost [%] 1. a 2. MMIP pro BAP, *mT*, [²H₇]BAP, [¹⁵N₄]mT o koncentracích 0,1 – 100 pmol, chybové úsečky zobrazují směrodatnou odchylku, n = 3

Posledním experimentem bylo testování koncentračního rozsahu směsi 25 CK standardů, obsahující jak aromatické, tak isoprenoidní báze, ribosidy a *N*⁹-glukosidy. Koncentrační rozsah byl testován na dvou zvolených purifikačních protokolech popsanych výše v kapitole 4.2. Použité protokoly se liší okyselením MMIP technickým promytím 5% kyselinou octovou před nanesením vzorku, elučním činidlem byl 0,5M hydroxid amonný v 60% methanolu. Stanovené hladiny účinností vůči jednotlivým CK metabolitům jsou vypsány v tabulce 6, 7, 8 a 9.

Tab. 6: Stanovené účinnosti [%] MMIP u koncentračního rozsahu 0,1 – 50 pmol STD aromatických CK při použití purifikačního protokolu bez technického promytí 5% kyselinou octovou, eluční roztok 0,5M hydroxid amonný v 60% methanolu, hodnoty jsou ve tvaru průměr ± směrodatná odchylka, n = 3, n.d. = nedetekováno

		KONCENTRACE					
		[pmol]					
		0,1	0,5	1	5	10	50
TYP CYTOKININU	VZOREK MMIP	ÚČINNOST [%]					
BAP	1.	n.d.	n.d.	11,9 ± 1,4	3,6 ± 0,9	2,0 ± 0,6	7,7 ± 1,8
	2.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2,9 ± 2,7	13,1 ± 4,0
BAPR	1.	n.d.	0,8 ± 0,0	1,1 ± 0,1	4,1 ± 0,4	1,3 ± 0,2	5,5 ± 0,7
	2.	n.d.	0,6 ± 0,1	1,1 ± 0,2	5,0 ± 0,9	1,3 ± 0,2	5,3 ± 1,2
BAP9G	1.	n.d.	0,5 ± 0,0	0,6 ± 0,2	1,4 ± 0,3	0,6 ± 0,1	1,7 ± 0,3
	2.	n.d.	0,6 ± 0,1	0,6 ± 0,2	1,7 ± 0,6	0,6 ± 0,1	1,8 ± 0,5
<i>m</i> T	1.	n.d.	1,4 ± 0,1	0,9 ± 0,2	1,5 ± 0,4	0,6 ± 0,1	2,0 ± 0,4
	2.	n.d.	2,0 ± 0,1	1,9 ± 1,4	2,1 ± 0,0	0,4 ± 0,0	1,6 ± 0,4
<i>m</i> TR	1.	n.d.	0,4 ± 0,0	0,6 ± 0,1	0,9 ± 0,2	0,5 ± 0,1	1,2 ± 0,2
	2.	n.d.	0,9 ± 0,2	0,6 ± 0,2	1,2 ± 0,4	0,6 ± 0,1	1,3 ± 0,3
<i>m</i> T9G	1.	n.d.	0,2 ± 0,1	0,5 ± 0,2	0,5 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,7 ± 0,2
	2.	n.d.	0,4 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,8 ± 0,3	0,5 ± 0,1	0,8 ± 0,3
<i>o</i> T	1.	n.d.	1,0 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,9 ± 0,2	0,6 ± 0,1	1,2 ± 0,2
	2.	n.d.	n.d.	n.d.	0,7 ± 0,3	0,6 ± 0,2	1,2 ± 0,2
<i>o</i> TR	1.	n.d.	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,0	0,8 ± 0,1	0,6 ± 0,1	1,1 ± 0,2
	2.	n.d.	0,5 ± 0,1	0,5 ± 0,0	0,9 ± 0,2	0,5 ± 0,1	1,0 ± 0,2
<i>p</i> T	1.	n.d.	0,7 ± 0,1	0,6 ± 0,1	1,3 ± 0,2	0,6 ± 0,1	2,0 ± 0,2
	2.	n.d.	1,8 ± 0,7	0,2 ± 0,1	1,6 ± 0,5	0,5 ± 0,0	1,9 ± 0,3
<i>p</i> TR	1.	n.d.	0,4 ± 0,0	0,6 ± 0,1	1,0 ± 0,2	0,5 ± 0,1	1,2 ± 0,2
	2.	n.d.	0,4 ± 0,1	0,6 ± 0,1	1,1 ± 0,3	0,6 ± 0,1	1,3 ± 0,4
K	1.	n.d.	2,0 ± 0,1	1,1 ± 0,2	2,2 ± 0,5	0,6 ± 0,2	3,4 ± 0,7
	2.	n.d.	2,0 ± 0,7	1,1 ± 0,1	6,5 ± 1,6	0,3 ± 0,1	4,3 ± 1,3
KR	1.	n.d.	0,6 ± 0,0	0,8 ± 0,2	2,4 ± 0,4	0,7 ± 0,2	2,9 ± 0,5
	2.	n.d.	0,7 ± 0,1	0,8 ± 0,2	2,9 ± 0,8	0,8 ± 0,1	3,1 ± 0,8
K9G	1.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,6 ± 0,2
	2.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,6 ± 0,0

Tab. 7: Stanovené účinnosti [%] MMIP u koncentračního rozsahu 0,1 – 50 pmol STD isoprenoidních CK při použití purifikačního protokolu bez technického promytí 5% kyselinou octovou, eluční roztok 0,5M hydroxid amonný v 60% methanolu, hodnoty jsou ve tvaru průměr ± směrodatná odchylka, n = 3, n.d. = nedetekováno

TYP CYTOKININU	VZOREK MMIP	KONCENTRACE [pmol]					
		0,1	0,5	1	5	10	50
		ÚČINNOST [%]					
<i>tZ</i>	1.	n.d.	0,8 ± 0,2	0,8 ± 0,2	1,6 ± 0,2	0,6 ± 0,0	1,8 ± 0,4
	2.	n.d.	0,7 ± 0,1	0,6 ± 0,2	1,7 ± 0,8	0,5 ± 0,1	1,5 ± 0,5
<i>tZR</i>	1.	n.d.	0,4 ± 0,1	0,3 ± 0,0	0,5 ± 0,1	0,3 ± 0,0	1,0 ± 0,4
	2.	n.d.	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,1	1,3 ± 0,6	0,4 ± 0,1	1,3 ± 0,5
<i>tZ9G</i>	1.	n.d.	0,6 ± 0,1	0,3 ± 0,0	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,0	0,4 ± 0,1
	2.	n.d.	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,8 ± 0,3	0,4 ± 0,1	0,9 ± 0,0
<i>cZ</i>	1.	n.d.	0,8 ± 0,0	1,1 ± 0,3	2,4 ± 0,5	0,8 ± 0,1	2,9 ± 0,8
	2.	n.d.	0,8 ± 0,2	1,0 ± 0,3	3,2 ± 1,3	0,7 ± 0,1	3,0 ± 0,7
<i>cZR</i>	1.	n.d.	0,3 ± 0,1	0,8 ± 0,3	2,8 ± 1,0	0,6 ± 0,1	2,8 ± 1,0
	2.	n.d.	0,5 ± 0,1	0,7 ± 0,2	3,5 ± 1,4	3,3 ± 1,0	3,3 ± 1,0
<i>cZ9G</i>	1.	n.d.	0,2 ± 0,1	0,6 ± 0,3	1,4 ± 0,7	0,4 ± 0,1	1,9 ± 0,9
	2.	n.d.	0,4 ± 0,1	0,6 ± 0,2	2,7 ± 1,3	0,6 ± 0,2	2,5 ± 0,9
DHZ	1.	n.d.	0,6 ± 0,1	0,7 ± 0,3	1,4 ± 0,3	0,5 ± 0,1	1,7 ± 0,7
	2.	n.d.	0,5 ± 0,1	0,6 ± 0,2	2,2 ± 1,0	0,5 ± 0,1	1,8 ± 0,6
DHZR	1.	n.d.	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,0	1,3 ± 0,7	0,5 ± 0,1	1,8 ± 0,8
	2.	n.d.	0,5 ± 0,1	0,6 ± 0,2	2,5 ± 1,1	0,6 ± 0,1	2,2 ± 0,7
DHZ9G	1.	n.d.	0,3 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,4 ± 0,1	1,1 ± 0,1
	2.	n.d.	0,4 ± 0,1	0,6 ± 0,2	1,6 ± 0,4	0,5 ± 0,1	2,0 ± 0,7
iP	1.	n.d.	1,1 ± 0,1	1,1 ± 0,1	3,3 ± 0,6	0,9 ± 0,1	3,9 ± 0,1
	2.	n.d.	1,0 ± 0,1	1,2 ± 0,2	4,2 ± 1,3	1,0 ± 0,1	4,1 ± 0,8
iPR	1.	n.d.	0,2 ± 0,0	0,3 ± 0,1	0,9 ± 0,1	0,3 ± 0,0	1,5 ± 0,2
	2.	n.d.	0,2 ± 0,0	0,3 ± 0,1	1,3 ± 0,3	0,4 ± 0,1	1,6 ± 0,5
iP9G	1.	n.d.	n.d.	0,4 ± 0,0	1,7 ± 0,6	0,5 ± 0,1	2,0 ± 0,7
	2.	n.d.	0,5 ± 0,1	0,6 ± 0,2	2,5 ± 1,0	0,6 ± 0,1	2,3 ± 0,7

Tab. 8: Stanovené účinnosti [%] MMIP u koncentračního rozsahu 0,1 – 50 pmol STD aromatických CK při použití purifikačního protokolu s technickým promytím 5% kyselinou octovou, eluční roztok 0,5M hydroxid amonný v 60% methanolu, hodnoty jsou ve tvaru průměr ± směrodatná odchylka, n = 3, n.d. = nedetekováno

		KONCENTRACE					
		[pmol]					
		0,1	0,5	1	5	10	50
TYP CYTOKININU	VZOREK MMIP	ÚČINNOST [%]					
BAP	1.	n.d.	n.d.	14,3 ± 0,6	8,3 ± 0,8	0,8 ± 0,2	8,8 ± 2,7
	2.	n.d.	n.d.	n.d.	15,4 ± 0,0	13,4 ± 3,0	17,9 ± 1,9
BAPR	1.	n.d.	1,9 ± 0,9	1,9 ± 0,1	4,6 ± 0,7	1,3 ± 0,1	4,5 ± 0,3
	2.	n.d.	1,8 ± 0,2	2,5 ± 0,6	4,6 ± 0,7	1,1 ± 0,1	4,8 ± 1,1
BAP9G	1.	n.d.	0,7 ± 0,1	0,8 ± 0,1	1,3 ± 0,3	0,6 ± 0,1	1,4 ± 0,1
	2.	n.d.	1,3 ± 0,1	1,5 ± 0,5	1,5 ± 0,3	0,5 ± 0,1	1,6 ± 0,5
<i>m</i> T	1.	n.d.	1,7 ± 0,5	1,0 ± 0,2	1,7 ± 0,4	0,5 ± 0,0	1,6 ± 0,1
	2.	n.d.	0,4 ± 0,3	0,5 ± 0,0	1,4 ± 0,3	0,5 ± 0,1	1,7 ± 0,4
<i>m</i> TR	1.	n.d.	1,2 ± 0,7	0,9 ± 0,1	1,0 ± 0,1	0,6 ± 0,1	1,1 ± 0,1
	2.	n.d.	1,0 ± 0,1	1,2 ± 0,4	1,1 ± 0,2	0,5 ± 0,0	1,2 ± 0,3
<i>m</i> T9G	1.	n.d.	0,5 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,6 ± 0,1
	2.	n.d.	1,0 ± 0,2	1,2 ± 0,4	0,6 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,7 ± 0,2
<i>o</i> T	1.	n.d.	1,0 ± 0,1	0,8 ± 0,2	1,1 ± 0,3	0,5 ± 0,0	1,1 ± 0,1
	2.	n.d.	4,8 ± 3,8	n.d.	0,8 ± 0,2	0,3 ± 0,0	0,2 ± 0,3
<i>o</i> TR	1.	n.d.	0,7 ± 0,0	0,9 ± 0,1	0,9 ± 0,1	0,6 ± 0,0	0,9 ± 0,1
	2.	n.d.	0,9 ± 0,1	0,9 ± 0,2	0,9 ± 0,2	0,5 ± 0,1	0,9 ± 0,3
<i>p</i> T	1.	n.d.	0,7 ± 0,1	1,4 ± 0,4	1,7 ± 0,4	0,5 ± 0,1	1,8 ± 0,0
	2.	n.d.	0,9 ± 0,3	0,8 ± 0,3	1,7 ± 0,5	0,6 ± 0,2	1,9 ± 0,4
<i>p</i> TR	1.	n.d.	0,6 ± 0,0	0,8 ± 0,1	1,0 ± 0,2	0,6 ± 0,0	1,0 ± 0,1
	2.	n.d.	1,0 ± 0,2	1,2 ± 0,4	1,1 ± 0,2	0,5 ± 0,1	1,3 ± 0,3
K	1.	n.d.	1,5 ± 0,3	0,8 ± 0,1	3,5 ± 1,3	0,6 ± 0,1	2,2 ± 0,8
	2.	n.d.	3,4 ± 0,1	1,5 ± 0,1	1,9 ± 0,5	0,9 ± 0,3	2,8 ± 0,5
KR	1.	n.d.	0,7 ± 0,1	1,1 ± 0,1	2,5 ± 0,5	0,8 ± 0,1	2,5 ± 0,2
	2.	n.d.	1,4 ± 0,1	1,8 ± 0,5	2,6 ± 0,4	0,7 ± 0,1	2,3 ± 0,0
K9G	1.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,3 ± 0,0
	2.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,5 ± 0,2

Tab. 9: Stanovené účinnosti [%] MMIP u koncentračního rozsahu 0,1 – 50 pmol STD isoprenoidních CK při použití purifikačního protokolu s technickým promytím 5% kyselinou octovou, eluční roztok 0,5M hydroxid amonný v 60% methanolu, hodnoty jsou ve tvaru průměr ± směrodatná odchylka, n = 3, n.d. = nedetekováno

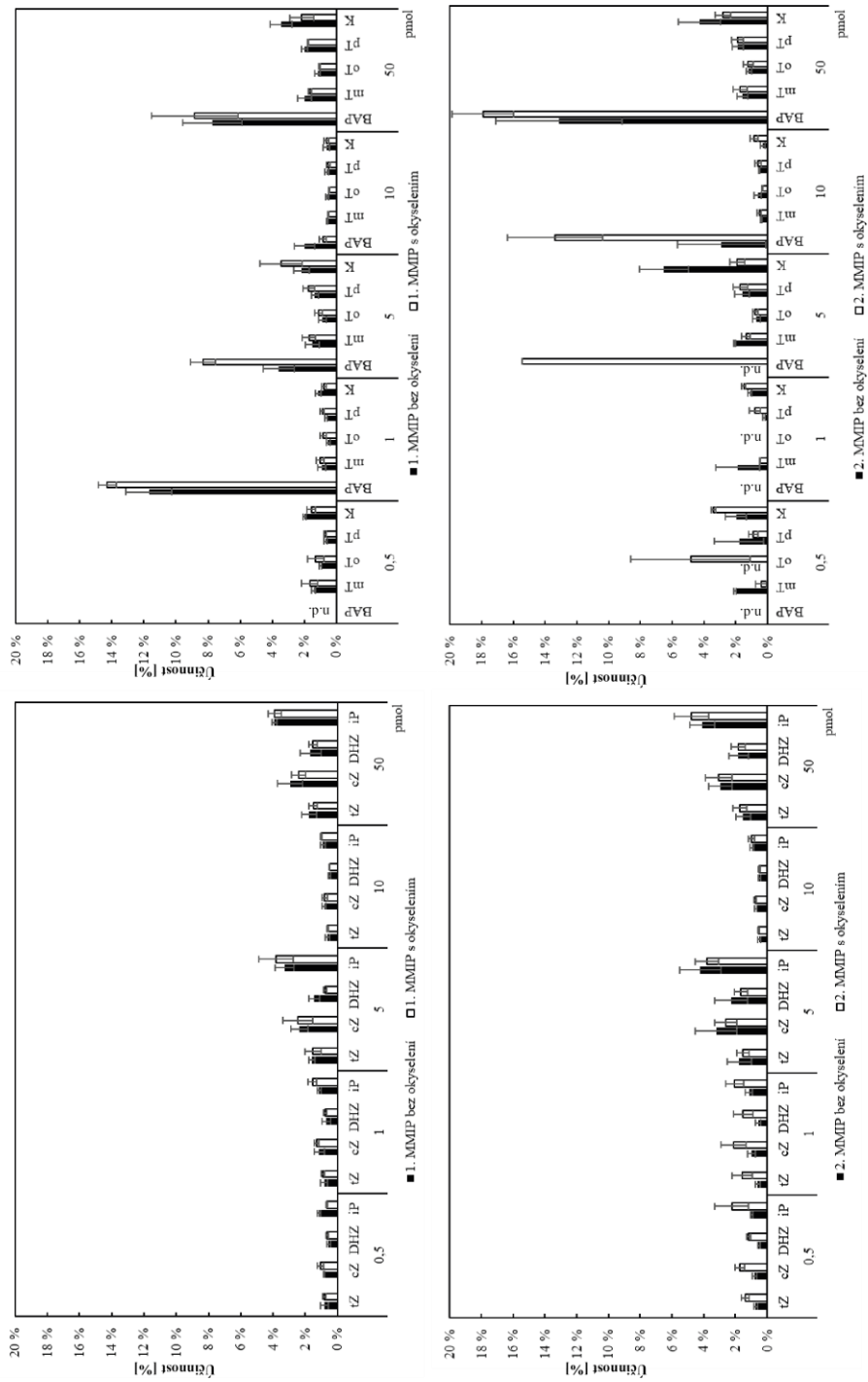
TYP CYTOKININU	VZOREK MMIP	KONCENTRACE [pmol]					
		0,1	0,5	1	5	10	50
		ÚČINNOST [%]					
<i>tZ</i>	1.	n.d.	0,8 ± 0,1	0,9 ± 0,1	1,5 ± 0,5	0,6 ± 0,0	1,5 ± 0,2
	2.	n.d.	1,4 ± 0,2	1,6 ± 0,6	1,5 ± 0,4	0,5 ± 0,1	1,4 ± 0,4
<i>tZR</i>	1.	n.d.	0,3 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,7 ± 0,3	0,3 ± 0,0	0,7 ± 0,2
	2.	n.d.	1,1 ± 0,1	1,3 ± 0,5	1,0 ± 0,3	0,3 ± 0,0	1,1 ± 0,3
<i>tZ9G</i>	1.	n.d.	0,3 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,4 ± 0,2	0,3 ± 0,0	0,4 ± 0,1
	2.	n.d.	1,1 ± 0,0	1,7 ± 0,2	0,6 ± 0,2	0,3 ± 0,1	0,6 ± 0,2
<i>cZ</i>	1.	n.d.	1,1 ± 0,2	1,3 ± 0,1	2,5 ± 0,9	0,8 ± 0,2	2,4 ± 0,4
	2.	n.d.	1,7 ± 0,3	2,1 ± 0,8	2,6 ± 0,7	0,8 ± 0,1	3,1 ± 0,8
<i>cZR</i>	1.	n.d.	0,4 ± 0,1	1,0 ± 0,2	2,1 ± 0,8	0,5 ± 0,1	2,2 ± 0,4
	2.	n.d.	1,2 ± 0,1	2,1 ± 0,8	2,9 ± 0,9	0,7 ± 0,1	3,1 ± 0,8
<i>cZ9G</i>	1.	n.d.	0,4 ± 0,1	0,8 ± 0,2	1,3 ± 0,6	0,4 ± 0,1	1,5 ± 0,4
	2.	n.d.	1,1 ± 0,0	1,9 ± 0,8	2,1 ± 0,5	0,5 ± 0,1	2,3 ± 0,6
DHZ	1.	n.d.	0,6 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,5 ± 0,4	1,5 ± 0,3
	2.	n.d.	1,2 ± 0,1	1,5 ± 0,6	1,7 ± 0,4	0,5 ± 0,1	1,8 ± 0,4
DHZR	1.	n.d.	0,4 ± 0,1	0,8 ± 0,2	1,3 ± 0,5	0,4 ± 0,1	1,4 ± 0,3
	2.	n.d.	1,2 ± 0,0	1,8 ± 0,7	2,0 ± 0,6	0,5 ± 0,1	2,2 ± 0,5
DHZ9G	1.	n.d.	0,4 ± 0,1	0,8 ± 0,2	1,1 ± 0,5	0,4 ± 0,1	1,2 ± 0,3
	2.	n.d.	1,2 ± 0,1	2,3 ± 0,2	1,7 ± 0,4	0,5 ± 0,1	1,8 ± 0,4
iP	1.	n.d.	0,7 ± 0,1	1,6 ± 0,3	3,8 ± 1,1	2,0 ± 0,0	3,9 ± 0,4
	2.	n.d.	2,2 ± 1,1	2,0 ± 0,6	3,8 ± 0,7	1,0 ± 0,2	4,8 ± 1,1
iPR	1.	n.d.	0,4 ± 0,0	0,5 ± 0,0	0,9 ± 0,3	0,3 ± 0,0	1,0 ± 0,1
	2.	n.d.	0,6 ± 0,1	0,7 ± 0,2	1,1 ± 0,2	0,3 ± 0,0	1,2 ± 0,3
iP9G	1.	n.d.	0,5 ± 0,1	0,9 ± 0,2	1,6 ± 0,6	0,5 ± 0,1	1,6 ± 0,3
	2.	n.d.	1,2 ± 0,1	1,7 ± 0,6	2,1 ± 0,6	0,5 ± 0,1	1,8 ± 0,0

Účinnost MMIP proti zvoleným 25 CK je zobrazena na obr. 14, 15 a 16. Nejnižší koncentrace, která byla detekována, byla ve všech případech 0,5 pmol, nejnižší zvolená koncentrace 0,1 pmol byla pod limitem detekce.

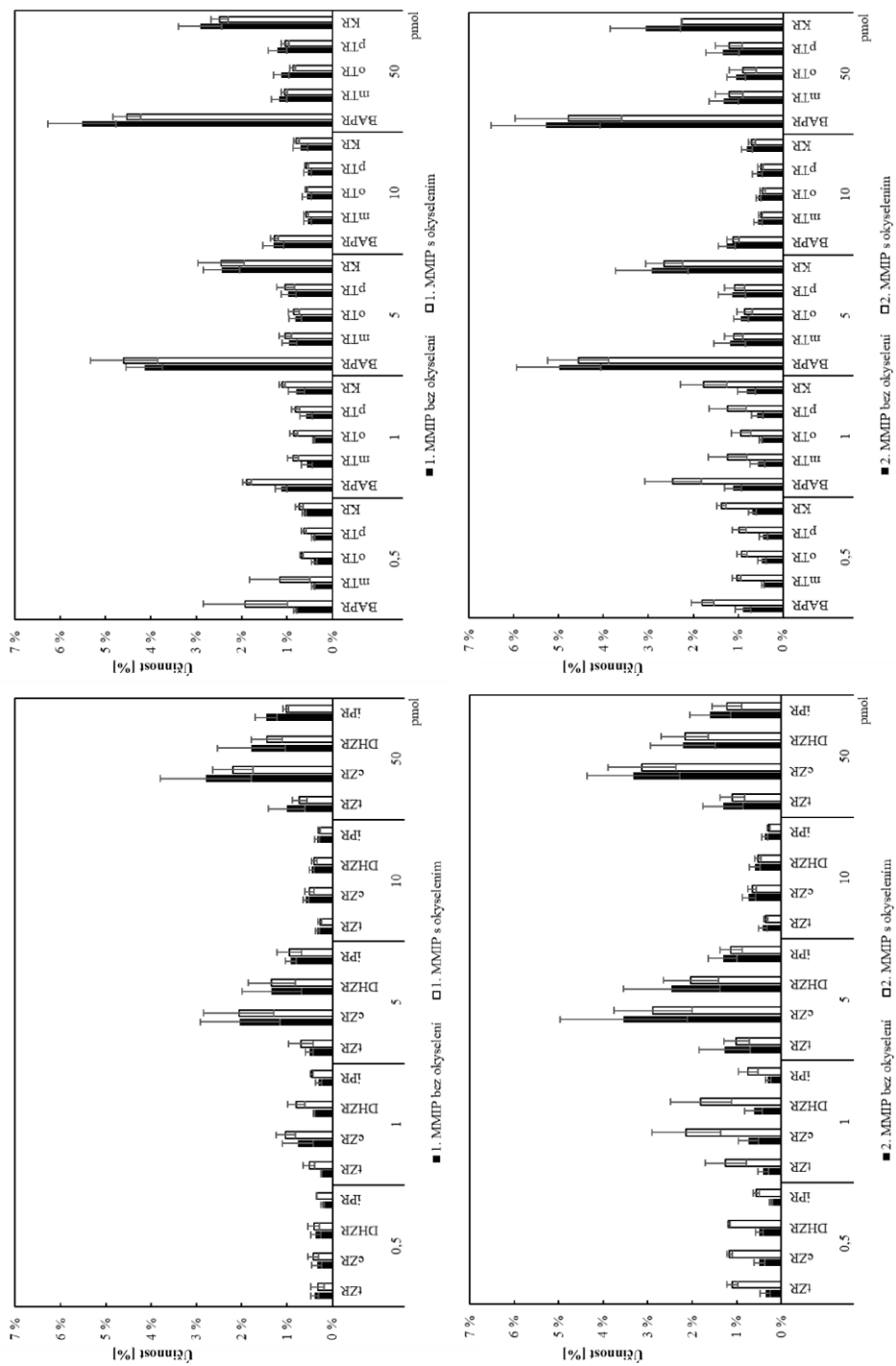
Na obr. 13 je zobrazeno porovnání účinnosti 1. a 2. MMIP při použití dvou purifikačních protokolů, bez okyselení MMIP technickým promytím 5% kyselinou octovou a s okyselením MMIP pomocí uvedeného technického promytí. Jsou zde zobrazeny získané hladiny účinnosti proti CK bázím. Z obrázku je patrné, že MMIP jsou selektivní pro vychytávání BAP. V případě 1. MMIP bylo dosaženo nejvyšší účinnosti u BAP v koncentraci 1 pmol, a to 14,3 %, respektive 11,9 %. Při zvyšující se koncentraci docházelo ke snížení účinnosti MMIP, která se snížila až na 2 % u neokyselených MMIP a na 0,8 % u MMIP s okyseleným technickým promytím v případě koncentrace 10 pmol. U 2. MMIP byl BAP detekován až od koncentrace 5 pmol, s nejvyšší účinností při 50 pmol, tj. 17,9 %. U obou MMIP je pro BAP více účinný purifikační protokol zahrnující jejich technické promytí 5% kyselinou octovou. Účinnost vychytávání ostatních aromatických a isoprenoidních bází se pohybovala v průběhu celého koncentračního rozsahu ve velmi nízkých hodnotách, maximálně do 5 %.

Obr. 14 zobrazuje účinnosti obou typů MMIP proti CK ribosidům. Zde je možné vidět nejvyšší účinnosti u vychytávání BAPR v případě obou typů MMIP, s nejvyššími hladinami u koncentrace 50 pmol. Pro 1. MMIP jde o účinnost 5,5 % u protokolu bez okyselení a 4,5 % s okyselením. V případě 2. MMIP jde o 5,3 % bez okyselení a 4,8 % s okyselením. Z ostatních aromatických ribosidů je nejvíce vychytáván KR, s maximem kolem 3 %. Ostatní aromatické ribosidy jsou vychytávány s účinností pod 2 %. Isoprenoidní ribosidy jsou v celém koncentračním rozsahu vychytávány s účinností pod 4 %, nejlépe je ovšem zachycován cZ.

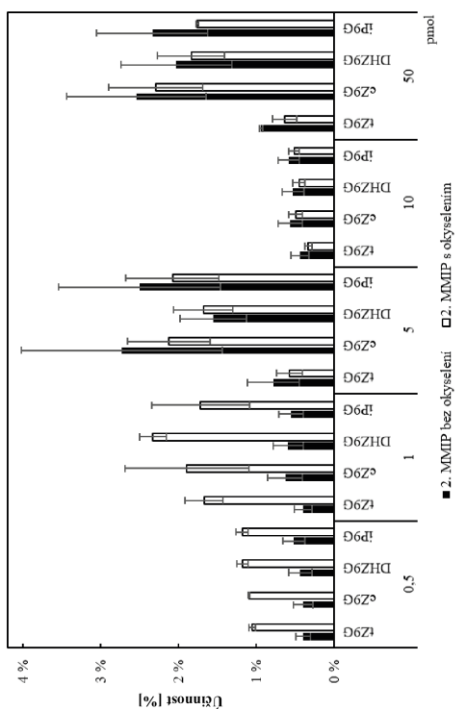
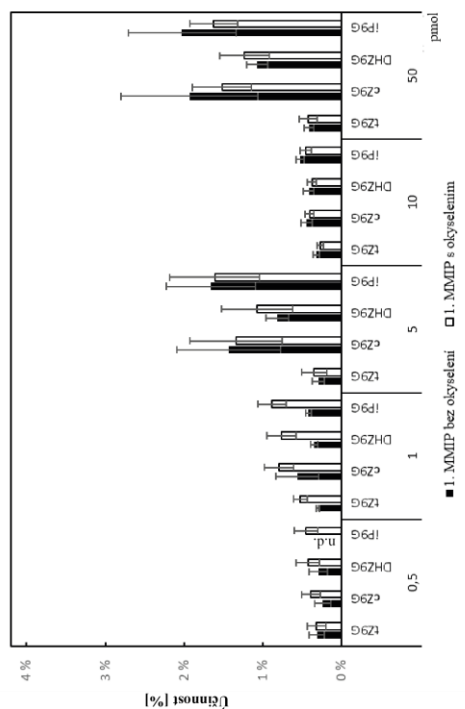
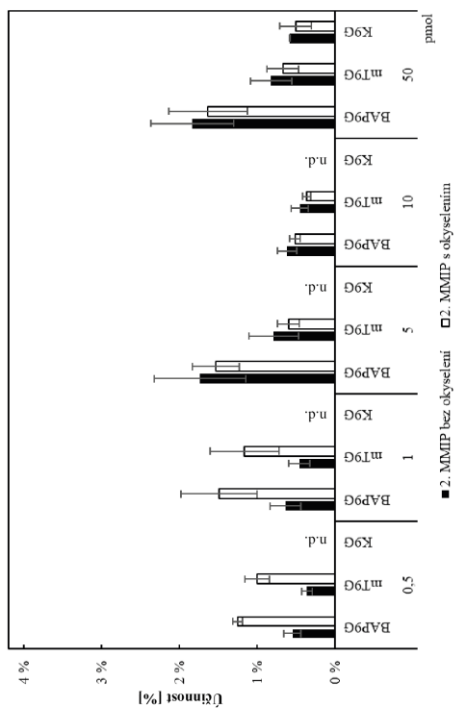
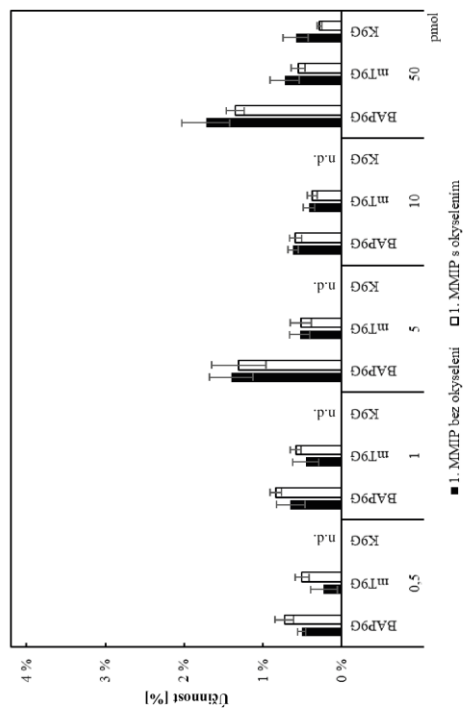
Na obr. 15 jsou zobrazeny účinnosti pro vychytávání CK N^9 -glukosidů. Jak aromatické, tak isoprenoidní N^9 -glukosidy jsou 1. i 2. MMIP vychytávány s velmi nízkou účinností pod 3 %.



Obr. 13: Stanovené účinnosti [%] MMIP u koncentračního rozsahu 0,1 – 50 pmol pro isoprenoidní a aromatické CK báze a porovnání purifikačních protokolů bez a s technickým prouštěním 5% kyselinou octovou, eluční roztok 0,5M hydroxid amonný v 60% methanolu, n = 3, chybové úsečky značí směrodatnou odchylku n.d. = nedetekováno; nahore: 1. MMIP, dole: 2. MMIP



Obr. 14: Stanovené účinnosti [%] MMIP u koncentračního rozsahu 0,1 – 50 pmol pro isoprenoidní a aromatické CK ribosidy a porovnání purifikačních protokolů bez a s technickým prmytím 5% kyselinou octovou, eluční roztok 0,5M hydroxid amonný v 60% methanolu, n = 3, chybové úsečky značí směrodatnou odchylku; n.d. = nedetekováno; nahoře: 1. MMIP, dole: 2. MMIP



Obr. 15: Stanovené účinnosti [%] MMIP u koncentračního rozsahu 0,1 – 50 pmol pro isoprenoidní a aromatické N^9 -glukosidy a porovnání purifikačních protokolů bez a s technickým pronytím 5% kyselinou octovou, eluční roztok 0,5M hydroxid amonný v 60% methanolu, n = 3, chybové úsečky značí směrodatnou odchylku n.d. = nedetekováno; nahore: 1. MMIP, dole: 2. MMIP

Z výše uvedených výsledků je patrné, že koncentrační rozsah metody začíná na koncentraci 1 pmol STD, respektive 0,5 pmol STD. Nižší zvolená koncentrace, 0,1 pmol, nebyla detekována, a byl tak stanoven limit detekce testované metody. V případě příliš vysoké koncentrace dochází ke snížení účinnosti MMIP. Tento jev může být vysvětlen tak, že u příliš vysokých koncentrací analytu dochází k překročení kapacity materiálu. Podobných výsledků bylo dosaženo u imunopurifikačních metod publikovaných Novák et al. (2008) a Plačková et al. (2017). Další testování polymerního materiálu by tak mohlo být zaměřeno na přesné stanovení maximální adsorpční kapacity MMIP.

Selektivní vlastnosti MMIP pro vychytávání BAP jsou patrné na obrázcích 13 – 15. Účinnost jeho vychytávání se pohybovala do 20 %, oproti tomu účinnost pro vychytávání ostatních typů CK byla mnohokrát nižší, pohybovala se kolem 2, maximálně 5 %.

Nízké účinnosti MMIP mohou být způsobeny nedostatečným množstvím tohoto materiálu použitého při purifikačním protokolu. ²Zhang et al. (2010) pro validaci metody pro purifikaci indol-3-octové kyseliny pomocí MMIP použili 50 mg materiálu, oproti tomu Xiong et al. (2022) použili pro purifikaci BAP pouze 1 mg. Z důvodu nedostatku dodaného materiálu nebylo možné toto množství v diplomové práci optimalizovat, stanovení potřebného množství materiálu by tak mohlo být dalším krokem v testování daného materiálu.

Zaměření dalšího testování by také mohlo být cíleno na optimalizaci inkubace vzorku s MMIP. V této diplomové práci byly MMIP inkubovány se vzorkem po dobu 30 min, ovšem výsledky Xiong et al. (2022) naznačují, že adsorpční kapacita MMIP výrazně narůstá po 40 min inkubace a vrcholu dosahuje po 60 min. Prodloužení inkubace vzorku s dodanými MMIP by tak mohlo zvýšit jejich účinnost.

Zvolení vhodného monomeru pro syntézu MIP je důležitou součástí pro vznik vazebných míst mezi monomerem a templátem. Pro syntézu testovaného materiálu byla jako monomer použita MAA, ta obsahem karboxylové skupiny je schopna tvořit s iminovými skupinami BAP vodíkové vazby (Han et al., 2017). Xiong et al. (2022) ve své studii použili pro syntézu MMIP vychytávající BAP bifunkční monomer kombinující MAA a *p*-styrensulfonyl sodný. Sulfonylová a fenylová skupina *p*-styrensulfonylu sodného je schopna s molekulou BAP tvořit elektrostatické interakce. Touto kombinací došlo k navýšení interakcí mezi MMIP a BAP a tedy k lepšímu navázání. Pro další optimalizaci metody by mohly být syntetizovány nové typy MMIP s jinými monomery, které by byly schopny vytvářet více interakcí s molekulou BAP a zvýšit tak účinnost metody.

Ideální templát pro syntézu MIP by měl obsahovat funkční skupiny, díky kterým se zachytne a vytvoří komplex s polymerem (Chen et al., 2011). BAP, použitý jako templát v testovaném materiálu, nemá ve svém postranním řetězci funkční skupinu, pouze aromatické jádro, které je chemicky stabilní. Díky tomu může s použitým monomerem, MAA, interagovat pouze svými iminovými skupinami. Z tohoto důvodu by pro syntézu MMIP vychytávající aromatické cytokininy mohl být vhodnější jako templát *mT*, který ve své struktuře obsahuje navíc hydroxylovou skupinu, která by mohla vytvářet více slabých interakcí, například vodíkové vazby, díky kterým by mohlo docházet k lepšímu zachycení CK v materiálu.

Po optimalizaci purifikačních kroků, typu a množství použitého MMIP by v neposlední řadě mělo být provedeno testování metody na rostlinném materiálu.

5 Závěr

Diplomová práce se zabývala testováním nového molekulárně imprintovaného polymerního materiálu navázaného na magnetických nanočásticích, jehož templátem byl BAP. Mezi cíle práce patřilo měření čistoty a dočištění dodaného materiálu, optimalizace purifikačního protokolu využívající tento polymerní materiál a testování jeho koncentračního rozsahu.

Pro přečištění materiálu byly testovány tři různé roztoky, z nichž jako nejvhodnější roztok pro vymytí BAP byl zvolen 1% hydroxid amonný v 60% isopropanolu, který byl dále použit jako regenerační roztok v purifikačním protokolu.

V případě optimalizace purifikačního protokolu byly testovány různé eluční roztoky, z nichž nejvyšší účinnosti dosahovaly MMIP při použití 0,5 M hydroxidu amonného v 60% methanolu. Dále byly testovány různé koncentrace kyseliny octové jako technické promytí MMIP před nanesením vzorku. Nejlepší účinnosti bylo dosaženo při použití 5% kyseliny octové, s vyššími koncentracemi účinnost klesala. Po okyselení materiálu kyselinou octovou dosahovaly MMIP mírně vyšší účinnosti než MMIP bez okyselení.

V případě testování koncentračního rozsahu metody byla detekována až koncentrace 1 pmol, a byl tedy stanoven limit detekce. Maximální rozsah metody byl stanoven na 100 pmol, ovšem při vyšších koncentracích docházelo ke snížení účinnosti MMIP.

Pomocí směsi 25 CK STD, obsahující jak isoprenoidní tak aromatické báze, ribosidy a N^9 -glukosidy, byla ověřena selektivita MMIP, kdy účinnost vůči BAP byla vyšší než vůči ostatním typům CK.

Magnetické molekulárně imprintované polymery jsou levnou, jednoduchou a selektivní metodou pro purifikaci vzorků před jejich analýzou. Tato diplomová práce by mohla být nápomocna k položení základů a podnětů jak k dalšímu testování nového polymerního materiálu, tak k syntéze nových typů MMIP pro účinnou purifikaci cytokininů ze vzorku.

6 Zdroje

- Ahmad, O. S., Bedwell, T. S., Esen, C., Garcia-Cruz, A., & Piletsky, S. A. (2019). Molecularly Imprinted Polymers in Electrochemical and Optical Sensors. In *Trends in Biotechnology* (Vol. 37, Issue 3). <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.08.009>
- Akiyoshi, D. E., Klee, H., Amasino, R. M., Nester, E. W., & Gordon, M. P. (1984). T-DNA of *Agrobacterium tumefaciens* encodes an enzyme of cytokinin biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81(19 I). <https://doi.org/10.1073/pnas.81.19.5994>
- Altintas, Z., Guerreiro, A., Piletsky, S. A., & Tothill, I. E. (2015). NanoMIP based optical sensor for pharmaceuticals monitoring. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 213. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2015.02.043>
- Andersson, H. S., & Nicholls, I. A. (2001). Chapter 1 A historical perspective of the development of molecular imprinting. In *Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry* (Vol. 23, Issue C). [https://doi.org/10.1016/S0167-9244\(01\)80004-4](https://doi.org/10.1016/S0167-9244(01)80004-4)
- Belbruno, J. J. (2019). Molecularly Imprinted Polymers. In *Chemical Reviews* (Vol. 119, Issue 1). <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00171>
- Brzobohatý, B., Moore, I., Kristoffersen, P., Bako, L., Campos, N., Schell, J., & Palme, K. (1993). Release of active cytokinin by a β -glucosidase localized to the maize root meristem. *Science*, 262(5136). <https://doi.org/10.1126/science.8235622>
- Colombani, D. (1997). Chain-growth control in free radical polymerization. In *Progress in Polymer Science (Oxford)* (Vol. 22, Issue 8). [https://doi.org/10.1016/S0079-6700\(97\)00022-1](https://doi.org/10.1016/S0079-6700(97)00022-1)
- Cormack, P. A. G., & Elorza, A. Z. (2004). Molecularly imprinted polymers: Synthesis and characterisation. In *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* (Vol. 804, Issue 1). <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2004.02.013>
- D'Agostino, I. B., & Kieber, J. J. (1999). Molecular mechanisms of cytokinin action. In *Current Opinion in Plant Biology* (Vol. 2, Issue 5). [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(99\)00005-9](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(99)00005-9)

- Davies, P. J. (2010). The plant hormones: Their nature, occurrence, and functions. In *Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action!* https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2686-7_1
- Dobrev, P. I., & Kamínek, M. (2002). Fast and efficient separation of cytokinins from auxin and abscisic acid and their purification using mixed-mode solid-phase extraction. *Journal of Chromatography A*, 950(1–2). [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)00024-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)00024-9)
- El-Schich, Z., Zhang, Y., Feith, M., Beyer, S., Sternbæk, L., Ohlsson, L., Stollenwerk, M., & Wingren, A. G. (2020). Molecularly imprinted polymers in biological applications. In *BioTechniques* (Vol. 69, Issue 6). <https://doi.org/10.2144/btn-2020-0091>
- Entsch, B., Parker, C. W., & Letham, D. S. (1983). An enzyme from lupin seeds forming alanine derivatives of cytokinins. *Phytochemistry*, 22(2). [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(83\)83008-8](https://doi.org/10.1016/0031-9422(83)83008-8)
- Feng, J., Shi, Y., Yang, S., & Zuo, J. (2017). Cytokinins. In *Hormone Metabolism and Signaling in Plants* (pp. 77–106). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811562-6.00003-7>
- Frébort, I., Kowalska, M., Hluska, T., Frébortová, J., & Galuszka, P. (2011). Evolution of cytokinin biosynthesis and degradation. *Journal of Experimental Botany*, 62(8), 2431–2452. <https://doi.org/10.1093/jxb/err004>
- Frébortová, J., Fraaije, M. W., Galuszka, P., Šebela, M., Peč, P., Hrbáč, J., Novák, O., Bilyeu, K. D., English, J. T., & Frébort, I. (2004). Catalytic reaction of cytokinin dehydrogenase: Preference for quinones as electron acceptors. *Biochemical Journal*, 380(1). <https://doi.org/10.1042/BJ20031813>
- Gupta, R., & Kumar, A. (2008). Bioactive materials for biomedical applications using sol-gel technology. *Biomedical Materials*, 3(3). <https://doi.org/10.1088/1748-6041/3/3/034005>
- Haberer, G., & Kieber, J. J. (2002). Cytokinins. New insights into a classic phytohormone. In *Plant Physiology* (Vol. 128, Issue 2). <https://doi.org/10.1104/pp.010773>

- Haginaka, J. (2009). Molecularly imprinted polymers as affinity-based separation media for sample preparation. In *Journal of Separation Science* (Vol. 32, Issue 10). <https://doi.org/10.1002/jssc.200900085>
- Han, Y., Yang, C., Zhou, Y., Han, D., & Yan, H. (2017). Ionic Liquid-Hybrid Molecularly Imprinted Material-Filter Solid-Phase Extraction Coupled with HPLC for Determination of 6-Benzyladenine and 4-Chlorophenoxyacetic Acid in Bean Sprouts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(8). <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b03922>
- Holub, J., Hanuš, J., Hanke, D. E., & Strnad, M. (1998). Biological activity of cytokinins derived from Ortho- and Meta-hydroxybenzyladenine. *Plant Growth Regulation*, 26(2). <https://doi.org/10.1023/A:1006192619432>
- Hoshino, Y., Kodama, T., Okahata, Y., & Shea, K. J. (2008). Peptide imprinted polymer nanoparticles: A plastic antibody. *Journal of the American Chemical Society*, 130(46). <https://doi.org/10.1021/ja8062875>
- Hoyerová, K., Gaudinová, A., Malbeck, J., Dobrev, P. I., Kocábek, T., Šolcová, B., Trávníčková, A., & Kamínek, M. (2006). Efficiency of different methods of extraction and purification of cytokinins. *Phytochemistry*, 67(11). <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.03.010>
- Hu, Y., Pan, J., Zhang, K., Lian, H., & Li, G. (2013). Novel applications of molecularly-imprinted polymers in sample preparation. In *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* (Vol. 43). <https://doi.org/10.1016/j.trac.2012.08.014>
- Huang, S., Xu, J., Zheng, J., Zhu, F., Xie, L., & Ouyang, G. (2018). Synthesis and application of magnetic molecularly imprinted polymers in sample preparation. In *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (Vol. 410, Issue 17). <https://doi.org/10.1007/s00216-018-1013-y>
- Chaves Das Neves, H. J., & Pais, M. S. S. (1980). A new cytokinin from the fruits of *Zantedeschia aethiopica*. *Tetrahedron Letters*, 21(45). [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)77865-8](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)77865-8)
- Chen, C. M. (1997). Cytokinin biosynthesis and interconversion. *Physiologia Plantarum*, 101(4). <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.1997.1010402.x>

- Chen, L., & Li, B. (2012). Application of magnetic molecularly imprinted polymers in analytical chemistry. In *Analytical Methods* (Vol. 4, Issue 9). <https://doi.org/10.1039/c2ay25354b>
- Chen, L., Wang, X., Lu, W., Wu, X., & Li, J. (2016). Molecular imprinting: Perspectives and applications. In *Chemical Society Reviews* (Vol. 45, Issue 8). <https://doi.org/10.1039/c6cs00061d>
- Chen, L., Xu, S., & Li, J. (2011). Recent advances in molecular imprinting technology: Current status, challenges and highlighted applications. *Chemical Society Reviews*, 40(5). <https://doi.org/10.1039/c0cs00084a>
- Chianella, I., Guerreiro, A., Moczko, E., Caygill, J. S., Piletska, E. V., De Vargas Sansalvador, I. M. P., Whitcombe, M. J., & Piletsky, S. A. (2013). Direct replacement of antibodies with molecularly imprinted polymer nanoparticles in ELISA - Development of a novel assay for vancomycin. *Analytical Chemistry*, 85(17). <https://doi.org/10.1021/ac402102j>
- Kakimoto, T. (2001). Identification of plant cytokinin biosynthetic enzymes as dimethylallyl diphosphate:ATP/ADP isopentenyltransferases. *Plant and Cell Physiology*, 42(7). <https://doi.org/10.1093/pcp/pce112>
- Kakimoto, T. (2003). Biosynthesis of cytokinins. *Journal of Plant Research*, 116(3), 233–239. <https://doi.org/10.1007/s10265-003-0095-5>
- Kamínek, M., Vaněk, T., & Motyka, V. (1987). Cytokinin activities of N6-benzyladenosine derivatives hydroxylated on the side-chain phenyl ring. *Journal of Plant Growth Regulation*, 6(2). <https://doi.org/10.1007/BF02026460>
- Kamínek, M. (2015). Tracking the Story of Cytokinin Research. *Journal of Plant Growth Regulation*, 34(4), 723–739. <https://doi.org/10.1007/s00344-015-9543-4>
- Kieber, J. J., & Schaller, G. E. (2014). Cytokinins. *The Arabidopsis Book*, 12, e0168–e0168. <https://doi.org/10.1199/tab.0168>
- Kryscio, D. R., & Peppas, N. A. (2012). Critical review and perspective of macromolecularly imprinted polymers. In *Acta Biomaterialia* (Vol. 8, Issue 2). <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.11.005>

- Letham, D. S. (1973). Cytokinins from *Zea mays*. *Phytochemistry*, 12(10), 2445–2455.
[https://doi.org/10.1016/0031-9422\(73\)80453-4](https://doi.org/10.1016/0031-9422(73)80453-4)
- Li, S. M., Zheng, H. X., Zhang, X. S., & Sui, N. (2021). Cytokinins as central regulators during plant growth and stress response. In *Plant Cell Reports* (Vol. 40, Issue 2).
<https://doi.org/10.1007/s00299-020-02612-1>
- Liu, Z., Cai, B. D., & Feng, Y. Q. (2012). Rapid determination of endogenous cytokinins in plant samples by combination of magnetic solid phase extraction with hydrophilic interaction chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 891–892.
<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.02.015>
- Liu, Z., Wei, F., & Feng, Y. Q. (2010). Determination of cytokinins in plant samples by polymer monolith microextraction coupled with hydrophilic interaction chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical Methods*, 2(11).
<https://doi.org/10.1039/c0ay00334d>
- Ljung, K., Sandberg, G., & Moritz, T. (2010). Methods of plant hormone analysis. In *Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action!* https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2686-7_31
- Mattiasson, B., & Ye, L. (2015). *Molecularly Imprinted Polymers in Biotechnology* (Vol. 150). Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-20729-2>
- Miller, C. O., Skoog, F., Okumura, F. S., Von Saltza, M. H., & Strong, F. M. (1956). Isolation, Structure and Synthesis of Kinetin, a Substance Promoting Cell Division^{1,2}. *Journal of the American Chemical Society*, 78(7), 1375–1380.
<https://doi.org/10.1021/ja01588a032>
- Miller, C. O., Skoog, F., Von Saltza, M. H., & Strong, F. M. (1955). Kinetin, a Cell Division Factor from Deoxyribonucleic Acid. *Journal of the American Chemical Society*, 77(5).
<https://doi.org/10.1021/ja01610a105>
- Mok, D. W. S., & Mok, M. C. (2001). CYTOKININ METABOLISM AND ACTION. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 52(1), 89–118.
<https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.52.1.89>

- Novák, O., Hauserová, E., Amakorová, P., Doležal, K., & Strnad, M. (2008). Cytokinin profiling in plant tissues using ultra-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Phytochemistry*, 69(11). <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2008.04.022>
- Novák, O., Tarkowski, P., Tarkowská, D., Doležal, K., Lenobel, R., & Strnad, M. (2003). Quantitative analysis of cytokinins in plants by liquid chromatography-single-quadrupole mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 480(2). [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(03\)00025-4](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(03)00025-4)
- Okumura, F. S., Kotani, Y., Ariga, T., Masumura, M., & Kuraishi, S. (1959). Syntheses of Kinetin-analogues. II. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 32(8). <https://doi.org/10.1246/bcsj.32.883>
- Okumura, F. S., Masumura, M., Motoki, T., Takahashi, T., & Kuraishi, S. (1957). Syntheses of Kinetin-analogs. I. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 30(2). <https://doi.org/10.1246/bcsj.30.194>
- Pačes, V., Werstiuk, E., & Hall, R. H. (1971). Conversion of N⁶-(Δ^2 -Isopentenyl)adenosine to Adenosine by Enzyme Activity in Tobacco Tissue. *Plant Physiology*, 48(6). <https://doi.org/10.1104/pp.48.6.775>
- Plačková, L., Hrdlička, J., Smýkalová, I., Cvečková, M., Novák, O., Griga, M., & Doležal, K. (2015). Cytokinin profiling of long-term in vitro pea (*Pisum sativum* L.) shoot cultures. *Plant Growth Regulation*, 77(2). <https://doi.org/10.1007/s10725-015-0044-z>
- Plačková, L., Oklestkova, J., Pospíšková, K., Poláková, K., Buček, J., Stýskala, J., Zatloukal, M., Šafařík, I., Zbořil, R., Strnad, M., Doležal, K., & Novák, O. (2017). Microscale magnetic microparticle-based immunopurification of cytokinins from *Arabidopsis* root apex. *Plant Journal*, 89(5). <https://doi.org/10.1111/tpj.13443>
- Plíhalová, L., Vylíčilová, H., Doležal, K., Zahajská, L., Zatloukal, M., & Strnad, M. (2016). Synthesis of aromatic cytokinins for plant biotechnology. In *New Biotechnology* (Vol. 33, Issue 5, pp. 614–624). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2015.11.009>
- Podlešáková, K., Zalabák, D., Čudejková, M., Plíhal, O., Szüčová, L., Doležal, K., Spíchal, L., Strnad, M., & Galuszka, P. (2012). Novel cytokinin derivatives do not show negative effects on root growth and proliferation in submicromolar range. *PLoS ONE*, 7(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039293>

- Poller, A. M., Spieker, E., Lieberzeit, P. A., & Preininger, C. (2017). Surface Imprints: Advantageous Application of Ready2use Materials for Bacterial Quartz-Crystal Microbalance Sensors. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 9(1). <https://doi.org/10.1021/acsami.6b13888>
- Polyakov, M. (1931). Adsorption properties and structure of silica gel. In *Zhur. Fiz. Khim.* (Vol. 2).
- Procházka, S., Macháčková, I., Krekule, J., & Šebánek, J. Procházka, S. (1998). *Fyziologie rostlin*. Academia.
- Ríos, A., Zougagh, M., & Bouri, M. (2013). Magnetic (nano)materials as an useful tool for sample preparation in analytical methods. A review. In *Analytical Methods* (Vol. 5, Issue 18). <https://doi.org/10.1039/c3ay40306h>
- Sakakibara, H. (2006). Cytokinins: Activity, biosynthesis, and translocation. In *Annual Review of Plant Biology* (Vol. 57). <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105231>
- Sakakibara, H. (2010). Cytokinin biosynthesis and metabolism. In *Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action!* https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2686-7_5
- Saylan, Y., Akgönüllü, S., Yavuz, H., Ünal, S., & Denizli, A. (2019). Molecularly imprinted polymer based sensors for medical applications. In *Sensors (Switzerland)* (Vol. 19, Issue 6). <https://doi.org/10.3390/s19061279>
- Selvolini, G., & Marrazza, G. (2017). MIP-based sensors: Promising new tools for cancer biomarker determination. In *Sensors (Switzerland)* (Vol. 17, Issue 4). <https://doi.org/10.3390/s17040718>
- Skoog, F., & Miller, C. O. (1957). Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. *Symposia of the Society for Experimental Biology*, 11.
- Skoog, Folke, Strong, F. M., & Miller, C. O. (1965). Cytokinins. *Science*, 148(3669), 532–533.
- Spíchal, L. (2012). Cytokinins - Recent news and views of evolutionally old molecules. In *Functional Plant Biology* (Vol. 39, Issue 4). <https://doi.org/10.1071/FP11276>

- Strnad, M. (1997). The aromatic cytokinins. *Physiologia Plantarum*, 101(4).
<https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1997.tb01052.x>
- Strnad, M. (2021). History of Meta-Topolin and the Aromatic Cytokinins. In *Meta-topolin: A Growth Regulator for Plant Biotechnology and Agriculture*.
https://doi.org/10.1007/978-981-15-9046-7_1
- Strnad, M., Hanuš, J., Vaněk, T., Kamínek, M., Ballantine, J. A., Fussell, B., & Hanke, D. E. (1997). Meta-topolin, a highly active aromatic cytokinin from poplar leaves (*Populus x canadensis* Moench., cv. Robusta). *Phytochemistry*, 45(2).
[https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(96\)00816-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(96)00816-3)
- Svačinová, J., Novák, O., Plačková, L., Lenobel, R., Holík, J., Strnad, M., & Doležal, K. (2012). A new approach for cytokinin isolation from Arabidopsis tissues using miniaturized purification: pipette tip solid-phase extraction. *Plant Methods*, 8(1).
<https://doi.org/10.1186/1746-4811-8-17>
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2006). *Plant Physiology*. 4th Edition, Sinauer Associates, Inc.
- Takei, K., Sakakibara, H., & Sugiyama, T. (2001). Identification of Genes Encoding Adenylate Isopentenyltransferase, a Cytokinin Biosynthesis Enzyme, in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*, 276(28).
<https://doi.org/10.1074/jbc.M102130200>
- Takei, K., Yamaya, T., & Sakakibara, H. (2004). Arabidopsis CYP735A1 and CYP735A2 encode cytokinin hydroxylases that catalyse the biosynthesis of trans-Zeatin. *Journal of Biological Chemistry*, 279(40). <https://doi.org/10.1074/jbc.M406337200>
- Tanaka, M., Takei, K., Kojima, M., Sakakibara, H., & Mori, H. (2006). Auxin controls local cytokinin biosynthesis in the nodal stem in apical dominance. *Plant Journal*, 45(6).
<https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02656.x>
- Tarkowská, D., Novák, O., Floková, K., Tarkowski, P., Turečková, V., Grúz, J., Rolčík, J., & Strnad, M. (2014). Quo vadis plant hormone analysis? In *Planta* (Vol. 240, Issue 1).
<https://doi.org/10.1007/s00425-014-2063-9>

- Vasapollo, G., Sole, R. Del, Mergola, L., Lazzoi, M. R., Scardino, A., Scorrano, S., & Mele, G. (2011). Molecularly imprinted polymers: Present and future prospective. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 12, Issue 9). <https://doi.org/10.3390/ijms12095908>
- Wackerlig, J., & Schirhagl, R. (2016). Applications of Molecularly Imprinted Polymer Nanoparticles and Their Advances toward Industrial Use: A Review. In *Analytical Chemistry* (Vol. 88, Issue 1). <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b03804>
- Wang, H. Y., Kobayashi, T., & Fujii, N. (1996). Molecular imprint membranes prepared by the phase inversion precipitation technique. *Langmuir*, 12(20). <https://doi.org/10.1021/la960243y>
- Werbrouck, S. P. O., Strnad, M., Van Onckelen, H. A., & Debergh, P. C. (1996). Meta-topolin, an alternative to benzyladenine in tissue culture? *Physiologia Plantarum*, 98(2). <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.1996.980210.x>
- Werner, T., Motyka, V., Strnad, M., & Schmülling, T. (2001). Regulation of plant growth by cytokinin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(18). <https://doi.org/10.1073/pnas.171304098>
- Werner, T., Motyka, V., Laucou, V., Smets, R., Van Onckelen, H., & Schmülling, T. (2003). Cytokinin-Deficient Transgenic Arabidopsis Plants Show Multiple Developmental Alterations Indicating Opposite Functions of Cytokinins in the Regulation of Shoot and Root Meristem Activity. *Plant Cell*, 15(11). <https://doi.org/10.1105/tpc.014928>
- Xie, L., Jiang, R., Zhu, F., Liu, H., & Ouyang, G. (2014). Application of functionalized magnetic nanoparticles in sample preparation. In *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (Vol. 406, Issue 2). <https://doi.org/10.1007/s00216-013-7302-6>
- Xiong, Y., Cao, Y., Luo, L., Li, P., Li, M., Wang, R., Xiao, L., & Liu, X. (2022). Synthesis, characterization and absorption evaluation of bifunctional monomer magnetic molecularly imprinted polymers nanoparticles for the extraction of 6-benzylaminopurine from vegetables. *Food Chemistry*, 386, 132792. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2022.132792>

- Yan, H., & Kyung, H. R. (2006). Characteristic and synthetic approach of molecularly imprinted polymer. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 7, Issues 5–6). <https://doi.org/10.3390/i7050155>
- ¹Zhang, Y., Song, D., Lanni, L. M., & Shimizu, K. D. (2010). Importance of functional monomer dimerization in the molecular imprinting process. *Macromolecules*, *43*(15). <https://doi.org/10.1021/ma101013c>
- ²Zhang, Y., Li, Y., Hu, Y., Li, G., & Chen, Y. (2010). Preparation of magnetic indole-3-acetic acid imprinted polymer beads with 4-vinylpyridine and β -cyclodextrin as binary monomer via microwave heating initiated polymerization and their application to trace analysis of auxins in plant tissues. *Journal of Chromatography A*, *1217*(47). <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.09.059>
- Zhang, Z., Tan, W., Hu, Y., Li, G., & Zan, S. (2012). Microwave synthesis of gibberellin acid 3 magnetic molecularly imprinted polymer beads for the trace analysis of gibberellin acids in plant samples by liquid chromatography-mass spectrometry detection. *Analyst*, *137*(4). <https://doi.org/10.1039/c2an16001c>