



**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Laboratoř růstových regulátorů**

**Vývoj citlivé metody pro stanovení  
6-thioguaninu v DNA za použití  
kapalinové chromatografie ve spojení  
s hmotnostní spektrometrií**

## **BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Autor:	<b>Kateřina Jarošová</b>
Studijní program:	B1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>PharmDr. Jitka Široká, Ph.D.</b>
Termín odevzdání práce:	2017

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Kateřina Jarošová
Název práce	Vývoj citlivé metody pro stanovení 6-thioguaninu v DNA za použití kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	PharmDr. Jitka Šíroková, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2017
Abstrakt	Práce se zabývá vývojem a optimalizací metody pro stanovení 6-thioguaninu v DNA. Teoretická část byla zaměřena na rešerši způsobů hydrolýzy DNA a stanovení 6-thioguaninu v biologické matrici. Pro vývoj metody byla použita metoda kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií, konkrétně hydrofilní interakční chromatografie. Analyty byly separovány na koloně založené na hybridním sorbentu „BEH“ a ionizovány za pomoci elektrospreje v kladném ionizačním módu. Mobilní fáze byly složeny z kyselé vodné fáze a organické fáze. Jako vhodné hydrolyzační činidlo byla vybrána kyselina mravenčí.
Klíčová slova	DNA, 6-thioguanin, kapalinová chromatografie, hmotnostní spektrometrie
Počet stran	47
Jazyk	Český (anglický)

## Bibliographical identification

Author's first name and surname	Kateřina Jarořov
Title of thesis	Development of a sensitive method for determination of 6-thioguanine in DNA using liquid chromatography coupled to mass spectrometry
Type of thesis	Bachelor
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	PharmDr. Jitka řirok, Ph.D.
The year of presentation	2017
Abstract	<p>The thesis deals with the development and optimization of the method for determination of 6-thioguanine in DNA. The theoretical part was focused on the search of methods for DNA hydrolysis and determination of 6-thioguanine in biological matrix. During development of this method liquid chromatography hydrophilic interaction chromatography was used coupled to mass spectrometry. The analytes were separated on a column based on the hybrid sorbent „BEH“ and ionized by electrospray in positive ionization mode. The mobile phases were composed of an acidic aqueous phase and an organic phase. Formic acid was chosen as a suitable hydrolyzing agent.</p>
Keywords	Deoxyribonucleic acid, 6-thioguanine, liquid chromatography, mass spectrometry
Number of pages	47
Language	Czech (English)

„Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury.“

V Olomouci dne .....

## Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat své vedoucí PharmDr. Jitce Široké, Ph.D. za umožnění vypracování bakalářské práce pod jejím vedením, za cenné rady a připomínky. Rovněž bych chtěla poděkovat Ústavu molekulární a translační medicíny za poskytnutí vzorků.

## OBSAH

1	ÚVOD .....	9
2	TEORETICKÁ ČÁST .....	10
2.1	DEOXYRIBONUKLEOVÁ KYSELINA .....	10
2.1.1	Primární struktura DNA .....	10
2.1.2	Způsoby hydrolýzy DNA.....	12
2.1.3	Merkaptopuriny .....	12
2.2	KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE.....	15
2.2.1	Kapalinová chromatografie.....	15
2.2.2	Složení kapalinového chromatografu .....	15
2.3	HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE.....	17
2.3.1	Ionizační techniky .....	17
2.3.2	Analyzátor .....	18
2.3.3	Detektor .....	19
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	20
3.1	PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ A MATERIÁL .....	20
3.2	POUŽITÉ CHEMIKÁLIE .....	20
3.3	PŘÍPRAVA ROZTOKŮ.....	21
3.4	VZORKY DNA.....	21
4	VÝSLEDKY A DISKUZE .....	22
4.1	OPTIMALIZACE SEPARAČNÍCH PODMÍNEK .....	22
4.2	OPTIMALIZACE HMOTNOSTNĚ SPEKTROMETRICKÝCH PARAMETRŮ 31	
4.2.1	Optimalizace napětí na kónusu .....	33
4.2.2	Optimalizace kolizní energie .....	34
4.2.3	Optimalizace napětí na kapiláře .....	35
4.2.4	Výsledky hmotnostně spektrometrické optimalizace.....	37
4.3	OPTIMALIZACE ÚPRAVY VZORKU DNA .....	38
4.3.1	Hydrolýza DNA kyselinou chloristou.....	38
4.3.2	Hydrolýza kyselinou mravenčí.....	41

4.3.3	Optimalizace času hydrolýzy DNA .....	43
5	ZÁVĚR .....	44
6	LITERATURA .....	45

## **SEZNAM ZKRATEK**

6-MP	6-merkaptopurin
6-MMP	6-methylmerkaptopurin
6-TG	6-thioguanin
AZA	azathioprin
DTT	dithiotreitol



# 1 ÚVOD

Deoxyribonukleová kyselina (DNA) je jedna z nejdůležitějších makromolekul. Je základem všech živých organismů. Díky tomu, že se nachází ve všech živých organismech, je její studium velice přínosné ve všech oblastech lidského života, nejenom v lékařství při studiu onemocnění, ale i v kriminalistice nebo při určování stáří, například hornin.

Cílem této práce je vývoj citlivé metody, která by jednoduše a efektivně zhydrolyzovala DNA na jednotlivé báze, díky čemuž by bylo možné stanovit analog guaninové báze 6-thioguanin v DNA. Látka 6-thioguanin je hlavní účinnou látkou, která zprostředkovává imunosupresivní efekt léčiva azathioprinu a 6-merkaptopurinu, jež jsou využívány k terapii idiopatických střevních zánětů, akutní lymfatické leukémie nebo Crohnovy choroby.

Ke stanovení 6-thioguaninu v DNA byla použita metoda kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií, která je jednou z nejrozšířenějších analytických metod.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

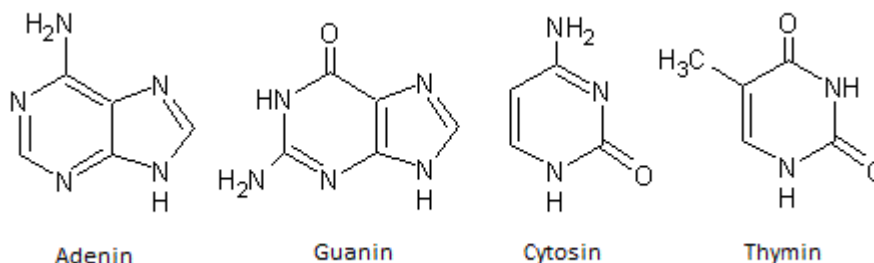
### 2.1 DEOXYRIBONUKLEOVÁ KYSELINA

Nukleové kyseliny jsou základní složkou všech živých organismů (Alberts, 2002). Jsou to makromolekulární látky, které nesou genetickou informaci organismu. Základní stavební jednotkou je nukleotid. Nukleotid obsahuje tři části: cukernou složku, pyrimidinovou nebo purinovou bázi a zbytek kyseliny fosforečné. Existují dva hlavní typy nukleových kyselin: deoxyribonukleová kyselina a ribonukleová kyselina. Liší se pentosou: deoxyribonukleová kyselina obsahuje 2'-deoxyribosu, ribonukleová kyselina obsahuje ribosu. Dále se liší heterocyklickými bázemi: deoxyribonukleová kyselina obsahuje adenin, guanin, thymin a cytosin, u ribonukleové kyseliny je báze thymin nahrazena bází uracil.

Deoxyribonukleová kyselina, zkráceně DNA je chemickým nositelem buněčné genetické informace (McMurry, 2012). Má schopnost přenášet a uchovávat informace, což je dáno pořadím bází v řetězci nukleotidu (Klásek, 2013). Přenos informací se uskutečňuje pomocí biosyntézy bílkovin. Genetická informace je předávána z DNA do RNA procesem zvaným transkripce a následně z RNA do proteinu procesem zvaným translace. Model struktury DNA odvodili v roce 1953 James Watson a Francis Crick (Alberts, 2002).

#### 2.1.1 Primární struktura DNA

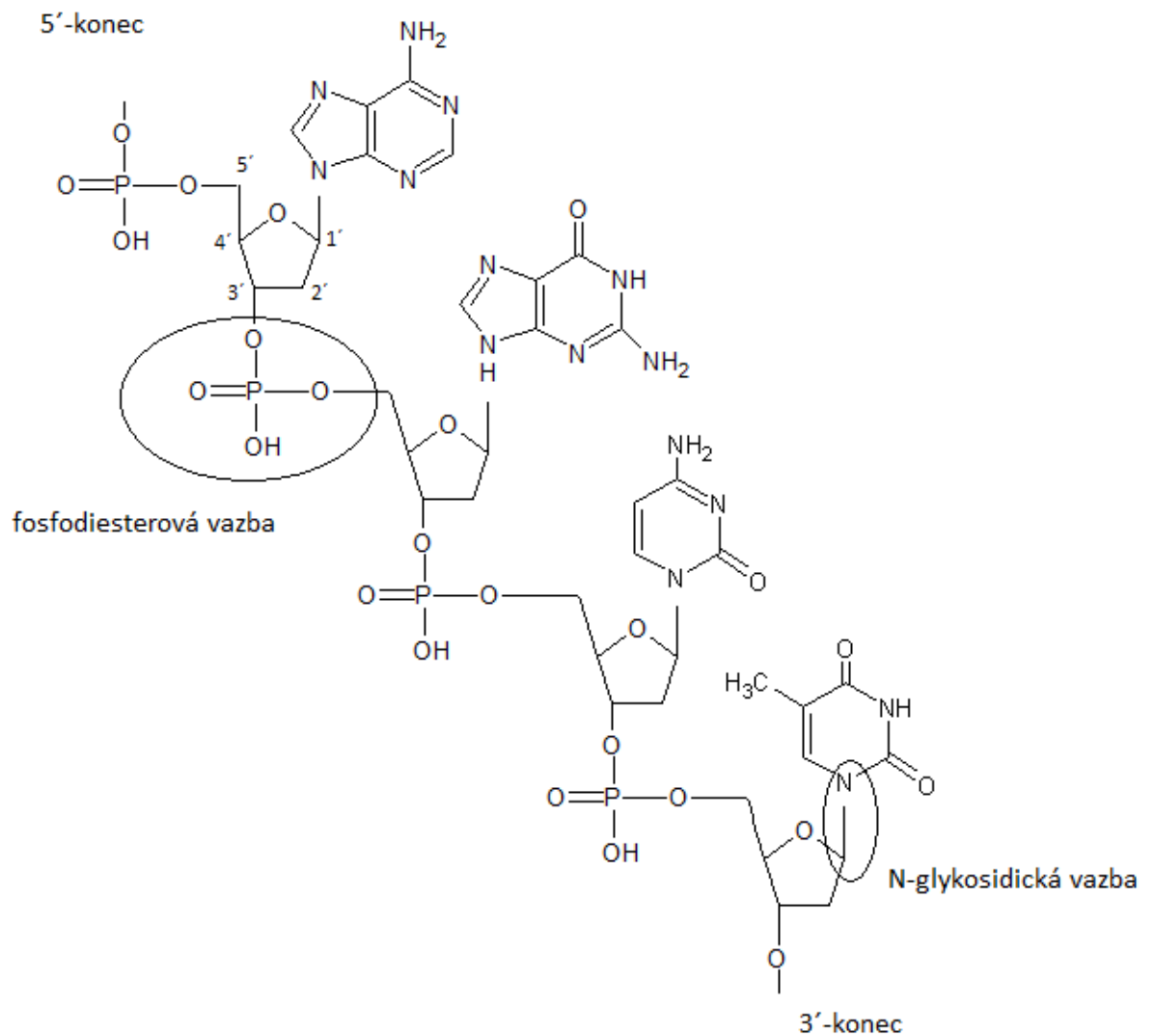
Jednotlivé nukleotidy jsou složeny z nukleosidů, které jsou vázány na fosfátovou skupinu (Klásek, 2013). Nukleosid je tvořen pentosou, na jejímž poloacetálovém uhlíku je navázána N-glykosidickou vazbou heterocyklická báze. Pentosou je 2'-deoxyribosa. V DNA se vyskytují čtyři heterocyklické báze. Dvě z bází jsou deriváty purinu, další dvě jsou deriváty pyrimidinu (Obr. 1).



Obr. 1 Chemická struktura purinových a pyrimidinových bází

Nukleotidové jednotky jsou pospojovány pomocí esterové vazby s kyselinou fosforečnou tak, že 5'-hydroxylová skupina jednoho nukleosidu se váže na 3'-hydroxylovou

skupinu dalšího nukleosidu, tudíž jeden konec polymeru nukleové kyseliny končí 3'-konce, druhý 5'-konce (Obr. 2) (McMurry, 2012).



Obr. 2 Primární struktura DNA, převzato a upraveno z:

<http://www.studiumbiochemie.cz/na.html>, 11. 3. 2017

### 2.1.2 Způsoby hydrolýzy DNA

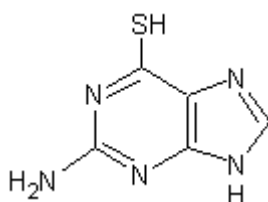
Zásaditá hydrolýza je jedna z možností hydrolýzy nukleových kyselin (Alberts, 2002). Fosfoesterové vazby se snadno štěpí zředěnými zásadami za vzniku nukleotidů. N-glykosidická vazba zůstává zachována. DNA je vůči zásadité hydrolýze stabilnější kvůli nepřítomnosti hydroxylové skupiny v poloze 2'. Zásaditá hydrolýza se provádí zásadami, jako jsou hydroxid sodný nebo hydroxid amonný.

Další možností je kyselá hydrolýza (Zenkova, 2004). Při mírně kyselé hydrolýze dochází k apurinaci. Purinové báze se obecně odštěpují snáze než pyrimidinové, tudíž hydrolyzát obsahuje převahu purinových bází a pyrimidinových nukleotidů. Fosfoesterové vazby jsou těžce hydrolyzovány oproti N-glykosidickým vazbám. V silně kyselém prostředí a při zvýšené teplotě se DNA štěpí na jednotlivé báze a cytosin se deaminuje na uracil. Kyselá hydrolýza se provádí kyselinou sírovou, kyselinou mravenčí, nebo kyselinou chlorovodíkovou (Dervieux, 2005).

Pro stanovení primární sekvence DNA je vhodná enzymatická hydrolýza. Tuto hydrolýzu katalyzují nukleázy. DNA je zhydrolyzována na jednotlivé nukleotidy (Wang, 2010).

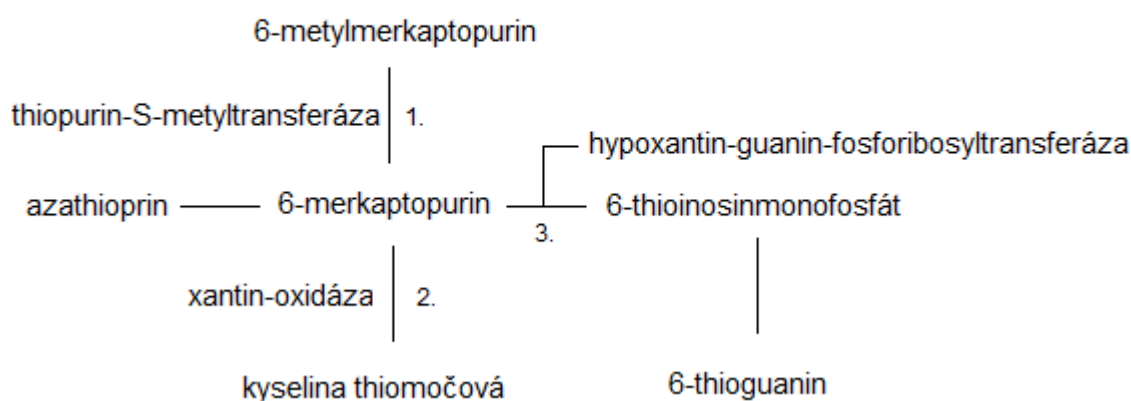
### 2.1.3 Merkaptopuriny

Merkaptopuriny jsou purinové báze, které obsahují thiolové skupiny (Chalupná, Lukáš, 2004) Jedná se o antimetabolity purinových bází. Jsou to cytostatika inhibující syntézu nukleových kyselin. Hlavním mechanismem účinku je zásah do buněčného jádra, a tím narušení množení buněk (Česká onkologická společnost, 2017). Řadí se mezi ně například azathioprin (AZA), 6-merkaptopurin (6-MP) a 6-thioguanin (6-TG). AZA je proléčivem, které je v játrech přeměněno na 6-MP (Schwab, 2001). 6-TG, který je analogem přirozeně se vyskytující purinové báze guaninu (Obr. 3), je hlavní účinnou látkou, která zprostředkovává imunosupresivní efekt léčiva AZA a 6-MP. Tento efekt je zprostředkován indukci apoptózy nadměrně stimulovaných lymfocytů. 6-TG je využíván ve zdravotnictví v terapii pacientů s idiopatickými střevními záněty, akutní lymfatickou leukémií, chronickou myeloidní leukémií, Crohnovou nemocí a ulcerózní kolitidou. Až u 60 % pacientů má pozitivní odpověď na léčbu.



Obr. 3 Chemická struktura 6-TG

6-MP je metabolizován třemi cestami (Chalupná, 2004). První cestou (1.) je metylace enzymem thiopurin-S-metyltransferázou na 6-metylmerkaptopurin (6-MMP). 6-MMP je zodpovědný za nežádoucí účinky léčby merkaptopurinů, konkrétně působí hepatotoxicky. Druhou cestou (2.) je degradace molekuly xanthin-oxidázou na thiouráty. Třetí cesta (3.) využívá enzym hypoxanthin-guanin-fosforibosyltransferáza, která enzymatickými reakcemi přemění 6-MP na 6-TG přes meziprodukt 6-thioinosinmonofosfát. Tato cesta vede ke tvorbě metabolitů, které mají schopnost zabudovat se do DNA (Obr. 4). 6-TG je metabolizován dvěma hlavními cestami: metylací za vzniku 2-amino-6-metylthiopurinu a deaminací za vzniku 2-hydroxy-6-merkaptopurinu, který je dále oxidován na kyselinu thiomočovou. Metabolit 2-amino-6-metylthiopurin má schopnost zabudovat se do DNA. Naopak tomu vznik 2-hydroxy-6-merkaptopurinu vede ke vzniku kyseliny thiomočové, která je jako odpadní produkt vyloučena z těla (Munshi, 2014). 6-MP a 6-TG mají schopnost zabudovat se do DNA a tím způsobit cytotoxický účinek.



Obr. 4 Enzymatická dráha přeměny azathioprinu a 6-merkaptopurinu, převzato a upraveno z: Chalupná P., Lukáš M., Šroubková R., Bortlík M., Stříteský J., Kumšta M. Šebesta I. *6-thioguanine therapy in inflammatory bowel disease*. Folia Gastroenterol Heptaol 2004, 2(3): 112-120

Léčivé přípravky registrované v České republice na bázi merkaptopurinů jsou Puri-nethol a Xaluprine s účinnou látkou merkaptopurin (Státní ústav pro kontrolu léčiv, 2017). Azathioprin je součástí tří léčivých přípravků: Azathioprin, Imuran a Imasup. Lék Lanvis obsahuje 6-thioguanin jako účinnou látku.

Stanovení 6-TG je možné elektrochemicky (Mirmomtaz, 2009), kapilární elektroforézou se spektrofotometrickou detekcí (Flores, 2003), (Wang, 2005), nejčastěji

ovšem pomocí kapalinové chromatografie se spektrofotometrickou detekcí (Boulieu, 1993), (Hawwa, 2009) nebo hmotnostně spektrometrickou detekcí (Tabulka 1).

Tabulka 1. Příklady stanovení 6-thioguaninu pomocí kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostně spektrometrickou detekcí v biologické matrici

<b>Matrice</b>	<b>Látky</b>	<b>Separační kolona</b>	<b>Chromatografické podmínky</b>	<b>Příprava vzorku</b>	<b>Citace</b>
Červené krvinky	6-TG, 6-MMP	C18, 3 µm, 2,1 x 150 mm, Waters	2,5*10 <sup>-3</sup> mol/l octan amonný s 0,1 % kyselinou mravenčí (A), acetonitril s 0,1 % kyselinou mravenčí (B), isokratická eluce 95 % A	DTT, kyselina chloristá, inkubace 100 °C po 1 hodinu	Dervieux, 2005
Plná krev	6-TG, 6-MP	HILIC BEH 1,7 µm, 2,1 x 50 mm, Waters	10*10 <sup>-3</sup> mol/l mravenčan amonný s 160*10 <sup>-3</sup> mol/l kyselinou mravenčí (A), acetonitril (B), isokratická eluce 95 % B	Derivatizace, extrakce na pevné fázi	Jacobsen, 2012
Plasma	6-MP, 6-TG	UPLC BEH shield RP 1,7 µm, 2,1 x 150 mm, Waters	0,1 % kyselina mravenčí (A), acetonitril (B), isokratická eluce 85 % B	Extrakce na pevné fázi	Al-Ghobashy, 2016
Plná krev	6-MMP, 6-TG	BEH C18 1,7 µm, 2,1 x 50 mm, Waters	2*10 <sup>-3</sup> mol/l s 0,1 % kyselinou mravenčí (A), 2*10 <sup>-3</sup> mol/l s 0,1 % kyselinou mravenčí v acetonitrilu, gradientová eluce: 3 % B -> 95 % B -> 3 % B	DTT, kyselina sírová, inkubace 95 °C po 3 hodiny	Zochowska, 2016

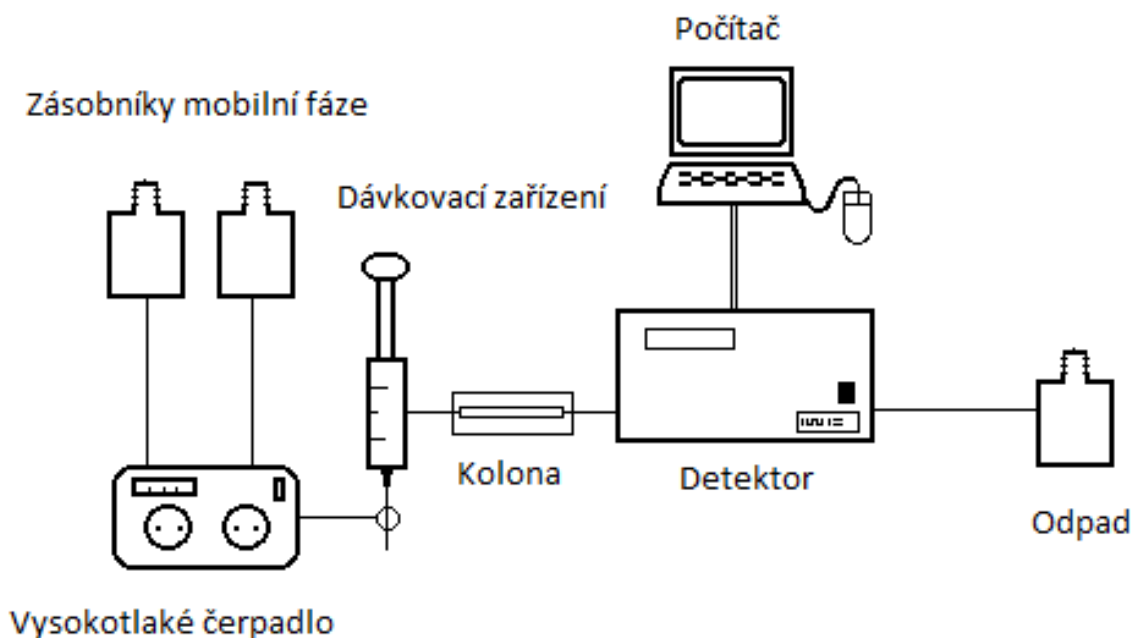
## 2.2 KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE

### 2.2.1 Kapalinová chromatografie

Kapalinová chromatografie představuje techniku umožňující separaci složek ve vzorku za účelem stanovení jejich přítomnosti a koncentrace (Praus, Vontorová, 2015). Pomocí kapalinové chromatografie se dělí skupiny netěkavých organických a anorganických sloučenin, které se v mobilní fázi rozpouštějí.

### 2.2.2 Složení kapalinového chromatografu

Hlavními částmi jsou zásobníky mobilní fáze, vysokotlakové čerpadlo, dávkovací zařízení, kolona, detektor a počítač (Obr. 5) (Praus, Vontorová, 2015).



Obr. 5 Schéma kapalinové chromatografy, převzato a upraveno z:

<http://www.hplc.cz/Der/pcrs.htm>, 8. 3. 2017

Vysokotlaké čerpadlo zachovává konstantní průtok mobilní fáze za velmi malých průtoků ( $0,1 - 10 \text{ cm}^3/\text{min}$ ) a poměrně vysokých tlaků (30-50 MPa) (Churáček, 1985). Nejčastěji se používají membránová nebo pístová čerpadla. Před čerpadla se zařazují odplynovače mobilní fáze odstraňující vzduchové mikrobublinky, které by se na výstupu z kolony díky poklesu tlaku uvolňovaly a znemožňovaly úspěšnou separaci. V kapalinové chromatografii se využívá dvou modů čerpání mobilních fází: isokratický, při kterém je za stálého průtoku čerpána jedna mobilní fáze, a gradientový, kdy v průběhu jedné analýzy lze měnit složení i průtok mobilní fáze.

Separační kolony slouží k vlastní separaci (Nováková, 2013). Kolony jsou kovové trubice plněné vhodným sorbentem, mezi nichž patří silikagel, chemicky vázané fáze na bázi silikagelu, polymerní a hybridní sorbenty, oxid hlinitý, aktivní uhlí. Rozměry kolon se pohybují v délce 5-30 cm s vnitřním průměrem 1-4 mm. (Churáček, 1985). Účinnost kolon závisí na kvalitě použitého sorbentu, na délce kolony, jejím tvaru, materiálu a na spojovacích součástech.

Mezi polární sorbenty kolon se řadí silikagel a oxid hlinitý (Praus, Vontorová, 2015). Díky kyselosti silně ovlivňují separaci bazických sloučenin. S polárními sorbenty se pracuje v systému s normálními fázemi. V tomto systému platí, že polarita mobilní fáze je menší než polarita stacionární fáze. Na koloně se zadržují analyty s vyšším obsahem hydrofilních oblastí (polární látky). Mezi nepolární sorbenty kolon patří tzv. chemicky vázané fáze, které vznikají chemickou modifikací silikagelu. Nepolární sorbenty využívá chromatografie na reverzní fázi. V tomto systému je polarita mobilní fáze větší než polarita stacionární fáze. Velmi často se používá technika gradientové eluce, při které se polarita mobilní fáze mění během separace v závislosti na čase. Na koloně se zadržují analyty s vyšším obsahem hydrofobních oblastí (nepolární látky).

Jako mobilní fáze se používají organická rozpouštědla nebo různé elektrolyty (Praus, Vontorová, 2015).

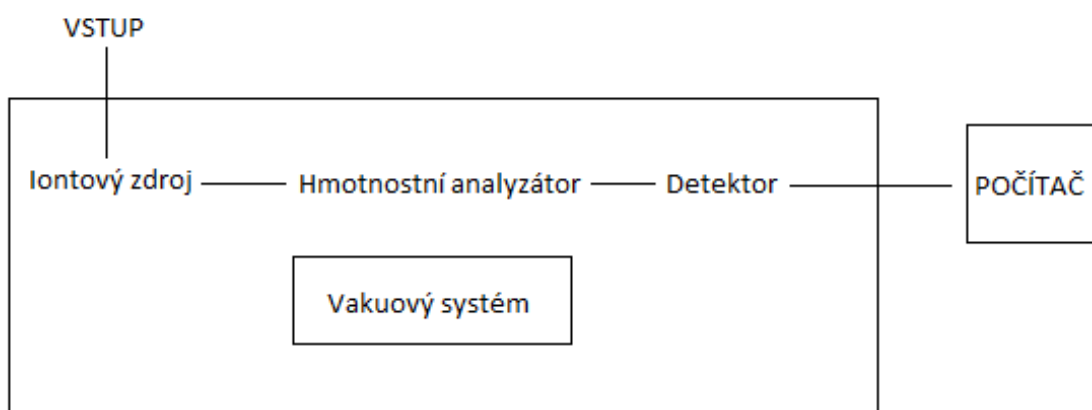
Detektory lze rozdělit na univerzální a selektivní (Praus, Vontorová, 2015). Mezi univerzální patří refraktometrický a konduktometrický detektor. Selektivními detektory jsou spektrofotometrický, fluorimetrický, elektrochemický nebo hmotnostní. Data z detektoru jsou vyhodnocována na počítači.



## 2.3 HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

Hmotnostní spektrometrie je analytická metoda sloužící k určování hmotnosti molekul a jejich částí. Metoda je založená na převedení molekul na ionty, rozlišení těchto iontů podle poměru hmotnosti a náboje ( $m/z$ ) a detekci v hmotnostním analyzátoru (Klásek, 2013).

Základními částmi hmotnostního spektrometru jsou: iontový zdroj, ve kterém dochází k ionizaci, hmotnostní analyzátor, kde dochází k separaci směsi iontů podle hodnoty  $m/z$ , detektor a počítač (Obr. 6)



Obr. 6 Schéma hmotnostního spektrometru, převzato a upraveno z:

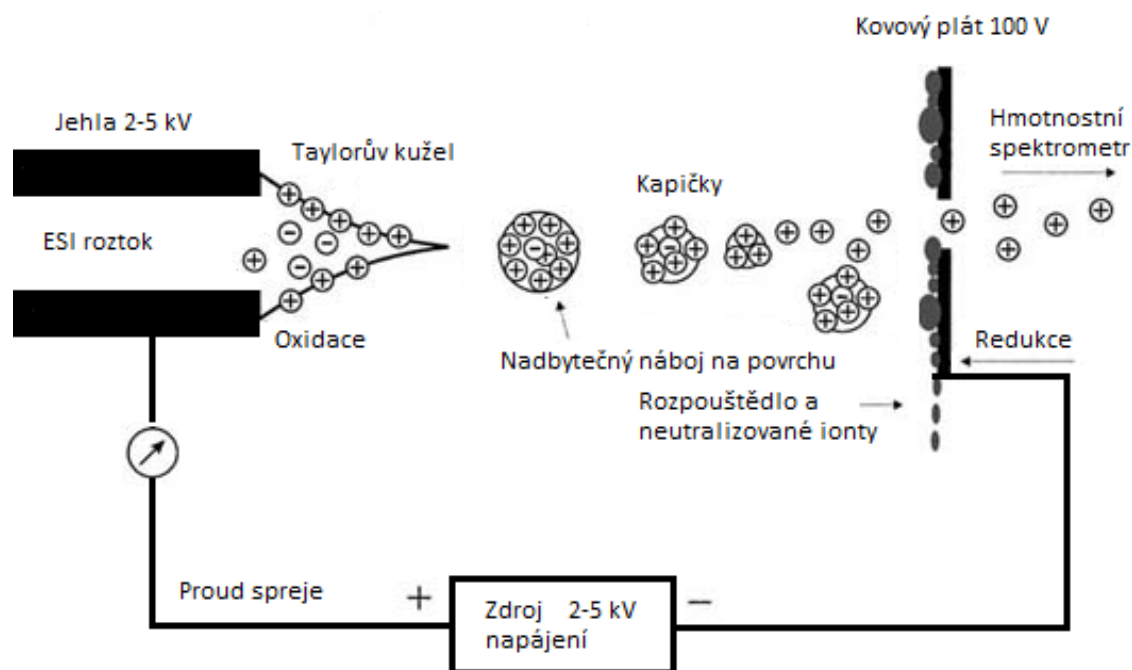
<http://slideplayer.cz/slide/2523025/>, 20.2.2017

### 2.3.1 Ionizační techniky

Podle množství energie lze ionizační techniky dělit na tvrdé a měkké (Lee, 2003). Tvrdé ionizační techniky mají dodanou energii dostatečně velkou, aby z neutrální molekuly vytvořili ion a dále tento ion štěpily. Mezi tvrdé ionizační techniky patří elektronová ionizace a chemická ionizace. Měkké ionizační techniky poskytují molekulám mnohem menší množství energie, proto jsou ve spektrech pozorovány ionizované molekuly a minimum fragmentových iontů. Mezi sprejové měkké ionizační techniky se řadí ionizace elektrosprejem, chemická ionizace za atmosférického tlaku, ionizace termosprejem a fotoionizace za atmosférického tlaku.

Ionizace elektrosprejem je měkká ionizační technika (Hoffmann, 2007). Tato technika umožňuje převedení iontů z roztoku do plynné fáze. V důsledku působení silného elektrického pole dochází k ionizaci vzorku. Elektrické pole je vyvoláno aplikací elektrického napětí (2-5 kV), díky čemuž dojde ke vzniku malých nabitých kapiček. Odpařováním rozpouštědla dochází ke zmenšování kapiček, a tím ke zvyšování hustoty povrchového

náboje. Nastane Coulombická exploze, při které dochází k rozpadu na menší kapičky, mezi kterými je distribuován původní náboj až ke vzniku molekulárního iontu (Obr. 7).



Obr. 7 Schéma ionizace elektrosprejem, převzato a upraveno z:

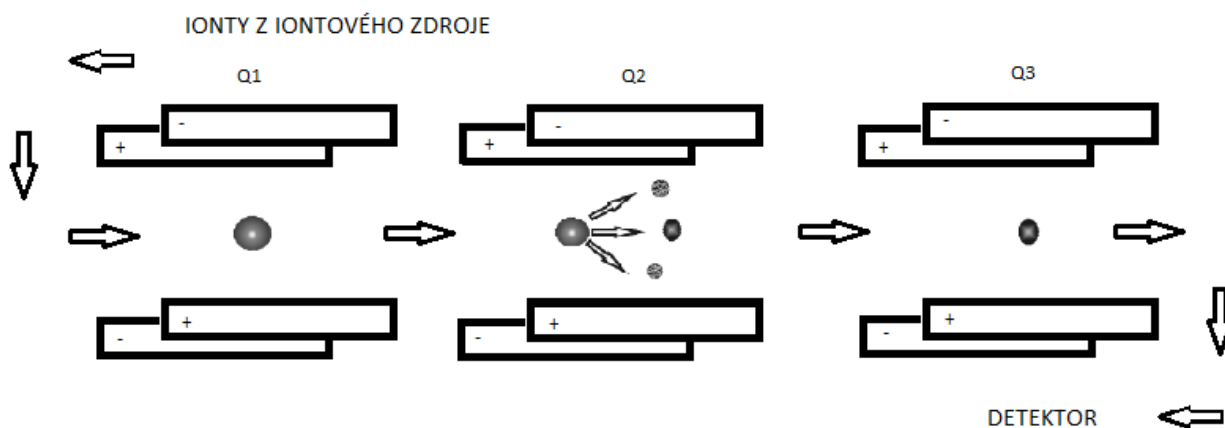
Cech N. B., Enke Ch., *Practical Implications of Some Recent Studies in Electrospray Ionization Fundamentals*. Mass Spectrometry Reviews, 2001, 24. 3. 2017

### 2.3.2 Analyzátor

Analyzátor odděluje ionty dle jejich  $m/z$  (Holčápek, 2016). Mezi analyzátory se řadí iontová past, analyzátor doby letu, orbitrap, iontová cyklotronová rezonance a kvadrupólový analyzátor.

Kvadrupólový analyzátor je nejběžněji používaným analyzátozem pro účely kvantitativní analýzy (Banerjee, 2012). Skládá se ze čtyř kovových tyčí rozmístěných okolo středu osy. Na dvě z nich je vloženo kladné napětí, na zbylé dvě záporné napětí. Ion je přiveden do středu osy kvadrupólu, kde dochází k jeho oscilaci. Oscilace je stabilní pouze pro ion s určitou hodnotou  $m/z$ , který projde kvadrupólem a dostane se až na detektor.

Trojitý kvadrupólový analyzátor se skládá ze tří kvadrupólů řazených za sebou (Banerjee, 2012). První kvadrupól selektuje prekurzorové ionty. Prostřední z kvadrupólů slouží jako kolizní cela s kolizním plynem, který způsobí excitaci, vybraných iontů prvním kvadrupólem. Vzniklé fragmenty jsou analyzovány třetím kvadrupólem (Obr. 8).



Obr. 8 Schéma trojitého kvadrupólového analyzátoru, převzato a upraveno z:

[https://www.researchgate.net/publication/266890675\\_KVANTIFIKACE\\_PROTEINOVYCH\\_BIOMARKERU\\_POMOCI\\_HMOTNOSTNI\\_SPEKTROMETRIE\\_PRACUJICI\\_V\\_REZIMU\\_MONITOROVANI\\_VYBRANYCH\\_REAKCI](https://www.researchgate.net/publication/266890675_KVANTIFIKACE_PROTEINOVYCH_BIOMARKERU_POMOCI_HMOTNOSTNI_SPEKTROMETRIE_PRACUJICI_V_REZIMU_MONITOROVANI_VYBRANYCH_REAKCI), 10. 3. 2017

### 2.3.3 Detektor

Detekce iontů je založena na základě jejich náboje nebo rychlosti (Hoffmann, 2007). Detektory využívají hmotnostní analyzátor s výjimkou orbitrapu a iontové cyklotronové rezonance, kde probíhá detekce přímo v analyzátoru. Existují dva typy detektorů: detektory pro přímá měření detekující elektrický proud vznikající přímým dopadem stanovených iontů a násobičové detektory využívající efekt násobení elektronů. Nejpoužívanějšími detektory jsou detektory na bázi elektronových násobičů.

### **3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

#### **3.1 PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ A MATERIÁL**

Analytické kolony

ACQUITY UPLC HSS T3 1,8  $\mu\text{m}$ , 2,1 mm x 100 mm

ACQUITY UPLC BEH C18 1,7  $\mu\text{m}$ , 2,1 mm x 100 mm

ACQUITY UPLC BEH Amide Column, 1,7  $\mu\text{m}$ , 2,1 mm x 100 mm

Kapalinový chromatograf ACQUITY Ultra Performance (Waters, USA)

PDA Detector (Waters, USA)

Sample manager (Waters, USA)

Binary Solvent Manager (Waters, USA)

Hmotnostní spektrometr Quattro micro API Tandem Quadrupole System (Waters, USA)

Teplotní třepačka Thermo Shaker Grant Bio (Botgal, UK)

Výparník Caliper Life Sciences TurboVap LV (GenTech Scientific, USA)

Systém na úpravu vody Millipore Simplicity Personal Ultrapure Water System (Cole Parmer, USA)

Vortex mixér Wizard Advanced IR 30x100 (Velp Scientifica, Itálie)

Ultrazvuk Elma Transsonic 310 (Labexchange, Německo)

#### **3.2 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE**

Kyselina mravenčí (Fluka, eluent additive for LC-MS, 98 %, p.a., MW 46,03)

Acetonitril (Merck Millipore, gradient grade for liquid chromatography, MW 41,05)

Amoniak (EMD Millipore, 25 %, MW 35,04)

Methanol (Sigma-Aldrich, gradient grade for liquid chromatography, MW 32,04)

Dithiothreitol (Sigma-Aldrich, MW 154,25)

Kyselina chloristá (Lach-ner, MW 100,46)

Adenin (Sigma-Aldrich, 99 %, MW 135,13)

Guanin (Sigma-Aldrich, 98 %, MW 151,13)

Thioguanin (Sigma-Aldrich, 98 %, MW 167,19)

### 3.3 PŘÍPRAVA ROZTOKŮ

Byl připraven zásobní roztok adeninu, guaninu a thioguaninu. Pevné standardy látek byly naváženy a rozpuštěny v deionizované vodě. Výsledná koncentrace roztoku adeninu byla  $5 \cdot 10^{-3}$  mol/l, guaninu a thioguaninu  $1 \cdot 10^{-2}$  mol/l.

Byl připraven zásobní roztok dithiotreitolu (DTT) – 75 mg/ml rozpuštěno v 15 ml deionizované vody.

Byly připraveny mobilní fáze A, B. První připravená mobilní fáze A byla složena z  $2,5 \cdot 10^{-3}$  mol/l octanu amonného s 0,1 % kyselinou mravenčí a doplněna na objem 250 ml deionizovanou vodou. První mobilní fáze B obsahovala 0,1 % kyselinu mravenčí smíchanou s acetonitrilem do 250 ml (tabulka 2).

Následná mobilní fáze obsahovala 0,05 % kyselinu mravenčí (125  $\mu$ l) doplněnou deionizovanou vodou na objem 250 ml. Mobilní fáze B byla složena z 0,05 % kyseliny mravenčí (125  $\mu$ l) smíchanou s acetonitrilem do objemu 250 ml (tabulka 3).

Další mobilní fáze A obsahovala  $15 \cdot 10^{-3}$  mol/l mravenčan amonný (3,75 ml kyseliny mravenčí, dotitrováno amoniakem) doplněný na objem 250 ml deionizovanou vodou a mobilní fáze B byla složena z 250 ml methanolu (Tabulka 4 a 5).

Finální mobilní fáze A obsahovala 0,1 % kyselinu mravenčí (250  $\mu$ l) doplněnou na objem 250 ml deionizovanou vodou. Mobilní fáze B obsahovala čistý acetonitril ve 250 ml láhvi (Tabulka 6).

### 3.4 VZORKY DNA

Vzorky DNA byly připraveny a poskytnuty Mgr. Annou Janošťákovou a doc. Drábkem z Ústavu molekulární a translační medicíny v Olomouci. DNA byla vyizolována kitem Cobas od firmy Roche z kontrolních CEM buněk a CEM buněk inkubovaných s 10 nebo 50  $\mu$ g/ml 6-thioguaninu.

## 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

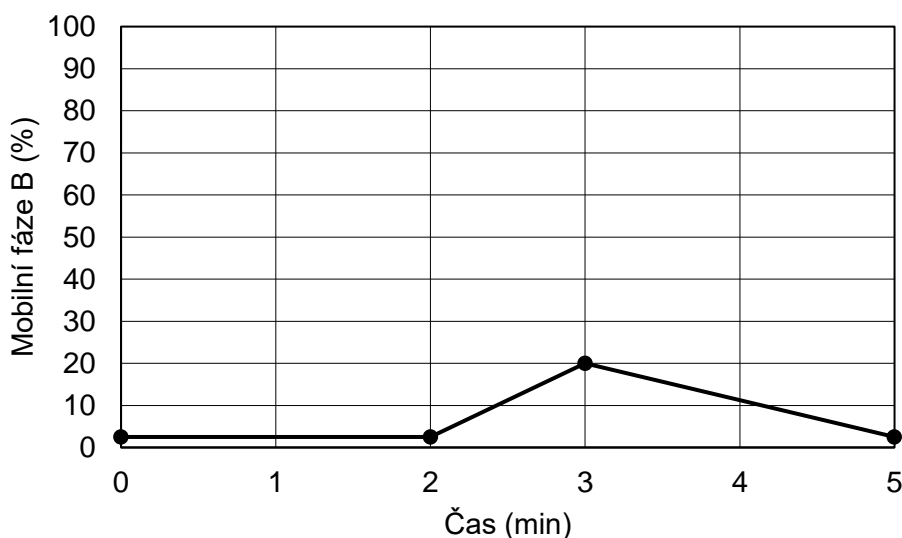
### 4.1 OPTIMALIZACE SEPARAČNÍCH PODMÍNEK

Za účelem optimalizace byly testovány dvě kolony s reverzními fázemi C18 (ACQUITY UPLC HSS T3 a ACQUITY UPLC BEH C18) a jedna kolona s polární amido fází (ACQUITY UPLC BEH Amide). Cílem optimalizace byla separace analytů za co nejlepšího tvaru chromatografických píků mimo mrtvý objem kolony při co nejkratším čase analýzy. Roztoky analytů používané pro účely optimalizace měly výslednou koncentraci  $1 \cdot 10^{-5}$  mol/l a byly detekovány v režimu snímání celého hmotnostního spektra („full scan“) v pozitivním ionizačním módu.

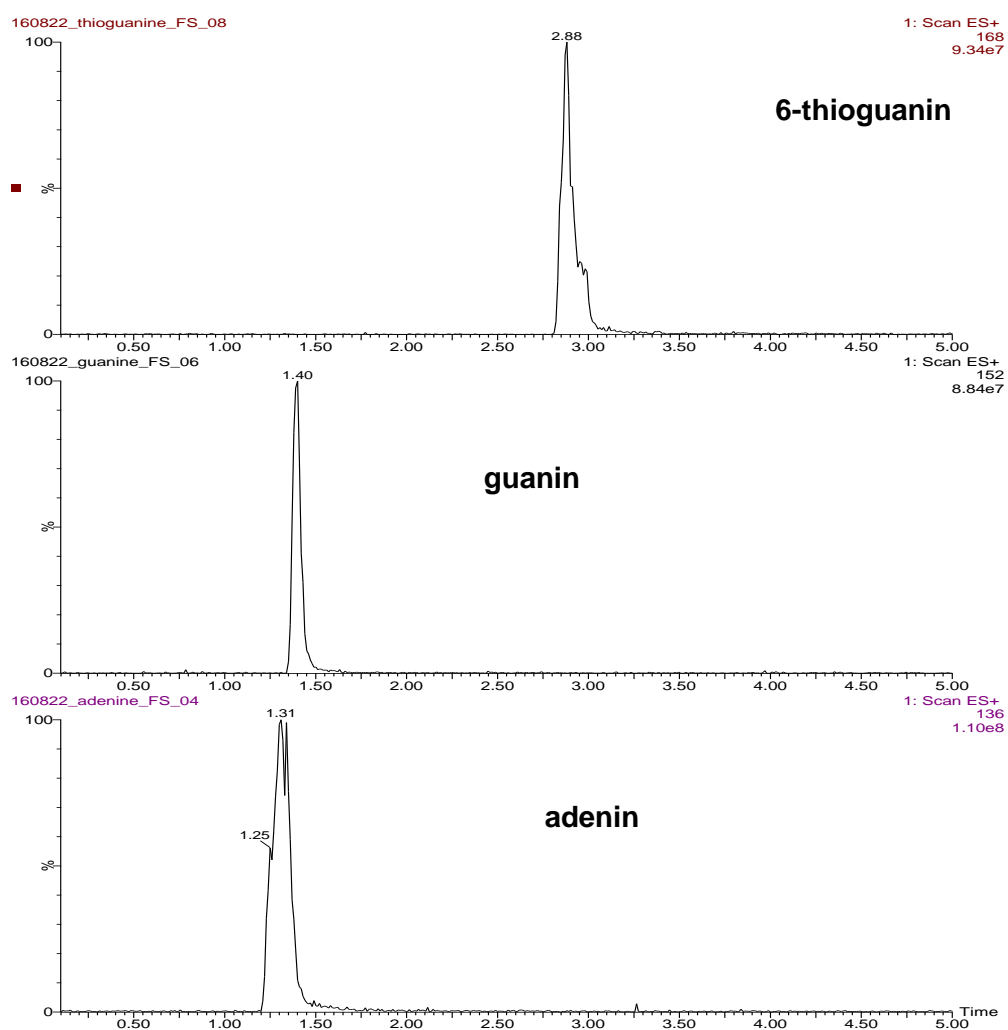
Pro první testování byla vybrána Waters kolona s „high strenght silica“ (HSS) charakterem částic na bázi 100 % silikagelu a T3 technologií vazby C18 řetězců umožňující retenci k polárním látkám. Podmínky experimentu byly inspirovány dle Dervieux, 2005. (Tabulka 2, Obr. 9).

Tabulka 2: Separační podmínky

Analytická kolona	ACQUITY UPLC HSS T3 1,8 $\mu$ m, 2,1 mm x 100 mm
Složení mobilní fáze A	$2,5 \cdot 10^{-3}$ mol/l octan amonný, 0,1 % kyselina mravenčí
Složení mobilní fáze B	0,1 % kyselina mravenčí v acetonitrilu
Nástřik	5 $\mu$ l
Průtok	0,4 ml/min
Teplota	30 °C



Obr. 9 Gradient mobilní fáze



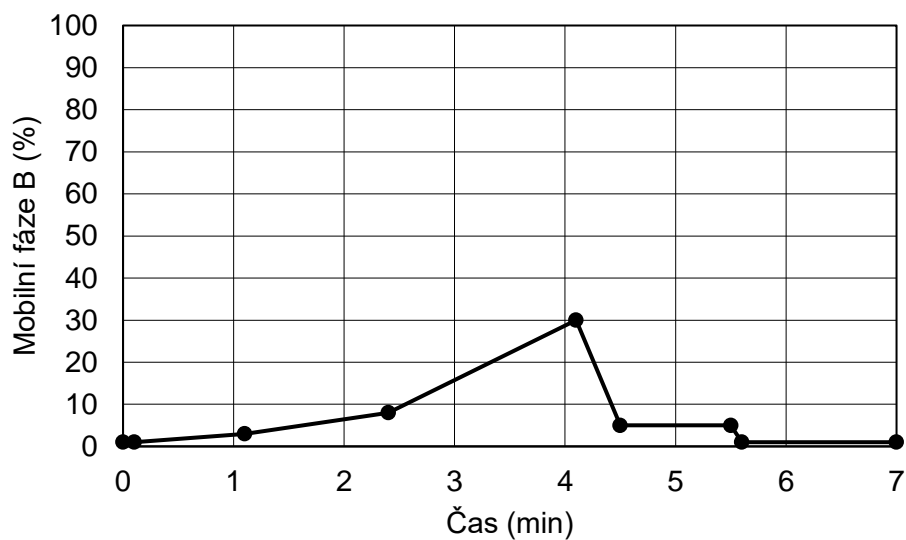
Obr. 10 Iontové chromatogramy adeninu, guaninu a thioguaninu za separačních podmínek Tabulky 2 a gradientu Obr. 9

Při tomto testování i následných modifikací gradientu nebylo dosaženo ani optimální separace ani vhodného tvaru píků (Obr. 10).

Při druhém testování byl vybrán experiment, který prováděl A. de Nicoló v roce 2014 na koloně o stejné fázi (ACQUITY UPLC HSS T3 1,8  $\mu$ m, 2,1 mm x 100 mm) za podmínek a gradientu uvedených v tabulce 3 a obrázku 11.

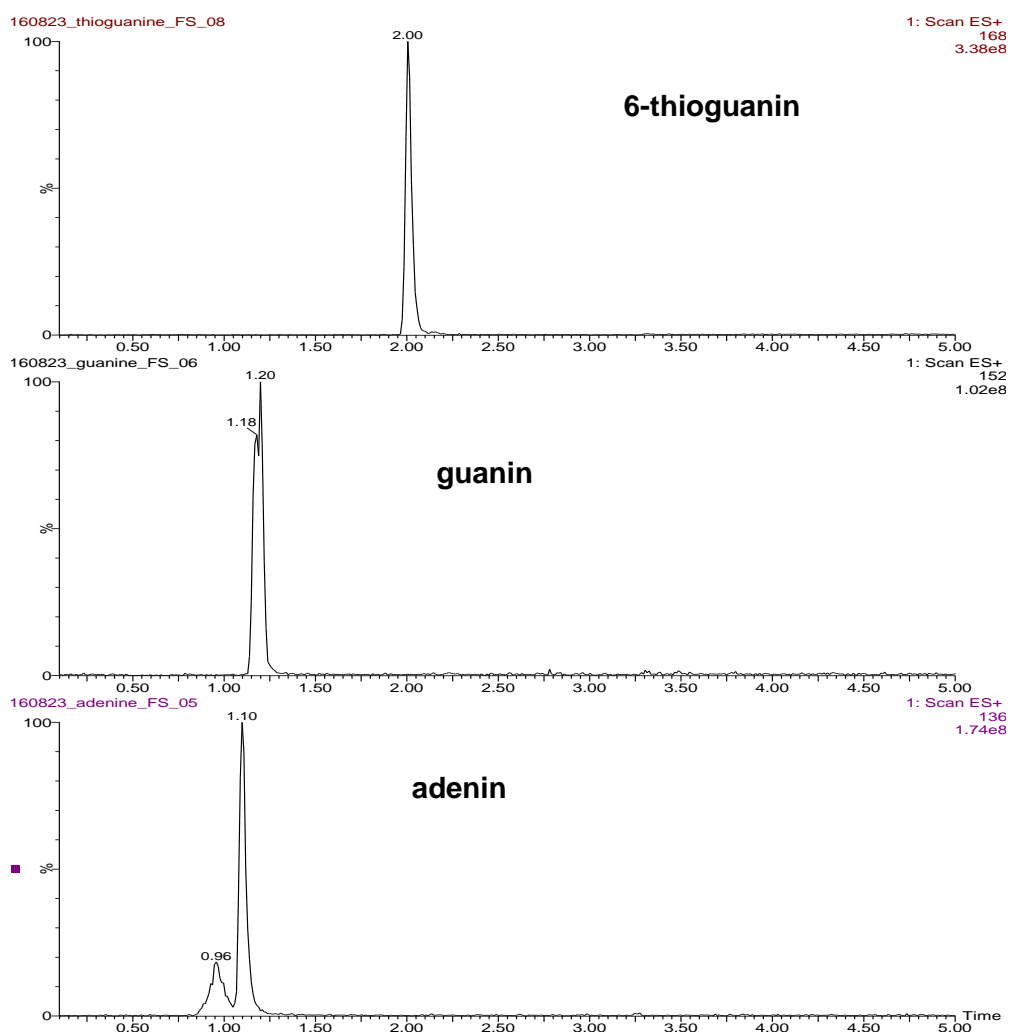
Tabulka 3: Separační podmínky dle A. de Nicoló, D. Agnesod, etc., 2014

Analytická kolona	ACQUITY UPLC HSS T3 1,8 $\mu$ m, 2,1 mm x 100 mm
Složení mobilní fáze A	0,05 % kyselina mravenčí ve vodě
Složení mobilní fáze B	0,05 % kyselina mravenčí v acetonitrilu
Nástřik	5 $\mu$ l
Průtok	0,4 ml/min
Teplota	30 °C



Obr. 11 Gradient mobilní fáze (Nicoló, 2014)





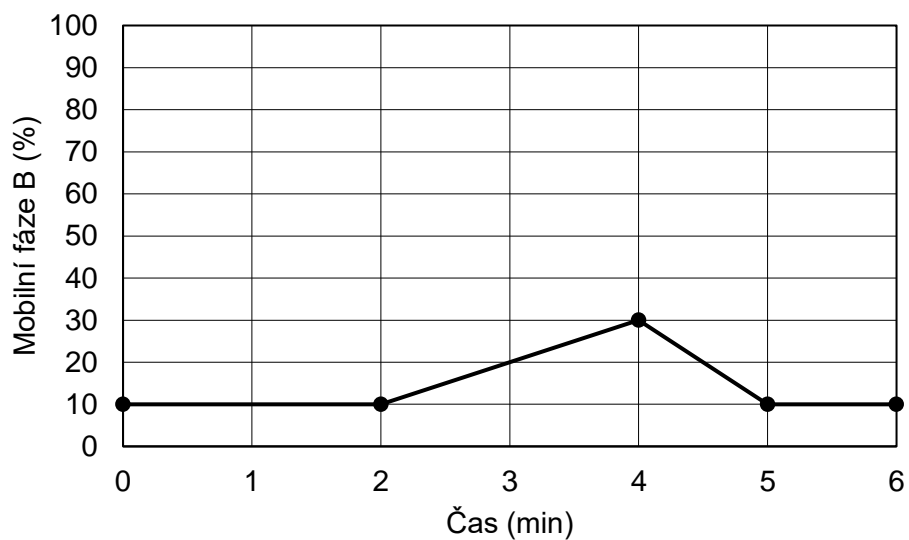
Obr. 12 Iontové chromatogramy, separační podmínky adeninu, guaninu a thioguaninu dle Nicoló (2014)

Za těchto podmínek i při následujících modifikacích gradientu nebylo dosaženo optimálního tvaru píku adeninu a guaninu ani jejich separace od mrtvého objemu kolony (Obr. 12), proto bylo od použití ACQUITY UPLC HSS T3 kolony upuštěno.

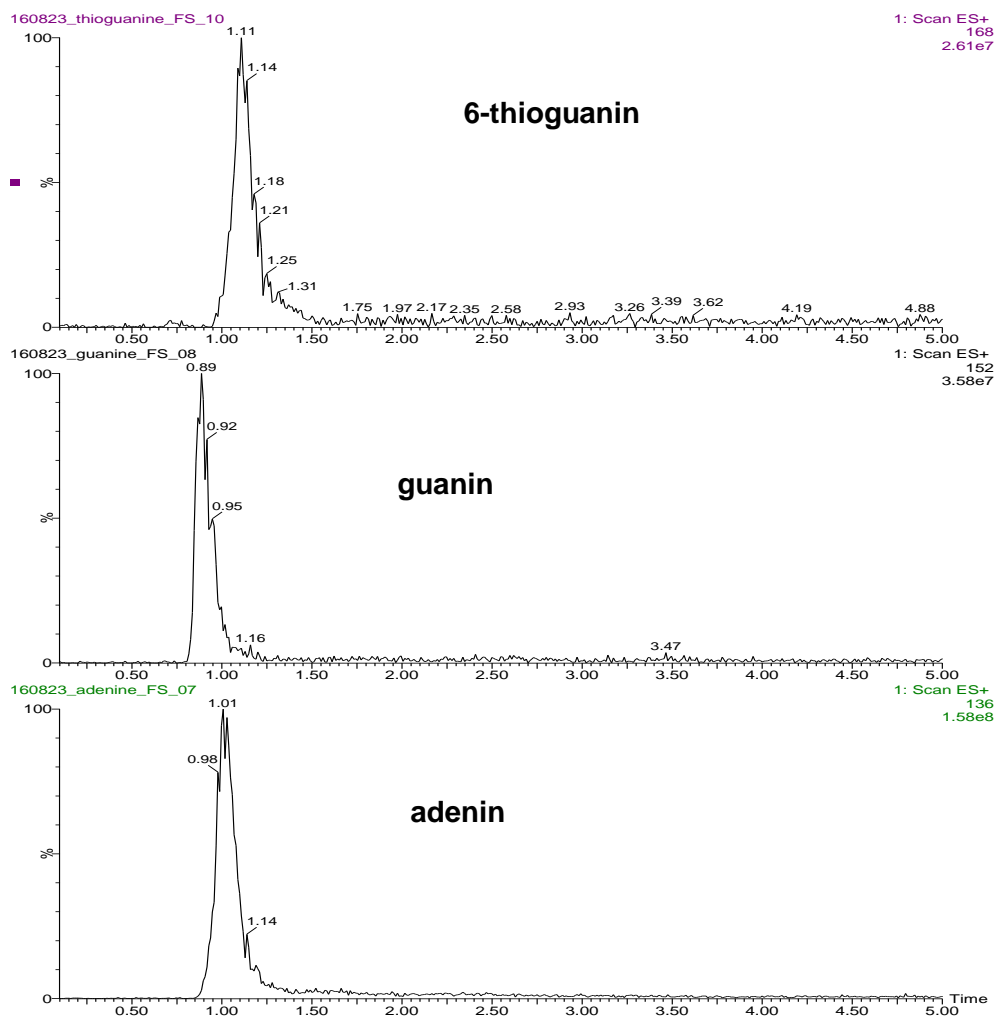
V následujícím testování byla vyměněna analytická kolona za Waters kolonu s částicemi s hybridním sorbentem „bridge ethyl hybrid“ (BEH) s fází C18 a byly připraveny nové mobilní fáze (Tabulka 4, obr. 13).

Tabulka 4: Separační podmínky analytické kolony BEH C18

Analytická kolona	ACQUITY UPLC BEH C18 1,7 $\mu$ m, 2,1 mm x 100 mm
Složení mobilní fáze A	15*10 <sup>-3</sup> mol/l mravenčan amonný, pH 4
Složení mobilní fáze B	Methanol
Nástřik	5 $\mu$ l
Průtok	0,25 ml/min
Teplota	40 °C



Obr. 13 Gradient mobilní fáze při použití kolony BEH C18



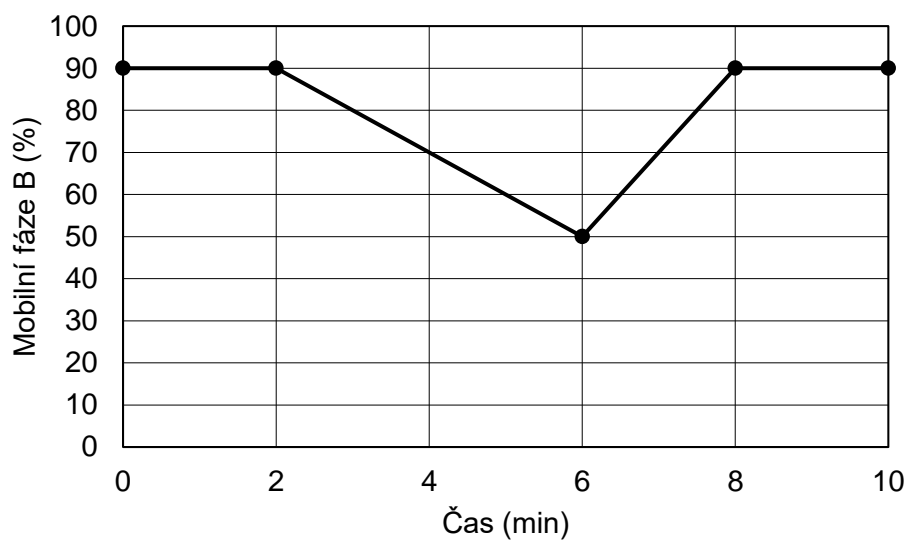
Obr. 14 Iontové chromatogramy 6-thioguaninu, adeninu a guaninu na koloně BEH C18 za separačních podmínek (Tabulka 4, Obr. 13)

V tomto experimentu se nepodařilo oddělit analyty od mrtvého objemu (Obr. 14), proto byly tyto podmínky opuštěny.

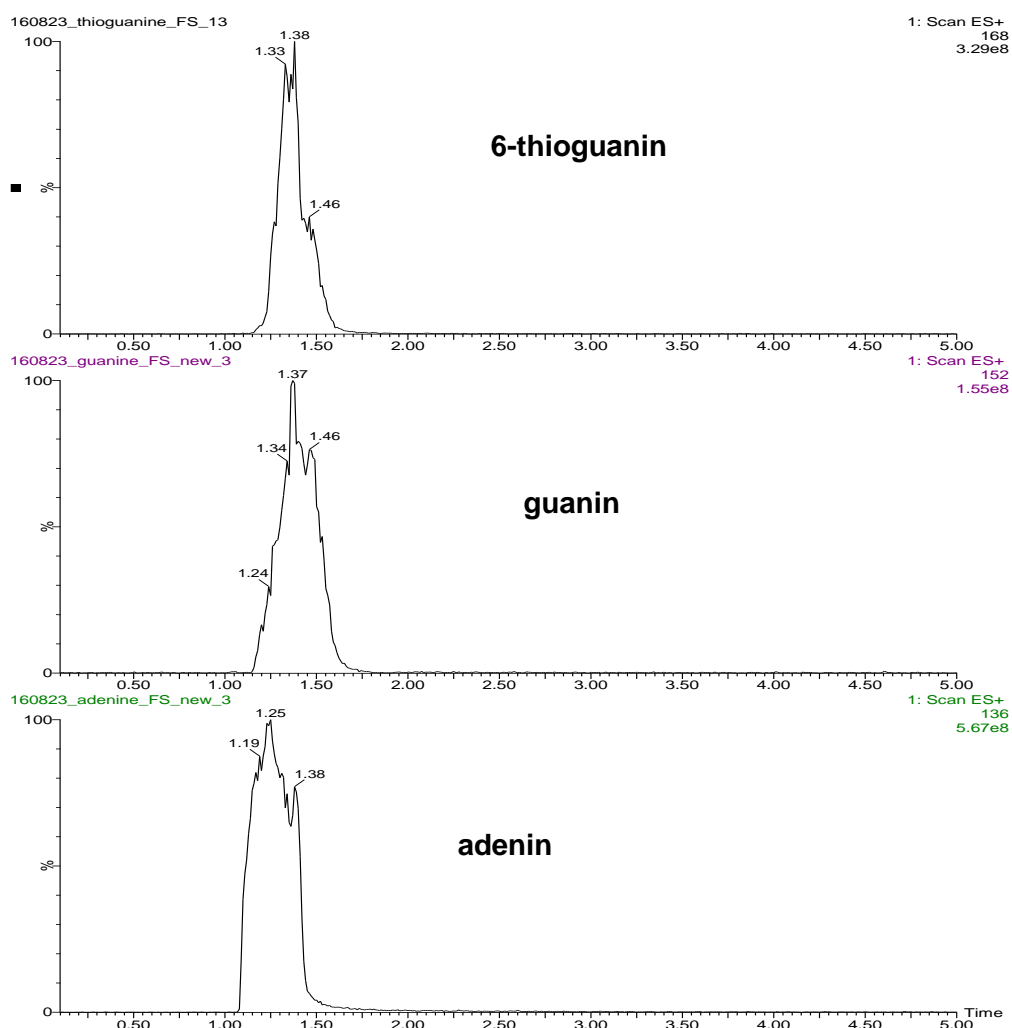
Pro další testování byla vybrána analytická kolona založena na hybridním sorbentu „BEH“ s navázanou amido fází schopná retence velmi polárních látek. Mobilní fáze byly ponechány stejné jako u předchozího experimentu (Tabulka 5) a při gradientu, jak znázorněno na obrázku 15.

Tabulka 5: Separační podmínky amidové analytické kolony

Analytická kolona	ACQUITY UPLC BEH Amide Column, 1,7 $\mu$ m, 2,1 mm x 100 mm
Složení mobilní fáze A	15*10 <sup>-3</sup> mol/l mravenčan amonný, pH 4
Složení mobilní fáze B	Methanol
Nástřik	5 $\mu$ l
Průtok	0,25 ml/min
Teplota	40 °C



Obr. 15 Gradient mobilní fáze amidové kolony



Obr. 16 Iontové chromatogramy adeninu, guaninu a thioguaninu dle separačních podmínek (Tabulka 5, Obr. 15) na amidové koloně

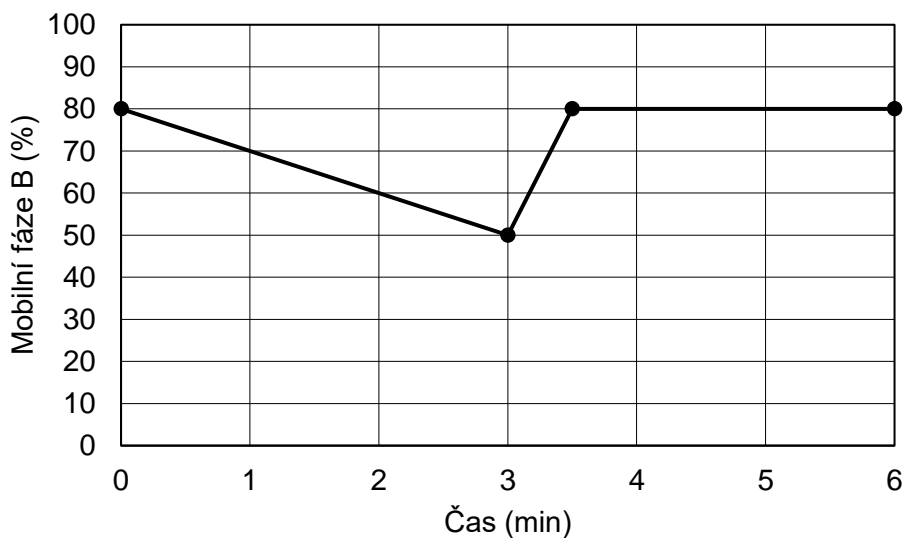
V tomto systému nebylo dosaženo separace analytů od mrtvého objemu ani optimálního tvaru píků. Pravděpodobně díky tomu, že analyty při pH vodné mobilní fáze (pH 4) nejsou dostatečně nabitě, aby se mohly zadržovat na polární stacionární fázi.

V posledním experimentu k optimalizaci separačních podmínek byla ponechána amidová analytická kolona, ale za použití kyselé vodné mobilní fáze a acetonitrilu jako organické mobilní fáze (Tabulka 6).

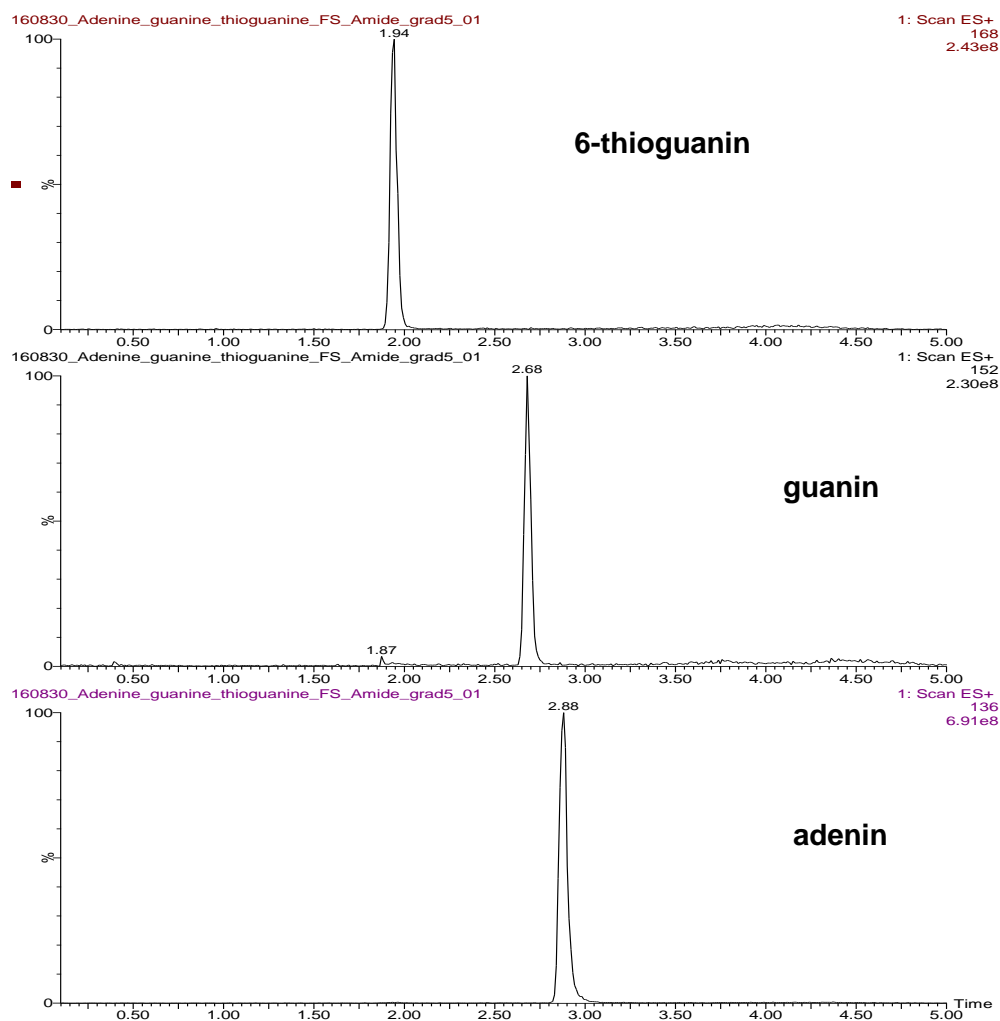
Tabulka 6: Nastolené separační podmínky při použití amidové kolony

Analytická kolona	ACQUITY UPLC BEH Amide Column, 1,7 $\mu$ m, 2,1 mm x 100 mm
Složení mobilní fáze A	0,1 % kyselina mravenčí ve vodě
Složení mobilní fáze B	Acetonitril
Nástřik	1 $\mu$ l
Průtok	0,25 ml/min
Teplota	40 °C

Za podmínek (Tabulka 6) bylo dosaženo dobré separace analytů a jejich oddělení od mrtvého objemu kolony za optimálního tvaru píků. Při kyselém pH jsou molekuly nukleových bází nabitě a mohou se na polární stacionární fázi zadržovat. Profil gradientu byl optimalizován vzhledem k celkovému času analýzy od počátečních 90 % až po finálních 80 % iniciálního obsahu organické mobilní fáze. Profil gradientu je znázorněn na obrázku 17, celková doba analýzy byla 6 min. Záznam iontového chromatogramu za optimálních podmínek je uveden na obrázku 18.



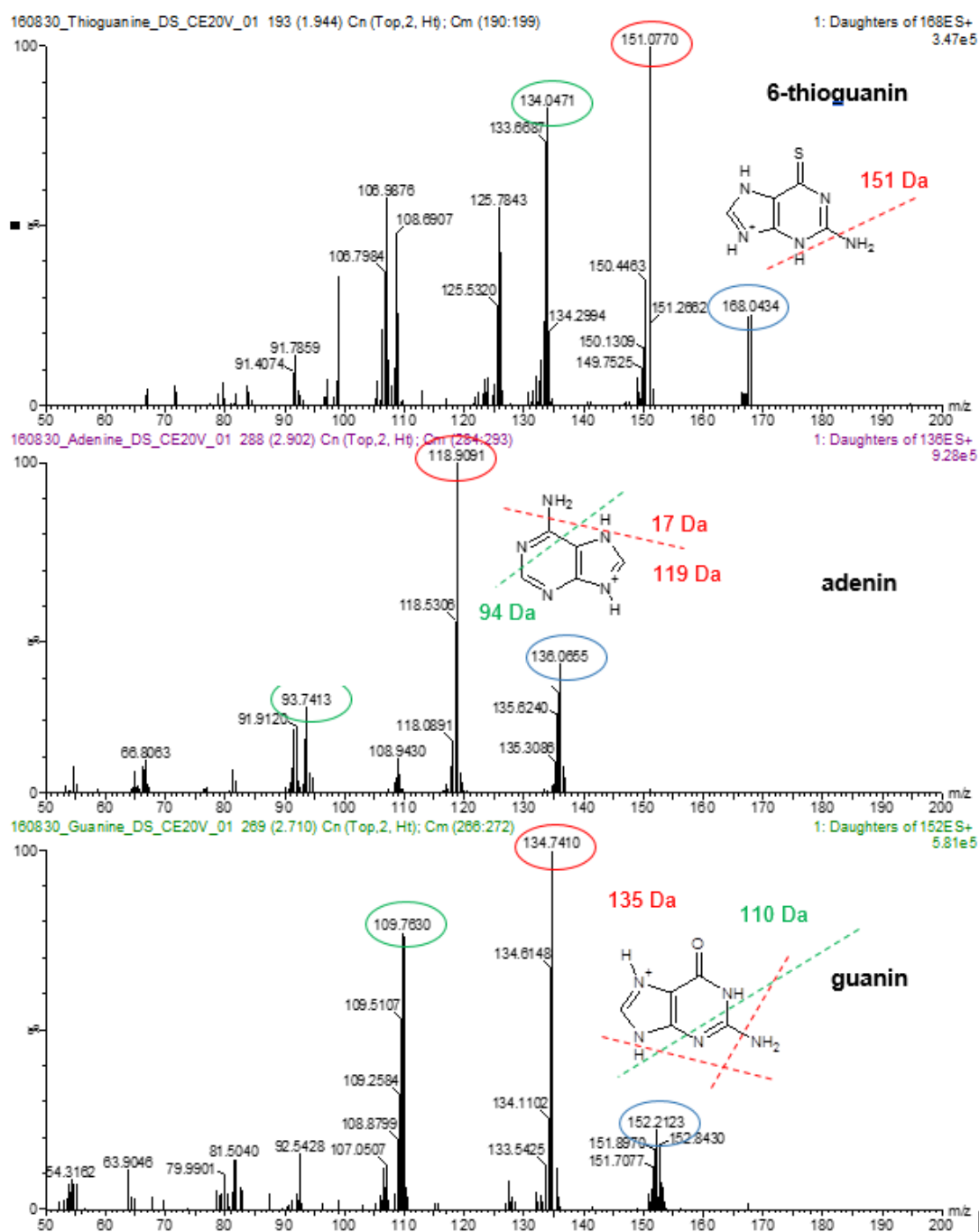
Obr. 17 Gradient mobilní fáze v závislosti na čase



Obr. 18 Iontové chromatogramy adeninu, guaninu a thioguaninu za použití finálních podmínek (Tabulka 6, Obr. 17)

## 4.2 OPTIMALIZACE HMOTNOSTNĚ SPEKTROMETRICKÝCH PARAMETRŮ

Za optimálních separačních podmínek (Tabulka 6, Obr. 17) byla v režimu skenování produktových iontů v pozitivním ionizačním módu naměřena fragmentační spektra analytů (Obr. 19). Pro dva nejintenzivnější fragmenty (kvantifikační a konfirmační) byly optimalizovány parametry: napětí na kónusu, kolizní energie a napětí na kapiláře v režimu sledování produktu rozpadu molekulárního iontu. Vybrány byly ty hodnoty, při kterých byla plocha píku analytů největší.

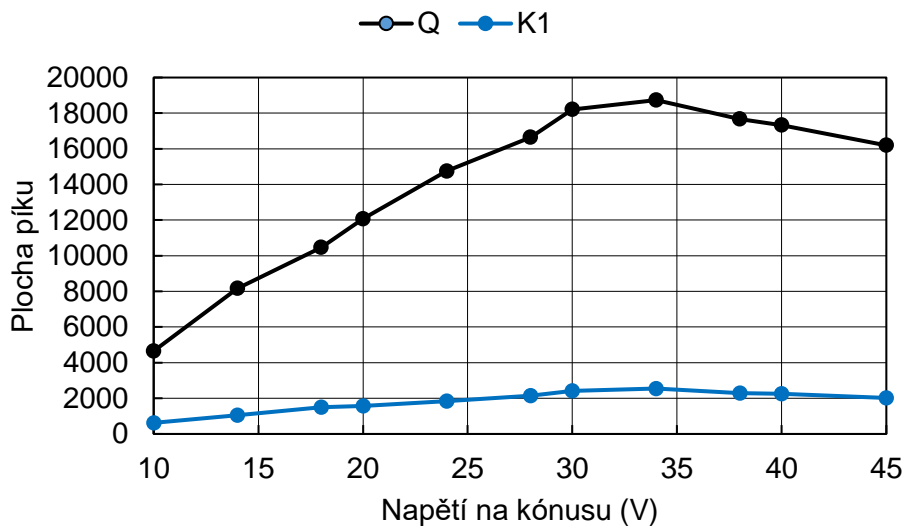


Obr. 19 Fragmentační spektra 6-thioguaninu, adeninu a guaninu získaných v režimu skenu produktových iontů v pozitivním ionizačním módu s návrhem struktury jednotlivých fragmentů dle databáze Metlin. V modrém kroužku m/z prekursoru, v červeném kroužku m/z kvantifikačního fragmentu a v zeleném kroužku m/z konfirmačního fragmentu.

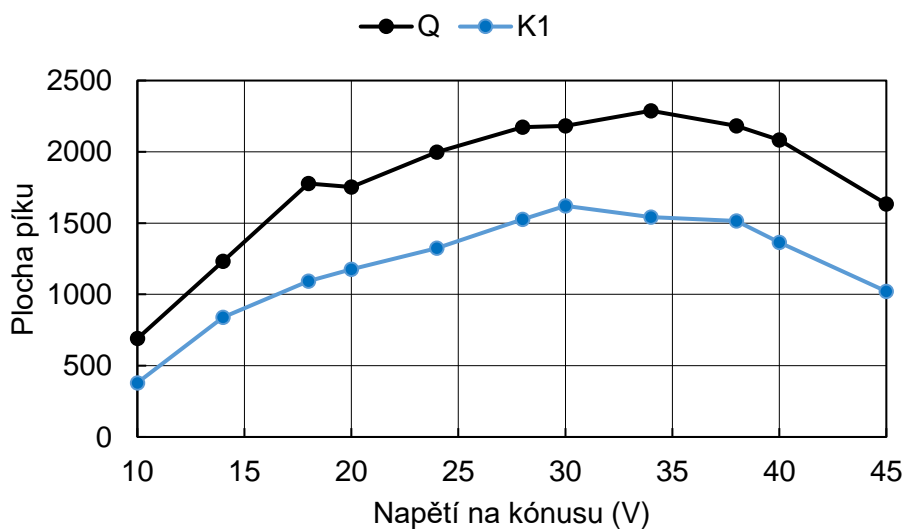


#### 4.2.1 Optimalizace napětí na kónusu

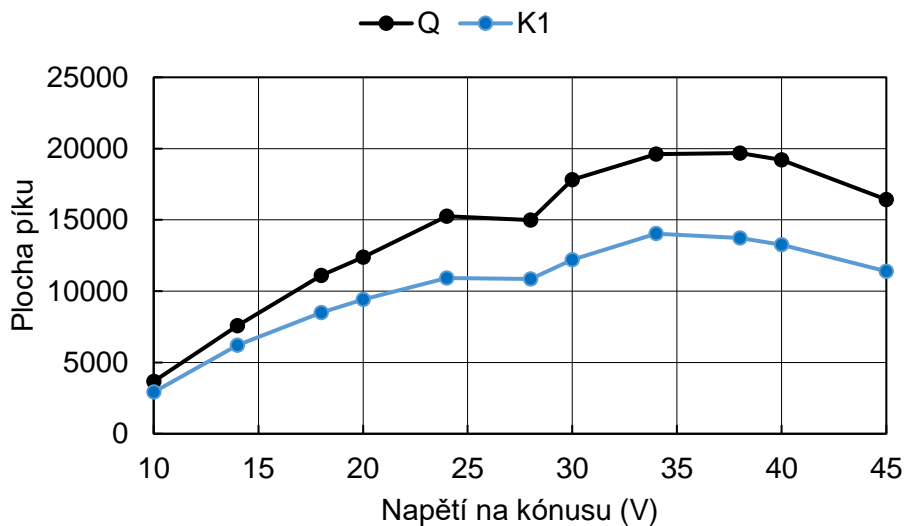
Napětí na kónusu bylo optimalizováno pro adenin, guanin a 6-thioguanin při hodnotách 10 – 14 – 18 – 20 – 24 – 28 – 30 – 34 – 38 – 40 – 45 (V).



Obr. 20 Optimalizace napětí na kónusu adeninu Q a K1



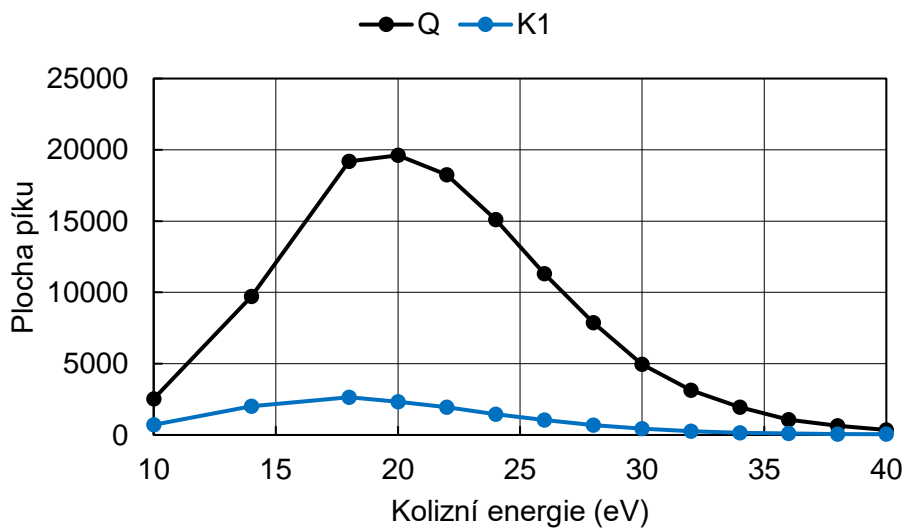
Obr. 21 Optimalizace napětí na kónusu guaninu Q a K1



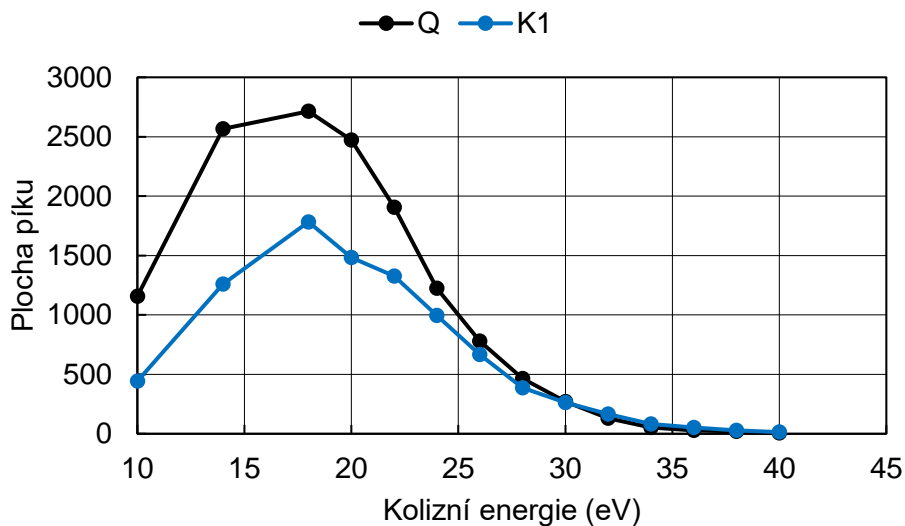
Obr. 22 Optimalizace napětí na kónusu thioguaninu Q a K1

#### 4.2.2 Optimalizace kolizní energie

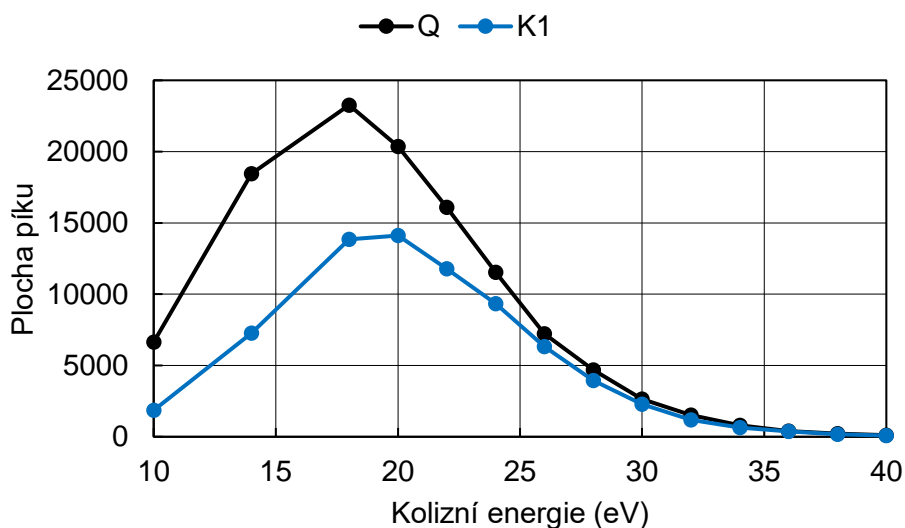
Optimalizace parametru kolizní energie probíhala v rozmezí hodnot 10 – 14 – 18 – 20 – 22 – 24 – 26 – 28 – 30 – 32 – 34 – 36 – 38 – 40 (eV).



Obr. 23 Optimalizace kolizní energie adeninu Q a K1



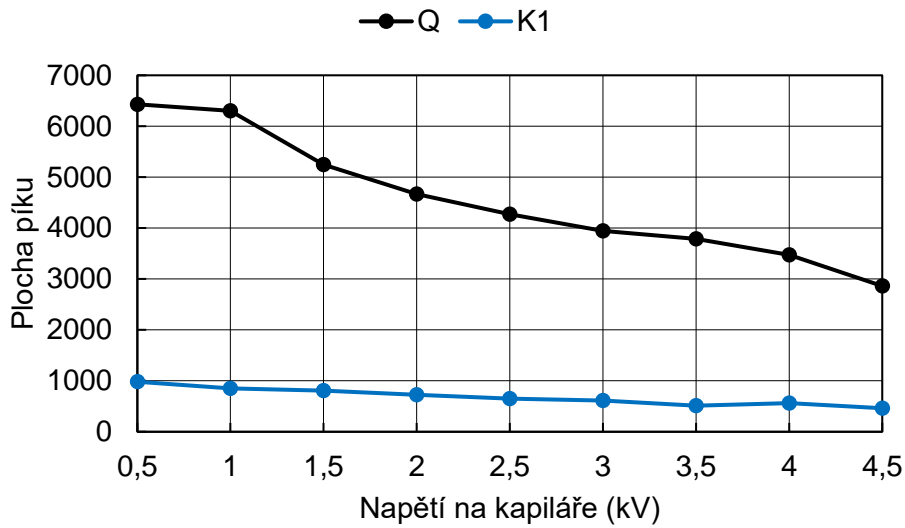
Obr. 24 Optimalizace kolizní energie guaninu Q a K1



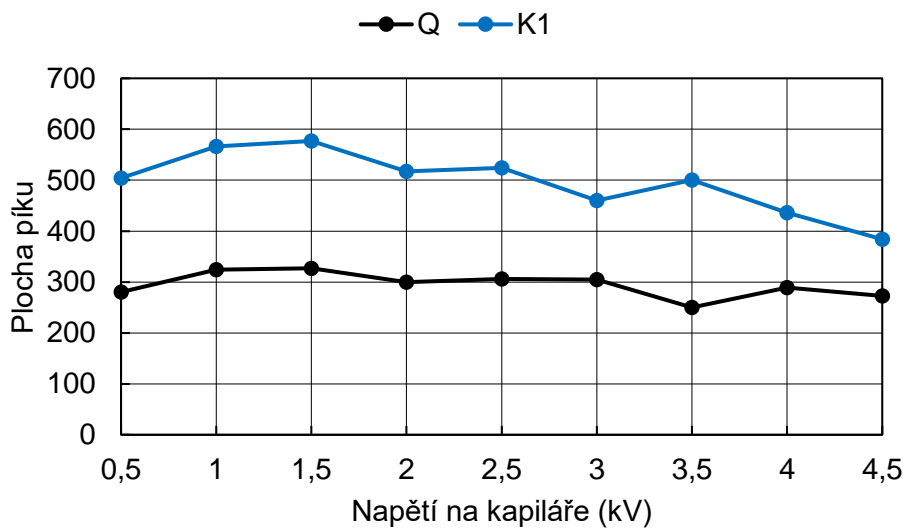
Obr. 25 Optimalizace kolizní energie thioguaninu Q a K1

#### 4.2.3 Optimalizace napětí na kapiláře

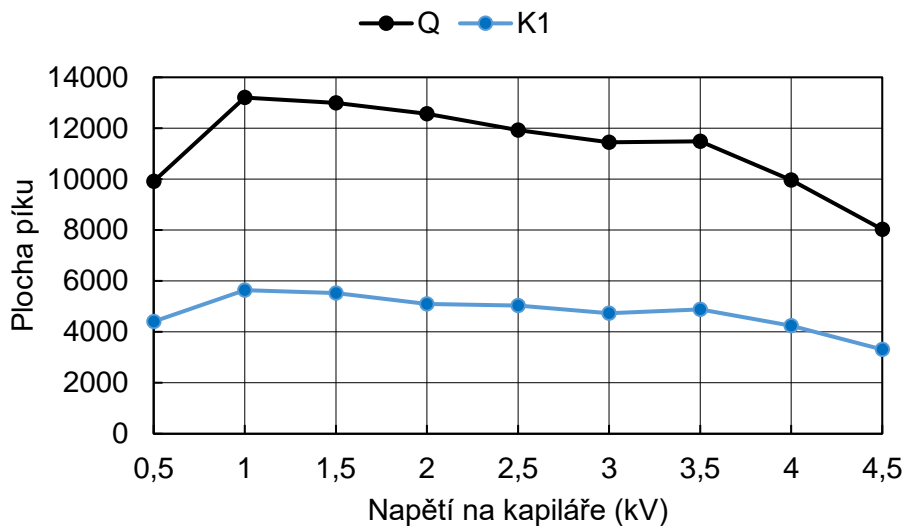
Optimalizace napětí na kapiláře probíhala v rozmezí hodnot 0,5 – 1 – 1,5 – 2 – 2,5 – 3 – 3,5 – 4 – 4,5 (kV).



Obr. 26 Optimalizace napětí na kapiláře adeninu Q a K1



Obr. 27 Optimalizace napětí na kapiláře guaninu Q a K1



Obr. 28 Optimalizace napětí na kapiláře thioguaninu Q a K1

#### 4.2.4 Výsledky hmotnostně spektrometrické optimalizace

Tabulka 7: Optimalizované hodnoty hmotnostně spektrometrických parametrů pro jednotlivé přechody analytů (kvantifikační – Q, a konfirmační – K)

		Napětí na kónusu [V]	Kolizní energie [eV]	Napětí na kapiláře [kV]
Q	Adenin	34	20	1
	Guanin	34	18	
	Thioguanin	38	18	
K	Adenin	34	18	
	Guanin	30	18	
	Thioguanin	34	20	

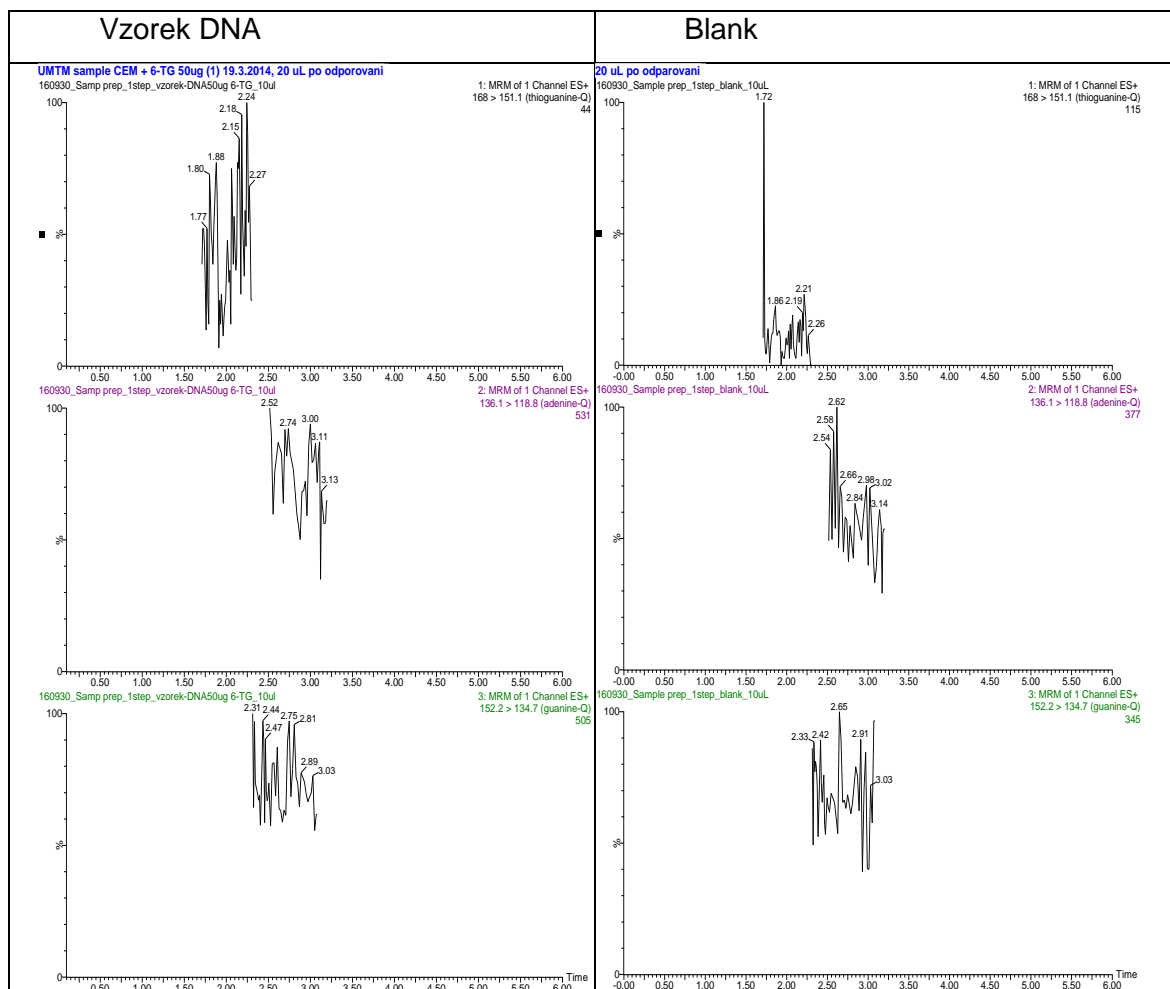
Po provedení experimentů pro optimalizaci MS parametrů byly vybrány hodnoty napětí na kónusu (dle Obr. 20, 21, 22) a hodnota kolizních energií (dle Obr. 23, 24, 25) sumarizováno v Tabulce 7. Hodnota napětí na kapiláře byla zvolena kompromisní, 1 kV.

### 4.3 OPTIMALIZACE ÚPRAVY VZORKU DNA

Vzorky DNA (z CEM buněk inkubovaných s 6-TG) byly analyzovány na koloně s amido fází ACQUITY UPLC BEH Amide 1,7  $\mu\text{m}$ , 2,1 mm x 100 mm. Mobilní fáze byla složena z 0,1 % kyseliny mravenčí a acetonitrilu. Pro hmotnostně spektrometrický parametr napětí na kónusu byla vybrána hodnota 34 V, pro kolizní energii 18 eV. Hodnota napětí na kapiláře byla zvolena jako 1 kV. Vzorky DNA byly ředěny v 70 % acetonitrilu. Tento poměr byl vybrán z důvodu největší plochy píků analytů.

#### 4.3.1 Hydrolýza DNA kyselinou chloristou

Podmínky hydrolýzy DNA kyselinou chloristou byly převzaty z publikace Hawwa 2009. Do mikrozkušavky bylo smícháno 80  $\mu\text{l}$  izolované DNA (z CEM buněk inkubovaných s 50  $\mu\text{g/ml}$  6-TG o koncentraci DNA 210  $\text{ng}/\mu\text{l}$ ), 100  $\mu\text{l}$  dithiotreitolu (DTT, 75  $\text{mg/ml}$ ) 50  $\mu\text{l}$  vody a 50  $\mu\text{l}$  kyseliny chloristé ( $\text{HClO}_4$ , 700  $\text{ml/l}$ ). Dithiotreitol byl přidán z důvodu ochrany thiolových skupin. Vzorek blanku byl připraven obdobně s tím rozdílem, že místo vzorku DNA byla do mikrozkušavky přidána deionizovaná voda. Připravené vzorky v mikrozkušavkách byly zahřívány po dobu 60 minut při 100  $^{\circ}\text{C}$  na termobloku. Následně byl odebrán 1  $\mu\text{l}$  vzorku i blanku a nastříknut na kolonu (záznamy neukázány). V záznamu však nebyl signál ani jednoho analytu, proto byly vzorky částečně odpařeny pomocí dusíkové odparky, rozředěny v 70 % acetonitrilu a 10  $\mu\text{l}$  bylo nastříknuto na kolonu (Obr. 29).

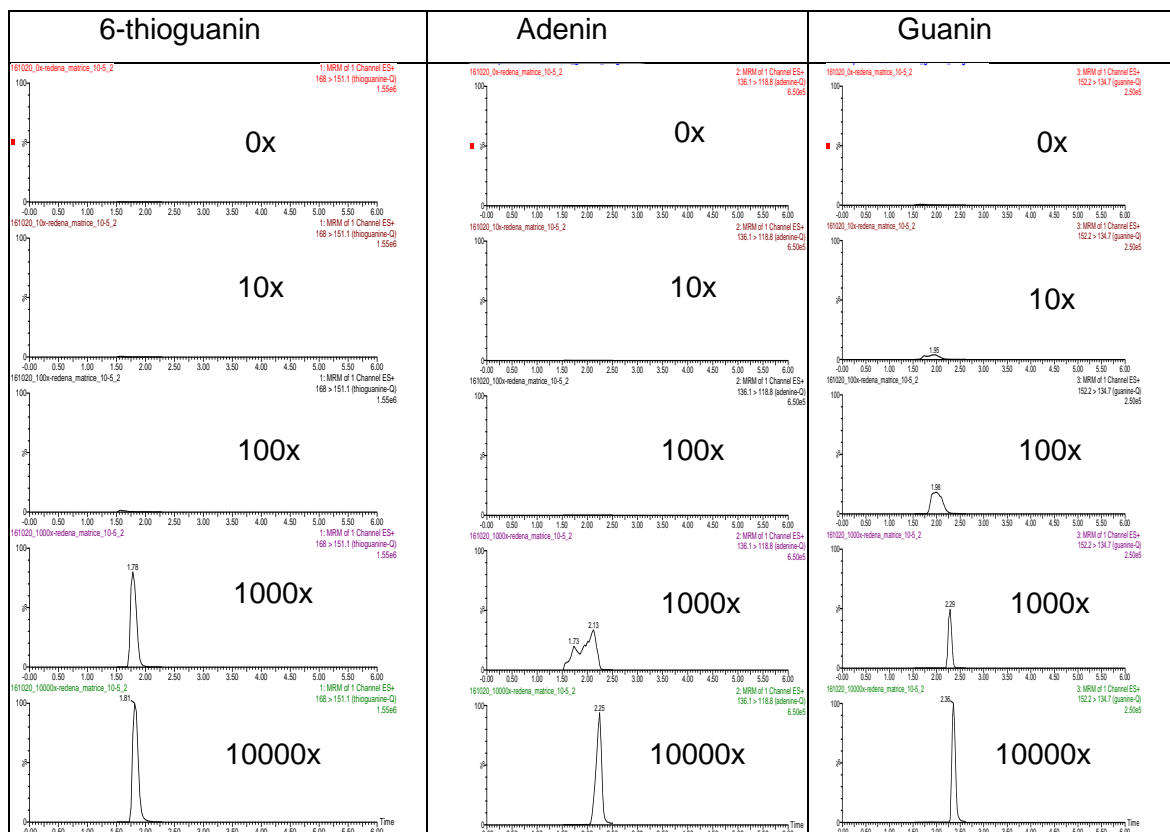


Obr. 29 Ionový chromatogram vzorku DNA (izolované z CEM buněk inkubovaných s 50 µg/ml 6-TG, koncentraci DNA 210 ng/µl) a blanku po hydrolyze kyselinou chloristou, nástřik 10 µl

V záznamu částečně odpařené matrice vzorku DNA opět nebyl signál analytů (Obr. 29), což by mohlo být důsledkem: (1.) silné iontové suprese analytů vysoce koncentrovanou matricí vzorku, (2.) nízké koncentrace nukleových bází ve vzorku hydrolyzované DNA (2.).

Vliv iontové suprese – ředění matrice s kyselinou chloristou

Za účelem zjištění vlivu iontové suprese byla matrice vzorku (DTT, HClO<sub>4</sub>, deionizovaná voda) naředěna 10x, 100x, 1000x a 10000x 70 % acetonitrilem a byly do ní přidány analyty adenin, guanin a thioguanin tak, aby jejich koncentrace byla 1\*10<sup>-5</sup> mol/l. Výsledné iontové chromatogramy jsou znázorněny na Obr. 30.

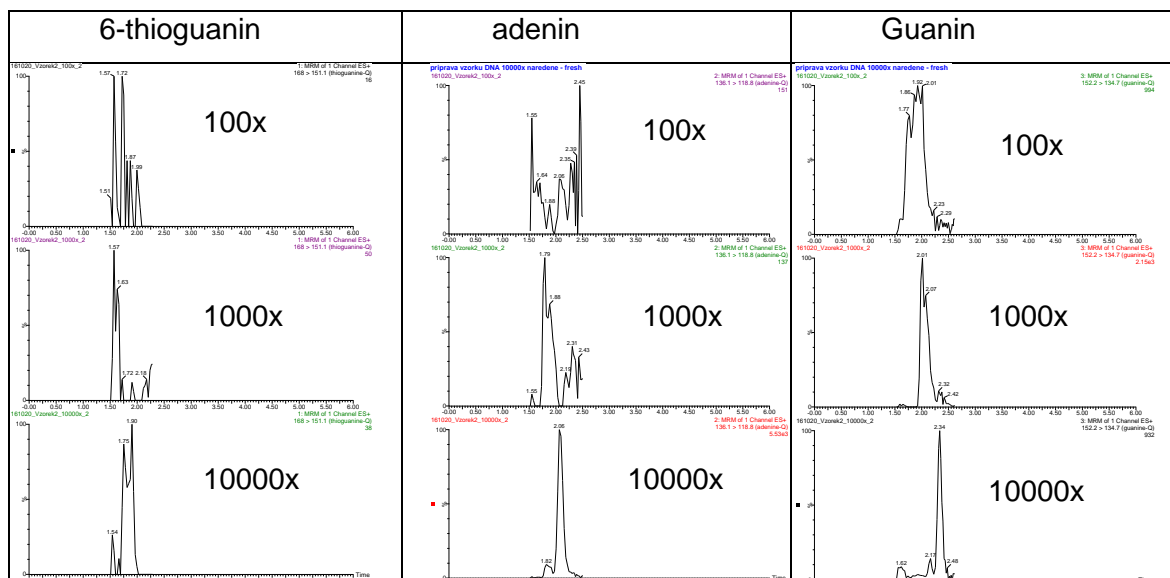


Obr. 30 Ionový chromatogram matrice vzorku (dithiotreitol, kyselina chloristá) ředěné 0x, 10x, 100x, 1000x a 10000x, naspikované 6-TG, adeninem a guaninem o výsledné koncentraci  $1 \cdot 10^{-5}$  mol/l všech analytů, nástřík 10  $\mu$ l

#### Vliv iontové suprese – ředění vzorku DNA

Z Obr. 30 je vidět silný vliv matrice vzorku, který mizí až po mnohonásobném ředění, ideálně 10000x. Ředění 100x, 1000x a 10000x bylo aplikováno na vzorek DNA z CEM buněk inkubovaných s 50  $\mu$ g/ml 6-TG (koncentrace DNA 210 ng/ $\mu$ l) hydrolyzovaným dle podmínek Hawwa 2009 (Obr. 31).





Obr. 31 Ionový chromatogram vzorku DNA (izolované z CEM buněk inkubovaných s 50 µg/ml 6-TG, koncentraci DNA 210 ng/µl) naředěného 100x, 1000x a 10000x, nástřík 10µl

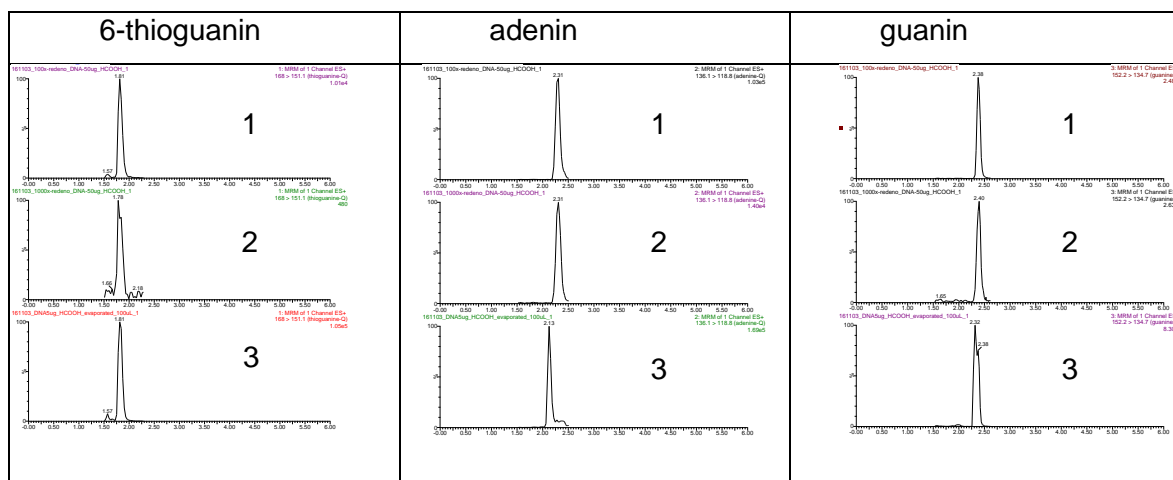
Ze záznamu je vidět, že ředěním vzorku klesá iontová suprese, ale zároveň se ředí koncentrace analytů ve vzorku, které se takto mohou pohybovat na limitu detekce, či se stát nedetekovatelnými (Obr. 31).

#### 4.3.2 Hydrolýza kyselinou mravenčí

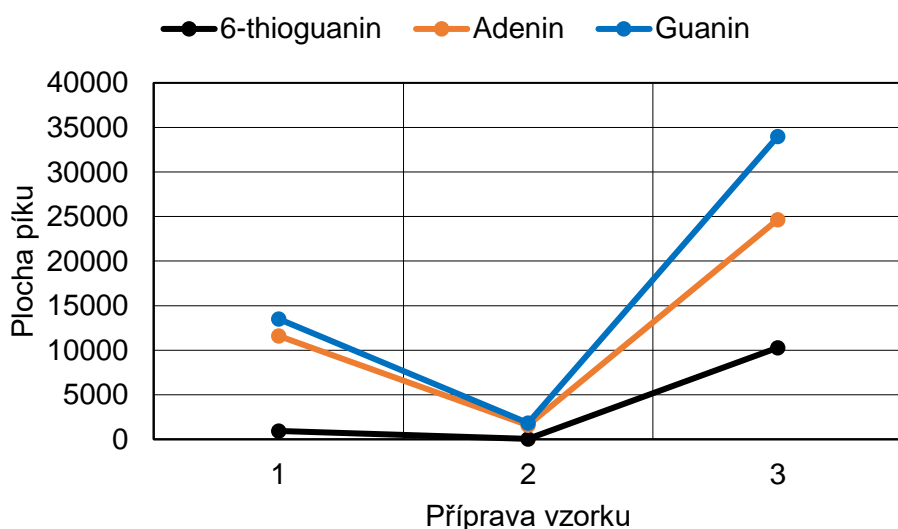
Kvůli silné iontové supresi matricí vzorku s kyselinou chloristou byla vybrána těkavější kyselina mravenčí jako hydrolytické činidlo. Vzorky byly připraveny stejně jako v předchozím experimentu pouze s rozdílem kyseliny: 80 µl vzorku DNA izolovaného z CEM buněk inkubovaných s 50 µg/ml 6-TG, koncentrace DNA 210 ng/µl, 100 µl DTT (75 mg/ml), 50 µl vody a 50 µl HCOOH. Vzorky byly zahřívány na termobloku po dobu 60 minut při 100 °C. Po 60 minutách byly vzorky odstraněny, naředěny 100x (příprava 1) a 1000x (příprava 2) nebo odpařeny a rozředěny (příprava 3) (Tabulka 8). 10 µl každého vzorku každé přípravy bylo nastříknuto na kolonu (Obr. 32).

Tabulka 8: Příprava vzorků pro nástřik na kolonu

Příprava 1	Příprava 2	Příprava 3
1 $\mu$ l vzorku do 100 $\mu$ l 70 % acetonitrilu s vodou	1 $\mu$ l vzorku do 1000 $\mu$ l 70 % acetonitrilu s vodou	vzorek odpařen, rozpuštěn v 70 % acetonitrilu s vodou



Obr. 32 Ionový chromatogram vzorku DNA izolovaného z CEM buněk inkubovaných s 50  $\mu$ g/ml 6-TG o koncentraci DNA 171 ng/ $\mu$ l hydrolyzovaného kyselinou mravenčí a naředěného 100x (1) a 1000x (2) či odpařeného a rozředěného ve 100  $\mu$ l 70 % acetonitrilu s vodou (3), nástřik 10  $\mu$ l

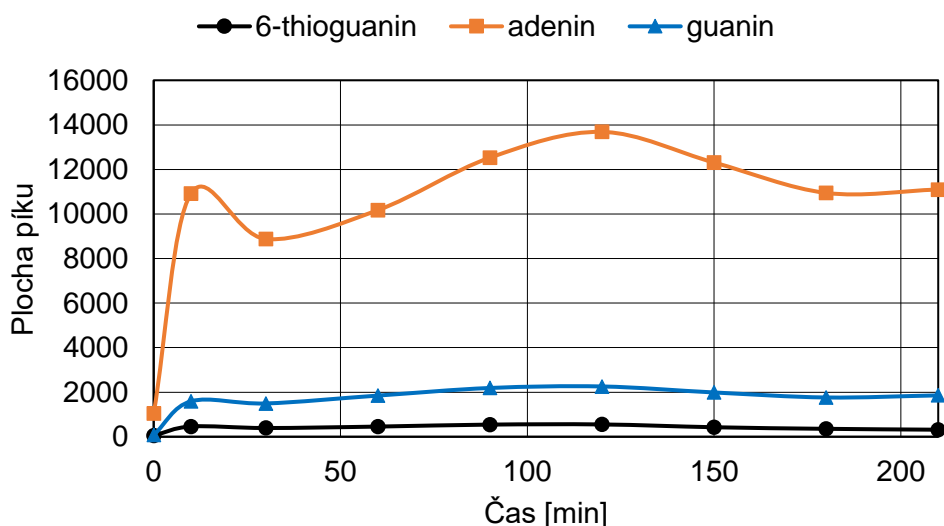


Obr. 33 Závislost způsoby přípravy vzorku na ploše píku

Hydrolýza vzorků DNA kyselinou mravenčí poskytla signál analytů u všech způsobů přípravy vzorku (příprava 1-3) (Obr. 32), odpovídající plochy píků jsou uvedeny v Obr. 33. Přípravou 1 a 2 byla zkoumána případná iontová suprese matrice vzorku, která se nepotvrdila, jelikož plochy píků analytů byly nižší u zředěného vzorku (Obr. 33, příprava 2). Odpařením matrice vzorku a následné rozředění ve 100  $\mu$ l 70 % acetonitrilu vedlo k zakoncentrování analytů (Obr. 33, příprava 3).

#### 4.3.3 Optimalizace času hydrolýzy DNA

V posledním kroku byla optimalizována doba potřebná k hydrolýze DNA na jednotlivé nukleové báze. Za tímto účelem byl připraven vzorek DNA získaný z CEM buněk inkubovaných s 10  $\mu$ g/ml 6-TG o koncentraci DNA 195 ng/ $\mu$ l a byl hydrolyzován za podmínek: 50  $\mu$ l vzorku DNA, 25  $\mu$ l DTT (75 mg/ml), 200  $\mu$ l HCOOH (98 %) a blank (místo DNA přidáno 50  $\mu$ l vody). Vzorek DNA i blank byly vloženy do termobloku při 100  $^{\circ}$ C a v časovém intervalu 0 – 10 – 30 – 60 – 90 – 120 – 150 – 180 – 210 minut byl 1  $\mu$ l odebrán, 100x naředěn 70 % acetonitrilem a následně bylo 10  $\mu$ l nastříknuto na kolonu.



Obr. 34 Vliv doby hydrolýzy kyselinou mravenčí na plochu píku 6-thioguaninu, adeninu, guaninu ve vzorku DNA (inkubace s 10  $\mu$ g/ml 6-TG o koncentraci DNA 195 ng/ $\mu$ l)

Z Obr. 34 je patrné, že k hydrolýze dochází již během 1 hodiny inkubace s kyselinou mravenčí. Pokles ploch píků analytů ve 30. a 60. minutě mohl být způsobený chybou v odebrání a následném ředění vzorku k analýze.

## 5 ZÁVĚR

Byla vyvinuta citlivá metoda pro stanovení 6-thioguaninu ve vzorcích izolované DNA. V rámci vývoje metody byly také optimalizovány podmínky pro stanovení adeninu a guaninu jako kontroly hydrolýzy DNA.

Během optimalizace chromatografických podmínek byly testovány separace v módu reverzní chromatografie na C18 kolonách (ACQUITY UPLC HSS T3 a ACQUITY UPLC BEH C18) a hydrofilní interakční kapalinové chromatografie na koloně s amido fází (ACQUITY UPLC BEH Amide). Optimální separace analytů proběhla na koloně ACQUITY UPLC BEH Amide (1,7  $\mu\text{m}$ , 2,1 mm x 100 mm) s mobilní fází složené z 0,1 % kyseliny mravenčí a acetonitrilu.

Po optimalizaci separačních parametrů bylo nutné optimalizovat hmotnostně spektrometrické parametry (napětí na konusu, kolizní energie a napětí na kapiláře) pro dva nejintenzivnější fragmenty v režimu sledování produktu rozpadu molekulárního iontu.

Dále byla optimalizována příprava vzorku izolované DNA nejdříve za použití kyseliny chloristé následně pak kyseliny mravenčí. Z důvodu silné iontové suprese při použití kyseliny chloristé byla jako vhodné hydrolyzační činidlo vybrána kyselina mravenčí za podmínek: 50  $\mu\text{l}$  vzorku DNA, 25  $\mu\text{l}$  DTT (75 mg/ml), 200  $\mu\text{l}$  HCOOH (98 %). Za těchto podmínek a zahřívání na termobloku při 100 °C proběhla hydrolýza do 1 hodiny.

Metoda může sloužit pro sledování stupně inkorporace 6-thioguaninu do DNA pacientů léčených merkaptopuriny.

## 6 LITERATURA

Al-Globashy M. A., Hassan S. A., Abdelaziz D. H., Elhosseiny N. M., Sabry N. A., Attia A. S., El-Sayed M. H. *Development and validation of LC-MS/MS assay for the simultaneous determination of methotrexate, 6-mercaptopurine and its active metabolite 6-thioguanine in plasma of children with acute lymphoblastic leukemia: Correlation with genetic polymorphism.* Journal of chromatography B. 2016. 83-94

Alberts B. *Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky.* 2. vydání. Ústí nad Labem. 2002. 184-196

Banerjee S., Mazumdar S. *Electrospray ionization mass spektrometry: A technique to access the information beyond the molecular weight of the analyte.* International Journal of Analytical Chemistry. 2012

Bouliou R., Lenoir A. *High-performance liquid chromatographic determination of thiopurine metabolites of azathioprine in biological fluids.* Journal of Chromatography. 1993. 352 - 356

Cech B., Enke Ch., *Practical Implications of Some Recent Studies in Electrospray Ionization Fundamentals.* Mass Spectrometry Reviews. 2001. 5-6

Česká onkologická společnost České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně: <http://www.linkos.cz/>, dne 10. 5. 2017:

<http://www.linkos.cz/farmakoterapie/databaze-onkologickyh-leviv/levivo/id/3/>

<http://www.linkos.cz/farmakoterapie/databaze-onkologickyh-leviv/levivo/id/7/>

Dervieux T., Meyer G., Barham R., Matsutani M., Barry M., Bouliou R., Neri B., Seidman E. *Liquid chromatography-tandem mass spektrometry analysis of erythrocyte thiopurine nucleotides and effect of thiopurine methyltransferase gene variants on these metabolites in patients receiving azathioprine/6-mercaptopurine therapy.* Clinical Chemistry. 2005. 2074-2084

Flores J. R., Nevado J. J. B., Penalvo G. C., Caceres M. I. R. *Direct capillary electrophoretic determination of three chemotherapeutic drugs in human urine.* Chromatographia. 2003. 493-496

Hawwa A. F., Millership J. S., Collier P. S., McElnay J. C. *Development and validation of an HPLC method for the rapid and simultaneous determination of 6-mercaptopurine and four of its metabolites in plasma and red blood cells.* Journal of pharmaceutical and biomedical analysis. 2009. 401-409

de Hoffmann E., Stroobant V. *Mass spektrometry: principles and applications.* 2007. 43-54

- Hofmann U., Heinkele G., Angelberger S., Schaeffeler E., Lichtenberger C., Jaeger S., Reinisch W., Schwab M. *Simultaneous quantification of eleven thiopurine nucleotides by liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Analytical Chemistry. 2012. 1294-1301
- Holčápek M. *Hmotnostní analyzátory (přednáška)*. Pardubice: Univerzita Pardubice. 28. 3. 2016
- Churáček J, Jandera P. *Úvod do vysokoúčinné kapalinové kolonové chromatografie*. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1985. Knižnice technických aktualit.
- Chalupná P., Lukáš M., Šroubková R., Bortlík M., Stříteský J., Kumšta M. Šebesta I. *6-thioguanine therapy in inflammatory bowel disease*. Folia Gastroenterol Hepatol. 2004.112-120
- Jacobsen J. H., Schmiegelow K., Nersting J. *Liquid chromatography-tandem mass spectrometry quantification of 6-thioguanine in DNA using endogenous guanine as internal standard*. Journal of Chromatography B. 2012. 115-118
- Klásek A., *Organická chemie: bakalářský směr*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. 2006. 106-111
- Lee S., Uggerud E., etc. *Modern mass spectrometry*. Current topics in organic chemistry, 2003. 1503-1624
- McMurry J. *Organická chemie*. Brno: Vysoké učení technické v Brně. 2015. 269-272
- Mirmomtaz E., Ensafi A. A. *Voltammetric determination of trace quantities of 6-thioguanine based on the interaction with DNA at a mercury electrode*. Electrochimica acta. 2009. 4353-4358
- Munshi N. P., Lubin M., Bertino R. J. *6-thioguanine: a drug with unrealized potencial for cancer therapy*. The oncologist. 2014. 760-765
- de Nicoló A., Agnesod D., Simiele M., Rigano D., Adriani A., Canaparo R., etc. *UPLC-MS/MS method for quantification of azathioprine metabolites 6-mercaptopurine and 6-methylmercaptopurine riboside in peripheral blood mononuclear cells*. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis. 2014. 271-278
- Nováková L., Douša M. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. Praha. 2013. 11-14. 64-71.
- Praus P., Vontorová J. *Analytická chemie II*. Ostrava: VŠB - technická univerzita Ostrava. 2015. 8-9. 93. 107-115.

Schwab M., Klotz U. *Pharmacokinetic considerations in the treatment of inflammatory bowel disease*. *Clinical Pharmacokinetic*. 2001. 723-751

Státní ústav pro kontrolu léčiv, <http://www.sukl.cz/>, dne 31. 3. 2017, souhrny údajů o přípravcích:

Purinethol: <http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?kod=0136446>;

Xaluprine: <http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?kod=0168987>;

Azathioprin: <http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?kod=0203233>;

Imuran: <http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?kod=0199647>;

Imasup: <http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?kod=0213010>;

Lanvis: <http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?kod=0192843>;

Zenkova A. M. *Artificial nucleases*. Berlín. 2004. 243

Zochowska D., Zegarska J., Hryniewiecka E., Samborowska E., Jazwiec R., Tszysznic W., Borowies A., Dadlez M., Paczek L. *Determination of concentrations of azathioprine metabolites 6-thioguanine and 6-methylmercaptopurine in whole blood with the use of liquid chromatography combined with mass spektrometry*. *Transplantation proceedings* 2016. 1836-1839

Wang Ch. Ch., Chiou S. S., Wu S. M. *Determination of merkaptopurine and its four metabolites by large-volume sample stacking with polarity switching in capillary electrophoresis*. *Electrophoresis*. 2005. 2637-2642

Wang H., Wang Y. *LC-MS/MS coupled with stable isotope dilution method for quantification of 6-thioguanine and S<sup>6</sup>-methyl thioguanine in genomic DNA of human cancer cells treated with 6-thioguanine*. *Analytical chemistry*, 2010. 5797-5803