

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



Analytická metoda pro stanovení nových inhibitorů cyklin-dependentních kináz

Bakalářská práce

Lenka Řeháčková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

„Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci zpracovala samostatně s využitím uvedených zdrojů.“

Dne:

Podpis:.....

Souhrn

Cyklin-dependentní kinázy (Cdk) jsou klíčové enzymy regulace buněčného cyklu a jejich inhibitory jsou vhodným nástrojem farmakologické léčby celé řady onemocnění, např. rakoviny nebo HIV. V současnosti existuje přibližně dvacet inhibitorů Cdk a některé z nich již vstoupily do klinických testů.

Tato práce je zaměřena na vývoj a optimalizaci analytické metody pro stanovení pěti syntetických inhibitorů Cdk, derivátů roscovitinu - trisubstituovaného 2, 6, 9- purinu. Analytická metoda sestává ze dvou částí – separace pomocí ultraúčinné kapalinové chromatografie (UPLC) a hmotnostní detekce (MS) s trojitým kvadrupólem.

Nejprve byla pro testované látky nalezena vhodná analytická kolona a byly optimalizovány chromatografické podmínky. K eluci byl použit lineární gradient s počátečním poměrem mobilní fáze A a B – 65 : 35. Všechny analyty byly eluovány během 6 minut, kdy je dosaženo 100 % organické fáze (fáze B), kterou je pro všechny látky methanol. Jako nejvhodnější vodný roztok (fáze A) byl vybrán vodný roztok 0,1% kyseliny mravenčí a 15mM HCOONH₄ o pH= 4.

Vývoj MS metody zahrnoval hledání nejlepších podmínek pro tvorbu fragmentů (MRM přechodů), které jsou charakterizovány určitou hodnotou kolizní energie a dále pak optimalizaci nastavení parametrů iontového zdroje (ESI), konkrétně kapilárního a kónického napětí.

Nově vyvinutá metoda bude zvalidována a následně použita pro měření vzorků z *in vitro* a *in vivo* experimentů.

Summary

Cyclin-dependent kinases (Cdk) are key enzymes of cell cycle regulation and their inhibitors are an appropriate tool for pharmacological therapy of many diseases, such as cancer or HIV. Currently, there are approximately twenty CDK inhibitors and some of them have already entered clinical trials.

This work is focused on the development and optimization of analytical methods for the determination of five CDK inhibitors, roscovitine derivatives - trisubstituted 2, 6, 9 - purine. The method consists of two parts - ultra performance liquid chromatography (UPLC) separation and MS detection with triple quadrupole.

At first, the suitable analytical column was found and chromatographic conditions were optimized. Linear gradient with an initial ratio of mobile phases A and B – 65 : 35 was used for elution. As the most suitable aqueous solutions (phase A) were selected 0.1% formic acid and 15 mM HCOONH₄, pH = 4. The organic phase (phase B) was 100% methanol. All analytes were eluted in 6 minutes and the gradient was terminated with 100% phase B.

The development of MS method included finding the best conditions for the formation of fragments (MRM transitions), which are characterized by a value of the collision energy, and then optimization of the ESI parameters, capillary and cone voltage.

Poděkování:

Tímto bych chtěla velmi poděkovat zejména svému školiteli PharmDr. Luboru Urbánkovi, PhD za jeho vedení, cenné rady a konzultace v oblasti analytické chemie a odborných textů. Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Tomáši Guckému, PhD. za konzultace týkající se problematiky Cdk inhibitorů a zaměstnancům Laboratoře růstových regulátorů, kde jsou svou bakalářskou práci zpracovala, za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

Obsah

1. CÍLE BAKALÁŘSKÉ PRÁCE	8
2. ÚVOD.....	9
3. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	10
3.1 BUNĚČNÝ CYKLUS	10
3.1.1 G1 fáze buněčného cyklu:	11
3.1.2 S fáze buněčného cyklu:.....	11
3.1.3 G2 fáze buněčného cyklu:	11
3.1.4 M fáze buněčného cyklu:	11
3.2 REGULACE BUNĚČNÉHO CYKLU	13
3.2.1 Cyklin-dependentní kinázy	14
3.2.1.1 Cdk jako cíl léčby rakoviny	16
3.3 INHIBITORY CYKLIN-DEPENDENTNÍCH KINÁZ	16
3.3.1 Přírodní inhibitory Cdk.....	17
3.3.2 Syntetické inhibitory Cdk.....	17
3.4 CHROMATOGRAFIE	20
3.4.1 Plynová chromatografie.....	20
3.4.2 Kapalinová chromatografie	20
3.4.2.1 HPLC.....	21
3.4.2.2 UHPLC	23
3.4.2.3 UPC ²	24
3.5 HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE.....	25
3.5.1 Ionizace vzorku	25
3.5.1.3 ESI (ionizace elektrosprejem)	26
3.5.2 Analyzátor.....	27
3.5.2.1 Kvadrupólový analyzátor	27
3.5.3 Detekce iontů.....	28
4. MATERIÁL A METODIKA	29
4.1 OPTIMALIZACE PODMÍNEK UPLC.....	29
4.1.1 Přístroje a testované kolony:	29
4.1.2. Chemikálie a testované látky:.....	29
4.1.3 Výchozí chromatografické podmínky:.....	30
4.1.4 Postup optimalizace podmínek UPLC.....	30
4.2 OPTIMALIZACE PODMÍNEK MS.....	31
4.2.1 Přístroje.....	31
4.2.2 Chemikálie a testované látky.....	31
4.2.3 Postup optimalizace podmínek MS.....	31
5. VÝSLEDKY.....	32
5.1 OPTIMALIZACE PODMÍNEK UPLC.....	32
5.1.1 Rozpustnost vzorku	32
5.1.2 Výběr kolony a složení mobilní fáze (MF).....	32
5.1.3 Optimalizace složení a gradientu MF.....	35
5.2 OPTIMALIZACE PODMÍNEK HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE (MS)	36
5.2.1 MRM přechody a optimalizace kolizní energie	36

5.2.2	Optimalizace napětí na kapiláře	41
5.2.3	Optimalizace napětí na kóně	41
6.	DISKUSE	44
6.1	OPTIMALIZACE PODMÍNEK UPLC.....	44
6.2	OPTIMALIZACE PODMÍNEK MS.....	46
7.	ZÁVĚR	47
8.	LITERATURA.....	49
9.	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	54
10.	PŘÍLOHY.....	56
10.1	PŘÍLOHA 1: SROVNÁNÍ VÝSLEDKŮ ANALÝZY LÁTEK PŘI POUŽITÍ 50% METHANOLU A 50% ACETONITRILU	56
10.2	PŘÍLOHA 2: SOUHRNNÉ VÝSLEDKY UPLC ANALÝZY VŠECH TESTOVANÝCH LÁTEK.....	58

1. Cíle bakalářské práce

Vypracování stručné rešerše na téma cyklin-dependentní kinázy (Cdk) - definice, význam, farmakologický potenciál

Zvládnutí teoretických základů vybraných separačních metod se zaměřením na kapalinovou chromatografii a hmotnostní spektrometrii

Samostatná práce se systémem UPLC-MS - hardware, software

Vývoj a optimalizace analytické metody stanovení vybraných CDK inhibitorů pomocí jejich standardů

Zpracování výsledků a sepsání bakalářské práce

2. Úvod

Rakovina je onemocněním, které postihuje lidské populace na celém světě. Statistiky ukazují, že počet nemocných rakovinou neustále narůstá. Například ve Spojených státech amerických bylo v roce 2004 evidováno 1 368 030 nových případů rakoviny a 563 700 úmrtí spojených s tímto onemocněním [1], zatímco v roce 2012 uvádějí statistiky již 1 638 910 nových případů a 577 190 úmrtí [2]. To znamená, že v průběhu osmi let se výskyt rakoviny v USA zvýšil o 19,8 % a podobný trend lze pozorovat i v dalších zemích. Na základě toho vznikly po celém světě tisíce laboratoří zabývajících se výzkumem rakoviny a syntézou látek s potenciálním protirakovinným účinkem. Jedněmi z těchto látek jsou **inhibitory cyklin-dependentních kináz**.

Jak bude vysvětleno dále, cyklin-dependentní kinázy jsou nezbytné pro správný chod buněčného cyklu. U zdravých buněk jsou postupně různé kinázy aktivovány a inaktivovány. Rakovinné buňky ovšem tuto regulaci postrádají a mohou se neomezeně množit. Proto vznikla myšlenka, zastavit jejich dělení pomocí inhibice určitých cyklin-dependentních kináz.

V současnosti existuje celá řada inhibitorů cyklin-dependentních kináz. Mnohé z nich již vstoupily do klinických testů, například **roscovitín** patří do skupiny purinových derivátů.

Tato bakalářská práce je zaměřena na vývoj a optimalizaci analytické metody stanovení nových inhibitorů cyklin-dependentních kináz odvozených od roscovitinu. Metoda využívá spojení separace pomocí ultraúčinné kapalinové chromatografie (UPLC) a detekce hmotnostní spektrometrií (MS).

3. Současný stav řešené problematiky

V následujících kapitolách je popsán buněčný cyklus, význam cyklin-dependentních kináz, jsou zde charakterizovány jednotlivé inhibitory cyklin-dependentních kináz, včetně jejich mechanismu účinku a také použité metody (kapalinová chromatografie a hmotnostní spektrometrie).

3.1 Buněčný cyklus

Buněčné dělení je nezbytné pro vývoj a funkci všeho živého. U jednobuněčných organismů vznikají buněčným dělením noví jedinci. U složitějších, mnohobuněčných, živočichů transformuje řada buněčných dělení jednu původní buňku do seskupení tvořících tkáně a orgány. U dospělých jedinců mnohobuněčných organismů zajišťuje buněčné dělení nahrazení buněk, které odumírají ať už z přirozených příčin, nebo vlivem škodlivých vnějších vlivů. Buněčné dělení je konečnou fází procesu označovaného jako buněčný cyklus. [3, 4]

Buněčný cyklus je cyklický sled dějů, během nichž buňka zdvojuje svůj obsah a dělí se v dvě buňky dceřiné. Tento proces je základním mechanismem, kterým se rozmnožují živé organismy. Obecně lze buněčný cyklus rozdělit do dvou fází, na interfázi a mitotickou (M) fází, během níž buňka postupně duplikuje svůj obsah, připravuje se na následné dělení a ústí v cytokinezi. Doba trvání buněčného cyklu je u různých buněk různá, obecně ale platí, že většinu času (cca 90 %) setrvává buňka v interfázi.

Opodstatněním nepoměru mezi dobou trvání mitotické fáze a interfáze je fakt, že právě v interfázi dochází k replikaci DNA a zdvojení organel, což jsou významné kroky buněčného cyklu a je nesmírně důležité, aby proběhly správně. Proto se zde nacházejí také kontrolní body (tzv. check points), které jsou regulačními místy buněčného cyklu a mají za úkol zamezit průchodu defektních buněk do pokročilých fází cyklu. [4]

Interfáze se skládá ze tří fází: G1, G2 a S fáze. Speciální fází je tzv. G0 fáze, která může nahradit G1 fází. Pokud se již buňka nemá dále dělit a má dojít k její diferenciaci, přejde po posledním dělení do G0 fáze a v ní zůstane po zbytek svého života (příkladem takovýchto buněk mohou být například svalové nebo nervové buňky). [4] V případě, že se buňka nediferencuje, vstupuje do tzv. postmitotické, G1, fáze. [5]

3.1.1 G1 fáze buněčného cyklu:

V první fázi buněčného cyklu (G1 fáze) zvětšují buňky svou velikost v reakci na extracelulární signály, kterými jsou například růstové faktory a intracelulární signály. Během G1 fáze jsou aktivní proteinkinázy, které katalyzují přenos fosfátových skupin, a tím vysílají signál, že může započít dělení buňky. [6, 4, 7]

3.1.2 S fáze buněčného cyklu:

Druhým krokem buněčného cyklu je tzv. S fáze, během níž dochází k replikaci DNA. Správný průběh replikace DNA je pro buňku nezbytný, a proto je S fázi vyhrazena přibližně polovina celkového času trvání buněčného cyklu. Navíc se zde nachází také kontrolní systém, který má za úkol dohlížet nejen na správný průběh replikace, ale také na její ukončení a průchod do další fáze buněčného cyklu. [4, 7]

3.1.3 G2 fáze buněčného cyklu:

Na S fázi navazuje G2 fáze, v níž má buňka, oproti G1 fázi, dvojnásobné množství DNA a je téměř připravena na dělení. Pro správné rozdělení mateřské buňky do dvou buněk dceřiných je nutná nejen duplikace DNA, ale také duplikace buněčných organel, k níž dochází právě v G2 fázi. V G2 fázi se také syntetizují proteiny nezbytné pro dělení jádra a buňky. Na konci G2 fáze dochází ke kondenzaci chromosomů, což značí začátek M fáze, konkrétně začátek profáze. [4, 7]

3.1.4 M fáze buněčného cyklu:

M fáze buněčného cyklu (mitotická) je fáze dělení jádra buňky. Lze ji rozdělit na profázi, prometafázi, metafázi, anafázi a telofázi. [7]

Během **profáze** dochází ke kondenzaci chromozomů a zaniká jadérko. Tato kondenzace je tak výrazná, že je možné chromozomy pozorovat v optickém mikroskopu. Ovšem profáze není vhodná k určování počtu nebo morfologii jednotlivých chromozomů, protože nejsou vzájemně odděleny. Během metafáze se také tvoří dělicí vřetenko, které je tvořeno mikrotubuly. Na jeho vzniku se podílejí konkrétně mikrotubuly organizujícího centra (MTOC) nacházející se v cytoplazmě. Tyto MTOC se obvykle nacházejí nedaleko jádra, což urychluje jejich transport do jádra v průběhu mitózy. MTOC jsou u živočišných eukaryotických buněk tvořeny malými organelami, centrozomy, které ovšem rostlinné buňky nemají.

Prometafáze je charakteristická rozpadem jaderné membrány a navázáním dělicího vřeténka na jednotlivé chromozomy. [4] Dělicí vřeténko se váže na specifické oblasti chromozomů – centromery. Struktura eukaryotních centromer ještě stále není zcela známá, ale ví se, že obsahuje značené množství tandemových repetitivních sekvencí DNA. Syntéza funkční centromery během interfáze je základním předpokladem pro přechod buňky z profáze (respektive z prometafáze) do metafáze. Pokud se na chromozomu nenachází funkční centromera, dělicí vřeténko se nenaváže (nebo se naváže chybně) a dělení buňky neproběhne jak má.

Je-li ovšem centromera funkční, mikrotubuly dělicího vřeténka se naváží na kinetochory (proteinové struktury spojené s centromerou) a chromozomy se uspořádají do ekvatoriální roviny buňky, což značí začátek **metafáze**. Pohyb chromozomů do ekvatoriální roviny je dán změnou délky mikrotubulů. Ekvatoriální rovina bývá rovněž označována jako metafázní destička.

V této fázi jsou chromozomy stále tvořeny dvěma chromatidami, které vznikly duplikací původní chromatidy během S fáze. Tyto dvě chromatidy se označují jako sesterské. Každá ze sesterských chromatid je pomocí mikrotubulů připojena k opačnému pólu buňky a postupným zkracováním mikrotubulových vláken jsou sesterské chromatidy rozdělovány. Tato fáze je označována jako **anafáze**.

Jakmile doputují jednotlivé chromatidy k pólům buňky, nastává **telofáze**. Během telofáze dochází k opětovné dekonduzaci chromozomů, tvorbě jaderné membrány a obnovení jadérka. [8]

Na M fázi navazuje samotné dělení buňky, označované jako **cytokineze**. V průběhu cytokineze dojde k rozdělení cytoplazmy a také buněčných organel na dvě poloviny. Cytokineze zpravidla začíná již během anafáze, ale nemůže být dokončena dříve, než jsou vytvořena dvě nová jádra. Stejně tak, jako se během M fáze vytváří určitá přechodná struktura v podobě dělicího vřeténka, v průběhu cytokineze se tvoří podobná struktura. Nazývá se kontraktilní prstenec a u živočišných buněk je tvořen aktinem a myozinem. Kontraktilní prstenec je navázán na proteiny asociované s vnitřní stranou plazmatické membrány a zajišťuje hladký průběh dělení buňky. [4]

3.2 Regulace buněčného cyklu

Buněčný cyklus je složitý proces skládající se z menších mezikroků, které byly stručně popsány v předchozí kapitole. Duplikace a dělení buněčných komponent musí být provedeno přesně a spolehlivě z generace na generaci. Velmi důležitá je zejména správná replikace jaderné DNA uložené v chromozomech. [3, 4]

Kontrola buněčného cyklu zajišťující jeho správný průběh je pro živé organismy nezbytná. U jednobuněčných organismů musí být buněčné dělení a buněčný růst ve vzájemné rovnováze. Pokud roste buňka před dělením příliš rychle, může dojít k narušení jejích funkcí a počet nových buněk vzniklých jejím dělením roste jen pozvolna. U mnohobuněčných organismů je kontrola buněčného cyklu poměrně složitý proces. Dělení každé buňky musí být precizně kontrolováno a také správně načasováno. Ztráta nebo narušení tohoto kontrolního mechanismu je spojována s celou řadou onemocnění, např. s rakovinou. [9]

V rámci buněčného cyklu lze nalézt nejrůznější komponenty, které dohlížejí na správný chod jeho jednotlivých částí. Takovými komponenty jsou například enzymy potřebné pro duplikaci jaderné DNA nebo aparát zajišťující správnou segregaci chromosomů do nově vznikajících buněk.

Komplex všech komponent zajišťující správný chod buněčného cyklu se označuje jako **kontrolní systém buněčného cyklu**. Tento systém kontroluje průběh a načasování jednotlivých dějů buněčného cyklu a je schopen jej v kterékoliv jeho části pozastavit. Příkladem je začátek M fáze, který je možný, až po dokončení replikace jaderné DNA. [3, 4]

Buněčný cyklus zahrnuje dva hlavní molekulární děje, které jsou nezbytné pro reprodukci buňky. První z nich je replikace původních chromosomů buňky (parentální chromosomy) v S fázi a jejich následné rozdělení do nově vznikajících buněk v M fázi. Pokud by v buňce nebyl přítomen kontrolní systém buněčného cyklu, případně pokud by byla jeho funkce porušena, mohlo by docházet k rozcházení dceřiných chromosomů dříve, což by mělo za následek porušení rovnoměrného přenosu genetické informace do dalších generací. [9]

Důmyslnou součástí buněčného kontrolního systému jsou kontrolní body, neboli checkpoints. **Kontrolní body** zodpovídají za správné načasování začátku jednotlivých fází buněčného cyklu a nacházejí se vždy na jejich pomezí. První kontrolní bod se nachází na pomezí G_1 (případně G_0) fáze a S fáze. Tento kontrolní bod se označuje jako **Start**, případně jako restriční bod. Pokud se buňka nachází v prostředí s příznivými podmínkami zahrnujícími přítomnost růstových faktorů, projde bodem Start a dojde k replikaci její DNA. Po ukončení replikace DNA vstupuje buňka do G_2 fáze. Na pomezí G_2 a M fáze se nachází

druhý kontrolní bod, označovaný jako **G₂/M checkpoint**. Třetí kontrolní bod se nachází na přechodu z metafáze do anafáze a kontroluje správný rozchod sesterských chromatid chromosomů. [4, 10]

Buňky disponují propracovaným mechanismem, který monitoruje průběh buněčného cyklu a přenáší aktuální informace do kontrolního systému. Pokud tento kontrolní systém detektuje nějaký problém, tj. odchylku od standardního průběhu, zpozdí nástup další fáze cyklu do doby, než budou tyto problémy odstraněny. [3]

Mezi nejdůležitější komponenty kontroly buněčného cyklu patří skupina enzymů, označovaná jako **cyklin-dependentní kinázy** (Cdk).

3.2.1 Cyklin-dependentní kinázy

Cyklin-dependentní kinázy jsou enzymy, které umožňují vstup buňky do jednotlivých fází buněčného cyklu, a díky tomu jsou významným místem v jeho regulaci. Chemicky se jedná o heterodimerické proteinkinázy obsahující ve své struktuře dvě podjednotky – katalytickou (Cdk) a regulační (cyklin). [9, 11, 12]

V rámci buněčného cyklu dochází k dvěma periodickým akumulacím molekul cyklinů. Prvním z těchto mechanismů je aktivace transkripce a druhým proteinová degradace. Degradace cyklinů je řízena ubiquitin-proteasomovým systémem. Proteolýza molekul cyklinů je jedním z hlavních mechanismů regulace aktivity cyklin-dependentních kináz v průběhu buněčného cyklu. [13]

Uvážíme-li jak je buněčný cyklus složitý proces, není překvapením, že se na jeho regulaci podílí celá řada různých Cdk a cyklinů. Každá z těchto Cdk má svou funkci a ve své struktuře obsahuje vazebné místo pro specifickou molekulu cyklinu. [13] Zajímavé je, že koncentrace cyklinů se v průběhu buněčného cyklu mění v závislosti na aktuálních potřebách buňky, zatímco koncentrace Cdk je po celou dobu konstantní. [11]

Přestože je koncentrace Cdk v průběhu celého buněčného cyklu neměnná, jejich aktivita stoupá a klesá. Tyto změny jsou dány fosforylacemi a defosforylacemi jednotlivých komponent zajišťujících fungování buněčného cyklu, ale také Cdk samotných. [3]

Stejně jako další kinázy, i Cdk katalyzují přenos fosfátových skupin na molekuly substrátu. O tom, který protein bude fosforylován, rozhodují malé molekuly cyklinů. [9] Tato fosforylace následně způsobuje změny v enzymové aktivitě substrátu nebo ovlivňuje interakce substrátu s jinými proteiny. Fosforylace je tedy mechanismus, kterým Cdk ovlivňují aktivitu jednotlivých komponent buněčného cyklu. [3, 14]

Také samotné Cdk jsou aktivovány a deaktivovány pomocí fosforylace/ defosforylace. Fosforylace Cdk probíhá dvěma způsoby. Prvním z nich je fosforylace threoninových zbytků Cdk pomocí Cdk-aktivačních kináz (CAK). Druhým je fosforylace tyrosinových zbytků Wee1 protein-tyrosin kinázou. Pokud jsou fosforylovány tyrosinové i threoninové zbytky mitosis-promoting factor (MPF) je neaktivní. Častým modelem, na němž je studován vliv fosforylace na aktivitu Cdk, je lidská Cdk2. Výsledky zjištěné u Cdk2 byly shodné s výsledky zjištěnými u Cdk S.Pombe. To naznačuje, že struktura jednotlivých Cdk je podobná a jsou regulovány podobnými mechanismy. [9]

Savčí genom kóduje 12 cyklin-dependentních kináz, ačkoli jen 5 z nich se aktivně zapojuje do regulace buněčného cyklu. Jsou to Cdk1, Cdk2, Cdk3, Cdk4 a Cdk6. Cdk 1 je označována jako mitotická kináza, zbylé enzymy se zapojují v dřívějších fázích buněčného cyklu. [11]

Pokud buňky vstupují z klidové fáze do G1 fáze buněčného cyklu, Cdk4 a Cdk6 formují aktivní komplexy s D cykliny (D1, D2 a D3) a iniciují fosforylaci retinoblastoma proteinu (RB1) a také několika dalších proteinů, u nichž vyvolá fosforylace inaktivaci jejich funkce transkripčních represorů. V S fázi buněčného cyklu se uplatňují Cdk2 a cykliny typu A, B1, B2, E. Cdk2 se uplatňuje také v G2 fázi, ovšem netvoří již komplexy s cyklinem E. [15]

V případě poškození DNA je buněčný cyklus pozastaven aktivací souvisejících serin-proteinových kináz ATM, ATR a jejich efektorů – kinázy kontrolního bodu 1 (CHK1) a 2 (CHK2). Zastavení buněčného cyklu dává buňce čas, aby mohla opravit poškozená místa DNA. [16]

Kontrolní body buněčného cyklu jsou navrženy tak, aby zajišťovaly integritu genomu a vytvářely ochrannou bariéru proti patologickým stavům, jako je například rakovina. Nicméně mutace např. v ATM/ATR proteinkináze mohou narušit signalizaci o poškození DNA, což podporuje vznik rakoviny. [17, 18]

Paralelně s replikací DNA začíná také duplikace centrozomů a jejich separace, která vede k vytvoření pólů mitotického vřeténka na začátku mitózy. Pro průchod buňky druhým kontrolním bodem G2 do M fáze je důležitý komplex Cdk1 a cyklinu A. Následně je zrušena jaderná membrána, cyklin A je degradován a Cdk 1 vytváří nový komplex s cyklinem B. Komplex Cdk1-cyklin B zodpovídá za průchod buňky M fází, avšak pro dokončení buněčného dělení, za vzniku dvou samostatných buněk, je nutné komplex Cdk1-cyklin B inaktivovat. Tato deaktivace je zprostředkována proteolýzou cyklinu B pomocí anafázi-podporujícího komplexu (APC). [17]

3.2.1.1 Cdk jako cíl léčby rakoviny

V roce 2007 bylo známo přibližně 300 genů, které byly mutovány u nejméně jednoho typu lidské rakoviny. Ovšem pouze omezené množství „rakovinných genů“ kóduje molekuly, na něž je možné cílit farmakologickou léčbu. Těmito molekulami jsou například proteiny a enzymy, které mohou být cíli pro malé molekuly inhibitorů. Většina mutací podílejících se na procesu tumorogeneze zahrnuje mutace v genech kódujících proteiny regulující průchod G1 fázi buněčného cyklu. [5]

Savčí (a tedy i lidský) genom kóduje 5 cyklin-dependentních kináz, které se zapojují do regulace buněčného cyklu. Doposud bylo prokázáno, že u rakovinných buněk byla mutována cyklin-dependentní kináza 4. Její mutace byla prokázána na modelu dědičného melanomu. Navíc byla u řady lymfomů, leukemie a melanomů detekovaná zvýšená exprese Cdk6. [19]

Výzkum spojitosti rakoviny s Cdk ukazuje, že významná část lidských rakovin zahrnuje mutaci způsobující chybnou regulaci aktivity Cdk. Může se jednat například o nadměrnou expresi cyklinů nebo inaktivaci Cdk. Díky tomu získávají rakovinné buňky své specifické vlastnosti v oblasti jejich replikace. [5, 11] U lidských buněk postižených rakovinou byla velmi často zjištěna zvýšená aktivita cyklin-dependentních kináz. Nejvýznamnější odchylkou, oproti zdravým buňkám, je u rakovinných buněk ztráta integrity kontrolních bodů. Proto by mohla selektivní inhibice cyklin-dependentních kináz omezit progresi rakovinných buněk jednotlivými fázemi buněčného cyklu a usnadnit iniciaci apoptózy těchto buněk. [17]

Jedním z významných proteinů podílejících se na vzniku rakovinného bujení je protein p53. Jedná se o tumor-supresorový protein, který je v celé řadě rakovinných onemocnění inaktivován, nebo je jeho funkce výrazně omezena. [20] Inaktivace proteinu p53 může být způsobena například infekcí virem HPV, který kóduje protein E6. Cílem současné rakovinné terapie je aktivace p53 pomocí inhibice cyklin-dependentních kináz. [21]

3.3 Inhibitory cyklin-dependentních kináz

Přítomnost kináz, jejichž chybná regulace je zapojena ve vzniku rakoviny inspirovala myšlenku vytvořit molekulu, která bude schopna aktivitu těchto enzymů regulovat. Jedná se o tzv. **inhibitory cyklin-dependentních kináz**.

Na konci 20. století bylo objeveno a popsáno několik přírodních inhibitorů cyklin dependentních kináz. ATP-kompetitivní charakter a široká účinnost přirozených Cdk

inhibitorů vedly mnoho vědců k závěru, že syntetizovat jedinou molekulu Cdk inhibitoru vykazující dostatečnou selektivitu bude velmi složitý proces. Zvrat nastal v roce 1994, kdy byla vydána publikace popisující syntézu výjimečně silného inhibitoru tyrosinkináz, který byl ATP-kompetitivní a také vysoce specifický. Po tomto objevu opakovaly laboratoře po celém světě syntézu podobných látek a vznikla celá řada inhibitorů nejen tyrosinkináz. [20, 22]

3.3.1 Přirozené inhibitory Cdk

Cyklin-dependentní kinázy jsou velmi důležitou součástí buněčného cyklu. Jejich aktivita stoupá a postupně klesá v závislosti na dané fázi cyklu, v němž se buňka nachází. Tato regulace je pro správný průběh celého cyklu nezbytná. Není tedy překvapením, že se v buňkách nachází přirozené inhibitory Cdk. Tyto inhibitory se dají rozdělit do dvou skupin: INK4 a Cip/Kip. [23, 24]

INK4 je rodina proteinů zahrnující proteiny p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c} a p19^{INK4d}. Název této rodiny proteinů je vytvořen složením dvou zkratk IN (inhibitor) a K4 (kináza 4), lze si tedy odvodit, že se jedná o inhibitory Cdk 4.

Cip/Kip rodina proteinů je zastoupena zejména proteiny p21^{CIP1/WAF1}, p27^{KIP1} a p57^{KIP2}. [25] Na rozdíl od skupiny INK4 jsou tyto proteiny schopny inhibovat aktivitu všech Cdk. [23] Cip/Kip proteiny hrají významnou roli například v indukci apoptózy, regulaci transkripce, diferenciaci buněk a dynamice cytoskeletu. [26, 27]

Jedním z nejzajímavějších proteinů rodiny Cip/Kip je protein **p21**, který se běžně vyskytuje v lidských buňkách. [22] V savčích buňkách vyvolává zvýšení syntézy proteinu p21 aktivaci a zvýšenou syntézu proteinu **p53**, který je syntetizován jako odpověď na zvýšené poškození DNA. Protein p21 může také zablokovat replikaci DNA inhibicí PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen), který je pro průběh replikace esenciální. [28]

3.3.2 Syntetické inhibitory Cdk

V současnosti neexistuje žádný syntetický inhibitor Cdk, který by byl komerčně dostupný. Jednotlivé látky jsou prozatím v I., případně ve II. fázi klinických testů. Objasnění primární, sekundární a terciální struktury cyklin-dependentních kináz bylo prioritou v rozvoji prvních Cdk inhibitorů. [22] První syntetizované inhibitory Cdk (6-dimethylaminopurine a isopentenyladenin) nebyly nijak zvlášť aktivní a nevykazovaly ani dostatečnou selektivitu. Nicméně položily základ pro vývoj dalších látek, které se odrážely od jejich struktury a na rozdíl od původních sloučenin vykazovaly mnohem lepší vlastnosti. [29]

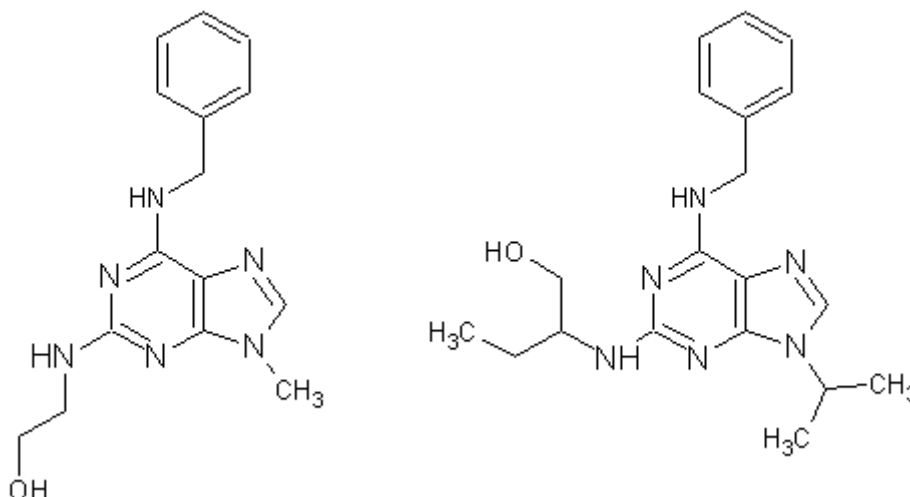
Začátkem 21. století byla syntetizována celá řada Cdk inhibitorů vycházejících ze struktury prvotních molekul. Tyto Cdk inhibitory jsou některými autory označovány jako druhá generace inhibitorů Cdk. [11] V současnosti je známo více než 50 syntetických inhibitorů Cdk, z nichž některé jsou aktivní i v nanomolárních koncentracích.

Všechny v současnosti známé inhibitory Cdk mají několik společných vlastností [29]:

- Nízká molekulová hmotnost ($M_r < 600$ g/mol)
- Jedná se o hydrofobní heterocykly
- Vykazují kompetitivní vazbu s ATP v ATP-vazebném místě kinázy
- S kinázami je pojí zejména hydrofobní interakce a vodíkové můstky

Mezi nejstudovanější inhibitory Cdk patří **flavopyridol** a **roscovitin** (CYC 202). [30, 14]

Obr. č. 1: *Strukturní vzorec olomoucínu a roscovitinu*



Olomoucín (2-(2-hydroxyethylamino)-6-benzylamino-9-methylpurin) je derivát purinu, který byl syntetizován v roce 1994. Jedná se o kompetitivní inhibitor vážící se do ATP-vazebného místa molekuly Cdk. V rámci regulace buněčného cyklu inhibuje Olomoucín komplexy Cdk2-Cyklin A, Cdk2-Cyklin B a Cdk2-Cyklin E. Účinnost Olomoucínu byla testována na řadě rostlinných i živočišných modelů a jednalo se o jednu z prvních purinových látek vykazujících inhibiční vlastnosti vůči aktivitě kináz. [31]

Roscovitin (2-(R)-(1-ethyl-2-hydroxyethylamino)-6-benzylamino-9-isopropylpurine) je látka odvozená od Olomoucínu. Roscovitin je často označován jako Selicib, případně jako CYC202. Jedná se o první selektivní inhibitor Cdk vykazující orální biologickou dostupnost. [32] Roscovitin má malou molekulovou hmotností ($M_r = 354,5$), což odpovídá obecné charakteristice inhibitorů Cdk. Vykazuje výbornou rozpustnost v chloroformu a DMSO. Bylo

prokázáno, že po užití vyvolává hromadění tumor supresoru p53, zastavuje buněčný cyklus a u lidských buněk vyvolává také apoptózu, což je v případě rakovinných buněk velmi žádoucí. Tyto účinky roscovitinu jsou dány zejména jeho vazbou na komplex cyklin-dependentní kinázy a příslušného cyklinu, ovšem ke konečnému výsledku přispívají také další děje, které na buněčné úrovni vyvolává.

Akumulace jaderné proteinu p53 po podání roscovitinu je dána silnou inhibicí syntézy RNA a je spojena se změnami na Ser315 a Lys382. Roscovitin inhibuje cyklin-dependentní kinázu 2, a tím inhibuje také fosforylaci Ser315. Ukázalo se, že fosforylace na místě Ser315 proteinu p53 vede k vytvoření tetrameru, který následně dělá p53 bezbrannější vůči degradaci v proteasomu. Pokud tedy roscovitin zablokuje fosforylaci Ser315, způsobí snížení degradace p53 a jeho akumulaci. [33]

Roscovitin je v současnosti v II. fázi klinických testů a zkoumá se jeho vliv při léčbě leukémie a rakoviny plic. Z dosavadních výsledků vyplývá, že roscovitin vykazuje velmi krátký poločas eliminace a netvoří další aktivní metabolity. Ukazuje se také, že by roscovitin mohl také zesilovat účinky protinádorového léčiva Doxorubicinu, které se užívá v léčbě rakoviny prsu. [34] V kombinaci s jinými léčivy se roscovitin nachází v I. fázi klinických testů. Kromě již zmíněného Doxorubicinu jsou zkoumány jeho vlastnosti také v kombinaci s látkou Sapacitabine [35], která vykazuje pozitivní vlastnosti v léčbě pevných tumorů [36].

Na základě vlastností roscovitinu vznikla řada dalších látek, které jsou odvozeny z jeho struktury. Nové inhibitory Cdk inspirované roscovitinem byly vyvíjeny [35]:

- Optimalizací purinových substituentů
- Změnami pozice a poměry mezi atomy dusíku a uhlíku v heterocyklickém jádře
- Použitím kombinací dvou předchozích možností

3.4 Chromatografie

Analytická chemie využívá k izolaci jednotlivých složek směsi celou řadu separačních metod, jednou z nich je **chromatografie**. Chromatografie je označení pro procesy založené na separaci látek mezi dvě fáze – nepohyblivou (stacionární) a pohyblivou (mobilní). Analyt je rozpuštěn v mobilní fázi a pomocí ní je unášen přes fázi stacionární, s níž může interagovat. K separaci pak následně dochází na základě různých interakcí analytu s mobilní a stacionární fází. Stacionární fáze může mít pevné nebo kapalně skupenství, zatímco mobilní fáze je buďto plynná, nebo kapalná. (LC). [37, 38, 39]

Chromatografické metody lze dělit podle mnoha přístupů. Nejrozšířenějším dělením chromatografických technik je podle skupenství mobilní fáze na **kapalinovou** (mobilní fáze je kapalina) a **plynovou** (mobilní fáze je plynná). Dalšími typy dělení jsou například dělení dle uspořádání systému na chromatografii na tenké vrstvě (TLC) a chromatografii na koloně nebo dle principu separace látek na adsorpční chromatografii, chromatografii na iontoměničích, rozdělovací chromatografii, gelovou permeační chromatografii a afinitní chromatografii. [38]

V současnosti jsou nejpoužívanějšími instrumentálními separačními technikami plynová a kapalinová chromatografie. Tyto techniky se od sebe liší skupenstvím mobilní fáze, a tedy i mechanismem separace složek analytu.

3.4.1 Plynová chromatografie

Sloučeniny analyzované pomocí plynové chromatografie jsou nejprve odpařovány a následně eluovány kolonou za pomoci plynné mobilní fáze. Mobilní fáze je zde využívána výhradně jen jako podpurný plyn pomáhající průchodu analyzované látky kolonou (např. H₂, N₂, He). Její interakce s analyzovanou látkou jsou minimální. [40]

Stacionární fáze může být pevná nebo kapalná. Je-li použita pevná stacionární fáze, označuje se tato metoda jako gas-solid chromatography (GSC), při použití kapalně stacionární fáze hovoříme o gas-liquid chromatography (GLC).

Plynová chromatografie je vhodná zejména k separaci těkavých, tepelně stabilních a nepolárních látek. [38]

3.4.2 Kapalinová chromatografie

Kapalinová chromatografie je metoda používaná od začátku 20. století, kdy s její pomocí ruský botanik Tswett separoval rostlinné pigmenty. Rozvoj kapalinové

chromatografie nastal v polovině 20. století, kdy byly mimo jiné položeny základy vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). [37] V současnosti je kapalinová chromatografie jednou z nejběžněji používaných metod analytické chemie. Mobilní fázi je zde kapalina, zatímco stacionární fáze může být kapalina, ale častěji se jedná o pevnou látku.

Kapalinová chromatografie tedy prochází neustálým vývojem. V posledních desetiletích docházelo k postupnému zmenšování částic stacionární fáze, což vedlo k zlepšení separačních vlastností kapalinové chromatografie, ovšem za nutnosti použití vyšších tlaků. Dnes jsou k dispozici HPLC techniky pracující s tlaky kolem 40 MPa [39], ale také techniky, jako je například UPLC, kde jsou tlaky podstatně vyšší, do 100 MPa, což umožňuje účinnější separaci [41].

Kapalinová chromatografie využívá hned několik mechanismů separace:

- Adsorpční
- Rozdělovací
- Iontové výměnná
- Vylučovací

Přičemž uvedené mechanismy se často prolínají a mnohdy není možné začlenit chromatografickou techniku pouze do jedné kategorie. [37, 38]

Kapalinovou chromatografii lze dělit také na základě eluce vzorku na izokratickou, při níž je složení mobilní fáze po celou dobu analýzy konstantní a gradientovou, při níž se složení s časem mění. Gradientová eluce je v současnosti využívána při HPLC a UPLC analýzách. [37]

3.4.2.1 HPLC

HPLC, neboli vysoko-účinná kapalinová chromatografie je technika založená na separaci látek za zvýšeného tlaku. Zatímco v případě plynové chromatografie interagovaly analyty pouze se stacionární fází, v případě HPLC dochází k interakcím mezi analytem a stacionární i mobilní fází. Mechanismus separace látek pomocí HPLC je založen na disperzních silách nacházejících se mezi molekulami analytu, které nemají žádné trvalé dipóly ani u nich dipóly nemohou vzniknout. Adsorpce k stacionární fázi je založena na polárních interakcích mezi touto fází a analytem. [38, 39]

HPLC se vyznačuje použitím vysokých tlaků (cca 40 MPa), které umožňují urychlit průběh analýzy. Vyšší tlak s sebou ovšem přináší vyšší nároky na kvalitu přístroje a chromatografických kolon, které musí být těmto tlakům přizpůsobené. [40] Klasický

kapalinový chromatograf určený pro HPLC má několik hlavních částí, které jsou popsány níže:

- **Autosampler**

HPLC analýza probíhá v uzavřeném systému, který je z velké části zautomatizovaný a propojený s počítačem obsahujícím software pro jeho ovládání. Pro odběr vzorku se u většiny přístrojů využívá tzv. **autosampler**, který automaticky odebere nadefinovaný objem a dokáže zpracovat velké množství vzorků s téměř 100% spolehlivostí. [42]

- **Systém pump**

Jednou z nejdůležitějších součástí kapalinového chromatografu pro HPLC je systém pump, na něž jsou kladeny vysoké nároky. Pumpy musí být schopny vytvořit tlak více než 40 MPa a umožňovat široké rozpětí rychlosti průtoku (0,05 – 10 ml/min). Důležité je, aby nedocházelo k pulzům a tok kapaliny byl plynulý. [42]

- **Kolony pro HPLC**

Kolony pro HPLC bývají vyrobeny z plastu nebo oceli a jsou naplněny stacionární fází, která je pro daný typ kolony specifická. Jednotlivé kolony se liší také dalšími parametry, jako je délka (běžně se pohybující od 5 do 30 cm) [40], velikostí částic sorbentu a vnitřním průměrem.

Stacionární fáze u HPLC kolon je velmi variabilní a její složení se liší zejména podle výrobce a typu analytů, pro jejichž separaci je určena. [39] Stacionární fázi mohou být např. částice (polymery, krystaly, silikagel) nebo monolity. Současný trend vývoje kapalinové chromatografie směřuje k stále lepším vlastnostem sorbentu, optimalizuje se například velikost a tvar použitých částic, což s sebou přináší zvýšení účinnosti separace.

Chromatografické kolony pro HPLC jsou drahé a vzhledem ke stále menším vnitřním průměrům, jsou stále náchylnější k ucpávání. Proto se velmi často využívají filtry a předkolony, které zabraňují vstupu nečistot do analytické kolony a jejímu případnému poškození. [40]

- **Detektory (Detectors)**

Pro vyhodnocení výsledků chromatografické analýzy se využívají různé druhy detektorů, které poskytují data pro sestavení chromatogramů. Pokud došlo k detekci a separaci několika látek, na chromatografickém záznamu jsou patrné píky odpovídající

jednotlivým látkám. Tyto látky jsou řazeny dle svého retenčního času a na záznamu jdou chronologicky za sebou podle toho, jak se vylučovaly z kolony.

Běžnými typy HPLC detektorů jsou například UV detektor využívající princip spektroskopie v UV oblasti, PDA detektor využívající také princip spektroskopie, ale při vlnových délkách od 190 do 990 nm [43], fluorescenční detektor měřící emisi světla vzorkem po jeho ozáření a elektrochemický detektor [44].

V současnosti bývají detektory čím dál častěji nahrazovány hmotnostními spektrometry, které dokážou analyzovat jednotlivé látky na základě jejich molekulární hmotnosti a náboje. [38, 40]

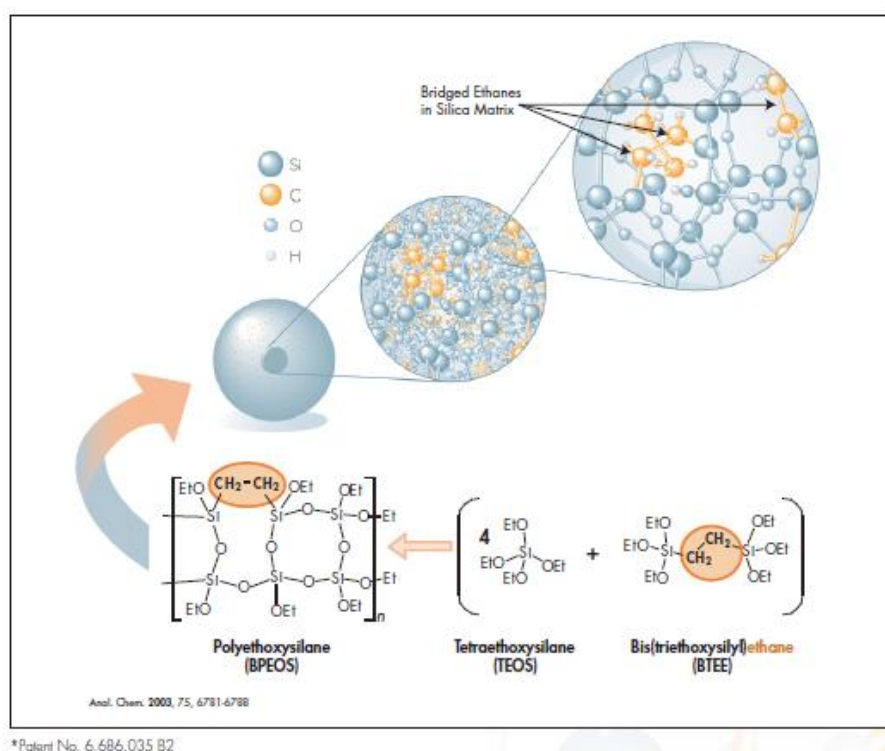
3.4.2.2 UHPLC

HPLC patří mezi nejrozšířenější separační techniky a od 50. let 20. století prošla různými modifikacemi. Obecně se postupuje směrem k zlepšení separačních vlastností a zvýšení účinnosti. Toho je dosahováno například snižováním velikosti částic sorbentu kolon, které s sebou ovšem přináší horší průchodnost mobilní fáze skrz kolonu. Aby bylo dosaženo optimálního průtoku mobilní fáze, je nutné zvýšit tlak, z původních 40 MPa využívaných v HPLC až na 100 MPa. Kapalinová chromatografie využívající takto vysokých tlaků a malých částic sorbentu se označuje jako **UHPLC**. [41]

UHPLC analýza vyžaduje speciální přístroje a kolony, které jsou schopné odolávat i vysokému tlaku. První UHPLC přístroj, který byl zaveden na trh v roce 2004 firmou Waters byl systém UPLC Acquity. Pro UPLC byly vyvinuty speciální chromatografické kolony. Tyto kolony obsahují částice o velikosti 1,7 až 1,8 μm a jsou vytvořeny pro tlak analýzy až 100 MPa. Vývoj chromatografických kolon neustále probíhá a směřuje k stále dokonalejším tvarům částic sorbentu a zlepšení jejich separačních vlastností.

Jednou z nových technologií využívanou pro UPLC separaci je technologie hybridní částice **BEH** (Ethylene Bridged Hybrid). BEH částice se vyznačují vysokou vnitřní stabilitou, což jim umožňuje provádět separaci v širokém spektru pH (od 1 do 12), a jsou tedy ideální zejména pro vývoj nových analytických metod. [45] Schéma stacionární fáze obsahující BEH částice je zobrazeno na obrázku č. 2.

Obr. č. 2: Schéma stacionární fáze obsahující částice BEH [46]



Dalšími částicemi vhodnými pro UPLC separaci jsou částice CSH (Charged Surface Hybrid), které jsou vylepšením BEH technologie. CSH částice se vyznačují nízkou úrovní povrchového náboje, což zlepšuje jejich separační vlastnosti zejména pro separaci bazických látek. Přitom se ale zachovává mechanická a také chemická stabilita typická pro technologii BEH. [47]

3.4.2.3 UPC²

Důkazem, že vývoj chromatografických metod jde neustále kupředu je novinka z roku 2012 tzv. Ultra Performance Converge Chromatography (UPC²). UPC² poskytuje exponenciální nárůst výkonu a selektivity analýzy a patří mezi nejmodernější separační techniky. Technika UPC v sobě kombinuje vlastnosti kapalinové a plynové chromatografie a tyto vlastnosti navíc rozšiřuje, aby bylo dosaženo co nejlepších vlastností separace.

Možnosti separace rozšiřuje zejména použití stlačeného CO₂ jako mobilní fáze. Oxid uhličitý nabízí řadu výhod oproti kapalně mobilní fázi nebo nosným plynům používaným v GC. Hlavními výhodami použití CO₂ je vyšší difuzní rychlost a možnost separace při nižších teplotách než v případě HPLC.

Nové složení mobilní fáze spolu s malými částicemi sorbentů chromatografických kolon umožňuje vylepšovat rozlišovací schopnosti a selektivitu systému UPC². Jednou

z výhod UPC² je pak použití stlačeného CO₂, který je na rozdíl od organických rozpouštědel poměrně levný, což umožňuje snížit náklady na analýzu velkého množství vzorků. [48]

UPC² analýza je vhodná zejména pro hydrofobní sloučeniny, lipidy, polymery a také tepelně labilní vzorky. [49]

3.5 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je metoda analytické chemie pomocí níž lze stanovit molekulovou hmotnost látek, využívá se jak pro kvalitativní, tak pro kvantitativní analýzu látek. Hmotnostní spektrometrie se používá například v biotechnologických, klinických, farmaceutických a toxikologických testech, ale také v řadě dalších vědních oborů. [50]

Hmotnostní spektrometr se skládá ze tří hlavních částí: **iontový zdroj**, **analyzátor** a **detektor**. Vzorek vstupuje nejprve do iontového zdroje, kam je nastříknut velmi tenkou kapilárou a okamžitě ionizován pomocí elektrického napětí. Tyto ionty následně putují do analyzátoru, kde jsou separovány na základě své hmotnosti a náboje.

Při zkoumání vlastností určitých molekul, případně při analýze neznámých vzorků se často využívá kolize a následné fragmentace původních (prekursorových) iontů na ionty produktové. Fragmentace je pro každou molekulu specifická a lze ji díky tomu identifikovat. [51]

Hmotnostní spektrometrie se velmi často propojuje s plynovou a kapalinovou chromatografií, při níž jsou jednotlivé složky vzorku rozděleny a následně detekovány pomocí hmotnostního spektrometru. V současnosti je ve výzkumných laboratořích hojně využíváno zejména propojení MS a UPLC, které bylo použito i v rámci této bakalářské práce.

3.5.1 Ionizace vzorku

Prvním krokem analýzy látek pomocí hmotnostní spektrometrie je jejich ionizace. Ionizační techniky využívané MS se dají rozdělit na tzv. **měkké** a **tvrdé**. Tvrdé ionizační techniky jsou starší a patří sem např. ionizace nárazem elektronů (EI). Při tvrdé ionizaci dochází k rozsáhlé fragmentaci původní molekuly, což u mnoha látek znemožňuje přesné určení jejich molekulové hmotnosti (Mr).

Novějším a šetrnějším způsobem ionizace jsou tzv. měkké ionizační techniky, mezi něž patří např. ionizace elektrosprejem (ESI). Díky šetrnosti ionizace jsou měkké ionizační techniky využívány v systémech, kdy je hmotnostní spektrometrie propojená s kapalinovou chromatografií (HPLC, UPLC) a hmotnostní spektrometr zde slouží jako vysoce citlivý

detektor. Výhodou šetrné fragmentace měkkých ionizačních technik je také možnost následného stanovení M_r látek, pro něž je tvrdá ionizace nevhodná. [52]

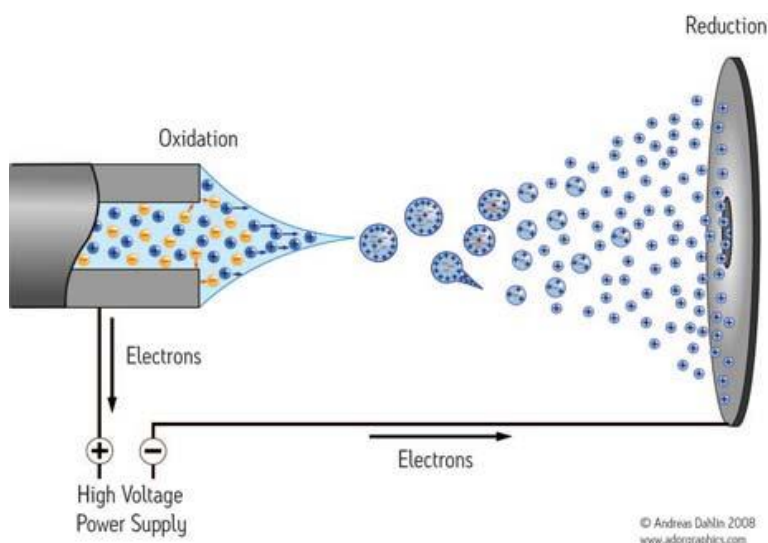
Nízká ionizace měkkých ionizačních technik je sice výhodná pro určení molekulových hmotností látek, ovšem pro zjištění struktury těchto látek příliš vhodná není. Dostatečné fragmentace však lze docílit použitím tandemových hmotnostních analyzátorů, např. trojitých kvadrupólů, u nichž slouží prostřední kvadrupól jako kolizní cela, v níž vznikají dceřiné ionty z parentního iontu. [52, 53]

3.5.1.3 ESI (ionizace elektrosprejem)

Ionizace elektrosprejem (ESI) je ionizační desorpční metoda vhodná k ionizaci pevných i kapalných vzorků a umožňuje ionizaci i tepelně nestabilních vzorků. Před samotnou ionizací je vhodné vzorek přechistit. Využívá-li se propojení kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie, čištění vzorku probíhá při průchodu kapalinovým chromatografem.

ESI je typ ionizace molekul za atmosférického tlaku (API). Ionizuje molekuly analytu pomocí tenkých kapilár, jejichž špička je pod vysokým napětím (3-5 kV). Vzorek tedy prochází kapilárou a mění se v plyn drobných nabitých kapiček, z nichž se postupně odpařují molekuly rozpouštědla. Díky tomu se na povrchu kapek zvyšuje elektrické napětí. Molekuly analytu tvořící každou kapičku nesou stejný náboj, a jsou vzájemně odpuzovány. Ve chvíli kdy tato odpuzivá síla překročí hranici povrchového napětí kapky, dojde ke kulombické explozi a rozdělení na jednotlivé ionty. Schéma ionizace elektrosprejem je zobrazeno na obrázku č. 3.

Obr. č. 3: Schéma ionizace elektrosprejem [54]



Ionizace elektrosprejem se obvykle využívá k určení molekulové hmotnosti širokého spektra látek od malých molekul až po proteiny a další biologické makromolekuly. Je vhodná pro polární, těkavé a tepelně nestabilní analyty. Na rozdíl od chemické ionizace lze ESI využít i pro ionizaci velkých molekul, proto se hojně využívá pro analýzu léčiv a přírodních látek. [39, 55]

3.5.2 Analyzátor

Hlavní součástí hmotnostního spektrometru je analyzátor, který zodpovídá za separaci iontů. Oddělení iontů probíhá ve vakuu a děje se na základě poměru hmotnosti a náboje iontu (m/z). V současnosti se používá celá řada analyzátorů. Mezi nejčastější patří kvadrupóly, TOF (Time-of-light) analyzátoři, magnetické a iontové pasti. Každý z těchto analyzátorů má své specifické vlastnosti, specifickou přesnost a rozlišení. Mohou mít také různou kompatibilitu s danými ionizačními metodami. [56]

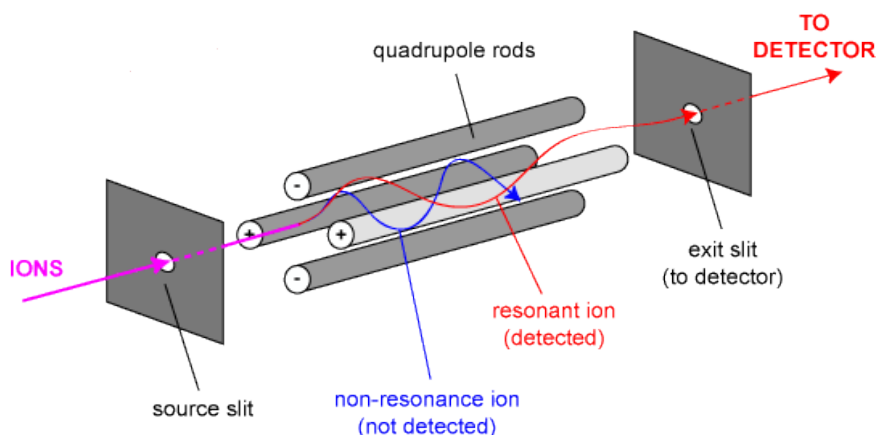
Pokud se provádí MS analýza, při níž se využívá více než jeden analyzátor, jedná se o **tandemovou hmotnostní spektrometrii** (MS-MS). MS-MS analýza vhodná pro strukturní a sekvenční analýzy, přičemž analyzátoři nemusí být stejného typu, což ovlivňuje jejich detekční vlastnosti. Kombinací jednotlivých typů lze dosáhnout mnohem lepších výsledků, než při použití jednoho typu analyzátoru. Velmi oblíbené jsou například použití dvou kvadrupólových analyzátorů nebo kombinace kvadrupólového analyzátoru s magnetickým, případně TOF analyzátořem. [57]

3.5.2.1 Kvadrupólový analyzátor

Kvadrupólový analyzátor je tvořen čtyřmi paralelními tyčemi, které jsou uloženy rovnoběžně se směrem, kterým zde proudí ionty. Na všechny tyče je vloženo stejnosměrné napětí, přičemž dvě protilehlé mají záporný náboj a zbylé dvě kladný. Ionty přicházející z ionizátoru jsou vedeny do středu těchto tyčí a pouze ionty s daným poměrem hmoty a náboje (m/z) jsou vedeny skrz analyzátor dále do detektoru. Pokud se m/z liší, ionty nemají stabilní trajektorii a neprocházejí dále.

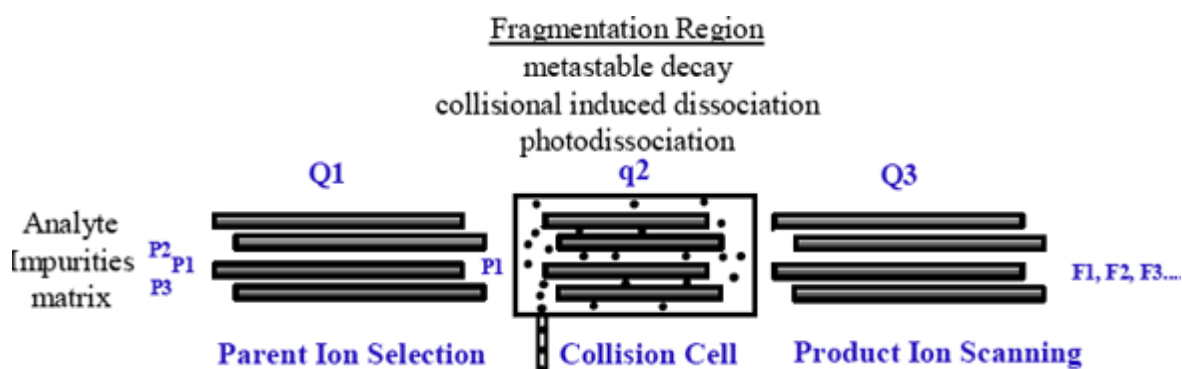
Změnou stejnosměrného napětí procházejícího tyčemi lze regulovat průchod iontů analyzátořem. Tímto způsobem lze tedy směs iontů postupně rozdělit na základě jejich odlišné m/z . [58] Schéma kvadrupólového analyzátoru je zobrazeno na obrázku č. 4.

Obrázek č. 4 : Schéma kvadrupólového analyzátoru [59]



Speciálním typem kvadrupólového analyzátoru je tzv. **trojitý kvadrupól**. Trojitý kvadrupól je tvořen třemi po sobě jdoucími kvadrupólovými analyzátory, přičemž prostřední (Q2) z nich slouží jako kolizní cela. První kvadrupól (Q1) propouští vybrané ionty na základě jejich poměru m/z , v druhém kvadrupólu (Q2) dochází ke kolizi se vzácnými plyny, nejčastěji s argonem, přičemž vznikající produktové fragmenty původního iontu, které jsou analyzovány ve třetím kvadrupólu (Q3). Díky tomu, že je analyzován nejen původní iont, ale také jeho fragmenty, dosahuje se vysoké citlivosti metody. [53, 58] Schéma trojitého kvadrupólu viz obrázek č. 5.

Obrázek č. 5: Schéma trojitého kvadrupólu [60]



3.5.3 Detekce iontů

Detektor je poslední částí hmotnostního spektrometru (pokud nepočítáme počítačovou jednotku, která umožňuje zpracovávat získané výsledky a také nastavovat jednotlivé parametry MS analýzy). Detektor slouží k sledování iontů proudících z analyzátoru. Dochází v něm k amplifikaci signálu a následnému zaznamenání výsledků ve formě hmotnostních spekter. [56]

Základními typy detektorů jsou fotonásobiče, elektronové násobiče a mikrokanálové desky. [55]

4. Materiál a metodika

4.1 Optimalizace podmínek UPLC

4.1.1 Přístroje a testované kolony:

Přístroje:

- Acquity™ Ultra Performance LC (Waters) + 2996 PDA detector (Waters)

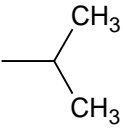
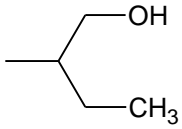
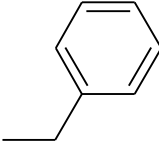
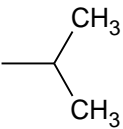
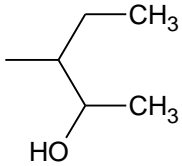
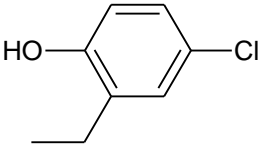
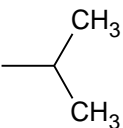
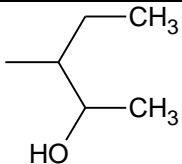
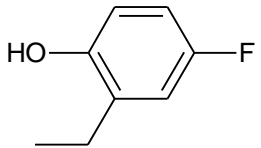
Testované kolony:

- Acquity BEH C18, 2,1 x 100 mm; 1,7μm (Waters)
- Acquity BEH C18 Shield, 2,1 x 150 mm; 1,7μm (Waters)
- Acquity CSH C18, 2,1 x 100 mm; 1,7μm (Waters)
- Cogent Diamond, 2,1 x 150 mm; 4μm (MicroSolv)
- VisionHT C18, 2,0 x 50 mm; 1,5μm (Grace)

4.1.2. Chemikálie a testované látky:

Testované látky: BA-09, BA-10, BA-11, BA-12, BP-14, roscovitin (LRR)

Tabulka č. 1: *Strukturní vzorce testovaných látek BA-09, BA-10, BA-11, BA-12, BP-14, roscovitin*

Látka	R ₁	R ₂	R ₃
Roscovitin			
BA-09			
BA-10			

BA-11			
BA-12			
BP-14			

Chemikálie a roztoky:

- Methanol
- Acetonitril
- 15mM-HCOONH₄ (pH 4)
- 0,1% kyselina mravenčí ve vodě
- 0,1% kyselina mravenčí v methanolu
- 0,1% kyselina mravenčí v acetonitrilu

4.1.3 Výchozí chromatografické podmínky:

- Průtoková rychlost: 0,25 ml/min
- Objem nástřiku (μl): 10.00
- Teplota kolony: 40°C
- Doba analýzy: 15.00 min
- Mobilní fáze A: 15mM-HCOONH₄ (pH 4)
- Mobilní fáze B: Methanol
- Počáteční podmínky gradientu (A : B): 80 : 20

4.1.4 Postup optimalizace podmínek UPLC

- Testování rozpustnosti vzorků
- Výběr analytické kolony

- Optimalizace složení mobilní fáze

4.2 Optimalizace podmínek MS

4.2.1 Přístroje

- Quattro microTM API (Waters)

4.2.2 Chemikálie a testované látky

Testované látky: BA-11, BA-12, BP-14, roscovitin (LRR)

Chemikálie a roztoky:

- 15 mM HCOONH₄ (pH=4)
- Methanol
- Acetonitril

4.2.3 Postup optimalizace podmínek MS

- Nalezení ideálních podmínek pro MS analýzu látek BA-11, BA-12, BP-14 a roscovitinu zahrnovalo:
 - Hledání vhodných fragmentů pro identifikaci a kvantifikaci a optimalizaci následujících parametrů:
 - Kolizní energie (collision energy)
 - Napětí na kapiláře iontového zdroje (cappilary voltage)
 - Napětí na kóně iontového zdroje (cone voltage)

5. Výsledky

5.1 Optimalizace podmínek UPLC

V této kapitole jsou shrnuty výsledky analýz jednotlivých látek, na základě kterých byly definovány optimální podmínky UPLC separace. Jsou zde uvedeny výsledky analýzy rozpustnosti všech testovaných látek v methanolu/ acetonitrilu, vliv koncentrace rozpouštědla na intenzitu signálu, rozdíly v kvalitě signálu s použitím 6 rozdílných mobilních fází a 5 rozdílných chromatografických kolon a také vliv gradientu na retenční čas jednotlivých látek.

5.1.1 Rozpustnost vzorku

U všech látek (BA-09, BA-10, BA-11, BA-12, BP-14) byla testována rozpustnost ve 100% rozpouštědle. Byly připraveny STD zásobního roztoku o koncentraci 10^{-3} mol/l ve 100% methanolu a acetonitrilu, přičemž všechny testované látky vykazovaly výbornou rozpustnost.

Ze zásobních roztoků o koncentraci 10^{-3} mol/l byly vytvořeny pracovní roztoky o koncentraci 10^{-6} mol/l v 50% a 10% methanolu a acetonitrilu, které byly použity pro analýzu prostřednictvím UPLC a MS. Rozpustnost jednotlivých látek je shrnuta v tabulce č. 2.

Tabulka č. 2: Rozpustnost testovaných látek v methanolu a acetonitrilu

Látka	Methanol		Acetonitril	
	10 %	50 %	10 %	50 %
BA-09	+	+	+	+
BA-10	+	+	+	+
BA-11	+	+	-	-
BA-12	+	+	-	-
BP-14	+	+	-	-
Roscovitin	+	+	+	+

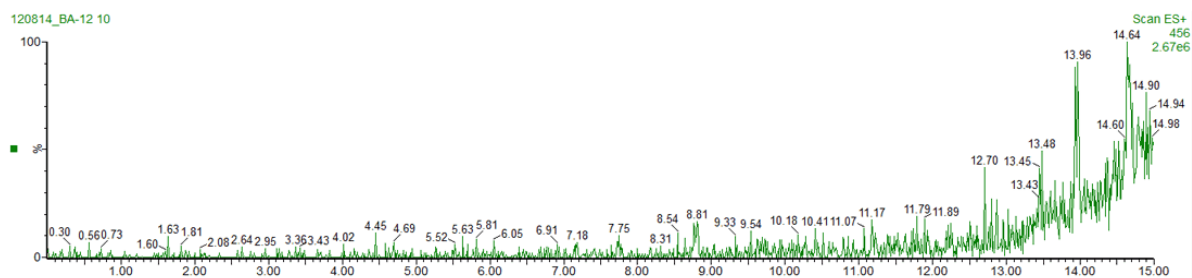
Vysvětlivky: (+) zcela rozpuštěno, (-) částečně rozpuštěno

5.1.2 Výběr kolony a složení mobilní fáze (MF)

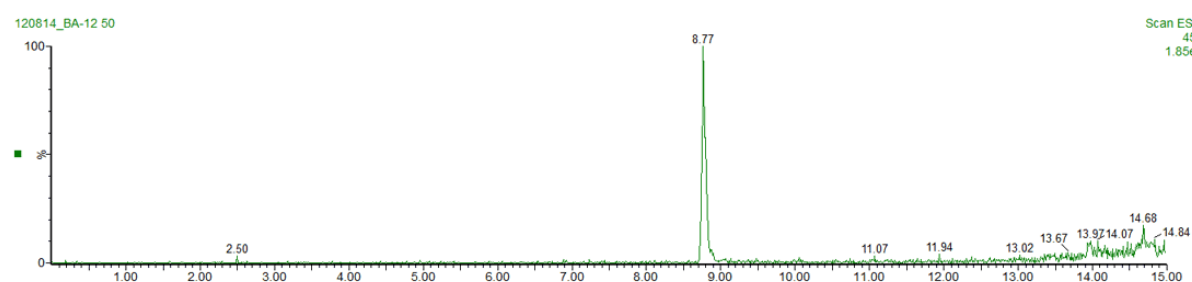
V první sérii měření (s použitím kolony Acquity BEH C18) byly použity vzorky všech testovaných látek v 10% a 50% methanolu ($c = 10^{-6}$ mol/l; objem nástřiku: 10 μ l). Následně byly porovnány získané chromatogramy. Rozdíly v chromatografických záznamech jsou ilustrovány na příkladu látky BA-12 (viz obrázky č. 6 a 7) Z tvarů píků, jejich šířky, plochy a odezvy bylo jasně patrné, že jsou pro analýzu mnohem vhodnější vzorky v 50% methanolu.

Obrázek č. 6: Chromatogram látky **BA-12** v 10% MeOH (Kolona Acquity BEH C18, 2,1 x 100 mm; 1,7 μm)

BA-12



BA-12

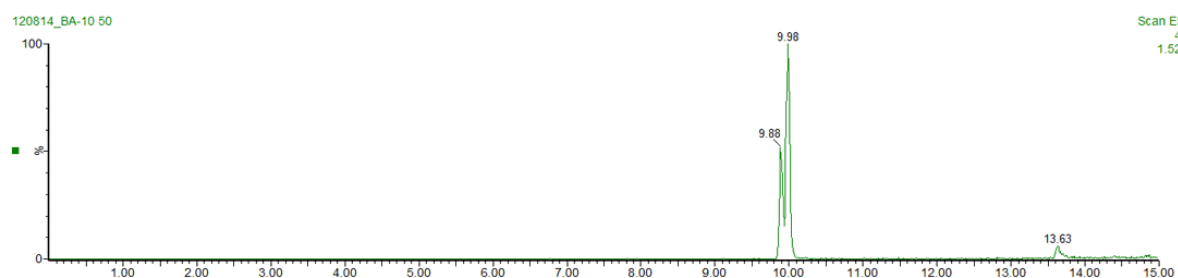


Obrázek č. 7: Chromatogram látky **BA-12** v 50% MeOH (Kolona Acquity BEH C18, 2,1 x 100 mm; 1,7 μm)

Následně byla provedena analýza s identickými podmínkami pro vzorky v 10% a 50% acetonitrilu. Výsledky analýzy potvrdily, stejně jako v případě použití methanolu, že také zde je vhodnější použít vzorky v 50% rozpouštědle. Následně byly srovnány chromatogramy jednotlivých látek s použitím 50 % methanolu a 50 % acetonitrilu. U všech látek byly pozorovány lepší separační vlastnosti s použitím STD v 50% methanolu, u látek BA-09 a BA-10 došlo, na rozdíl od použití 50% acetonitrilu, k částečnému rozdělení jejich izomerů. Na obrázcích č. 8 a 9 lze pozorovat rozdíl v separaci látky BA-10 při použití 50 % methanolu a 50% acetonitrilu.

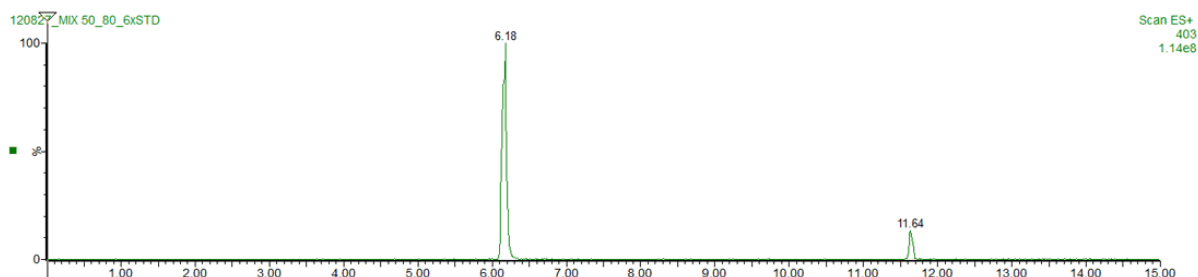
Obrázek č. 8: Chromatogram látky **BA-10** v 50% methanolu (Kolona Acquity BEH C18, 2,1 x 100 mm; 1,7 μm)

BA-10



Obrázek č. 9: Chromatogram látky **BA-10** v 50% ACN (Kolona Acquity BEH C18, 2,1 x 100 mm; 1,7 µm)

BA-10

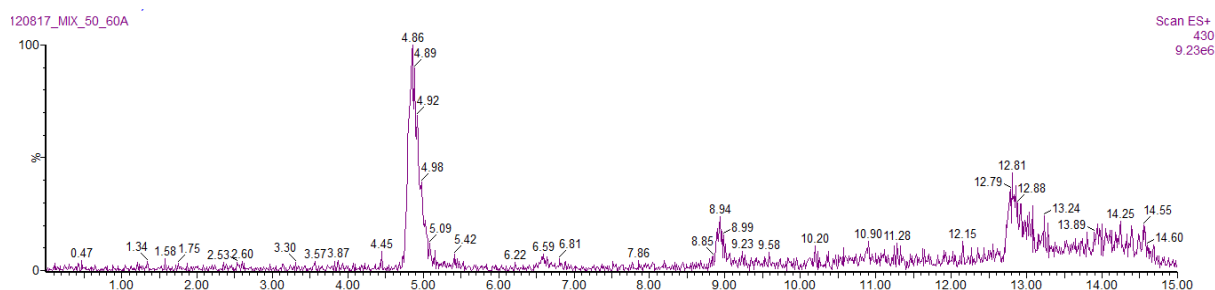


Poté, co byly zhodnoceny výsledky pro kolonu Acquity BEH C18, bylo provedeno měření vzorků v 50% methanolu a 50% acetonitrilu pro zbylé kolony (Acquity BEH C18 Shield, Acquity CSH C18, Cogent Diamond a VisionHT).

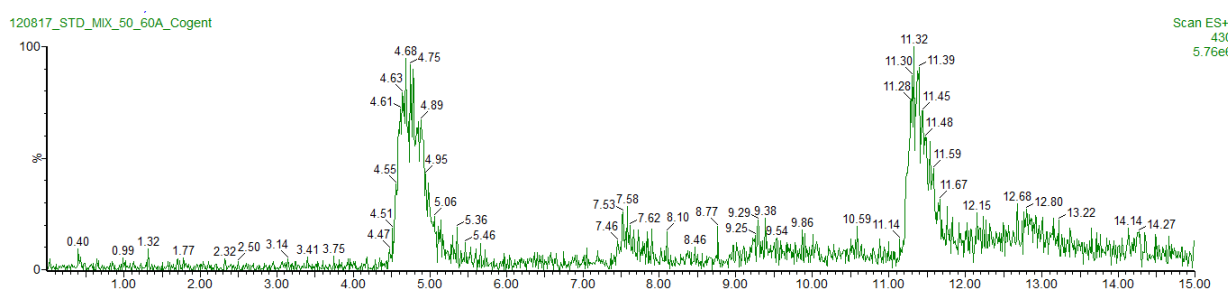
Měření byla prováděna pouze pro vzorky rozpuštěné v 50% rozpouštědle (methanol, ACN- dle použitých vzorků), na základě předešlých výsledků byly vzorky v 10% methanolu a 10% ACN vyloučeny. Kompletní výsledky měření všech testovaných látek na všech testovaných kolonách, s použitím upraveného gradientu eluce, 60 : 40, jsou shrnuty v tabulkách č. 3 až 8 (viz přílohy).

Ze získaných chromatogramů bylo jasně patrné, že kolony VisionHT C18 a Cogent Diamond nejsou pro separaci testovaných látek tak vhodné, jako zbylé kolony. Pro další analýzy byly tedy vybrány kolony **Acquity BEH C18**, **Acquity CSH C18** a **Acquity BEH C18 Shield**. Srovnání kvality chromatografických záznamů kolon VisionHT, Cogent Diamond a Acquity BEH C18 Shield je zobrazeno na příkladu látky BA-11 v 50% methanolu na obrázcích č. 10, 11 a 12.

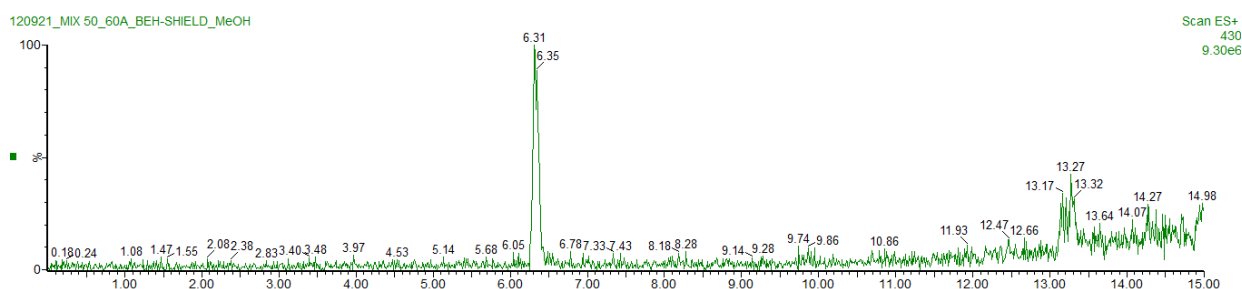
Obrázek č. 10: Chromatogram látky **BA-11** v 50% methanolu (Kolona VisionHT C18, 2,0 x 50 mm; 1,5 µm)



Obrázek č. 11: Chromatogram látky **BA-11** v 50% methanolu (Kolona Cogent Diamond, 2,1 x 150 mm; 4 μ m)



Obrázek č. 12: Chromatogram látky **BA-11** v 50% methanolu (Kolona Acquity BEH C18 Shield, 2,1 x 150 mm; 1,7 μ m)



Pro lepší představu o vlivu mobilní fáze na separaci testovaných látek, byla provedena měření s využitím dalších čtyř mobilních fází:

- A: 0,1% kyselina mravenčí ve vodě; B: 0,1% kyselina mravenčí v methanolu
- A: 0,1% kyselina mravenčí ve vodě; B: 0,1% kyselina mravenčí v acetonitrilu
- A: 0,1% kyselina mravenčí ve vodě; B: methanol
- A: 0,1% kyselina mravenčí ve vodě; B: acetonitril

S těmito mobilními fázemi byla provedena analýza vzorků v 50% methanolu a 50% acetonitrilu s použitím tří vybraných kolon. Výsledky těchto měření s použitím všech mobilních fází jsou shrnuty v tabulkách č. 9 až 14 (viz přílohy). Ze získaných dat bylo možné určit, že pro separaci látek BA-09 a BA-10 je nejvhodnější kolona Acquity BEH C18 Shield a mobilní fáze složená z vodného roztoku 0,1% kyseliny mravenčí (FA) a methanolu. Pro zbylé látky (BA-11, BA-12, BP-14 a roscovitin) byla nejvhodnější kolona Acquity BEH C18 a mobilní fáze složená z 15 mM HCOONH₄ (pH= 4) a methanolu.

5.1.3 Optimalizace složení a gradientu MF

Ve všech provedených UPLC analýzách byla využívána gradientová eluce mobilní fáze. Počáteční podmínky gradientu byly nastaveny na 80 % MF A a 20 % MF B, přičemž ve 14-té minutě přecházel gradient do 100 % MF B a poté zpět na počáteční hodnoty. Při analýzách je žádoucí, aby se všechny separované látky eluovaly z kolony před dosažením maxima gradientu.

Výchozí hodnotou, která byla testována jako první, byl poměr 30 : 70 (15mM HCOONH₄ : 100% methanol), dále se pak testovaly poměry 40 : 60, 50 : 50, 60 : 40, 65 : 35, 70 : 30 a 80 : 20 se stejnými látkami. Jako ideální se jevil poměr 65 : 35, při němž byl retenční čas poslední uvolňované látky 5,63 min. Při nastavení 2 minut na rekondiaci podmínek bylo tedy možné snížit délku analýzy na 8 minut. Souhrnný přehled vlivu poměru MF 1 a MF 2 na retenční časy testovaných látek viz tabulka č. 15.

Tabulka č. 15: *Kompletní přehled vlivu poměru MF A a MF B na retenční čas [min] testovaných látek*

Látka	30 : 70	40 : 60	50 : 50	60 : 40	65 : 35	70 : 30	80 : 20
BA-09	2,66	3,93	5,05	5,85	5,63	6,42	10,68
BA-10	2,17	3,24	4,38	5,29	5,18	5,92	9,98
BA-11	1,34	1,81	2,69	3,69	3,87	4,5	7,70
BA-12	1,58	2,34	3,43	4,40	4,45	5,15	8,77
BP-14	1,39	1,95	2,93	3,94	4,08	4,76	8,12
Roscovitin	2,16	3,15	4,26	5,18	5,12	5,85	9,78

5.2 Optimalizace podmínek hmotnostní spektrometrie (MS)

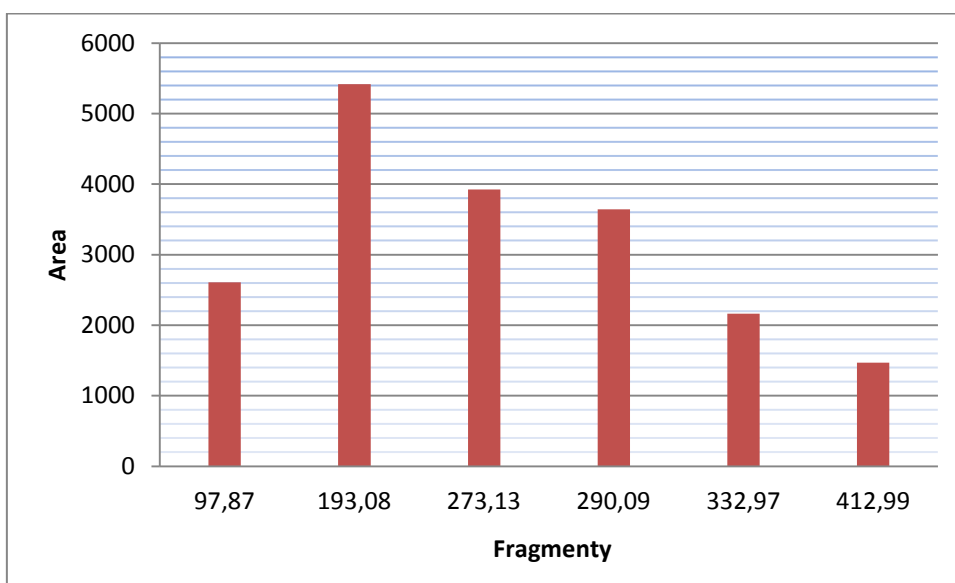
V této kapitole jsou uvedeny výsledky optimalizace podmínek MS, konkrétně se jednalo o optimalizaci napětí na kapiláře (cappillary voltage), napětí na kóně (cone voltage), nalezení MRM přechodů a s nimi související hodnoty kolizní energie (coll. energy) pro látky BA-11, BA-12, BP-14 a roscovitin.

5.2.1 MRM přechody a optimalizace kolizní energie

Optimalizace MS podmínek metody sloužící k analýze látek BA-11, BA-12, BP-14 a roscovitin zahrnovala v první řadě nalezení vhodných MRM přechodů pro jednotlivé látky a také optimalizaci kolizní energie. MRM přechody byly zjištěny pomocí měření v pozitivním módu Daughter scan (ESI⁺).

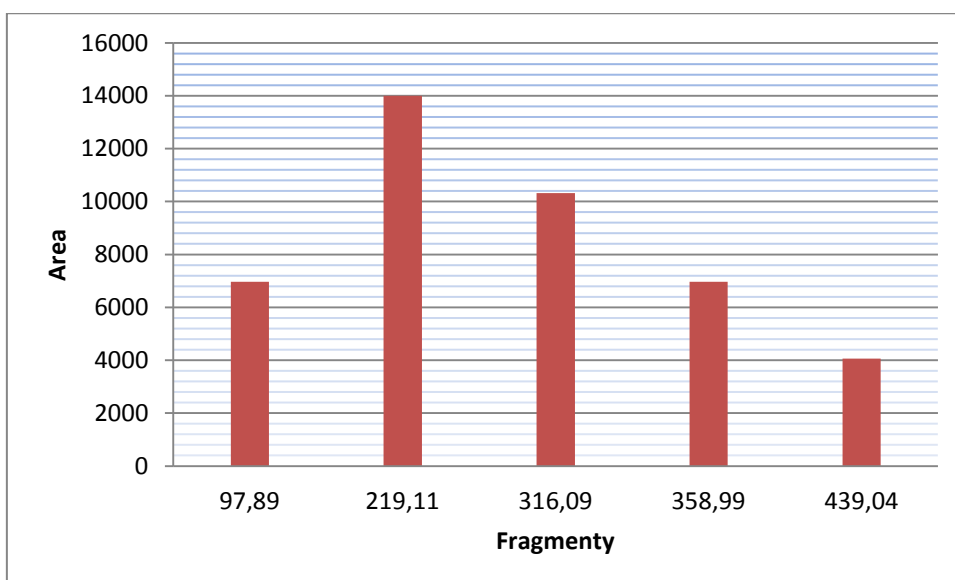
Pro látku **BA-11 (M_w= 430)** bylo detekováno 6 produktových fragmentů prekurzorového iontu, které jsou zobrazeny v grafu č. 1, včetně ploch píků. Pro následné analýzy látky BA-11 byly vybrány 2 fragmenty s největší plochou, tj. fragmenty s M_w= 193,213 a 273,13.

Graf č. 1: *Fragmenty látky BA-11*



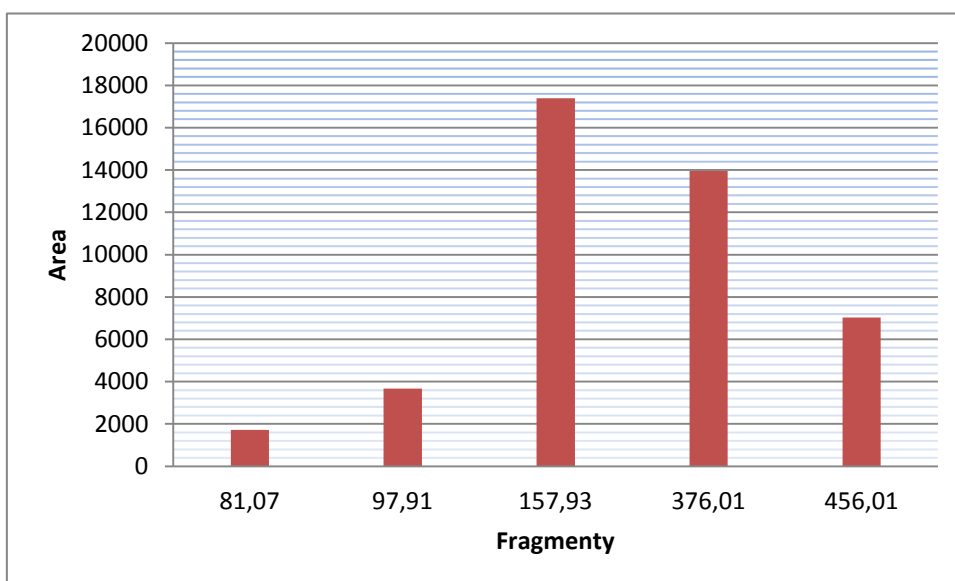
Pro látku **BA-12** ($M_w = 456$) bylo detekováno 5 produktových fragmentů. Jednotlivé fragmenty a jejich plochy píků jsou shrnuty v grafu č. 2. Nejvýraznějšími byly fragmenty s $M_w = 219,11$ a $316,09$.

Graf č. 2: *Fragmenty látky BA-12*



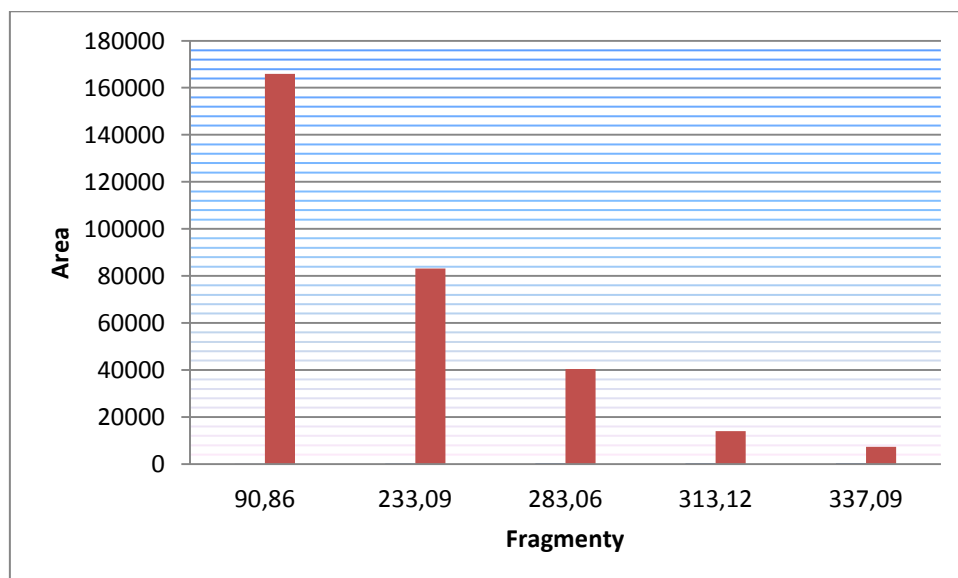
Pro látku **BP-14** ($M_w = 473$) bylo detekováno 5 produktových fragmentů, které jsou zobrazeny v grafu č. 3. V tomto grafu jsou zobrazeny také plochy píku jednotlivých fragmentů, na základě kterých byly zvoleny dva nejvýraznější fragmenty pro následující analýzy – fragmenty o $M_w = 157,93$ a $376,06$.

Graf č. 3: *Fragmenty látky BP-14*



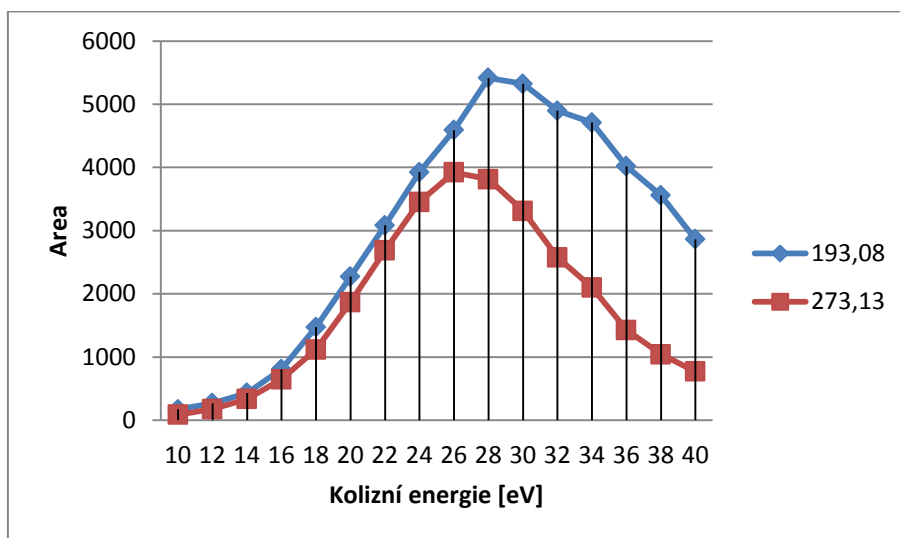
Pro látku **roscovitin** ($M_w = 355$) bylo detekováno 5 fragmentů. Na základě plochy píku těchto fragmentů byly vybrány dva fragmenty s největší plochou, tj. fragment s $M_w = 90,86$ a $233,09$. Přehled ploch píku jednotlivých fragmentů roscovitinu jsou zobrazeny v grafu č. 4.

Graf č. 4: *Fragmenty látky roscovitin*

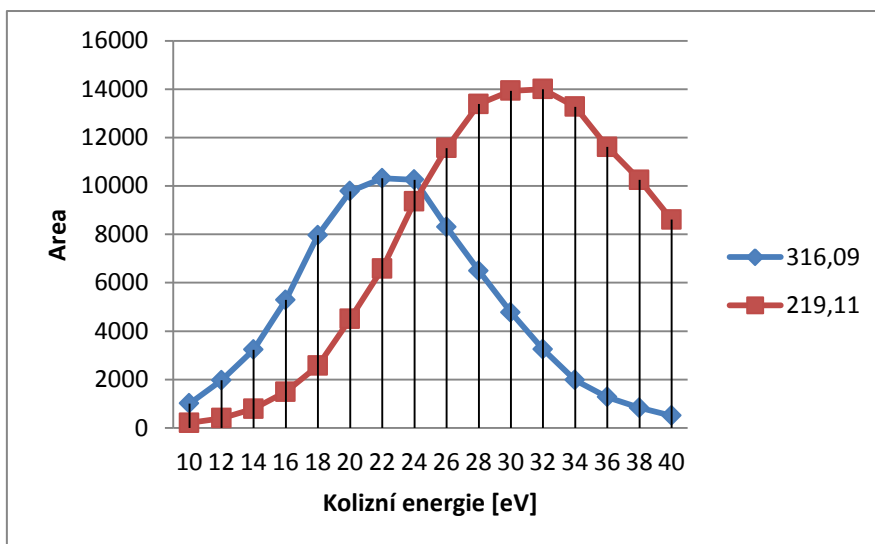


Současně s MRM přechody byla optimalizována také hodnota kolizní energie pro látku BA-11, BA-12, BP-14 a roscovitin. Grafy č. 5 až 8 zobrazují závislost kolizní energie na ploše píku pro nejvýraznější fragmenty testovaných látek. Pro každou látku byly testovány vždy dva fragmenty (kvantifikační a konfirmační).

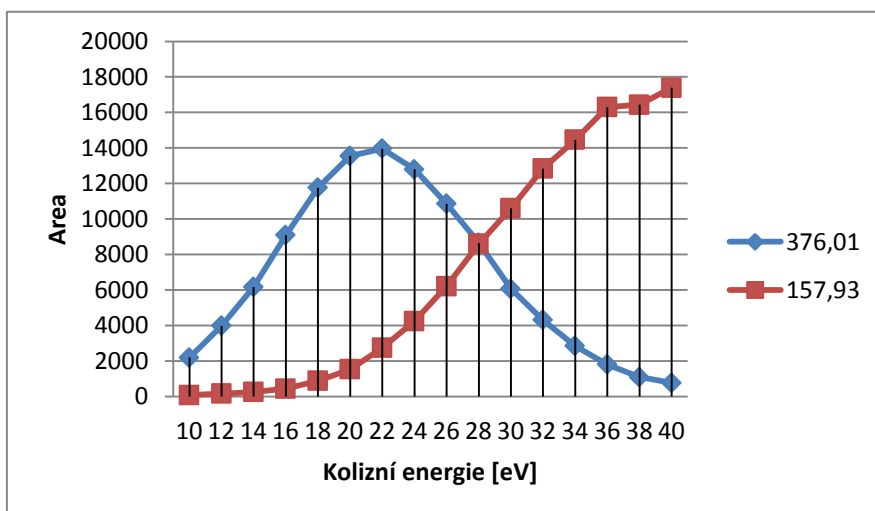
Graf č. 5: Optimalizace kolizní energie pro fragmenty 193,08 a 273,13 látky BA-11



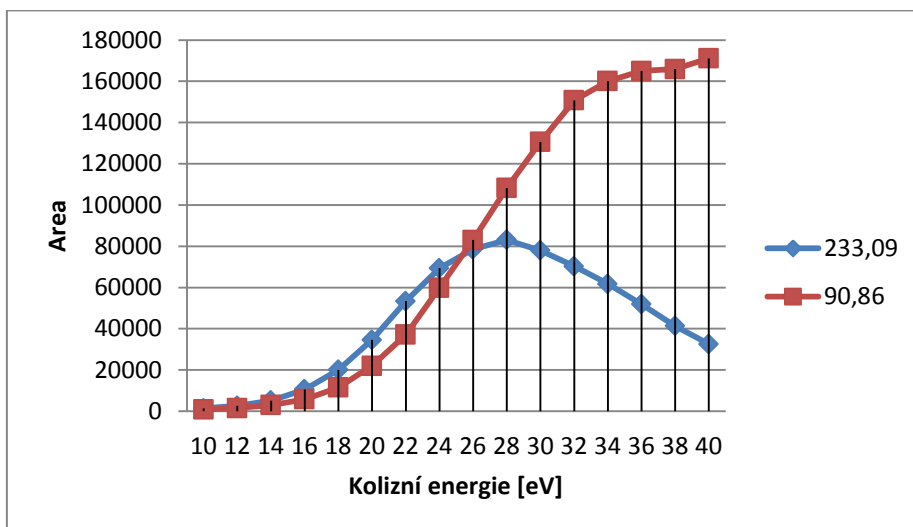
Graf č. 6: Optimalizace kolizní energie pro fragmenty 219,11 a 316,09 látky BA-12



Graf č. 7: Optimalizace kolizní energie pro fragmenty 157,93 a 376,01 látky BP-14



Graf č. 8: Optimalizace kolizní energie pro fragmenty 90,86 a 233,09 látky roscovitin



Přehled 5 nejvýraznějších fragmentů testovaných látek, včetně jejich optimální hodnoty kolizní energie je shrnut v tabulce č. 16.

Tabulka č. 16: Optimalizace kolizní energie a MRM přechody

Hmota parentálního iontu [M+H] ⁺	Fragment	Kolizní energie [eV]	Plocha
Roscovitin 355	90,86	40 V	165907,13
	233,09	28 V	83074,07
	283,06	24 V	40442,25
	313,12	22 V	13989,36
	337,09	22 V	7293,27
BA-11 430	97,87	28 V	2606,91
	193,08	28 V	5417,09
	273,13	26 V	3922,59
	290,09	22 V	3640,67
	332,97	20 V	2162,35
BA-12 455	412,99	18 V	1468,33
	97,89	30 V	6961,03
	219,11	32 V	13997,08
	316,09	22 V	10317,36
	358,99	22 V	6964,07
BP-14 473	439,04	20 V	4066,69
	81,07	38 V	1713,73
	97,91	30 V	3662,14
	157,93	40 V	17394,89
	376,01	22 V	13960,88
456,01	22 V	7022,23	

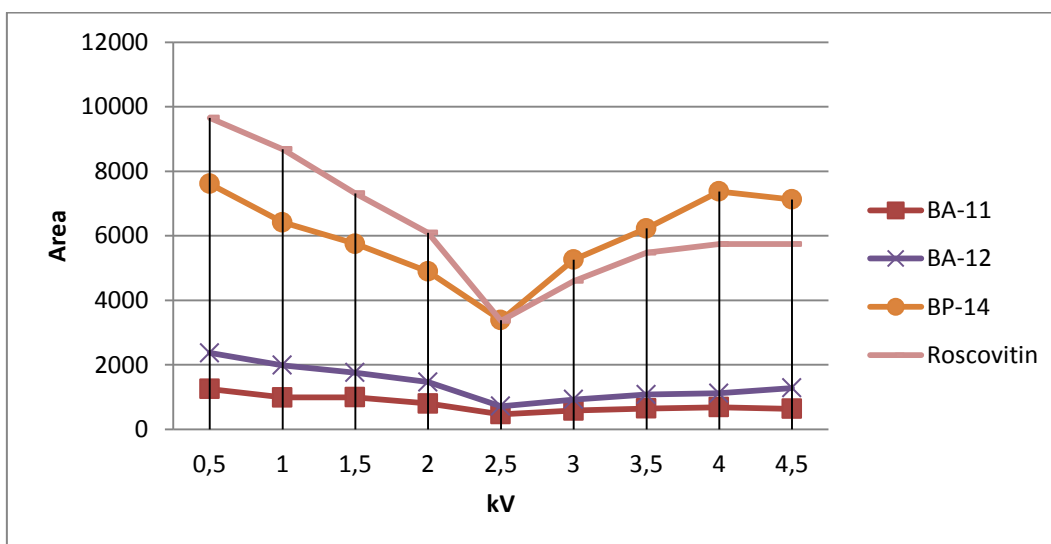
5.2.2 Optimalizace napětí na kapiláře

Po nalezení vhodných MRM přechodů jednotlivých látek bylo nutné optimalizovat napětí na kapiláře (Cap voltage) pro nejvýraznější fragment, přičemž ostatní parametry MS byly konstantní. Pro analýzu bylo zvoleno rozpětí Cap voltage od 0,5 kV po 4,5 kV. Pro všechny látky byly získány nejlepší výsledky při použití napětí na kapiláře **0,5 kV**. Kompletní výsledky analýzy jednotlivých látek jsou uvedeny v tabulce č. 17 a graficky jsou znázorněny na grafu č. 9.

Tabulka č. 17: Optimalizace napětí na kapiláře pro látky BA-11, BA-12, BP-14 a roscovitin

Capillary Voltage [kV]	Plocha			
	BA-11 (193,08)	BA-12 (219,11)	BP-14 (157,93)	Roscovitin (90,86)
0,5	1252	2371	7610	9654
1,0	988	1987	6419	8684
1,5	994	1757	5750	7313
2,0	802	1468	4892	6095
2,5	468	718	3385	3360
3,0	583	925	5261	4595
3,5	650	1080	6229	5472
4,0	688	1119	7375	5744
4,5	638	1281	7125	5741

Graf č. 9: Optimalizace napětí na kapiláře pro látky BA-11, BA-12, BP-14 a Roscovitin



5.2.3 Optimalizace napětí na kóně

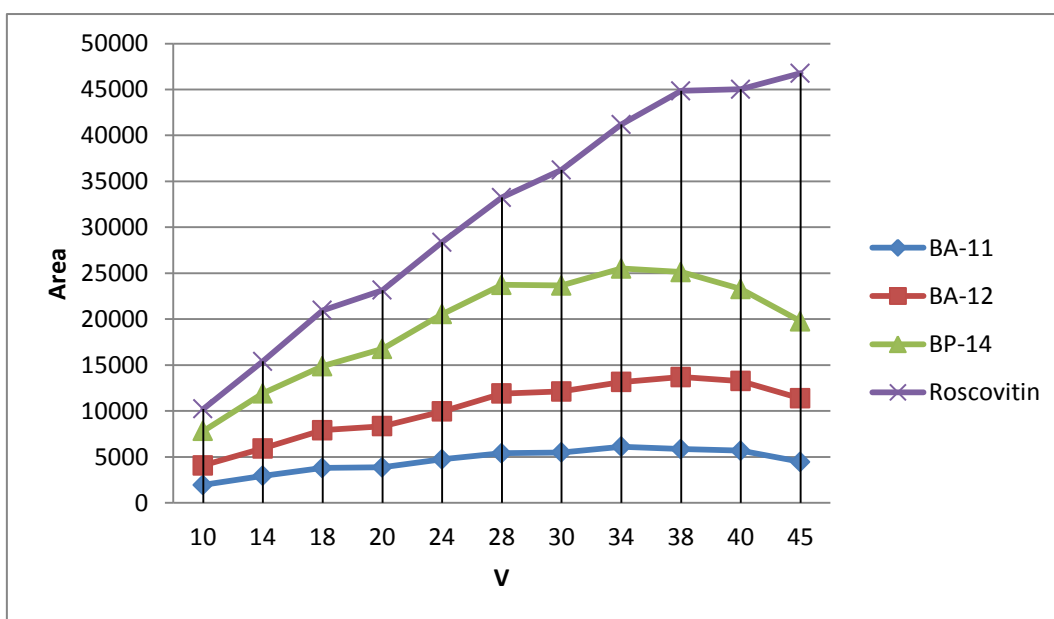
Posledním parametrem MS metody, který bylo nutné optimalizovat, bylo napětí na kóně (Cone voltage). Stejně jako v případě Cap voltage byly výsledky hodnoceny na základě nejvyšší plochy píku nejvýraznějšího fragmentu dané látky (BA-11, BA-12, BP-14

a roscovitin). Pro analýzu bylo použito rozpětí Cone voltage v rozmezí 10 – 45 V. Výsledky analýzy všech látek jsou shrnuty v tabulce č. 18 a znázorněny v grafu č. 10.

Tabulka č. 18: *Optimalizace napětí na kóně pro látky BA-11, BA-12, BP-14 a roscovitin*

Cone Voltage	Area			
	BA-11	BA-12	BP-14	Roscovitin
10 V	1944	4079	7820	10229
14 V	2935	5924	11915	15400
18 V	3796	7905	14883	20965
20 V	3867	8348	16763	23159
24 V	4740	9949	20544	28366
28 V	5390	11900	23725	33247
30 V	5481	12122	23653	36234
34 V	6114	13149	25505	41188
38 V	5843	13690	25120	44850
40 V	5682	13250	23273	45026
45 V	4450	11379	19762	46765

Graf č. 10: *Optimalizace napětí na kóně pro látky BA-11, BA-12, BP-14 a roscovitin*



Z výsledků vyplynulo, že pro látky BA-11 a BP-14 je optimální hodnota Cone voltage **34 V**, pro látku BA-12 **38 V** a pro látku roscovitin **45 V**.

V tabulce č. 19 jsou shrnuty kompletní výsledky optimalizace podmínek MS pro látky BA-11, BA-12, BP-14 a roscovitin.

Tabulka č. 19: *Optimalizace podmínek MS pro látky BA-11, BA-12, BP-14, roscovitin*

Látka	MRM přechody	Kolizní energie [V]	Napětí na kapiláře [kV]	Napětí na kóně [V]
BA-11	193,08	28	0,5	34
	273,13	26		
BA-12	219,11	32	0,5	38
	316,09	22		
BP-14	157,93	40	0,5	34
	376,01	22		
Roscovitin	90,86	40	0,5	45
	233,09	28		

6. Diskuse

6.1 Optimalizace podmínek UPLC

Pro vytvoření analytické metody UPLC separace testovaných látek (BA-09, BA-10, BA-11, BA-12, BP-14 a roscovitinu) bylo nutné optimalizovat několik podmínek analýzy. Prvním krokem bylo zjištění rozpustnosti těchto látek v organických rozpouštědlech (methanol a acetonitril). Nejprve byla testována rozpustnost všech látek ve 100% rozpouštědle (koncentrace 10^{-3} mol/l), přičemž při této koncentraci rozpouštědla a vzorku byly všechny látky dobře rozpustné. Při použití nižších koncentrací rozpouštědel (10% a 50%) byla rozpustnost látek horší. Konkrétně docházelo pouze k částečnému rozpuštění látek BA-11, BA-12, BP-14 v 10% i 50% acetonitrilu, naproti tomu v 10% i 50% methanolu se tyto látky zcela rozpustily. Změna v kvalitě rozpustnosti je dána tím, že acetonitril je slabším nepolárním rozpouštědlem, než methanol.

Po zjištění rozpustnosti všech testovaných látek bylo nutné zvolit složení rozpouštědla pro přípravu standardů (STD), které budou použity pro následující analýzy. Proto byly vytvořeny STD roztoky o koncentraci 10^{-6} mol/l v 10% i 50% rozpouštědle (methanol i acetonitril), s nimiž byla provedena testovací UPLC analýza za standardních podmínek (viz metodika – počáteční podmínky UPLC analýzy).

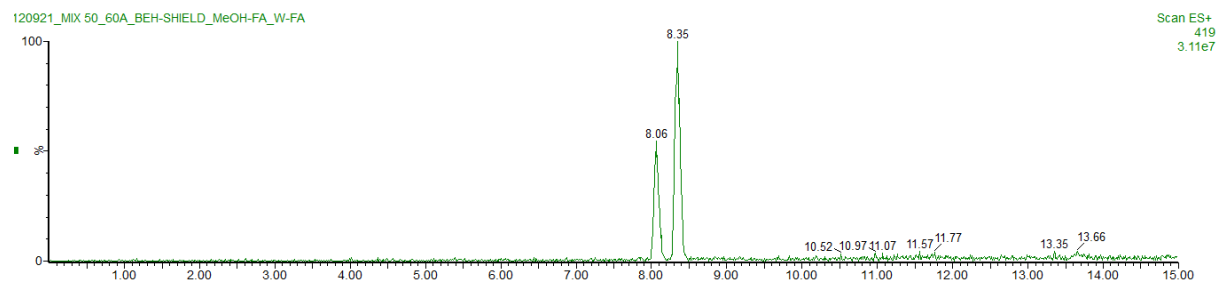
Z výsledných chromatogramů bylo jasně patrné, že je vhodnější použití 50% rozpouštědla. V těchto případech byla pozorována vyšší odezva a lepší tvar píků. Na záznamech 10% vzorků nebyly mnohdy pozorovány žádné píky odpovídající separované látce (viz obrázky č. 6 a 7). Pro následující analýzy byly vybrány STD rozpuštěné v 50% rozpouštědle.

Důležitým parametrem pro separaci látek je typ chromatografické **kolony**. V rámci této práce bylo testováno 5 chromatografických kolon, které se vzájemně lišily typem sorbentu a velikostí jeho částic (1,5 μm – 4,0 μm), délkou (od 50 mm do 150 mm) a vnitřním průměrem (2,0 mm nebo 2,1 mm). Testované látky BA-09, BA-10, BA-11, BA-12, BP-14 a roscovitin se liší svou molekulovou strukturou a tedy i afinitou k různým mobilním a stacionárním fázím.

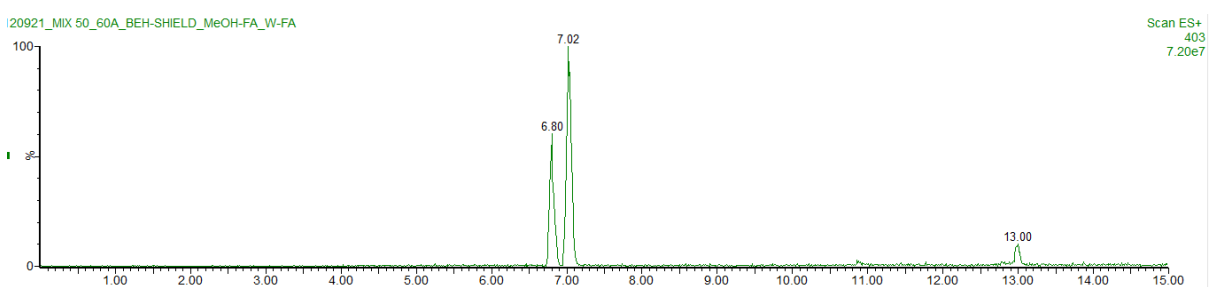
Látky **BA-09** a **BA-10** se ve své struktuře liší pouze jedním substituentem, vykazovaly podobné vlastnosti ve vztahu k stacionárním fázím testovaných kolon a pro separaci obou těchto látek byla nejvhodnější kolona **Acquity BEH C18 Shield**. Při separaci obou látek byly pozorovány dvojité píky, což naznačovalo přítomnost dvou izomerů. Výhodou kolony

Acquity BEH C18 Shield je větší délka (150 mm), což umožnilo delší dobu separace a následné rozdělení dvojpíků na dva rozdělené píky (viz obrázek č. 13 a 14)

Obrázek č. 13: Chromatogram látky **BA-09**, Kolona Acquity BEH C18 Shield, 2,1 x 150 mm; 1,7 μ m)



Obrázek č. 14: Chromatogram látky **BA-10**, Kolona Acquity BEH C18 Shield, 2,1 x 150 mm; 1,7 μ m)



Pro separaci látek **BA-11**, **BA-12**, **BP-14** a **roscovitín** byla nejvhodnější kolona **Acquity BEH C18** o délce 100 mm, průměru 2,1 mm a velikosti částic sorbentu 1,7 μ m.

Výběr analytické kolony je úzce spjat s výběrem vhodné mobilní fáze a optimalizací gradientu její eluce. Počáteční podmínky lineárního gradientu byly nastaveny na poměr mobilních fází A a B: 80 : 20, přičemž ve 14-té minutě analýzy bylo dosaženo 100 MF B a celková doba analýzy byla 15 minut. Tento poměr byl postupně optimalizován s ohledem na co nejvýhodnější retenční časy jednotlivých látek, celkovou dobu analýzy a plánované využití metody pro separaci látek v biologickém materiálu. Jako nejlepší se jevil poměr 65 : 35, při němž se poslední látka eluovala v čase 5,63 min. Následně bylo nutné nastavit dostatečně dlouhý čas analýzy, aby mohlo dojít k rekondukcii výchozích podmínek gradientu. Celkový čas analýzy byl tedy nastaven na 8 minut.

Bylo testováno celkem 6 mobilních fází, jejichž přesné složení je shrnuto v tabulce č. 20. Testované látky se vzájemně více, či méně liší svou strukturou, a proto vykazovaly, stejně jako v případě výběru chromatografických kolon, různou afinitu pro různé mobilní fáze.

Tabulka č. 20: Přehled testovaných mobilních fází

	MF A	MF B
MF č. 1	15 mM HCOONH ₄	Methanol
MF č. 2	0,1% FA ve vodě	0,1% FA v methanolu
MF č. 3	0,1% FA ve vodě	Methanol
MF č. 4	15 mM HCOONH ₄	Acetonitril
MF č. 5	0,1% FA ve vodě	0,1% FA v acetonitrilu
MF č. 6	0,1% FA ve vodě	Acetonitril

Látky BA-09 a BA-10, které jsou si strukturně velmi podobné, pro separaci obou látek byla optimální stejná mobilní fáze. Konkrétně MF č. 3. Zbylé látky (BA-11, BA-12, BP-14 a roscovitin) se svou strukturou liší více, ovšem všechny vykazovaly nejlepší separační vlastnosti při použití MF č. 1.

6.2 Optimalizace podmínek MS

Poté, co byly nalezeny optimální podmínky UPLC, bylo nutné optimalizovat také podmínky hmotnostní spektrometrie (MS). Jednalo se konkrétně o nalezení optimální **kolizní energie**, při níž vznikají z původních molekul dceřiné fragmenty (MRM přechody), které jsou pro danou látku charakteristické, optimalizaci napětí na kapiláře a napětí na kóně. Vzhledem k tomu, že pro *in vitro* testování byly vybrány látky BA-11, BA-12, BP-14 a roscovitin, optimalizace MS podmínek se prováděla pouze pro ně.

Pro nalezení vhodných fragmentů (MRM přechodů) bylo použito rozpětí kolizní energie 10 eV – 40 eV. Při každé hodnotě kolizní energie byly zaznamenány vzniklé fragmenty a vybrány dva nejvýraznější (kvantifikační a konfirmační). Zaznamenávala se také jim odpovídající kolizní energie. Kompletní přehled vybraných hodnot kolizní energie a fragmentů pro všechny testované látky viz tabulka č. 16.

Poté, co byly nalezeny vhodné kvantifikační a konfirmační fragmenty a jim odpovídající kolizní energie, bylo optimalizováno nastavení parametrů iontového zdroje (ESI), konkrétně napětí na kapiláře a na kóně. Výsledné hodnoty viz tabulka č. 19.

7. Závěr

Cílem této bakalářské práce byl vývoj a optimalizace analytické metody stanovení vybraných Cdk inhibitorů pomocí jejich standardů. Konkrétně se jednalo o látky s označením BA-09, BA-10, BA-11, BA-12, BP-14 a roscovitin. Kompletní analytická metoda využívající spojení ultraúčinné kapalinové chromatografie (UPLC) a hmotnostní spektrometrie (MS) byla vytvořena pro látky BA-11, BA-12, BP-14 a roscovitin. Pro zbylé látky BA-09 a BA-10 byla optimalizovány podmínky UPLC separace.

V rámci vývoje a optimalizace této analytické metody byla optimalizována celá řada parametrů UPLC i MS. Nejdůležitějšími parametry UPLC byl výběr vhodné chromatografické kolony a mobilní fáze. Pro látky BA-09 a BA-10 byla nejvhodnější kolona Acquity BEH C18 Shield, s jejíž pomocí bylo možné oddělit izomery těchto látek, a mobilní fáze tvořená 0,1% FA ve vodě a methanolem. Pro zbylé látky byla nejvhodnější kolona Acquity BEH C18 a mobilní fáze tvořená 15 mM HCOONH₄ a methanolem.

V rámci optimalizace MS byly nalezeny kvantifikační a konfirmační fragmenty látek BA-11, BA-12, BP-14 a roscovitinu a jim odpovídající hodnota kolizní energie. Dále pak bylo optimalizováno napětí na kapiláře a napětí na kóně. Souhrnný přehled parametrů UPLC a MS optimalizovaných pro analýzu jednotlivých látek viz tabulka č. 21.

Tabulka č. 21: Přehled parametrů vytvořené analytické metody pro stanovení Cdk inhibitorů BA-09, BA-10, BA-11, BA-12, BP-14 a roscovitinu

Látka	UPLC		MS		
	Kolona	Složení mobilní fáze (65 : 35)	MRM (kolizní energie)	Napětí na kapiláře	Napětí na kóně
BA-09	Acquity BEH C18 Shield, 2,1 x 150 mm; 1,7μm	0,1 % FA ve vodě : methanol	–	–	–
BA-10	Acquity BEH C18 Shield, 2,1 x 150 mm; 1,7μm	0,1 % FA ve vodě : methanol	–	–	–
BA-11	Acquity BEH C18, 2,1 x 100 mm; 1,7μm	15 mM HCOONH ₄ (pH= 4) : 100 % methanol	193,08 (28 V); 273,13 (26 V)	0,5 kV	34 V
BA-12	Acquity BEH C18, 2,1 x 100 mm; 1,7μm	15 mM HCOONH ₄ (pH= 4) : methanol	219,11 (32 V); 316,09 (22 V)	0,5 kV	38 V
BP-14	Acquity BEH C18, 2,1 x 100 mm; 1,7μm	15 mM HCOONH ₄ (pH= 4) : methanol	157,93 (40 V); 376,01 (22 V)	0,5 kV	34 V
ROSCOVITINE	Acquity BEH C18, 2,1 x 100 mm; 1,7μm	15 mM HCOONH ₄ (pH= 4) : methanol	90,86 (40 V); 233,09 (28 V)	0,5 kV	45 V

Analytická metoda, vyvinutá v rámci této bakalářské práce, je v současnosti aplikována při *in vitro* testování látek BA-12 a BP-14 (látka BA-11 byla z analýz vyloučena)

a v budoucnu bude použita také v rámci *in vivo* testování některých farmakologických parametrů zmíněných látek.

8. Literatura

1. Jemal A, Tiwari RC, Murray T, Ghafoor A, Samuels A, Ward E, Feuer EJ, Thun MJ. *Cancer statistics, 2004*. CA Cancer J Clin. 2004 Jan-Feb; 54(1): 8-29
2. Siegel R., Naishadham D., Jemal A. *Cancer statistics, 2012*. A Cancer Journal for Clinicians. Volume 62, Issue 1., pages 10-29. 4 Jan 2012.
3. Morgan D. O. *The cell cycle: principles of control*. Oxford University Press 2007. ISBN 978-0-19-920610-0
4. Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P.. *Molecular Biology of the cell*. 5th ed. 2008. ISBN 978-0-8153-4105-5
5. Foster D. A., Yellen P., Xu L., Saqcena M. *Regulation of G1 Cell Cycle Progression: Distinguishing the Restriction Point from a Nutrient-Sensing Cell Growth Checkpoint(s)*. Genes & Cancer. 1(11) 1124-1131. 2011
6. McLennan A. et. al. *Molecular biology*. 4th ed. Garland Science. 2012. ISBN 978-0-415-68416-3
7. Campbell N. A., Reece J.B. *Biologie*. 2008 Computer Press, a.s., Brno ISBN 80-251-1178-4
8. Snustad D.P., Simmons M.J. *Genetika*. Masarykova univerzita. 2009. ISBN 9788021048522
9. Lodish H., Berk A., Kaiser C. A. et. al. *Molecular cell biology*. 6th edition. 2007. ISBN 978-0-7167-7601-7
10. Elledge S. J., Harper J. W. *Cdk inhibitors: on the threshold of checkpoints and development*. Current Opinion in Cell Biology 1994, 6:847:852
11. Malumbres M., Barbacid M. *Cell cycle kinases in cancer*. Current Opinion in Genetics & Development 2007, 17: 60-65
12. Collins I., Garrett D. M. *Targeting the cell division cycle in cancer: CDK and cell cycle checkpoint kinase inhibitors*. Current Opinion in Pharmacology 2005, 5:366-373

13. Dinarina A., Santamaria P. G., Nebreda A. R. *Cell cycle regulation of the mammalian CDK activator RINGO/Speedy A*. Febs Letters. 19 July 2009
14. Galons H., Oumata N., Meijer L. *Cyclin-dependent kinase inhibitors: a survey of recent patent literature*. Expert Opinion. Ther. Patents (2010) 20 (3): 377-404
15. Yang J., Kornbluth S. *All aboard the cyclin train: subcellular trafficking of cyclins and their CDK partners*. Trends in Cell Biology. Vol 9. June 1999
16. Zhou B. S., Elledge S. J. *The DNA damage response: putting checkpoint in perspective*. Nature 408, 433-439. 2002
17. Lappena S., Giorgano A. *Cell cycle kinases as therapeutic targets for cancer*. Nature Reviews. Volume 8, July 2009
18. Matsuoka S., Ballif B. A., Smogorzewska A., McDonald E. R., Hurov K. E., Luo J., Bakalarski C. E., Zhao Z., Solimini N., Lerenthal Y., Shiloh Y., Gygi S. P., Elledge S. J. *ATM a ATR Substrate Analysis Reveals Extensive Protein Networks Responsive to DNA Damage*. Science 25 May 2007
19. Malumbres M., Pevarello P., Barbacid M., Bischoff J. R. *CDK inhibitors in cancer therapy: what is next?* Trends in Pharmacological Sciences. Vol 29. No1. 2007
20. Kryštof V., Uldrijan S. *Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors as Anticancer Drugs*. Current Drug Targets, 2010, 11, 291-302
21. Müller P., Faitová J., Kryštof V., Uldrijan S., Strnad M., Vojtěška B. *Inhibitory CDK Roscovitin a Olomoucín II aktivují nádorový supresor p53*. Konference 2006 XXX. Brněnské onkologické dny a XX. Konference pro sestry a laboranty
22. Sielecki T. M. Boylan J. F., Benfield P. A. Trainor G. L. *Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors: Useful Targets in Cell Cycle Regulation*. Journal of Medicinal Chemistry. Volume 43, Number 1. January 13, 1999
23. Roussel M. F. *The INK4 family of cell cycle inhibitors in cancer*. Nature. 20 September 1999. Volume 18, Number 38, Pages 5311-5317
24. Vogt P. K., Reed S. I., Verlag S. *Cyclin Dependent Kinase (CDK) Inhibitors*. Curr Top Microbiol. 227. 1998

25. Sherr C. J., Roberts, J. M. *CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression*. Genes Dev. 13, 1501–1512. 1999
26. Besson A., Dowdy S. F., Roberts J. M. *CDK inhibitors: Cell Cycle Regulators and Beyond*. Developmental Cell. 2008. 01.13
27. LaBaer J., Garrett M. D., Stevenson L. F., Slingerland J. M., Sandhu Ch., Chou H. S., Fattaey A., Harlow E. *New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors*. Genes & Development. 1997. 11: 847-862
28. Li R., Waga S., Hannon G. J., Beach D., Stillman B. *Differential effects by the p21 CKD inhibitor on PCNA-dependent DNA replication and repair*. Nature. Vol 371. 6 October 1994
29. Knockaert M., Greengard P., Meijer L. *Pharmacological inhibitors of cyclin-dependent kinases*. Trends in Pharmacological Sciences. Vol. 23. No. 9 September 2002
30. Kryštof V., Baumli S., Fürst R. *Perspective of Cyclin-dependent kinase 9 (CDK9) as a Drug Target*. Current Pharmacological Design, 2012, 18, 2883-2890
31. Abraham R., Acquarone M., Andersen A., Asensi A., Bellé R., Berger F., Bergounioux C., et al. *Cellular effects of olomoucine, an inhibitor of cyclin-dependent kinases*. Biol Cell (1995) 83, 105-120
32. Benson C., White J., De Bono J., O'Donnell A., Raynaud F., Cruickshank C., McGrath H., Walton M., Workman P., Kaye S., Cassidy J., Gianella-Borradori A., Judson I., Twelves C. *A phase I trial of the selective oral cyclin-dependent kinase inhibitor selicib (CYC202, R-Roscovitin), administered twice daily for 7 days every 21 days*. British Journal of Cancer (2007) 96, 29-37
33. Ljungman M., Paulsen M. T. *The Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor Roscovitin Inhibits RNA Synthesis and Triggers Nuclear Accumulation of p53 That Is Unmodified at Ser15 and Lys382*. Mol Pharmacol 60:785-789, 2001
34. Nair B. C., Vallabhaneni S., Tekmal R. R., Vadlamudi R. K. *Roscovitin confers tumor suppressive effect on therapy-resistant breast tumor cells*. Breast Cancer Research 2011, 13:R80
35. Jorda R., Paruch K., Kryštof V. *Cyclin-dependent kinase Inhibitors Inspired by Roscovitin: Purine Bioisosteres*. Current Pharmaceutical Design, 2012, 18, 2974-2980

36. ClinicalTrials.gov. *A Study of Oral Sapacitabine and Oral Seliciclib in Patients With Advanced Solid Tumors* [online]. [cit. 2013-3-6]. Dostupné z: <http://clinicaltrials.gov/show/NCT00999401>
37. Motyka K., Hlaváč J. *Stručný přehled separačních metod*. 1. Vydání. Univerzita Palackého v Olomouci. 2009. ISBN 978-80-244-2304-3
38. Kellner R., Mermet J. M., Otto M., Valcárcel M., Widmer H. M. *Analytical chemistry*. 2004 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. ISBN 3-527-30590-4
39. Ardrey R. E. *Liquid Chromatography – Mass spectrometry: An introduction*. John Wiley & Sons, Ltd. 2003. ISBN 0470867299
40. Harris D. C. *Quantitative chemical analysis*. W. H. Freeman and Company. New York. Eight edition. 2010. ISBN-13: 978-1-4292-1815-3
41. Swartz M. E. *Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC): An Introduction*. Separation science redefined. May 2005
42. DePalma A. *HPLC Autosamplers Achieving Speed and Reduced Samples Volumes*. Lab Manager Magazine. 7.10.2010
43. Ecom. *Produkty/ Detektory UV-VIS/ PDA 190 – 990 nm* [online]. [cit. 2013-3-6]. Dostupné z: <http://www.ecomsro.com/cz/s32-produkty/detektory-uv-vis/c42-pda>
44. HubPages. *HPLC detector types: Principle in their working* [online]. [cit. 2013-3-6]. Dostupné z: <http://bheem.hubpages.com/hub/HPLC-detector-types>
45. Waters.com. *BEH (Ethylene Bridged Hybrid) Technology* [online]. [cit. 2013-3-6]. Dostupné z: <http://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=134618172>
46. Waters. *Acquity UPLC Columns* [online]. [cit. 2013-3-6]. Dostupné z: <http://www.ecs.umass.edu/eve/facilities/equipment/Acquity/UPLC%20column%20Brochure.pdf>
47. Waters.com. *CSH (Charged Surface Hybrid) Technology* [online]. [cit. 2013-3-6]. Dostupné z: <http://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=134618101>
48. Waters.com. *Waters Acquity UltraPerformance Convergence Chromatography Takes Pittcon Editors 'Gold Award* [online]. [cit. 2013-3-6]. Dostupné z: <http://www.waters.com/waters/newsDetail.htm?id=134669424>

49. Waters.com. *Waters UltraPerformance Convergence Chromatography Ushers in New Category of Separation Science at Pittcon* [online]. [cit. 2013-3-6]. Dostupné z: http://www.waters.com/waters/newsDetail.htm?locale=en_US&id=134668008
50. Gross J. H. *Mass Spectrometry – A Textbook*. 2nd edition. Springer Heidelberg Dordrecht London New York. 2011. e-ISBN 978-3-642-10711-5
51. Boersema P. J., Mohammed S., Heck A. J. *Phosphopeptide fragmentation and analysis by mass spectrometry*. *J Mass Spectrom*, 2009 Jun. 44(6):861-78.
52. Holčápek M., Jandera P. *Spojení kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (HPLC/MS)*. *Chem. listy* 92, 278-286 (1998)
53. Faktor J., Struhárová I., Fučíková A., Hubálek M., Vojtěšek B., Bouchal P. *Kvantifikace proteinových biomarkerů pomocí hmotnostní spektrometrie pracující v režimu monitorování vybraných reakcí*. *Chem. listy* 105, 846- 850 (2011)
54. Waters.com. *Common ionization* [online]. [cit. 2013-3-6]. Dostupné z: http://www.waters.com/waters/en_US/Common-Ionization/nav.htm?locale=en_US&cid=10073251
55. Herbert C. G., Johnstone R. A. W. *Mass spectrometry basics*. CRC Press 2002. ISBN 0-8493-1354-6
56. Ramanathan R. *Mass spectrometry in drug metabolism and pharmacokinetics*. 2009 John Willey & Sons. ISBN 978-0-471-75158-8
57. Prasain J. *Tandem Mass Spectrometry – Applications and Principles*. InTech. February 29, 2012. ISBN 978-953-51-0141-3
58. Wanner K., Höfner G. *Mass Spectrometry in Medicinal Chemistry*. 2007 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co KGaA, Weinheim. ISBN 978-3-527-31456-0
59. University of Bristol. *Gas Chromatography Mass Spectrometry (GC/MS)* [online]. [cit. 2013-3-6]. Dostupné z: <http://www.bris.ac.uk/nerclsmsf/techniques/gcms.html>
60. The Samuel Roberts Nobel Foundation. *Sumner Group: Metabolomics* [online]. [cit. 2013-3-6]. Dostupné z: <http://www.noble.org/plantbio/sumner/metabolomics/>

9. Seznam použitých zkratek a symbolů

AC: Acetonitil

APCI: Ionizace za atmosférického tlaku (Atmospheric Pressure Chemical Ionization)

BEH: Ethylene Bridged Hybrid

CAK: Cdk-aktivační kinázy

Cdk: Cyklin dependentní kinasy

CI: Chemická ionizace (Chemical Ionization)

CSH: Charged Surface Hybrid

CYC 202: Roscovitin

DMSO: Dimethyl sulfoxid

DNA: Deoxyribonukleová kyselina

EI: Elektronová ionizace (Electron Ionization)

ESI: Ionizace elektrosprejem (Electrospray Ionization)

FA: Kyselina mravenčí (Formic Acid)

GLC: Gass-Liquid Chromatography

GS: Plynová chromatografie (Gass Chromatography)

GSC: Gass-Solid Chromatography

HIV: Virus lidské imunitní nedostatečnosti (Human Immunodeficiency Virus)

HPLC: Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography)

HPV: Lidský Papillomavirus (Human Papillomavirus)

LC: Kapalinová chromatografie (Liquid Chromatography)

LRR: Laboratoř růstových regulátorů

MF: Mobilní fáze

MPF: Mitózu zahajující faktor (Mitosis promoting factor)

MRM: Multiple Reaction Monitoring

MS: Hmotnostní spektrometrie (Mass Spectrometry)

MTOC: Mikrotubuly organizující centrum

PCNA: Proliferating Cell Nuclear Antigen

RB: Retinoblastoma protein

STD: Standard

UHPLC: Ultravysokoúčinná kapalinová chromatografie (Ultra High Performance Liquid Chromatography)

UPLC: Ultraúčinná kapalinová chromatografie (Ultra Performance Liquid Chromatography)

10. Přílohy

10.1 Příloha 1: Srovnání výsledků analýzy látek při použití 50% methanolu a 50% acetonitrilu

Tabulka č. 3: Výsledky měření pro látku BA-09 v 50% methanolu/ acetonitrilu (MF: 15mM HCOONH₄ : methanol/ acetonitril; 60 : 40)

Kolona	15mM HCOONH ₄ : methanol			15mM HCOONH ₄ : acetonitril		
	Šířka píku	Plocha píku	Odezva	Šířka píku	Plocha píku	Odezva
Acquity BEH C18, 2,1 x 100 mm; 1,7μm	0,1573; 0,2018	3 762 723; 6 678 237	1,09.10 ⁸	0,098; 0,2108	1 763 564; 4 587 718	7,12.10 ⁷
Acquity CSH C18, 2,1 x 100 mm; 1,7μm	0,1137; 0,2299	3 857 396; 8 922 753	1,13.10 ⁸	0,3696	5 037 412	6,41.10 ⁷
Cogent Diamond, 2,1 x 150 mm; 4μm	0,8212	13 226 596	4,86.10 ⁷	0,5628	13 535 595	7,18.10 ⁷
VisionHT C18, 2,0 x 50 mm; 1,5μm	0,4622	12 299 089	9,35.10 ⁷	0,4201	10 968 050	8,32.10 ⁷
Acquity BEH C18 Shield, 2,1 x 150 mm; 1,7μm	0,1943	8 157 252	1,11.10 ⁸	0,2709	6 358 921	5,81.10 ⁷

*Pozn. V případě látky BA-09 jsme pozorovali u kolon Acquity BEH C18 a CSH dvojité píky

Tabulka č. 4: Výsledky měření pro látku BA-10 v 50% methanolu/ acetonitrilu (MF: 15mM HCOONH₄ : methanol/ acetonitril; 60 : 40)

Kolona	15mM HCOONH ₄ : methanol			15mM HCOONH ₄ : acetonitril		
	Šířka píku	Plocha píku	Odezva	Šířka píku	Plocha píku	Odezva
Acquity BEH C18, 2,1 x 100 mm; 1,7μm	0,1317; 0,1793	3 553 770; 7 366 565	1,30.10 ⁸	0,2296	4 094 298	5,90.10 ⁷
Acquity CSH C18, 2,1 x 100 mm; 1,7μm	0,1005; 0,2860	4 030 137; 11 371 625	1,33.10 ⁸	0,2199	7 127 448	1,05.10 ⁸
Cogent Diamond, 2,1 x 150 mm; 4μm	0,7541	17411148	6,70.10 ⁷	0,5318	18 030 080	1,04.10 ⁸
VisionHT C18, 2,0 x 50 mm; 1,5μm	0,4329	18805318	1,32.10 ⁸	0,3926	13 316 928	1,01.10 ⁸
Acquity BEH C18 Shield, 2,1 x 150 mm; 1,7μm	0,2014; 0,1424	15 543 420; 1 942 782	1,92.10 ⁸	0,3461; 0,1888	8 182 339; 1 369 935	6,59.10 ⁷

*Pozn. V případě látky BA-10 jsme pozorovali u kolony Acquity BEH C18 dvojité píky a dva píky u kolony BEH C18 Shield

Tabulka č. 5: Výsledky měření pro látku BA-11 v 50% methanolu/ acetonitrilu (MF: 15mM HCOONH₄ : methanol/ acetonitril; 60 : 40)

Kolona	15mM HCOONH ₄ : methanol			15mM HCOONH ₄ : acetonitril		
	Šířka píku	Plocha píku	Odezva	Šířka píku	Plocha píku	Odezva
Acquity BEH C18, 2,1 x 100 mm; 1,7μm	0,2072	605 419	9,56.10 ⁶	0,2737	1 742 920	2,12.10 ⁷
Acquity CSH C18, 2,1 x 100 mm; 1,7μm	0,2585	479 463	4,89.10 ⁶	0,3236	1 362 466	1,17.10 ⁷
Cogent Diamond, 2,1 x 150 mm; 4μm	0,6084	1 497 833	4,58.10 ⁶	0,6562	7 716 803	2,94.10 ⁷
VisionHT C18, 2,0 x 50 mm; 1,5μm	0,3718	1 391 547	8,84.10 ⁶	0,2989	3 280 934	2,87.10 ⁷
Acquity BEH C18 Shield, 2,1 x 150 mm; 1,7μm	0,2215	763 970	9,17.10 ⁶	0,3420	2 086 541	1,90.10 ⁷

*Pozn. V případě látky BA-10 jsme pozorovali u kolony Acquity BEH C18 dvojité píky a dva píky u kolony BEH C18 Shield

Tabulka č. 6: Výsledky měření pro látku BA-12 v 50% methanolu/ acetonitrilu (MF: 15mM HCOONH₄ : methanol/ acetonitril; 60 : 40)

Kolona	15mM HCOONH ₄ : methanol			15mM HCOONH ₄ : acetonitril		
	Šířka píku	Plocha píku	Odezva	Šířka píku	Plocha píku	Odezva
Acquity BEH C18, 2,1 x 100 mm; 1,7μm	0,3191	2 239 233	2,84.10 ⁷	0,2435	1 490 714	1,68.10 ⁷
Acquity CSH C18, 2,1 x 100 mm; 1,7μm	0,3031	1 486 988	1,51.10 ⁷	0,3221	960 625	9,16.10 ⁶
Cogent Diamond, 2,1 x 150 mm; 4μm	0,4798	3 904 344	1,50.10 ⁷	0,6943	5 653 166	2,06.10 ⁷
VisionHT C18, 2,0 x 50 mm; 1,5μm	0,4617	3 267 685	2,04.10 ⁷	0,4062	1 558 139	1,03.10 ⁷
Acquity BEH C18 Shield, 2,1 x 150 mm; 1,7μm	0,2602	2 356 330	2,41.10 ⁷	0,2671	1 323 856	1,28.10 ⁷

Tabulka č. 7: Výsledky měření pro látku BP-14 v 50% methanolu/ acetonitrilu (MF: 15mM HCOONH₄ : methanol/ acetonitril; 60 : 40)

Kolona	15mM HCOONH ₄ : methanol			15mM HCOONH ₄ : acetonitril		
	Šířka píku	Plocha píku	Odezva	Šířka píku	Plocha píku	Odezva
Acquity BEH C18, 2,1 x 100 mm; 1,7μm	0,1986	1 006 746	1,43.10 ⁷	0,1691	339 046	4,58.10 ⁶
Acquity CSH C18, 2,1 x 100 mm; 1,7μm	0,1929	703 045	8,34.10 ⁶	0,1504	326 310	4,43.10 ⁶
Cogent Diamond, 2,1 x 150 mm; 4μm	0,4117	1 479 745	5,98.10 ⁶	0,3334	1 623 647	8,69.10 ⁶
VisionHT C18, 2,0 x 50 mm; 1,5μm	0,4809	2 187 797	1,33.10 ⁷	0,2997	1 641 079	1,46.10 ⁷
Acquity BEH C18 Shield, 2,1 x 150 mm; 1,7μm	0,2481	1 260 041	1,41.10 ⁷	0,1041; 0,1918	316 464; 453 130	6,30.10 ⁶

Tabulka č. 8: Výsledky měření pro látku roscovitin v 50% methanolu/ acetonitrilu (MF: 15mM HCOONH₄ : methanol/ acetonitril; 60 : 40)

Kolona	15mM HCOONH ₄ : methanol			15mM HCOONH ₄ : acetonitril		
	Šířka píku	Plocha píku	Odezva	Šířka píku	Plocha píku	Odezva
Acquity BEH C18, 2,1 x 100 mm; 1,7μm	0,2027	15 224 390	2,14.10 ⁸	0,1791	8 769 933	1,46.10 ⁸
Acquity CSH C18, 2,1 x 100 mm; 1,7μm	0,2438	18 120 614	2,21.10 ⁸	0,1755	13 311 891	1,92.10 ⁸
Cogent Diamond, 2,1 x 150 mm; 4μm	0,6971	21 163 468	7,72.10 ⁷	0,5295	32 531 766	1,63.10 ⁸
VisionHT C18, 2,0 x 50 mm; 1,5μm	0,3684	26 795 566	2,05.10 ⁸	0,3287	30 086 074	2,45.10 ⁸
Acquity BEH C18 Shield, 2,1 x 150 mm; 1,7μm	0,2197	19 679 290	2,58.10 ⁸	0,2363	17 153 904	2,01.10 ⁸

10.2 Příloha 2: Souhrnné výsledky UPLC analýzy všech testovaných látek

Tabulka č. 9: Kompletní výsledky analýzy látky BA-09

MF	Kolona Acquity BEH C18				Kolona Acquity BEH C18 Shield				Kolona CSH				
	Šířka píku	Výška píku	Plocha píku	Odezva	Šířka píku	Výška píku	Plocha píku	Odezva	Šířka píku	Výška píku	Plocha píku	Odezva	
Methanol	č. 1	0,1003 0,1229	13392619 23920258	624239 1230599	2,6.10 ⁷	0,1706	122280608	8352965	1,22.10 ⁸	0,0783 0,2097	18659624 36617676	859308 2738300	3,69.10 ⁷
	č. 2	0,1572 0,182	46503244 95335072	3204800 6468548	9,66.10 ⁷	0,1825 0,201	19638954 39877380	1327801 2701206	4,02.10 ⁷	0,1836 0,3015	34037616 53805172	2422533 4936036	5,56.10 ⁷
	č. 3	0,1773 0,1327	63195704 106156528	4762649 8517526	1,07.10 ⁸	0,1993 0,2075	16741892 30399530	1254389 2275566	3,04.10 ⁷	0,2818 0,2225	40792236 68754048	3345833 6006832	7,15.10 ⁷
Acetonitril	č. 1	0,0821 0,1595	34910160 76486992	1611393 4693062	7,64.10 ⁷	0,2302	73147912	6513093	7,32.10 ⁷	0,3055	74528176	5757313	7,45.10 ⁷
	č. 2	0,0789 0,1916	48627568 73175712	2203127 5397044	7,31.10 ⁷	0,1269 0,1525	56188204 92452464	2704756 4736909	9,28.10 ⁷	0,1603 0,2498	23215220 45301124	1663863 3626637	4,73.10 ⁷
	č. 3	0,1087 0,1648	57202216 102156208	3360342 6822181	1,02.10 ⁸	0,1287 0,1521	45411536 78047880	2323782 4036970	7,83.10 ⁷	0,1767 0,2784	19492254 36737664	1384471 3101003	3,83.10 ⁷

Pozn.: MF č. 1 = 80 %: 15mM HCOONH₄; 20 %: methanol (acetonitril)

č. 2 = 80 %: 0,1% kyselina mravenčí (FA); 20 %: 0,1% FA ve 100% methanolu (acetonitrilu)

č. 3 = 80 %: 0,1% FA; 20 %: 100% methanol (acetonitril)

Tabulka č. 10: Kompletní výsledky analýzy látky BA-10

BA-10

MF	Kolona Acquity BEH C18				Kolona Acquity BEH C18 Shield				Kolona CSH				
	Šířka píku	Výška píku	Plocha píku	Odezva	Šířka píku	Výška píku	Plocha píku	Odezva	Šířka píku	Výška píku	Plocha píku	Odezva	
Methanol	č. 1	0,0952 0,1692	57639104 104891416	3138340 6977399	1,05.10 ⁸	0,1792	221296720	15924541	2,21.10 ⁸	0,3336	143087776	14831184	1,43.10 ⁸
	č. 2	0,1304 0,1728	46546504 94425376	2906350 60691222	1,02.10 ⁸	0,1652 0,1944	39906432 74374528	2783078 5390711	7,49.10 ⁷	0,1634 0,2695	37685640 64804896	2580448 5749490	6,82.10 ⁷
	č. 3	0,1458 0,1779	65911444 112345248	4459046 8091874	1,20.10 ⁸	0,2127 0,2227	35153032 58350744	2831725 4919873	5,84.10 ⁷	0,2373 0,3115	47348324 79763712	3615204 7438988	8,4.10 ⁷
Acetonitril	č. 1	0,1977	103542440	7810546	1,04.10 ⁸	0,2294	77259984	7817712	7,74.10 ⁷	0,2020	115855808	6983787	1,15.10 ⁸
	č. 2	0,1903	133302088	9014245	1,33.10 ⁸	0,0982 0,1135	64713880 110764992	3169039 5689078	1,11.10 ⁸	0,1815	133302088	9014245	1,33.10 ⁸
	č. 3	0,1882	133212624	11233931	1,33.10 ⁸	0,1287 0,1404	51281280 81592784	2521853 4247792	8,36.10 ⁷	0,2596	133212624	11233931	1,33.10 ⁸

Pozn.: MF č. 1 = 80 %: 15mM HCOONH₄; 20 %: methanol (acetonitril)

č. 2 = 80 %: 0,1% kyselina mravenčí (FA); 20 %: 0,1% FA ve 100% methanolu (acetonitrilu)

č. 3 = 80 %: 0,1% FA; 20 %: 100% methanol (acetonitril)

Tabulka č. 11: Kompletní výsledky analýzy látky BA-11

BA-11

MF	Kolona Acquity BEH C18				Kolona Acquity BEH C18 Shield				Kolona CSH				
	Šířka píku	Výška píku	Plocha píku	Odezva	Šířka píku	Výška píku	Plocha píku	Odezva	Šířka píku	Výška píku	Plocha píku	Odezva	
Methanol	č.1	0,2075	4685365	339699	4,72.10 ⁶	0,1818	9003267	650007	9,31.10 ⁶	0,2664	5306723	507208	5,35.10 ⁶
	č.2		x				x			0,3319	27648656	2563349	2,85.10 ⁷
	č.3	0,2213	7515132	708573	7,51.10 ⁶	0,1708	4246822	370011	4,24.10 ⁶		x		
Acetonitril	č.1	0,1919	21550796	1326086	2,14.10 ⁷	0,2146	23321018	1747074	2,32.10 ⁷	0,1811	10698660	862755	1,07.10 ⁷
	č.2	0,2324	19295398	1792196	1,93.10 ⁷	0,0977 0,1197	13460000 4786998	515373 227990	1,32.10 ⁷		x		
	č.3	0,2213	7515132	708573	7,51.10 ⁶	0,1287 0,1521	12801926 3519900	515462 159733	1,25.10 ⁷	0,0912	4892396	193530	4,88.10 ⁶

Pozn.: MF č. 1 = 80 %: 15mM HCOONH₄; 20 %: methanol (acetonitril)

č. 2 = 80 %: 0,1% kyselina mravenčí (FA); 20 %: 0,1% FA ve 100% methanolu (acetonitrilu)

č. 3 = 80 %: 0,1% FA; 20 %: 100% methanol (acetonitril)

Tabulka č. 12: Kompletní výsledky analýzy látky BA-12

		BA-12											
		Kolona Acquity BEH C18				Kolona Acquity BEH C18 Shield				Kolona CSH			
MF		Šířka píku	Výška píku	Plocha píku	Odezva	Šířka píku	Výška píku	Plocha píku	Odezva	Šířka píku	Výška píku	Plocha píku	Odezva
Methanol	č.1	0,1807	17229646	1227408	1,73.10 ⁷	0,2408	27330088	2255165	2,73.10 ⁷	0,2552	14460824	1319174	1,45.10 ⁷
	č.2	0,2147	4328540	324888	4,39.10 ⁶	0,2102	14763820	1040734	1,48.10 ⁷	0,2172	4328540	324888	4,39.10 ⁶
	č.3	0,2627	20947188	2214088	2,10.10 ⁷	0,2414	9025852	813357	9,04.10 ⁶	0,267	8124345	661647	8,13.10 ⁶
Acetonitril	č.1	0,2315	15765897	1065087	1,57.10 ⁷	0,2302	13531459	1176352	1,35.10 ⁷	0,2417	9323313	696105	6,40.10 ⁶
	č.2	0,2738	19768960	1675002	1,96.10 ⁷	0,1586	6445487	389146	6,61.10 ⁶		x		
	č.3	0,2228	22326176	1661908	2,21.10 ⁷	0,148	4792983	267635				x	

Pozn.: MF č. 1 = 80 %: 15mM HCOONH₄; 20 %: methanol (acetonitril)
 č. 2 = 80 %: 0,1% kyselina mravenčí (FA); 20 %: 0,1% FA ve 100% methanolu (acetonitrilu)
 č. 3 = 80 %: 0,1% FA; 20 %: 100% methanol (acetonitril)

Tabulka č. 13: Kompletní výsledky analýzy látky BP-14

		BP-14											
		Kolona Acquity BEH C18				Kolona Acquity BEH C18 Shield				Kolona CSH			
MF		Šířka píku	Výška píku	Plocha píku	Odezva	Šířka píku	Výška píku	Plocha píku	Odezva	Šířka píku	Výška píku	Plocha píku	Odezva
Methanol	č.1	0,1519	7712773	538787	7,72.10 ⁶	0,2569	16927918	1404197	1,67.10 ⁷	0,1988	7237678	582435	7,26.10 ⁶
	č.2	0,2574	56941948	4584496	5,75.10 ⁷	0,2097	8433309	594311	8,50.10 ⁶	0,2715	8892378	963733	9,06.10 ⁶
	č.3		x			0,2609	8236628	837566		0,2388	4112625	378806	4,09.10 ⁶
Acetonitril	č.1	0,1817	4172117	267125	4,17.10 ⁶	0,1815	9460401	719943	9,46.10 ⁶	0,157	4651298	287607	4,65.10 ⁶
	č.2	0,2353	6406533	650571	6,4.10 ⁶	0,0991	5063657	203376	5,06.10 ⁶		x		
	č.3		x				x			0,1091	1648086	73993	1,65.10 ⁶

Pozn.: MF č. 1 = 80 %: 15mM HCOONH₄; 20 %: methanol (acetonitril)
 č. 2 = 80 %: 0,1% kyselina mravenčí (FA); 20 %: 0,1% FA ve 100% methanolu (acetonitrilu)
 č. 3 = 80 %: 0,1% FA; 20 %: 100% methanol (acetonitril)

Tabulka č. 14: Kompletní výsledky analýzy látky roscovitine

		ROSCOVITINE											
		Kolona Acquity BEC C18				Kolona Acquity BEC C18 Shield				Kolona CSH			
MF		Šířka píku	Výška píku	Plocha píku	Odezva	Šířka píku	Výška píku	Plocha píku	Odezva	Šířka píku	Výška píku	Plocha píku	Odezva
Methanol	č.1	0,1493	187351456	11146704	1,89.10 ⁸	0,1881	317113088	20402920	3,18.10 ⁸	0,2427	211318048	18389904	2,11.10 ⁸
	č.2	0,2225	185334656	13981741	1,86.10 ⁸	0,1828	142996176	9992047	1,43.10 ⁸	0,1886	128739496	13979753	1,29.10 ⁸
	č.3	0,2437	208398576	17292438	2,08.10 ⁸	0,2184	118758416	9553101	1,19.10 ⁸	0,4153	138434976	15634531	1,38.10 ⁸
Acetonitril	č.1	0,1900	85265440	4754965	8,52.10 ⁷	0,1933	212345504	15696067	2,12.10 ⁸	0,1821	183161872	13647181	1,82.10 ⁸
	č.2	0,2106	269851968	20036122	2,69.10 ⁸	0,1846	190134832	13937298	1,90.10 ⁸	0,3852	104387920	13188876	1,04.10 ⁸
	č.3	0,1820	322850304	21901274	3,26.10 ⁸	0,2225	177564048	12388916	1,77.10 ⁸	0,2597	100979424	10406944	1,01.10 ⁸

Pozn.: MF č. 1 = 80 %: 15mM HCOONH₄; 20 %: methanol (acetonitril)
 č. 2 = 80 %: 0,1% kyselina mravenčí (FA) ve vodě; 20 %: 0,1% FA ve 100% methanolu (acetonitrilu)
 č. 3 = 80 %: 0,1% FA; 20 %: 100% methanol (acetonitril)