

Vývoj a optimalizace podmínek pro stanovení purinových sloučenin metodou LC-MS

Bc. Petra Fornůsková

Diplomová práce
2012



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav chemie

akademický rok: 2011/2012

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Petra FORNŮSKOVÁ**
Osobní číslo: **T100011**
Studijní program: **N 2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Chemie potravin a bioaktivních látek**

Téma práce: **Vývoj a optimalizace podmínek pro stanovení purinových sloučenin metodou LC-MS**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. **Stručně charakterizovat sloučeniny s purinovým skeletem.**
2. **Zpracovat rešerši na téma biologické účinky purinových sloučenin se zaměřením na inhibitory CDK.**
3. **Charakterizace LC-MS.**

II. Praktická část

1. **Připravit vybrané 2,6,9-trisubstituované puriny.**
2. **Optimalizovat podmínky stanovení připravených sloučenin metodou HPLC.**
3. **Provést sérii experimentů s cílem vyvinout podmínky pro stanovení připravených látek pomocí LC-MS.**

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

[1] SMITH, Paul J., YUE, Eddy W. Inhibitors of cyclin-dependent kinases as anti-tumor agents, USA: Taylor and Francis Group, 2007. ISBN 0-8493-3774-7

[2] ŠTULÍK, Karel a kol. Analytické separační metody. 1. vydání. Praha: Karolinum, 2005. ISBN 80-246-0852-2

[3] Dle provedení literární rešerše s využitím databáze Scopus

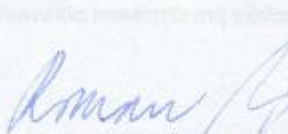
Vedoucí diplomové práce: **Ing. Michal Rouchal, Ph.D.**

Ústav chemie

Datum zadání diplomové práce: **10. února 2012**


Termín odevzdání diplomové práce: **7. května 2012**

Ve Zlíně dne 10. února 2012



doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan




prof. Ing. Antonín Klásek, DrSc.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: FORALÍSKOVÁ PETRA

Obor: CHTP - BIO

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60³⁾ odst. 2 a 3 mohu užit své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 9.5. 2012

Fornalísková

¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací

²⁾ Vysoká škola nevydávající zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalitativních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Diskertační, diplomová, bakalářské a výzkumné práce odezvuální ochráncem k obhajobě musí být těm zejména při pracovních úlohách před konáním obhajoby zveřejněny k nahlášení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Písní, že odezvuální práce uautor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

⁵ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3.

(3) Je právo autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem ziskového nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

⁶ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 školní dílo:

(2) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpovídá autor takového díla udělení svolení bez vzájemného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ústanovení § 35 odst. 3 zůstává neplatné.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užití či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložil, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přiměřeně k výši výdělku úhrazeného školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Hlavním cílem předložené práce bylo optimalizovat podmínky pro rychlé a efektivní stanovení 2,6,9-trisubstituovaných purinů s adamantanovým skeletem metodou LC-MS/MS. Studované sloučeniny vykazují schopnost inhibovat cyklin-dependentní kinázy a také dva typy nádorových buněčných linií. Práce se zabývá syntézou boheminu, od jehož struktury jsou zkoumané sloučeniny odvozeny, a to dvěma různými cestami s cílem srovnat celkový výtěžek obou použitých cest. Dále pak popisuje optimalizaci metody HPLC s UV/Vis detekcí, která předcházela optimalizaci podmínek pro stanovení studovaných sloučenin metodou LC-MS/MS.

Klíčová slova: purinové inhibitory CDK, HPLC- UV/Vis, LC-MS/MS, adamantan

ABSTRACT

The essential goal of the presented diploma thesis was to develop and optimize conditions for the rapid and effective determination of 2,6,9-trisubstituted purines bearing adamantane moiety by LC-MS/MS technique, because there has been demonstrated their ability to inhibit cyclin-dependent kinases and two types of tumor cell lines. This work deals with the synthesis of bohemine by means of two ways and comparing the overall yields of these two pathways. Finally, there is described the optimization of the HPLC with UV/Vis detection, which precedes the optimization of conditions for determination studied compounds using LC-MS/MS.

Keywords: purine inhibitors of CDK, HPLC-UV/Vis, LC-MS/MS, adamantane

Na tomto místě bych velmi ráda poděkovala především Ing. Michalu Rouchalovi, Ph.D. za jeho odborné vedení, trpělivost a pomoc, které mi během zpracování mé diplomové práce poskytl.

Dále bych ráda poděkovala Ing. Lence Fojtíkové za pomoc při seznamování se s metodou HPLC. Ing. Petře Branné a Ing. Evě Babjakové za pomoc při práci v laboratoři. Mgr. Robertu Víchovi, Ph.D. a doc. Ing. Miroslavu Fišerovi, CSc. za odborné rady.

Nemalý dík patří rovněž celé mé rodině za podporu v průběhu celého studia. V poslední řadě nesmím opomenout mé přátele Tomáše Vavříka (Vavřu) a Davida Kašného (Rytmuse), kteří mě doprovázeli celým mým studiem na UTB.

Motto:

Jestliže se vám podaří najít způsob života, který by vám vyhovoval, zbývá ještě k takovému životu najít odvahu.

(John Irving)

Prohlašuji, že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

OBSAH

ÚVOD.....	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 BUNĚČNÝ CYKLUS	12
1.1 CYKLIN DEPENDENTNÍ KINÁZY	12
1.2 NÍZKOMOLEKULÁRNÍ INHIBITORY CYKLIN-DEPENDENTNÍCH KINÁZ	14
2 PURINY – CHARAKTERISTIKA A INHIBICE CDK	16
2.1 STRUČNÁ CHARAKTERISTIKA PURINOVÝCH SLOUČENIN	16
2.2 PURINOVÉ INHIBITORY CDK	18
3 VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE	22
3.1 PRINCIP A VYUŽITÍ VYSOKOÚČINNÉ KAPALINOVÉ CHROMATOGRAFIE	22
3.2 STACIONÁRNÍ A MOBILNÍ FÁZE	23
3.3 INSTRUMENTACE	23
3.3.1 Detektory používané v HPLC	24
4 HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE	25
4.1 PRINCIP A VYUŽITÍ HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE	25
4.2 IONIZAČNÍ TECHNIKY	25
4.3 HMOTNOSTNÍ ANALYZÁTORY	26
4.4 DETEKTORY	27
5 KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE – HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE	28
II EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	29
6 PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ PRO URČENÍ STRUKTURY PŘIPRAVENÝCH SLOUČENIN	30
7 PŘÍPRAVA 2,6,9-TRISUBSTITUOVANÝCH PURINŮ	32
7.1 PŘÍPRAVA BOHEMINU CESTOU A	32
7.1.1 Alkylace 2,6-dichlor-9 <i>H</i> -purinu	32
7.1.2 S _N Ar 2,6-dichlor-9-isopropyl-9 <i>H</i> -purinu na C6.....	33
7.1.3 S _N Ar <i>N</i> -Benzyl-2-chlor-9-isopropyl-9 <i>H</i> -purin-6-aminu na C2	34
7.2 PŘÍPRAVA BOHEMINU CESTOU B	35
7.2.1 S _N Ar 2,6-dichlor-9 <i>H</i> -purinu na C6	35
7.2.2 Alkylace <i>N</i> -Benzyl-2-chlor-9 <i>H</i> -purin-6-aminu	35
7.2.3 S _N Ar <i>N</i> -Benzyl-2-chlor-9-isopropyl-9 <i>H</i> -purin-6-aminu na C2	36
8 ANALÝZA PURINOVÝCH SLOUČENIN POMOCÍ HPLC-UV/VIS	37
8.1 SPECIFIKACE SYSTÉMU HPLC S UV/VIS DETEKTOREM.....	37
8.2 PŘÍPRAVA VZORKŮ.....	37
8.3 POPIS ANALÝZY VZORKŮ METODOU HPLC-UV/VIS	38
9 LC-MS/MS ANALÝZA PURINOVÝCH SLOUČENIN	39

9.1	SPECIFIKACE HMOTNOSTNÍHO SPEKTROMETRU	39
9.2	PARAMETRY MS ANALÝZ.....	39
9.3	PŘÍPRAVA VZORKŮ	40
9.4	POPIS ANALÝZY VZORKŮ METODOU LC-MS/MS	40
III	VÝSLEDKY A DISKUZE	41
10	SYNTEZA A STRUKTURA 2,6,9-TRISUBSTITUOVANÝCH PURINŮ.....	42
10.1	PŘÍPRAVA BOHEMINU CESTOU A	43
10.2	PŘÍPRAVA BOHEMINU CESTOU B	45
11	HPLC-UV/VIS	48
11.1	HPLC-UV/VIS ANALÝZY SLOUČENIN 4 A AD1	48
11.2	HPLC-UV/VIS ANALÝZY SLOUČENINY 5	50
11.3	HPLC-UV/VIS ANALÝZY SLOUČENINY AD2.....	51
12	LC-MS/MS	54
12.1	LC-MS/MS ANALÝZY SLOUČENIN 4 A AD1	54
12.2	LC-MS/MS ANALÝZY SLOUČENIN 5 A AD2	58
	ZÁVĚR	62
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	64
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	67
	SEZNAM PŘÍLOH.....	69

ÚVOD

Buněčný cyklus je řízen fosforylací klíčových proteinů. Tyto fosforylační reakce jsou zprostředkovány cyklin-dependentními kinázami (CDK). Ty jsou však aktivovány až vazbou na příslušný cyklin. Aktivita CDK je regulována navázáním či odbouráním cyklinu nebo také inhibitoru CDK. Abnormální exprese cyklinů nebo ztráta schopnosti přirozených inhibitorů regulovat aktivitu CDK jsou jedny z několika příčin vedoucích k nekontrolovanému dělení buňky a ke vzniku nádorových a jiných onemocnění.

V posledních dvaceti letech bylo popsáno a připraveno mnoho syntetických inhibitorů CDK. Jednu skupinu těchto léčiv tvoří inhibitory CDK s 2,6,9-trisubstituovaným purinovým skeletem. V průběhu minulých tří let byla na Ústavu chemie Fakulty technologické Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně připravena série derivátů již známých a ověřených purinových inhibitorů CDK s adamantanovým skeletem. Také u těchto látek byla prokázána schopnost inhibovat CDK a také dva typy nádorových buněčných linií. Z tohoto důvodu je pro další zkoumání těchto sloučenin nutné zjistit jak jsou metabolizovány.

K detekci metabolitů z metabolomických studií daných sloučenin se běžně používá metoda LC-MS (neboli kapalinová chromatografie-hmotnostní spektrometrie). Cílem této práce bylo tedy především optimalizovat tuto metodu pro vybrané látky, protože se jevílo být výhodnější znát parametry této separačně-detekční metody již před zahájením samotného studia jejich metabolizačních drah.

Druhým, neméně významným důvodem pro vývoj a optimalizaci podmínek analýzy LC-MS pro 2,6,9-trisubstituované puriny s adamantanovým skeletem, je fakt, že tento typ látek není možné analyzovat pomocí jiné separačně-detekční metody, jako např. GC-MS. LC-MS tak představuje rychlou a účinnou metodu pro studium reakčních směsí, zejména pak čistoty jednotlivých připravených látek.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 BUNĚČNÝ CYKLUS

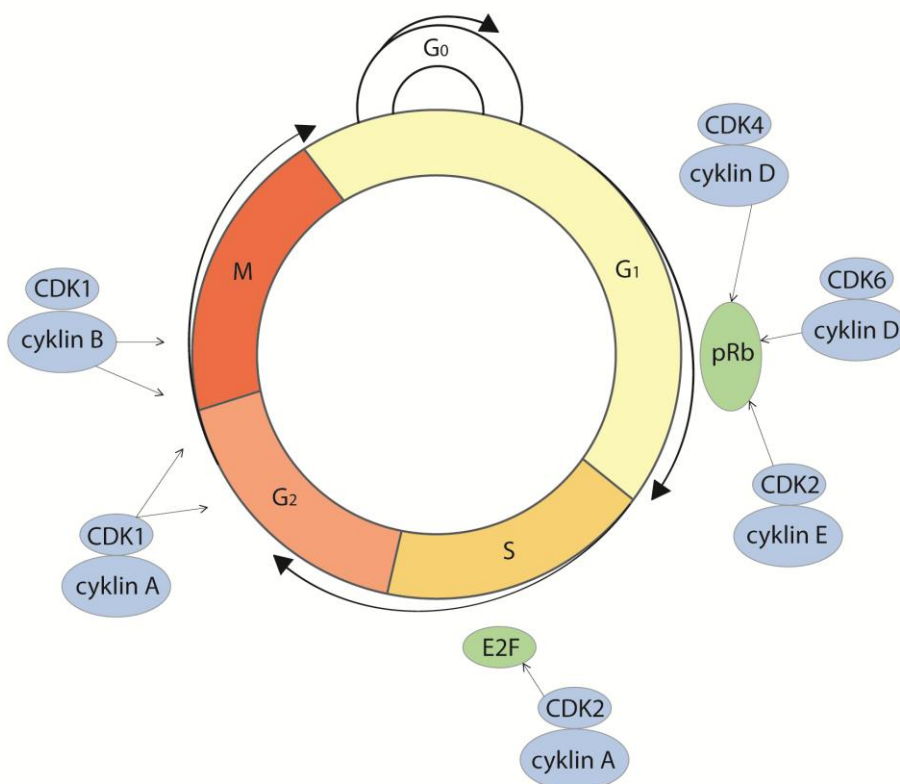
Buněčný cyklus je řadou kroků, které zodpovídají za dělení jedné buňky mateřské za vzniku dvou geneticky identických buněk dceřiných. Nejdůležitějšími kroky tohoto cyklu jsou S fáze (syntetická), kdy probíhá replikace DNA a zdvojení chromozomů a M fáze (mitotická) kdy je replikovaný materiál segregován do dvou dceřiných chromatid. G_1 fáze (předsyntetická) předchází S fázi a G_2 (postsyntetická) předchází M fázi. V normálním buněčném cyklu je S fáze následována M fází, jež nezačne probíhat, dokud není S fáze kompletní. Buňky se mohou rovněž nacházet mimo buněčný cyklus ve fázi G_0 (tzv. klidové stadium). Z klidové fáze může buňka přejít do G_1 fáze, čímž je zahájen nový buněčný cyklus^{1,2}. Buněčný cyklus také zahrnuje kontrolní body, jež ověřují, zda byly úspěšně dokončeny všechny úkony dané fáze, tedy jestli může buňka přejít do fáze následující. Zjištění poškození vede k pozastavení buněčného cyklu a jeho opravě. Pokud není možno chybu opravit nebo se její oprava jeví jako nevýhodná, dochází k programované buněčné smrti (apoptóze)³.

Přechod mezi jednotlivými fázemi buněčného dělení je řízen cykliny. Samotné cykliny nejsou schopny katalyzovat proteiny. To je umožněno až po navázání se na cyklin-dependentní kinázy (CDK). Vzniklé komplexy CDK/cyklin pak tedy regulují jednotlivé fáze buněčného cyklu. Naopak inaktivace CDK supresorovými regulačními proteiny vede k blokaci buněčného cyklu⁴. Interakce cyklin-dependentních kináz s jejich přirozenými proteinovými inhibitory (CKI) anebo s jejich aktivátory (cykliny) tvoří molekulární podstatu řízení buněčného cyklu.

1.1 Cyklin dependentní kinázy

Hlavní post-translační modifikací, která kontroluje a řídí všechny buněčné procesy je reverzibilní fosforylace. Fosforylace hydroxylových skupin serinových, threoninových a tyrozinových reziduí proteinu je katalyzována proteinkinázami. Lidský genom kóduje přibližně 518 proteinkináz⁵, středem zájmu jsou především ty, které se podílejí na vzniku a projevech lidských onemocnění⁶. CDK jsou vzhledem k jejich nepostradatelné funkci v regulaci buněčného cyklu, jež se výrazně mění v nádorových buňkách, typickým příkladem^{7,8,10}. Kromě regulace buněčného cyklu hrají CDK významnou roli v regulaci transkripce, v řízení diferenciaci buněk, signalizaci bolesti, fyziologii nervových buněk či navození buněčné smrti^{7,10}. CDK jsou heterodimerní komplexy složené z příslušné proteinkinázy a pozitivní regulační podjednotky, kterou představuje cyklin¹¹. CDK

s navázaným cyklinem katalyzují přenos fosfátové skupiny z ATP na serinový nebo threoninový zbytek v polypeptidovém řetězci určité sekvence. Některé CDK jsou schopny na sebe navázat více typů cyklinů, což umožňuje fosforylovat různé substráty. Těmito substráty mohou být transkripční faktory, proteiny biosyntézy purinů a jaderné membrány, proteiny cytoskeletu aj. Aktivita CDK však není regulována pouze asociací a disociací CDK a expresí cyklinu. Jako další příklady lze uvést aktivující fosforylaci threoninového zbytku v jejímž důsledku je odkryto aktivní místo, jež aktivuje CDK. Naopak deaktivující fosforylaci threoninu a tyrosinu ve vazebném místě pro ATP je zabráněno vstupu ATP do vazebného místa. Dále je regulace jejich aktivity ovlivněna například degradací cyklinu po označení ubiquitinem nebo vazbou přirozeného proteinového inhibitoru CDK tříd INK4 nebo CIP/KIP¹².



Obrázek 1: Regulace buněčného cyklu pomocí komplexů CDK/cyklin¹³.

V lidském genomu je kódováno 20 různých CDK, nicméně jen přibližně polovina z nich je považována za kinázy závislé na cyklinech, kterých je v současné době popsáno přibližně 25. Zatímco jednotlivé typy CDK se označují pomocí arabských číslic (např. CDK2), tak u cyklinů je jejich specifikace prováděna pomocí písmen (např. cyklin E).

Podle funkce lze CDK rozdělit do dvou hlavních skupin. Do první skupiny se řadí CDK1–3, CDK4 a CDK6, které se přímo podílejí na regulaci buněčného dělení způsobem uvedeným na **Obrázku 1**. V počátku fáze G_1 jsou CDK4 a CDK6 aktivovány navázáním cyklinu D. Vzniklé holoenzymy fosforylují protein retinoblastomu (pRb), čímž dochází k aktivaci transkripčních faktorů E2F a DP1 kontrolujících expresi genů, zodpovědných za přechod G_1/S a průběh S fáze. Jeden z genů regulovaných transkripčním faktorem E2F kóduje cyklin E. Ten aktivuje CDK2, což vede k fosforylaci pRB na dalších místech. To znamená, že i tento komplex umožňuje přechod z G_1 fáze do S fáze. Na inaktivaci pRb se může podílet také CDK3 interagující s cykliny A a E. V nedávné době byla v některých nádorových buněčných liniích prokázána vazba cyklinu C na CDK3, který stimuluje fosforylaci pRb během přechodu ze stadia G_0 do fáze G_1 . Holoenzym CDK2/cyklin A spouští v S fázi duplikaci DNA a inaktivuje transkripční faktory G_1 fáze. Během přechodu S/ G_2 se naváže na CDK1 cyklin A. Posléze komplex CDK1/cyklin B spustí G_2/M přechod fosforylací velkého množství substrátů. Degradací cyklinu B a inaktivací CDK1 dojde k zahájení anafáze, čímž je dokončena mitóza^{5,14,15,16}.

Druhou skupinu tvoří CDK5 a CDK7–13. CDK5 tvoří komplexy s cykliny typu D, E a G a hraje důležité role v dějích, jako jsou senescence a apoptóza. CDK7–9 jsou spjaty převážně s regulací transkripce. CDK10 a CDK11 vykonávají řadu funkcí v nervovém systému. Poslední z druhé skupiny jsou CDK11–13, jež řídí sestřih RNA⁹.

1.2 Nízkomolekulární inhibitory cyklin-dependentních kináz

Změny ve fosforylaci proteinů jsou častým znakem doprovázejícím celou řadu lidských onemocnění. Z tohoto důvodu exponenciálně roste výzkum, optimalizace a terapeutické vyhodnocování syntetických inhibitorů proteinkináz o malé molekulové hmotnosti. Odhadem 30 až 35 % výzkumu léčiv ve farmaceutickém průmyslu je věnováno právě proteinkinázám. Abnormality v regulaci a aktivitě CDK mohou způsobovat onemocnění, jako jsou rakovina, neurologická onemocnění (Alzheimer, Parkinson), ischemické choroby, imunologická a infekční onemocnění. Proto je podporován intenzivní výzkum především těchto farmaceutických inhibitorů CDK^{9,15}.

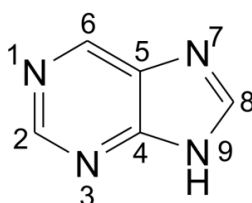
Mechanismus účinku inhibitorů CDK je založen na tom, že zabrání proteinkináze fosforylovat příslušný substrát. Inhibitory CDK kompetují s ATP o vazbu do aktivního místa kinázy. Tato kompetice musí být vysoce efektivní, neboť v buňkách se vyskytuje až

okolo dvou milionů molekul ATP a proteiny k němu vykazují vysokou afinitu. Během posledních několika let byly identifikovány desítky selektivních inhibitorů CDK nejrůznějších strukturních motivů¹³. Některé znaky však mají společné. Vyznačují se relativně malou molekulovou hmotností (<600 Da), většinou jde o planární hydrofobní heterocykly, které se na kinázu váží pomocí vodíkových vazeb a hydrofobních interakcí⁵, které jsou doprovázeny řadou dalších slabých kontaktů.

2 PURINY – CHARAKTERISTIKA A INHIBICE CDK

2.1 Stručná charakteristika purinových sloučenin

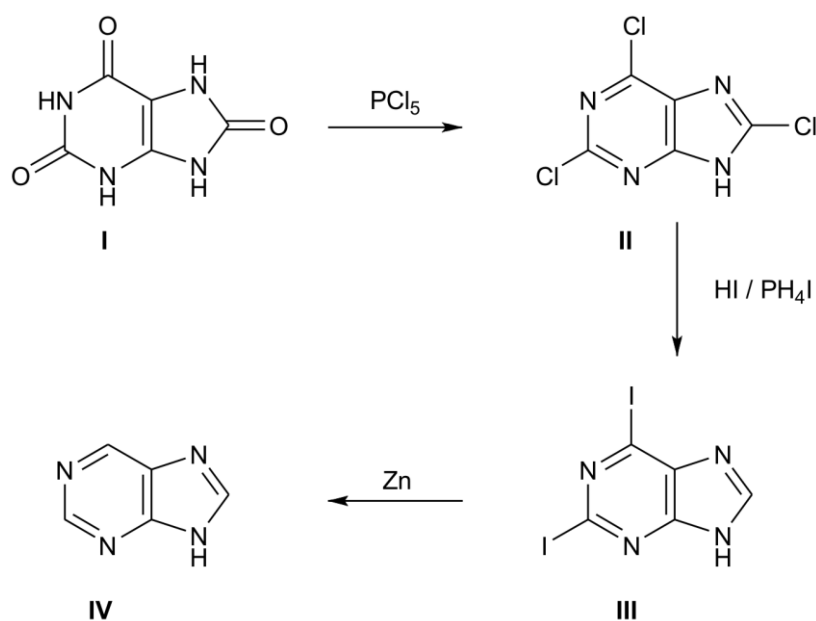
Purin je triviální název pro sloučeninu, kterou lze systematicky pojmenovat jako imidazo[4,5-*d*]pyrimidin. Jde o heterocyklickou aromatickou sloučeninu, jež je tvořena pyrimidinovým a imidazolovým kruhem. Purinový kruh má svoje specifické číslování (**Obrázek 2**):



Obrázek 2: Struktura a způsob číslování purinového skeletu.

Jako první připravil a pojmenoval tuto sloučeninu Emil Fischer a to v roce 1899 (**Schéma 1**), za což obdržel v roce 1902 Nobelovu cenu^{17,18}. Výchozím materiálem pro syntézu byla kyselina močová (**I**), jež byla izolována z ledvinových kamenů. Kyselina močová reagovala s PCl_5 za vzniku 2,6,8-trichlorpurinu (**II**), který byl pomocí HI a PH_4I přeměněn na 2,6-dijodpurin (**III**). Ten byl přidáním práškového zinku zredukován na purin (**IV**).

Schéma 1

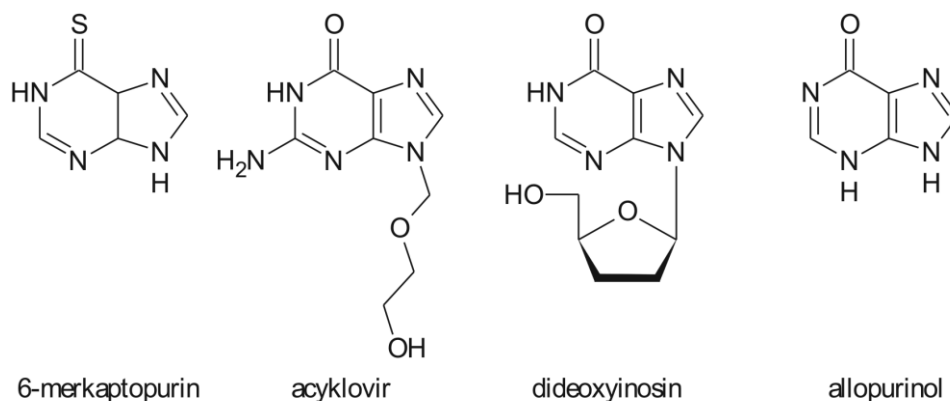


Čistý purin je bílá krystalická látka, jež je slabě bazická. V přírodě se nesubstituovaný purin nevyskytuje, ale jeho deriváty jsou obsaženy ve všech živých organismech. Jeho nejjednodušší forma je ribonukleosid pojmenovaný nebularin, který byl izolována z houby *Agaricus nebularine*. Mezi nejvýznamnější purinové deriváty patří purinové báze nukleových kyselin adenin a guanin. Nukleová báze připojená k cukerné složce a fosfátovému zbytku tvoří nukleotid, jehož polymerací vzniká páteř řetězce nukleové kyseliny. Párováním purinových bází s bázemi pyrimidinovými vzniká dvojšroubovicová struktura DNA a RNA¹⁹. Mnoho purinových derivátů, především deriváty adeninu, jsou součástí mnoha metabolických procesů. Adenosin trifosfát (ATP) řídí energetickou bilanci buněk. Cyklický adenosin monofosfát (cAMP) je v buňkách využíván jako tzv. druhý posel v řadě signálních drah, působící jako aktivátor proteinkináz, které následně fosforylují další enzymy, a tím je aktivují nebo deaktivují. Nikotinamid adenin dinukleotid (NAD⁺), nikotinamid adenin dinukleotid fosfát (NADP⁺) a flavinadenin dinukleotid (FAD⁺) jsou koenzymy oxidačně-redukčních reakcí, které probíhají na buněčné úrovni. Acetylkoenzym A je významným metabolitem zúčastňující se citrátového cyklu, ale také β -oxidace mastných kyselin^{20,21,22}.

Mezi neméně důležité deriváty pro metabolismus organismů patří xanthin a hypoxanthin, jež vznikají hydrolytickým rozkladem nukleových kyselin, a kyselina močová, která je koncovým produktem jejich katabolismu. Od xanthinu jsou dále odvozené jeho methylované deriváty kofein, thebromin a theofilin, nacházející se v kávě, čaji a kakaových bobech²³.

Je prokázáno, že asi 4–7 % všech proteinů kódovaných v genomu obsahuje purinový skelet. Tento fakt vede k tomu, že se tyto proteiny staly potencionálními terapeutickými cíly. Syntetické purinové deriváty tudíž mají velký potenciál k ovládní významných buněčných funkcí²⁴.

Syntetické analogy purinů zaznamenaly mnoho uplatnění v klinické medicíně. Například 6-merkaptopurin (**Obrázek 3**) je využíván k léčbě leukémie a i jiných typů rakoviny. Acyklovir (**Obrázek 3**) našel uplatnění v léčbě infekcí způsobených virem rodu *Herpes*. Dideoxyinosin (DDI, **Obrázek 3**) je účinným přípravkem proti HIV a v kombinaci s jinými antiretrovirálními léčivy je součástí velmi efektivní antiretrovirální terapie. Allopurinol (**Obrázek 3**) se používá při léčbě dny. Sildenafil který získal mezinárodní věhlas, je pod komerčním názvem Viagra[®] podáván při léčbě impotence²⁵.



Obrázek 3: Strukturální vzorce vybraných purinových sloučenin používaných v klinické praxi.

V posledních dvaceti letech byla objevena také schopnost určitých purinových derivátů působit jako inhibitory CDK.

2.2 Purinové inhibitory CDK

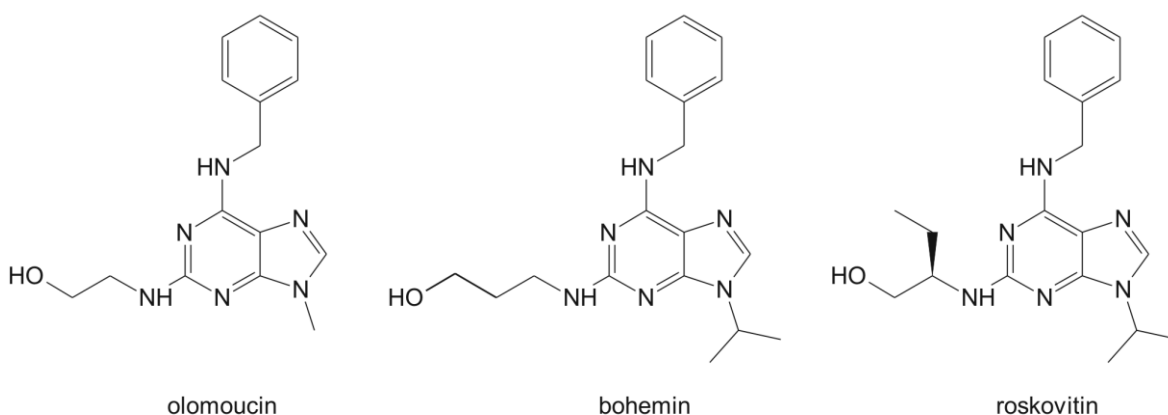
První sloučenina, u které byla zjištěna inhibiční aktivita vůči CDK (konkrétně vůči CDK1) byla 6-dimethylaminopurin, který byl původně připraven jako analog puromycinu. Další strukturální analog 6-(Δ^2 -isopentenyl)aminopurin se ukázal být v porovnání s 6-dimethylaminopurinem jako silnější inhibitor CDK. Následným intenzivním studiem řady substituovaných purinů byl vyvinut olomoucín (**Obrázek 4**)²⁶. Tato sloučenina byla strukturálně odvozena od rostlinných hormonů cytokininů a původně byla testována jako inhibitor rostlinných glukosyltransferáz. Poté u ní ale byla prokázána specifická inhibice některých CDK v mikromolární koncentraci. Z celkového počtu 35-ti testovaných proteinkináz bylo pouze 5 z nich inhibováno olomoucínem, konkrétně šlo o heterodimerní komplexy CDK2/cyklin A, CDK2/cyklin E, CDK1/cyklin B, CDK5 a MAP kinázy. Strukturálně méně podobné CDK4 a CDK6 v komplexu s cyklinem D nebyly olomoucínem inhibovány²⁷. V souladu s inhibičním efektem na interfázni a mitotické kinázy, olomoucín zastavuje buněčný cyklus jak na G1/S, tak G2/M rozhraní a spouští apoptózu v nádorových buňkách. Ačkoliv je olomoucín relativně slabým inhibitorem CDK (**Tabulka 1**), byla prokázána dostatečná účinnost tohoto léčiva na indukci apoptózy a dále regresi tumoru po jeho *in vivo* aplikaci v případě spontánního maligního melanomu prsu.

Modifikací substituentů v polohách C2, C6 a N9, které vykazují klíčové interakce mezi inhibitorem a CDK, byla dále zdokonalována struktura a inhibiční aktivita

purinových inhibitorů CDK. Náměnou methylu v poloze N9 isopropylem, se podařilo aktivitu trisubstituovaných purinů zvýšit. Následně se tento substituent, po řadě studií, ukázal být v poloze N9 jako optimální. To vedlo k objevu nového specifického inhibitoru CDK nazvaného boheminu (**Obrázek 4**), u kterého byl kromě změny substituentu na N9, také prodloužen alifatický řetězec v poloze C2 o jeden atom uhlíku²⁸.

U boheminu se prokázala silná cytotoxicita vůči mnoha nádorovým buněčným liniím *in vitro* a rovněž byl účinný za *in vivo* podmínek. Ačkoli toto léčivo nebylo úspěšné *in vitro* ve snížení aktivity CDK4, byl tento apoenzym inhibován *in vivo* prostřednictvím přímé blokády CDK7²⁹. Bohemin je intenzivně zkoumán rovněž při jeho komplexaci s přechodnými kovy (např. Zn^{II} a Pt^I), která může nejen zvýšit jeho inhibiční účinky, ale také rozpustnost ve vodných médiích³⁰.

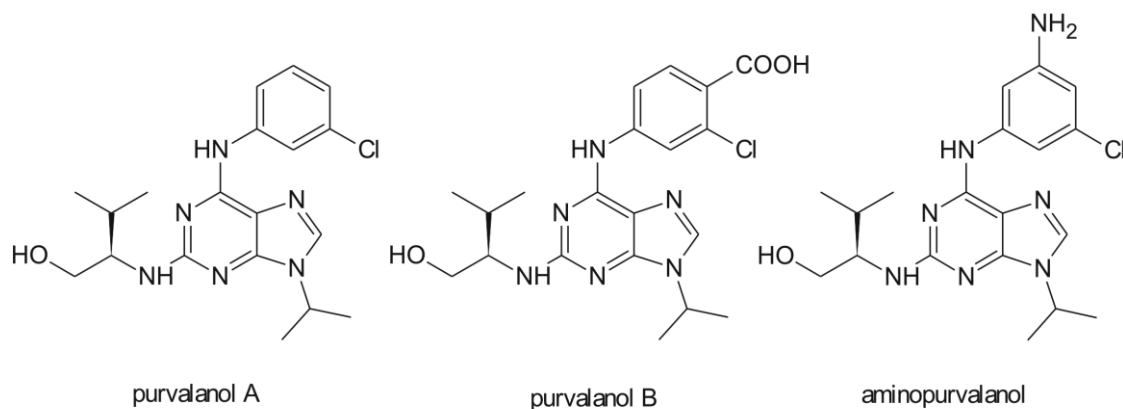
Roskovitin, (známý také jako CYC 202 nebo Seliciclib, **Obrázek 4**). Selektivně inhibuje CDK1, CDK2, CDK7 a CDK9, přičemž zastavuje buněčný cyklus v G_1 a G_2/M fázi³¹. Buňky ovlivněné roskovitinem podstupují apoptózu ve všech fázích buněčného cyklu. Roskovitin navíc selektivně preferuje rapidně proliferující buňky před buňkami zdravými. Je účinný v mnohem menších koncentracích než bohemín a olomoucín (**Tabulka 1**). Další výhodou roskovitinu je také jeho snadnější metabolizace v organismu, což zvyšuje jeho absorpci v tkáních. Nyní se nachází ve 2. fázi klinického testování jako perorální cytostatikum³².



Obrázek 4: Strukturní vzorce olomoucínu, bohemínu a roskovitinu.

Další modifikace roskovitinu, konkrétně v poloze C6, poskytly novou sérii velmi účinných inhibitorů CDK (téměř 1000krát účinnějších než olomoucín) souhrnně nazvaných purvalanoly (**Obrázek 5, Tabulka 1**). U těchto sloučenin byl benzylaminový substituent v poloze N6 nahrazen anilinovým. Purvalanol A (**Obrázek 5**) inhibuje

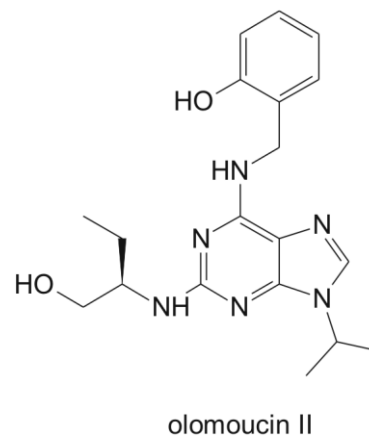
selektivně heterodimerní komplexy CDK2/cyklin E a CDK2/cyklin A, blokuje fosforylaci pRb, takže nedochází k uvolňování E2F a transkripci genů, potřebných pro vstup do S fáze. Tím prodlužuje nebo úplně zastavuje buňky v G₁ fázi³³. Purvalanol A vratně inhibuje buněčný cyklus v G₁ a G₂ fázi. Purvalanol B (**Obrázek 5**), lišící se od purvalanolu A umístěním karboxylové skupiny v poloze *para* na aromatickém kruhu, vykazuje vyšší enzymatickou afinitu (**Tabulka 1**). Aktivita aminopurvalanolu vůči analogickým komplexům CDK/cyklin je ve srovnání s purvalanolem B nižší, nicméně se jeví jako silnější inhibitor než purvalanol A. Při testování cytotoxicity vykazoval purvalanol A a aminopurvalanol velmi nízké hodnoty, avšak purvalanol B nevykazoval z důvodu malé prostupnosti přes buněčná rozhraní žádnou aktivitu^{28,34,35}.



Obrázek 5: Strukturální vzorce purvalanolu A, purvalanolu B a aminopurvalanolu.

Slabá protinádorová aktivita purvalanolů byla pravděpodobně způsobena jejich vyšší lipofilitou. Zavedením hydroxylové skupiny do již ověřených účinných inhibitorů se podařilo jejich aktivitu zvýšit. Neaktivnější derivát z této série byl nazván olomoucín II (**Obrázek 6**). Hydroxylová skupina navázaná do polohy *ortho* aromatického kruhu pomohla zvýšit schopnost blokovat aktivitu CDK1 a CDK9, v ostatních případech se olomoucín II chová podobně jako roskovitin^{28,34,36,37}.

Pro možnost porovnání účinnosti jmenovaných purinových inhibitorů jsou v **Tabulce 1** shrnuty jejich enzymatické aktivity proti různým heterodimerním komplexům CDK/cyklin.



Obrázek 6: Strukturální vzorec olomoucínu II.

Tabulka 1: Inhibiční aktivita vybraných purinových sloučenin vůči CDK ³⁵.

Sloučenina	IC ₅₀ [μM]					
	CDK1/B	CDK2/A	CDK2/E	CDK5/p35	CDK7/H	CDK9/T
olomoucín	7	7	7	3	-	-
bohemin	1		0,7			
roskovitin	0,65	0,7	0,1	0,16	0,49	0,74
purvalanol A	0,004	0,007	0,0035	0,0075	-	-
purvalanol B	0,006	0,006	0,009	0,006	-	-
olomoucín II	0,2	-	0,1	-	0,45	0,06

3 VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE

3.1 Princip a využití vysokoúčinné kapalinové chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z angl. high-performance liquid chromatography, HPLC) je chromatografickou metodou, používanou k separaci směsi sloučenin za účelem identifikace, kvantifikace a přečištění jednotlivých složek směsi. Velkou výhodou HPLC je zejména široká oblast použitelnosti. Umožňuje analyzovat ionty, polární i nepochární, málo těkavé, nestabilní i vysokomolekulární látky³⁸. Výhodou je také možnost ovlivňovat separaci složením mobilní fáze. HPLC nachází uplatnění v biochemickém a lékařském výzkumu, v environmentální analýze a v polymerní chemii. Dále může sloužit také k analýze biologicky aktivních látek a separaci chirálních látek^{38,39}.

HPLC je založena na rovnovážné distribuci analytu mezi vzájemně nemísitelnými fázemi. Na pevném nosiči uvnitř chromatografické kolony je zakotvena nepohyblivá stacionární fáze. Okolo fáze stacionární je pod vysokým tlakem protlačována pohyblivá mobilní fáze. Během separace je analyt rozdělován mezi stacionární a mobilní fázi. Doba, kterou stráví v jedné či druhé fázi, závisí na afinitě analytu ke každé z nich. Zadržování látek v koloně se nazývá retence a jejich vymývání z kolony eluce. Čím rychleji jsou vymývány látky z kolony, tím má mobilní fáze vyšší eluční sílu [38]. Při dělení směsí látek, jejichž eluční parametry se příliš neliší, se používá izokratická eluce jedinou mobilní fází, jejíž složení se během analýzy nemění. U některých směsí látek však nelze tímto způsobem dosáhnout optimálního dělení, zejména jestliže se jednotlivé složky směsi svými elučními parametry významně liší. V tomto případě se využívá gradientové eluce, při které se k jedné mobilní fázi plynule přimíchává množství druhé mobilní fáze s vyšším elučním účinkem. Vytváří se tak plynulý koncentrační gradient. Obdobným způsobem lze pro eluci využít i gradient pH⁴⁰.

V kapalinové chromatografii se pro separace využívá adsorpce, rozdělování mezi dvě fáze na základně různé rozpustnosti (separace na chemicky vázaných fázích), iontová výměna, síťový efekt a biospecifické interakce⁴¹. V chromatografickém systému se obvykle uplatňují jednotlivé typy interakce současně. Adsorpční chromatografii s polární stacionární a nepolární mobilní fází je označována jako chromatografie s normálními fázemi (z angl. normal-phase chromatography). Obrácenému typu s nepolární stacionární a polární mobilní fází se říká chromatografie s obrácenými fázemi či běžněji reverzní

chromatografie (z angl. reversed-phase chromatography, RP). Reverzní chromatografie je v praxi mnohem běžnější, protože je aplikovatelná na podstatně širší okruh analytů a typů vzorku^{38,42}.

3.2 Stacionární a mobilní fáze

Stacionární fáze je uspořádána v koloně. Rozhodující vliv na separaci při používání náplňových kolon má velikost, tvar a uspořádanost částic. Běžně jsou používány částice o velikosti 5–10 μm , ale jsou dostupné i náplně o velikosti 2 μm a menší. Separace je účinnější, pokud mají částice stejnou velikost, kulovitý tvar a kolona je jimi naplněna homogenně. Nejpoužívanějšími aplikacemi v RP systému jsou oktadecylsilikagel (C18) a oktylsilikagel (C8). Monolitické kolony jsou zcela vyplněny polymerem (nejčastěji silikagel) o definované pórovitosti. Vyznačují se velkou mechanickou stabilitou, odolností vůči změnám pH a vysokou účinností separace i při velkých průtocích mobilní fáze. Délka kolony bývá 5–25 cm, vnitřní průměr kolon 2–6 mm, objem vzorku 1–20 μl a průtok mobilní fáze okolo 1 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$. S rostoucí délkou kolony se zvyšuje účinnost, doba separace a pracovní tlak. Novým typem stacionární fáze jsou vtištěné polymery. U těchto kolon je do monolitické fáze zabudován „obtisk“ analytu, který chceme oddělit. Tyto typy chromatografických kolon jsou vhodné například pro chirální separace.

Mobilní fáze se také významně podílí na separačním procesu. Eluce analytů závisí na její polaritě. Např. u RP chromatografie vede její vyšší polarita k delšímu retenčnímu času. Možnosti jejího složení jsou téměř neomezené. Dále má vliv na účinnost kolony, rozlišení a citlivost analýzy. Mobilní fáze by měla mít co nejnižší viskozitu, stlačitelnost, toxicitu a hranu absorpce ultrafialového záření^{38,42}.

3.3 Instrumentace

Mobilní fáze je přiváděna ze zásobníku. Její pohyb zajišťuje vysokotlaké čerpadlo (dosahuje tlaků až několik desítek MPa), které musí zajišťovat konstantní, reprodukovatelný a bezpulsní průtok. Zajišťuje i směšování mobilních fází při gradientové eluci. U malých čerpadel je důležité odplynění mobilní fáze před vstupem do čerpadla, aby nedocházelo k uvolňování bublinek rozpuštěných plynů v koloně nebo detektoru. Mobilní fáze pokračuje z čerpadla do dávkovacího zařízení. V současnosti se používají především automatické dávkovače a manuální smyčkové dávkovače na principu přepínacích ventilů. Dávkovaný vzorek je dále veden do kolony, kde probíhá

vlastní separace. Před kolonou může být umístěna rovněž předkolona, jejíž hlavní funkcí je chránit kolonu před mechanickými nečistotami a nerozpustnými látkami. Nakonec je analyt veden do detektoru. Signál detektoru je vyhodnocen počítačem^{38,42,43}. Základní uspořádání systému ukazuje **Příloha I**.

3.3.1 Detektory používané v HPLC

Jednotlivé typy detektorů pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii, jejich stručná charakteristika a princip jsou shrnuty v **Tabulce 2**.

Tabulka 2: Detektory používané v HPLC^{38,43,44}.

Detektory	Charakteristika a princip detekce
Spektrofotometrické	Jsou založeny na absorpci v ultrafialové a viditelné (UV/Vis) oblasti spektra. Nejvíce se používají dvoupaprskové detektory, složitější systémy představují rychlé skenovací detektory. Detektory s diodovým polem měří současně velký počet miniaturních plošných diod. Jsou nejpoužívanější, jednoduché, spolehlivé, kompatibilní s gradientovou elucí.
Fluorimetrické a fosfimetrické	Analyt je ozařován UV zářením a produkuje luminiscenční (fluorescenční nebo fosforescenční) záření o nižší energii. Velmi citlivé a selektivní.
Refraktometrické	Měří index lomu solutu v mobilní fázi proti mobilní fázi. Jsou univerzální, ale přesná detekce vyžaduje konstantní teplotu a není možno použít gradientovou eluci.
Elektrochemické	Detekuje látky schopné elektrochemické reakce. Měří vodivost (pro iontové látky) nebo elektrický proud odpovídající oxidaci nebo redukci analytů. Jsou selektivní a také velmi citlivé.
Hmotnostní detektor	Umožňuje detekci separovaných látek s vysokou citlivostí, ale i identifikaci jednotlivých složek. Blíže popisuje kapitola 4.

4 HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

4.1 Princip a využití hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie (z angl. Mass spectrometry, MS) je fyzikálně-chemická metoda, jež určuje hmotnost atomů, molekul a molekulových fragmentů po jejich převedení na ionty. Tato metoda výborně vypovídá o struktuře analytů. Její využití je především ve stopové analýze organických látek s důrazem na zjištění jejich struktury. Spojením hmotnostního spektrometru s moderními separačními metodami je umožněno kvalitativně i kvantitativně analyzovat také látky v komplexních matricích. Dále informuje o funkčních skupinách obsažených v molekule analyzované látky a izotopovém složení⁴⁵.

Hmotnostní spektrometr je složen z iontového zdroje, hmotnostního analyzátoru, detektoru a vyhodnocovacího zařízení. Pracuje za vakua, proto je jeho další důležitou součástí i vakuový čerpací systém. Vzorek je přiváděn do iontového zdroje buď v plynném stavu anebo se vypařuje až ve zdroji. V něm je analyt převeden do ionizovaného stavu, probíhá zde i většina fragmentačních reakcí vedoucích k destrukci chemických vazeb vzniklého iontu. Hmotnostní analyzátor, pak směs iontů produkovanou v iontovém zdroji separuje podle hodnoty podílu jejich hmotnosti a náboje (m/z). Proud iontů, které prošly analyzátozem, je směřován na detektor, který poskytuje analogový signál úměrný počtu dopadajících iontů. Ten je digitalizován, převeden do počítače a zpracován do podoby hmotnostních spekter. Počítač slouží kromě sběru a zpracování dat i k řízení a kontrole funkcí souvisejících s chodem přístroje a optimalizací jeho provozních parametrů^{38,43}.

4.2 Ionizační techniky

V iontovém zdroji jsou analyty převáděny do ionizovaného stavu. Proces ionizace ovlivňuje citlivost metody a mez detekce, protože výtěžek ionizace většiny technik se pohybuje kolem 10 %. Pokud energie dodaná molekule v průběhu ionizace výrazně převyšuje její první ionizační energii, může dojít ke spotřebování nadbytečné vibračně-rotační energie fragmentací vzniklého iontu.

Podle množství dodané energie lze ionizační techniky rozdělit na tzv. tvrdé a měkké. Dodání většího množství nadbytečné energie vede u tvrdých ionizačních technik k rozsáhlé fragmentaci primárně vzniklého iontu. Nejběžnější jsou techniky ionizace v

plynné fázi, kde je analyzovaná látka předem odpařena do vakua. Tenhle způsob však vyžaduje dostatečně těžké analyty. Nejlépe propracovaným způsobem tvrdé ionizace je ionizace elektrony (z angl. electron impact, EI)^{38,43}.

Při měkké ionizaci je energetický přebytek dodaný ionizované molekule malý a pravděpodobnost fragmentace nízká. Příkladem měkkých ionizačních technik z plynné fáze je chemická ionizace (z angl. chemical ionization, CI), která je spolu s EI běžně používána v kombinaci s plynovou chromatografií (z angl. gass chromatography, GC). Dále sem řadíme sprejové ionizační techniky, které mohou být používány pro kapalné vzorky, a proto jsou vhodné pro kombinaci s kapalinovou chromatografií a kapilární elektroforézou. Jmenovitě to jsou elektrosprej (z angl. electrospray ionization, ESI), chemická ionizace za atmosférického tlaku (z angl. atmospheric pressure chemical ionization, APCI), fotoionizace za atmosférického tlaku (z angl. atmospheric pressure photoionization, APPI), případně laserová ionizace za atmosférického tlaku (z angl. atmospheric pressure laser ionization, APLI). Posledním uvedeným typem je ionizace laserem za účasti matrice (z angl. matrix-assisted laser desorption/ionization, MALDI)^{38,43}.

4.3 Hmotnostní analyzátory

Slouží k rozlišení iontů produkovaných v iontovém zdroji podle poměru jejich hmotnosti a náboje m/z . Hmotnostní analyzátory mohou pracovat v módu MS full scan, kdy jsou do analyzátoru vháněny všechny ionty a analyzátor skenuje celý rozsah hodnot m/z . Další možností je mód MS SIM (z angl. single ion monitoring), kde je vybrána jedna hodnota m/z a signál ostatních iontů je zanedbán. Poslední modifikací je analýza MS^n , kde n je celé reálné číslo a představuje počet nabití vybraného iontu. Na vybraný iont je aplikována určitá hodnota kolizní energie, která způsobí jeho štěpení ($n = 2$). Na vzniklý fragment je aplikována další dávka kolizní energie a vznikají další fragmenty ($n = 3$) atd.

Mezi nejpoužívanější typy analyzátorů patří magnetický hmotnostní analyzátor (z angl. sector field), kvadrupólový analyzátor (z angl. quadrupole, Q), iontová past (z angl. ion trap, IT) a průletový analyzátor (z angl. time of flight, TOF). Stručná charakteristika a možnost využití uvedených analyzátorů jsou uvedeny v **Tabulce 3**.

Tabulka 3: Charakteristika a možnost využití nepoužívanějších hmotnostních analyzátorů^{46,47}.

Typ analyzátoru	Charakteristika
Magnetický hmotnostní analyzátor	Elektromagnet, mezi jehož pólovými nástavci procházejí ionty. Na základě rozdílných hodnot m/z opisují ionty dráhy o různých poloměrech a dochází k jejich disperzi podle hmotnosti. Bývá součástí spektrometrů s velmi vysokým rozlišením. Obvykle ve spojení s EI a CI. Nebývá spojen se separačními metodami.
Kvadrupólový analyzátor	Čtyři kovové tyče, připojené ke zdrojům střídavého a stejnosměrného napětí. Chová se jako filtr, jenž podle zvoleného napětí propouští ionty o určitém m/z . Obvykle spojen s ESI a separačními metodami.
Iontová past	Trojrozměrná obdoba kvadrupólového analyzátoru. Možnost spojení s GC a LC.
Průletový analyzátor	Evakuovaná trubice. Rozdělení iontů s rozlišným m/z podle doby letu z iontového zdroje do detektoru. Používán hlavně v kombinaci s MALDI a spojován s LC.

4.4 Detektory

Detektory lze rozdělit do dvou kategorií. První kategorií jsou detektory pro přímá měření, které detekují elektrický proud, vznikající přímým dopadem iontů. Jsou aplikovány pro měření přesného izotopového zastoupení prvků. Druhou kategorií tvoří násobičové detektory, které využívají efekt násobení elektronů vzniklých po dopadu iontů a poskytují měřitelné signály dokonce pro jednotlivé ionty. Jsou využívány u veškeré komerční instrumentace včetně systémů GC-MS a LC-MS. Zástupci této kategorie jsou elektronnásobičové a fotonásobičové detektory^{43,46,47}.

5 KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE – HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

Spojení kapalinové chromatografie, metody s vysokou separační schopností, a hmotnostní spektrometrie, vysoce citlivé identifikační techniky, přináší důležité výhody pro analýzu netěkavých, vysoce polárních a termicky nestabilních látek. Primárním požadavkem pro spojení kapalinového chromatografu a hmotnostního spektrometru je odstranění složek mobilní fáze před samotnou ionizací.

V současnosti se používají sprejové ionizační techniky (především APCI a ESI), které jsou konstrukčně vybaveny tak, aby byly schopny odvést co největší množství těkavých složek kapalně mobilní fáze, ještě než se dostanou do hmotnostního analyzátoru. Nejčastěji používanými analyzátory jsou iontová past, která dosahuje ve srovnání s kvadrupólem nižších mezí detekce a je vhodná zejména pro stopovou analýzu, a průletový hmotnostní analyzátor, který je ve spojení LC velice žádaný pro analýzu biopolymerů, zejména bílkovin a fragmentů nukleových kyselin.

Pro výrazné zvýšení selektivity je výhodné tandemové LC-MS/MS uspořádání. S použitím těchto technik se běžně dosahují meze detekce o jeden a půl řádu nižší než metodou HPLC s UV/VIS detekcí ⁴⁶.

II. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

6 PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ PRO URČENÍ STRUKTURY PŘIPRAVENÝCH SLOUČENIN

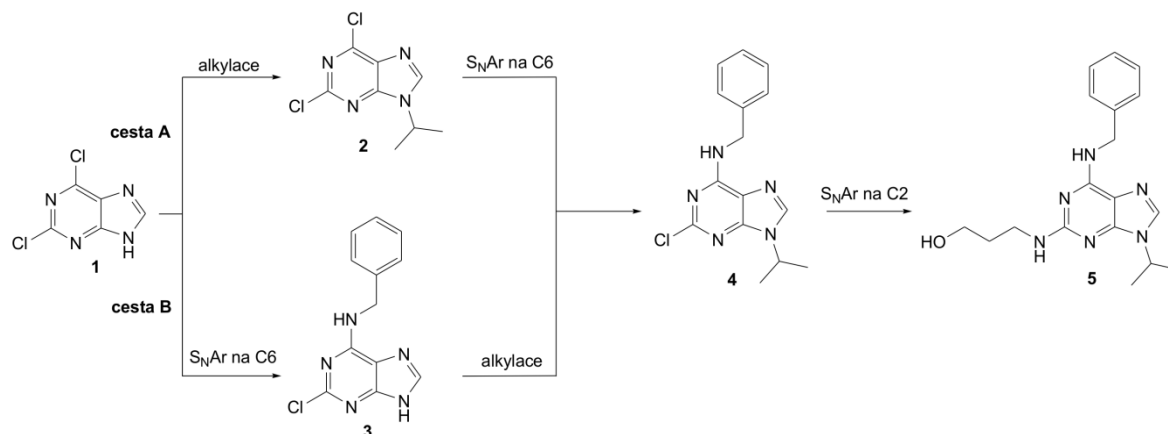
Teploty tání (t_t) byly měřeny na Koflerově bloku a jsou nekorigované. Elementární analýzy (C, H, N) byly provedeny na přístroji Thermo Fischer Scientific Flash EA 1112. Retenční faktory (R_f) byly určeny TLC analýzou při použití destiček typu Alugram Sil G/UV firmy Macherey-Nagel. Jako mobilní fáze byla použita směs pertolether/ethylacetát (1/1, v/v) jako systém A a chloroform/methanol (8/1, v/v) jako systém B. NMR spektra byla měřena na přístroji Bruker Avance 300 při frekvenci 300,13 MHz (^1H) a 75,77 MHz (^{13}C). Jako interní standard bylo používáno rozpouštědlo (^1H : $\delta(\text{reziduální CHCl}_3) = 7,27$ ppm, $\delta(\text{reziduální DMSO-}d_5) = 2,50$ ppm; ^{13}C : $\delta(\text{CDCl}_3) = 77,23$ ppm, $\delta(\text{DMSO-}d_6) = 39,52$ ppm). Při interpretaci protonových spekter bylo použito následujících zkratk: s = singlet, d = dublet, t = triplet, m = multiplet. Infračervená spektra byla měřena na přístroji iS 10, Smart omni – Transmission v podobě KBr tablet. Při vypisování spekter byly použity následující zkratky značící intenzitu absorpčního pásu: w = slabá, m = střední, s = silná, případně také jeho šířku: b = široký pás. Kvantitativní analýza reakčních směsí byla měřena na plynovém chromatografu Shimadzu GCMS-QP2010 s kvadrupólovým hmotnostním analyzátozem (GC-EI-MS). Chromatografická kolona: EquityTM-1 (30 m \times 0,32 mm \times 1,0 μm); nosný plyn: helium (konstantní průtok 38 $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$); teplotní program: 100 $^\circ\text{C}/7$ min, 25 $^\circ\text{C}/\text{min}$ zvýšení na teplotu 250 $^\circ\text{C}$, která byla držena patřičně dlouhou dobu; teplota nástřiku: 250 $^\circ\text{C}$; iontový zdroj: 200 $^\circ\text{C}$, 70 eV. Hmotnostní spektra sloučenin s vyšší molekulovou hmotností byla měřena metodou přímého vstupu (DI-EI-MS) na hmotnostním spektrometru Shimadzu QP-2010. Teplotní program: 80 $^\circ\text{C}/1$ min, 40 $^\circ\text{C}/\text{min}$ zvýšení na teplotu 350 $^\circ\text{C}$, jež byla držena patřičně dlouhou dobu. Iontový zdroj: 200 $^\circ\text{C}$, 70 eV. Při vypisování hmotnostních spekter byly brány v úvahu signály s relativním zastoupením alespoň 5 % (neplatí pro molekulové ionty). ESI-MS analýzy byly prováděny na hmotnostním spektrometru s iontovou pastí amaZon X (Bruker Daltonics) vybaveném elektrosprejovým ionizačním zdrojem. Veškerá měření byla provedena v pozitivním skenovacím módu. Do iontového zdroje byly vzorky přiváděny kovovou kapilárou při konstantním průtoku 5 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$. Ostatní parametry byly následující: napětí na kapiláře: -4,2 kV; teplota sušícího plynu (220 $^\circ\text{C}$); průtok sušícího plynu (6 $\text{dm}^3\cdot\text{min}^{-1}$); tlak rozprašovacího plynu (55,16 kPa). Jako sušící a rozprašovací plyn byl použit dusík. Případné další parametry byly optimalizovány během jednotlivých experimentů.

Tandemová hmotnostní spektra byla – po izolaci příslušného iontu – měřena pomocí kolizí vyvolané disociace (z angl. collision-induced dissociation, CID). Jako kolizní plyn bylo použito helium.

7 PŘÍPRAVA 2,6,9-TRISUBSTITUOVANÝCH PURINŮ

Požadovaná sloučenina **5** (bohemín) byla připravena dvěma různými cestami (Schéma 2).

Schéma 2



7.1 Příprava bohemínu cestou A

7.1.1 Alkylace 2,6-dichlor-9H-purinu (1)

Sloučenina **2** byla připravena mírně modifikovaným literárním postupem⁴⁹. V baňce o objemu 50 cm³ obsahující 17 cm³ dimethylsulfoxidu bylo rozpuštěno 1,0 g (5,3 mmol) 2,6-dichlor-9H-purinu (**1**). Vzniklý slabě žlutý roztok byl ochlazen na teplotu 15 °C. Poté bylo do ochlazeného roztoku přidáno 2,2 g (15,6 mmol) K₂CO₃ a 1,6 cm³ (16,2 mmol) 2-jodpropanu v uvedeném pořadí. Poté byla reakční směs důkladně míchána při teplotě 15–18 °C po dobu 8 hodin. Následně byla směs zředěna vodou (cca 25 cm³) a extrahována 7 × 15 cm³ diethyletheru. Spojené organické podíly byly promyty nasyceným roztokem NaCl (2 × 10 cm³) a sušeny nad síranem sodným. Surová směs byla přečištěna sloupcovou chromatografií (silikagel, systém A).

2,6-Dichlor-9-isopropyl-9H-purin (2)

Čistá titulní látka byla získána v podobě bezbarvých jehliček ve výtěžku 730 mg (60 %); $t_r = 149\text{--}152$ °C; $R_f = 0,34$ (systém A).

¹H NMR (CDCl₃): δ 1,66 (*d*, $J = 6,9$ Hz, 7H, CH(CH₃)₂); 4,93 (*septet*, $J = 6,9$ Hz, 1H, CH(CH₃)₂); 8,16 (*s*, 1H, NC⁸HN) ppm. ¹³C NMR (CDCl₃): δ 22,9(CH₃); 48,7(CH); 131,2(C); 143,8(CH); 152,1(C); 152,8(C); 153,0(C) ppm. IR (KBr): 3119(*w*), 2987(*w*),

1784(w), 1587(s), 1556(s), 1488(m), 1464(m), 1358(s), 1317(m), 1275(m), 1246(s), 1218(s), 1188(m), 1159(s), 1138(m), 1108(w), 958(m), 877(s), 779(m), 683(w), 644(m), 628(m), 597(m) cm^{-1} . GC-EI-MS ($t_R = 12,6$ min): 234($M_C^+(^{37}\text{Cl}_2)$, 4), 233(7), 232($M_B^+(^{35}\text{Cl}+^{37}\text{Cl})$, 22), 231(14), 230($M_A^+(^{35}\text{Cl}_2)$, 34), 215(9), 217(6), 197(7), 195(20), 192(11), 191(7), 190(64), 189(12), 188(100), 161(6), 155(12), 153(39), 92(12), 64(6), 43(31), 42(8), 41(39) m/z (%).

7.1.2 S_NAr 2,6-dichlor-9-isopropyl-9H-purinu (2) na C6

Sloučenina **4** byla připravena mírně modifikovaným literárním postupem⁵⁰. Ve směsi dimethylformamidu (5 cm^3) a triethylaminu (0,2 cm^3 ; 1,62 mmol) bylo rozpuštěno 250 mg (1,08 mmol) 2,6-dichlor-9-isopropyl-9H-purinu (**2**). Do vzniklého roztoku bylo následně přidáno 0,1 cm^3 (1,13 mmol) benzylaminu. Reakční směs byla míchána při teplotě 80–100 °C pod chlorkalciovým uzávěrem po dobu 3,5 hodin (monitorováno pomocí TCL). Po ukončení reakce byla směs zředěna vodou (pozorována tvorba jemné sraženiny) a vodná vrstva extrahována 4 \times 10 cm^3 diethyletheru. Spojené organické podíly byly promyty nasyceným roztokem NaCl (2 \times 10 cm^3) a sušeny nad síranem sodným. Surový produkt získaný odpařením rozpouštědla ve vakuu byl přečištěn sloupcovou chromatografií (silikagel, systém A).

N-Benzyl-2-chlor-9-isopropyl-9H-purin-6-amin (4)

Čistá titulní látka byla získána v podobě bezbarvého krystalického prášku ve výtěžku 249 mg (77 %); $t_f = 180$ –182 °C; $R_f = 0,14$ (systém A).

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): δ 1,55 (*d*, $J = 6,3$ Hz, 6H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$); 4,86 (*m*, 3H, $\text{C}^6\text{NHCH}_2\text{Ph} + \text{CH}(\text{CH}_3)_2$); 6,84 (*bs*, 1H, $\text{C}^6\text{NHCH}_2\text{Ph}$); 7,39 (*m*, 5H, Ph); 7,54 (*s*, 1H, NC^8HN) ppm. $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3): δ 22,8(CH_3); 47,2(CH); 119,2(C); 127,5(CH); 127,9(CH); 128,8(CH); 137,9(CH); 138,6(C); 139,3(C); 154,6(C); 155,4(C) ppm. IR (KBr): 3265(w), 3124(w), 2977(w), 1714(w), 1627(s), 1571(m), 1536(w), 1454(w), 1354(m), 1311(m), 1292(m), 1254(w), 1228(m), 1201(w), 1068(w), 930(m), 883(w), 789(w), 723(w), 696(w), 659(w), 642(w), 538(w), 484(w) cm^{-1} . GC-EI-MS ($t_R = 27,0$ min): 303($M_B^+(^{37}\text{Cl})$, 21), 302(12), 301($M_A^+(^{35}\text{Cl})$, 60), 300(5), 261(7), 260(16), 259(21), 258(40), 224(6), 223(5), 222(8), 161(5), 155(5), 154(10), 153(6), 119(21), 107(9), 106(100), 92(10), 91(64), 89(6), 79(7), 77(7), 65(21), 43(13), 41(15) m/z (%).

ESI-MS(pos) m/z (%): 340,2 $[M(^{35}\text{Cl})+K]^+$ (5); 324,2 $[M(^{35}\text{Cl})+Na]^+$ (12); 302,2 $[M(^{35}\text{Cl})+H]^+$ (100).

7.1.3 S_NAr *N*-Benzyl-2-chlor-9-isopropyl-9*H*-purin-6-aminu (4) na C2

Sloučenina **5** byla připravena mírně modifikovaným literárním postupem⁵⁰. Do baňky o objemu 10 cm³ bylo naváženo 150 mg (0,5 mmol) *N*-benzyl-2-chlor-9-isopropyl-9*H*-purin-6-aminu (**4**), k němuž bylo dále přidáno 0,3 cm³ (4,0 mmol) 3-aminopropan-1-olu. Vzniklá směs byla důrazně míchána při teplotě 160 °C pod ochrannou argonovou atmosférou po dobu 3 hodin (monitorováno TLC, systém B). Poté byla reakční směs ochlazená na laboratorní teplotu a zředěna cca 20 cm³ chloroformu, který byl (za účelem odstranění nezreagovaného přebytku 3-aminopropan-1-olu ze surové směsi) několikrát promyt destilovanou vodou. Organická fáze byla na závěr promyta 5 cm³ nasyceného roztoku NaCl a sušena nad síranem sodným. Odpařením rozpouštědla ve vakuu byl získán surový produkt, který byl následně dočištěn pomocí sloupcové chromatografie (silikagel, systém B).

3-[[6-(Benzylamino)-9-isopropyl-9*H*-purin-2-yl]amino]propan-1-ol (5)

Čistá titulní látka byla získána v podobě nažloutlého oleje s tendencí ke krystalizaci při teplotě -15 °C do podoby světle žlutého krystalického prášku ve výtěžku 75 mg (44 %); $t_f = 84-88$ °C; $R_f = 0,34$ (systém B).

¹H NMR (CDCl₃): δ 1,53 (*d*, $J = 6,8$ Hz, 6H, CH(CH₃)₂); 1,75 (kvintet, $J = 5,6$ Hz, 2H, NHCH₂CH₂CH₂OH); 3,64 (*m*, 4H, NHCH₂CH₂CH₂OH); 4,63 (septet, $J = 6,8$ Hz, 1H, CH(CH₃)₂); 4,80 (*s*, 2H, C⁶NHCH₂Ph); 5,06 (*m*, 2H, NH(CH₂)₃OH); 6,35 (*bs*, 1H, C⁶NHCH₂Ph); 7,29–7,39 (*m*, 5H, Ph); 7,42 (*s*, 1H, NC⁸HN) ppm. ¹³C NMR (CDCl₃): δ 22,9(CH₃); 33,8(CH₂); 37,6(CH₂); 46,3(CH); 58,5(CH₂); 114,6(CH); 127,5(C); 127,9(CH); 128,7(CH); 134,6(CH); 139,2(C); 155,2(C); 160,4(C) ppm. IR (KBr): 3400(*m*), 3268–3206(*bm*), 3125(*w*), 2972–2873(*bw*), 1623(*s*), 1600(*s*), 1523(*s*), 1474(*w*), 1390(*m*), 1341(*w*), 1292(*m*), 1260(*m*), 1220(*w*), 1130(*w*), 1183(*w*), 1065(*m*), 1026(*w*), 972(*m*), 886(*w*), 787(*m*), 745(*m*), 726(*w*), 696(*m*), 639(*m*), 543(*w*) cm⁻¹. ESI-MS(pos) m/z (%): 341,3 $[M+H]^+$ (100).

7.2 Příprava boheminu cestou B

7.2.1 S_NAr 2,6-dichlor-9H-purinu na C6

Sloučenina **3** byla připravena mírně modifikovaným literárním postupem⁵¹. V baňce o objemu 100 cm³ bylo rozpuštěno 500 mg (2,6 mmol) 2,6-dichlor-9-isopropyl-9H-purinu (**1**) v 11 cm³ butan-1-olu. Do vzniklého roztoku bylo následně přidáno 0,35 cm³ (3,2 mmol) benzylaminu a 0,6 cm³ (4,2 mmol) triethylaminu v uvedeném pořadí. Vzniklý nažloutlý roztok byl míchán při teplotě 110 °C pod chlorkalciovým uzávěrem, přičemž byl pozorován postupný vznik bezbarvé sraženiny. Po ukončení reakce (2 hodiny, monitorováno TLC, systém B) byl vzniklý pevný podíl odfiltrován, promyt 2 × 2 cm³ ledového butan-1-olu a důkladně vysušen za vakua. Takto získaný produkt byl dále používán bez nutnosti dalšího čištění.

***N*-Benzyl-2-chlor-9H-purin-6-amin (**3**)**

Čistá titulní látka byla získána v podobě bezbarvého krystalického prášku ve výtěžku 622 mg (90 %); $t_f = 272\text{--}279$ °C; $R_f = 0,15$ (systém B).

¹H NMR (DMSO): δ 4,65 (s, 2H, C⁶NHCH₂Ph); 5,10 (bs, 2H, NH(CH₂)₃OH); 7,24 (m, 1H, Ph); 7,31–7,36 (m, 4H, Ph); 8,13 (s, 1H, NC⁸HN); 8,60 (s, 1H, C⁶NHCH₂Ph); 13,00 (s, 1H, N⁹H) ppm. ¹³C NMR (DMSO): δ 43,6(CH₂); 127,3(CH); 127,9(CH); 128,8(CH); 140,0(C); 153,4(C) ppm. IR (KBr: 3208(w), 3026(w), 2807(m), 2702(w), 1631(s), 1554(s), 1472(m), 1382(m), 1349(m), 1249(s), 1228(w), 1136(m), 1076(w), 1029(w), 941(m), 865(w), 787(m), 750(m), 698(m), 615(m), 539(w) cm⁻¹. GC-EI-MS ($t_R = 30,8$ min): 261(M_B⁺(³⁷Cl), 19), 260(15), 259(M_A⁺(³⁵Cl), 58), 258(19), 224(9), 182(6), 154(8), 153(5), 119(17), 107(8), 106(100), 92(12), 91(67), 79(10), 77(8), 65(27), 63(5), 51(7) m/z (%).

7.2.2 Alkylace *N*-Benzyl-2-chlor-9H-purin-6-aminu (**3**)

Požadovaná sloučenina **4** byla připravena analogickým postupem jako sloučenina **2** (kap. 7.1.1) z výchozích navážek: 400 mg (1,6 mmol) *N*-benzyl-2-chlor-9H-purin-6-aminu (**3**), 0,5 cm³ (4,9 mmol) 2-jodpropanu, 646 mg (4,7 mmol) K₂CO₃ a 5 cm³ DMSO.

***N*-Benzyl-2-chlor-9-isopropyl-9*H*-purin-6-amin (4)**

Čistá titulní látka byla získána v podobě bezbarvého krystalického prášku ve výtěžku 355 mg (76 %); $t_f = 179\text{--}183\text{ }^\circ\text{C}$; $R_f = 0,65$ (systém B). Naměřená spektrální data odpovídají požadované struktuře a shodují se s daty uvedenými v kapitole 5.1.1.

7.2.3 S_NAr *N*-Benzyl-2-chlor-9-isopropyl-9*H*-purin-6-aminu (4) na C2

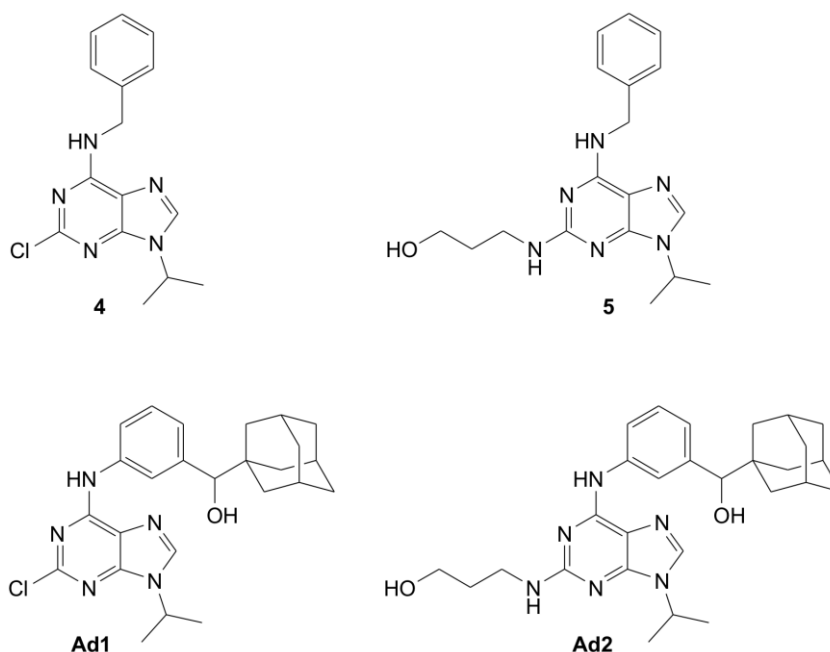
Požadovaná sloučenina **5** byla připravena analogickým postupem uvedeným v kapitole 7.1.3 z výchozích navážek: 100 mg (0,33 mmol) *N*-benzyl-2-chlor-9-isopropyl-9*H*-purin-6-aminu (**4**) a 0,2 cm³ (2,7 mmol) 3-aminopropan-1-olu.

3-[[6-(Benzylamino)-9-isopropyl-9*H*-purin-2-yl]amino]propan-1-ol (5)

Čistá titulní látka byla získána v podobě nažloutlého krystalického prášku ve výtěžku 74 mg (65 %); $t_f = 86\text{--}88\text{ }^\circ\text{C}$; $R_f = 0,28$ (systém B). Naměřená spektrální data odpovídají požadované struktuře a shodují se s daty uvedenými v kapitole 5.1.3.

8 ANALÝZA PURINOVÝCH SLOUČENIN POMOCÍ HPLC-UV/VIS

Pro analýzu sloučenin **4** a **5** a sloučenin **Ad1** a **Ad2** (pro potřeby této diplomové práce byly k dispozici dříve připravené a plně charakterizované vzorky těchto látek), jejichž strukturní vzorce jsou znázorněny na **Obrázku 7**. Byl použit vysokoúčinný kapalinový chromatograf (HPLC) Dionex UltiMate 3000 vybavený UV/Vis detektorem (**Příloha I**).



Obrázek 7: Strukturní vzorce sloučenin **4**, **5**, **Ad1** a **Ad2**.

8.1 Specifikace systému HPLC s UV/Vis detektorem

Název:	UltiMate 3000 (Dionex)
Pumpy:	SD a RS pumpy
Autosampler:	WPS-3000SL a WPS-3000RS
Chromatografická kolona:	Acclaim 120 (Dionex), C18 (2,1 mm × 150 mm; 5 μm)
Detektor:	UV/Vis (DAD-3000RS a MWD-3000RS)
Použitý software:	Chromeleon, Hystar

8.2 Příprava vzorků

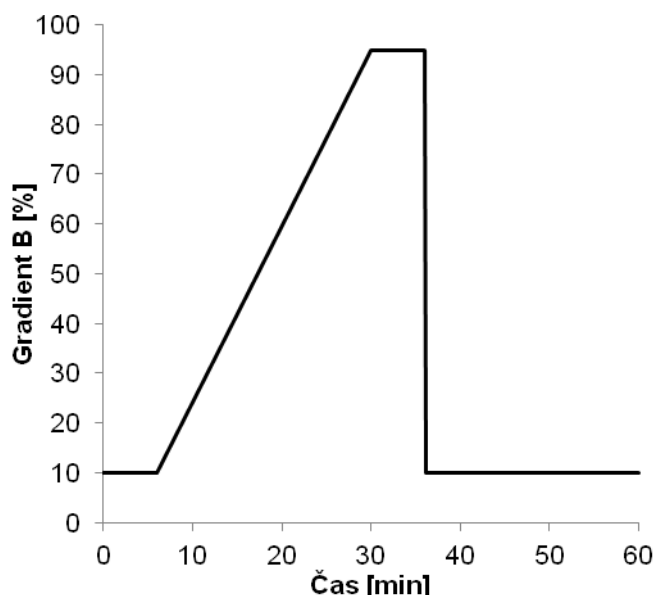
Do skleněné vialky o objemu 1,5 cm³ s krimpovacím uzávěrem byl na analytických vahách navážen 1,0 mg (± 0,1 mg) příslušného vzorku. Vzorek byl rozpuštěn přidáním 1 cm³ acetonitrilu. Přidáním 100 μl vzorku ze zásobního roztoku do 900 μl acetonitrilu bylo dosaženo požadované koncentrace 100 μg·ml⁻¹ pro analýzu HPLC.

8.3 Popis analýzy vzorků metodou HPLC-UV/Vis

Připravené vzorky byly podrobeny analýze pomocí HPLC s UV/Vis detekcí. Některé parametry se pro všechny měření shodovaly. Složení mobilní fáze A bylo 0,1 % kyseliny mravenčí v deionizované vodě. Mobilní fáze B byla složena z 0,1 % kyseliny mravenčí (Penta, ČR) v acetonitrilu pro HPLC (Fisher Scientific, USA). Koncentrace vzorku byla $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a objem nastříkovaného vzorku činil 10 μl . Teplota termostatu kolony byla nastavena na 30°C. Absorbance byla měřena při rozmezí vlnových délek 210–305 nm.

Při analýze sloučenin **4** a **5** byl průtok mobilní fáze nastaven na $0,2 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ a doba analýzy činila 60 min. Při měření byla použita gradientová eluce. Její průběh popisuje **Tabulka 4** a grafické znázornění je vyjádřeno na **Obrázku 8**.

Čas [min]	Gradient B [%]
0	10
6	10
30	95
36	95
36,1	10
60	10



Tabulka 4: Průběh gradientové eluce.

Obrázek 8: Grafické znázornění gradientu.

Při analýze vzorků **5** a **Ad2** byl průtok nastaven na $0,2 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ a $0,7 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, doba jednotlivých analýz byla 10 min a 20 min. Byla použita izokratická eluce, při které se poměr fází u jednotlivých měření lišil, což bude popsáno v části Výsledky a diskuze.

9 LC-MS/MS ANALÝZA PURINOVÝCH SLOUČENIN

Analýzy všech studovaných vzorků (**Obrázek 7**, strana 37) metodou LC-MS/MS byly prováděny na vysokoúčinném kapalinovém chromatografu UltiMate 3000 (Dionex) spojeného s hmotnostním spektrometrem s iontovou pastí amaZon X (Bruker Daltonics) vybaveného elektrosprejovým ionizačním zdrojem (**Příloha II**).

9.1 Specifikace hmotnostního spektrometru

Název:	amaZon X (Bruker Daltonics)
Ionizační zdroj:	elektrosprej
Hmotnostní analyzátor:	iontová past
Rozsah m/z :	50–3000
Sušící a rozprašovací plyn:	dusík
Způsob fragmetance iontů:	kolizí indukovaná disociace (CID)
Kolizní plyn:	helium
Software:	Trap Control, Data Analysis

9.2 Parametry MS analýz

Všechny analyzované vzorky byly do hmotnostního spektrometru přiváděny kovovou kapilárou a následně měřeny v pozitivní polaritě. Dále jsou uvedeny nevýznamnější parametry měření:

Skenování mód:	Enhanced resolution (8 100 $m/z \cdot s^{-1}$)
Napětí na kapiláře:	- 4,2 kV
Napětí na konci kapiláry:	140 V
Tlak rozprašovacího plynu:	137 895 Pa
Průtok sušícího plynu:	6 $dm^3 \cdot min^{-1}$
Teplota sušícího plynu:	300 °C
ICC (maximální počet iontů v pasti):	200 000
Maximální akumulací čas:	20 ms
Rozpětí m/z :	50–1500
Tandemová spektra:	MS^2 , MS^3 a MS^4
Kolizí indukovaná disociace:	Cut-off (27%), amplituda 1,0 V

Ostatní parametry měření jako např. zaměření se na příslušnou hodnotu m/z (provádí se pomocí tzv. SPS – SmartParameterSetting) byly nastavovány podle povahy analyzovaného vzorku bezprostředně před daným měřením.

9.3 Příprava vzorků

Do skleněné vialky o objemu $1,5 \text{ cm}^3$ s krimpovacím uzávěrem byl na analytických vahách navážen $1,0 \text{ mg}$ ($\pm 0,1 \text{ mg}$) příslušného vzorku. Vzorek byl rozpouštěn přidáním 1 cm^3 acetonitrilu. Přidáním $10 \mu\text{l}$ vzorku ze zásobního roztoku do $990 \mu\text{l}$ acetonitrilu bylo dosaženo požadované koncentrace $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pro analýzu LC/MS/MS.

9.4 Popis analýzy vzorků metodou LC-MS/MS

Složení mobilních fází, stejně jako teplota termostatu kolony a objem nástřiku vzorku u příslušného analytu bylo analogické jako v případě HPLC-UV/Vis analýz všech studovaných vzorků (kapitola 8.3).

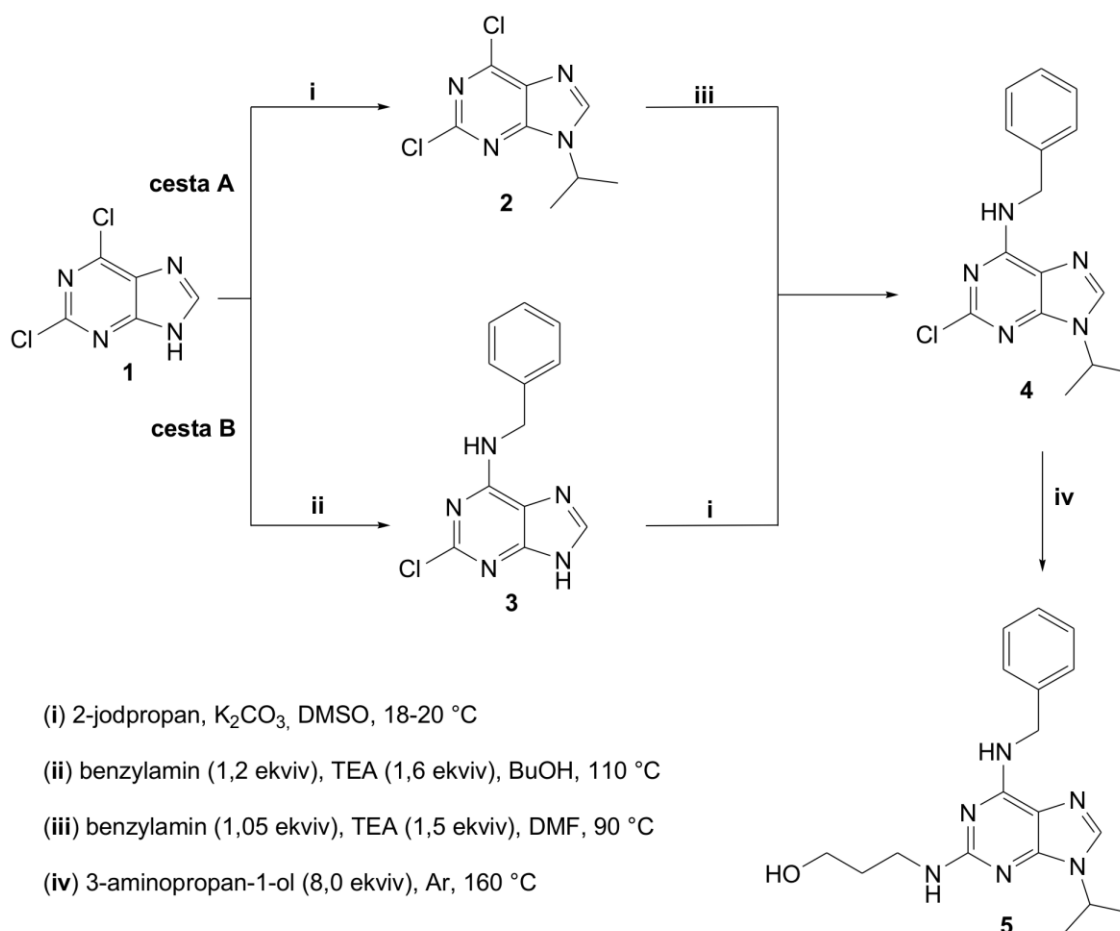
Pro sloučeniny **4** a **Ad1** byl průtok mobilní fáze nastaven na $0,2 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ a doba analýzy činila 45 min. Při měření byla použita gradientová eluce (viz kapitola 8.3). Při analýze vzorků **5** a **Ad2** byl průtok nastaven na $0,2 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, doba jednotlivých analýz činila 7 min a byla použita pouze mobilní fáze B.

III. VÝSLEDKY A DISKUZE

10 SYNTÉZA A STRUKTURA 2,6,9-TRISUBSTITUOVANÝCH PURINŮ

Jedním ze základních cílů této diplomové práce byla příprava a charakterizace vybraných 2,6,9-trisubstituovaných purinů, které byly následně podrobeny analýzám HPLC-UV/Vis a LC-MS/MS. Konkrétně se jednalo o *N*-benzyl-2-chlor-9-isopropyl-9*H*-purin-6-amin (**4**) a 3-{{6-(benzylamino)-9-isopropyl-9*H*-purin-2-yl}amino}propan-1-ol (**5**) známý také pod triviálním označením bohemin (o biologických účincích této látky je blíže pojednáno v kapitole 2.2). Sloučenina **5** byla vybrána především z důvodů blízké strukturní příbuznosti s 2,6,9-trisubstituovanými puriny obsahujícími adamantanový skelet, které byly dříve připraveny na Ústavu chemie FT UTB ve Zlíně. Ty představují klíčové sloučeniny, jež byly v rámci této práce studovány metodami HPLC-UV/Vis a LC-MS/MS (blíže viz kapitoly 11 a 12).

Schéma 3



celkový výtěžek: cesta A = 20 %
cesta B = 42 %

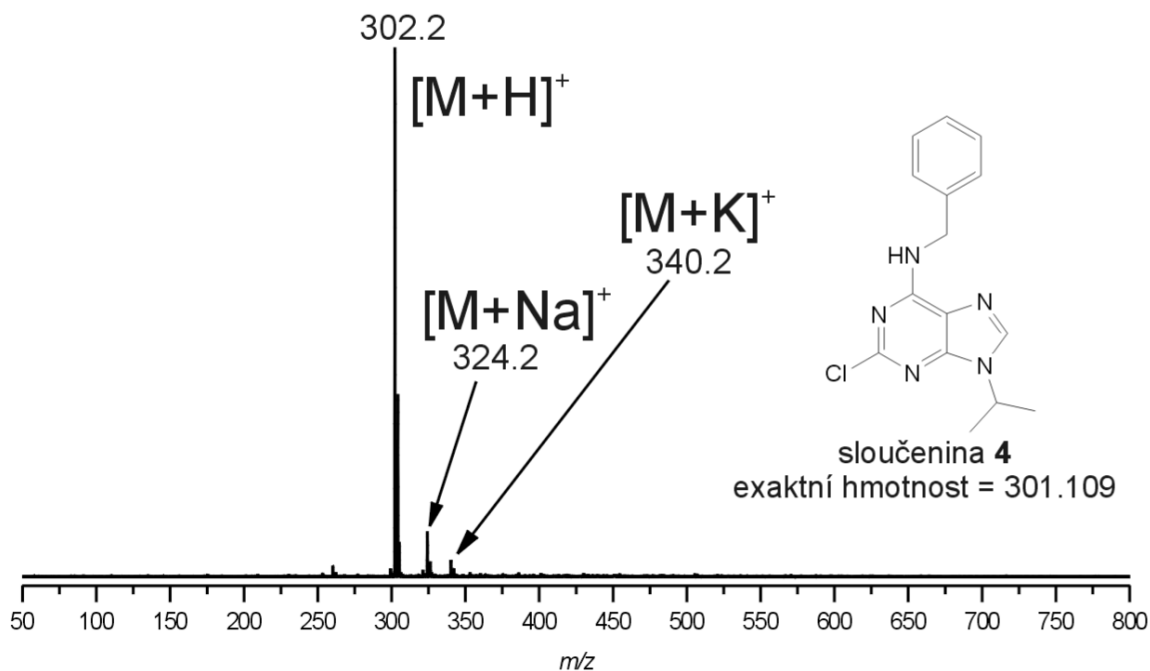
Sloučenina **5** byla připravena dvěma různými cestami, jak je graficky znázorněno na **Schématu 3**. Cesta A zahrnovala v prvním kroku přímou alkylaci výchozího 2,6-dichlor-9*H*-purinu (**1**). Následovala nukleofilní aromatická substituce atomu chloru v poloze 6 sloučeniny **2** za vzniku purinového derivátu **4**. Naopak, první krok cesty B představovala nukleofilní aromatická substituce atomu chloru na C6 výchozího 2,6-dichlor-9*H*-purinu (**1**) za vzniku sloučeniny **3**, která byla následně ponechána reagovat s 2-jodpropanem za vzniku sloučeniny **4**. Poslední krok byl pro obě zvolené cesty společný. Konkrétně se jednalo o nukleofilní aromatickou substituci atomu chloru v poloze 2 primární aminem, konkrétně 3-amino-propan-1-olem za vzniku sloučeniny **5**.

10.1 Příprava boheminu cestou A

Při alkylaci komerčně dostupného 2,6-dichlor-9*H*-purinu (**1**) 2-jodpropanem docházelo v reakční směsi ke vzniku dvou isomerů, a sice N7- a N9-alkylovaných derivátů. Vzhledem k obecně známé vyšší reaktivitě atomu dusíku v poloze 9 purinového kruhu byl v reakční směsi jako majoritní složka zastoupen právě N9-alkylovaný derivát **2**. Druhý isomer, tedy N7, byl ve směsi obsažen ve velmi malém množství. Oba isomery byly odděleny pomocí krystalizace ze směsi ethyl-acetát/hexan, přičemž byly-li po krystalizaci stále přítomny stopy N7-alkylovaného derivátu, bylo přistoupeno k dočištění pomocí sloupcové chromatografie (silikagel; petrolether/ethyl-acetát, 1/1, v/v). Struktura, jakož i čistota sloučeniny **2** byla určena pomocí běžných spektrálních metod, jako jsou plynová chromatografie s hmotnostní detekcí (GC-MS), infračervená spektroskopie (IR) a nukleární magnetická resonance (NMR).

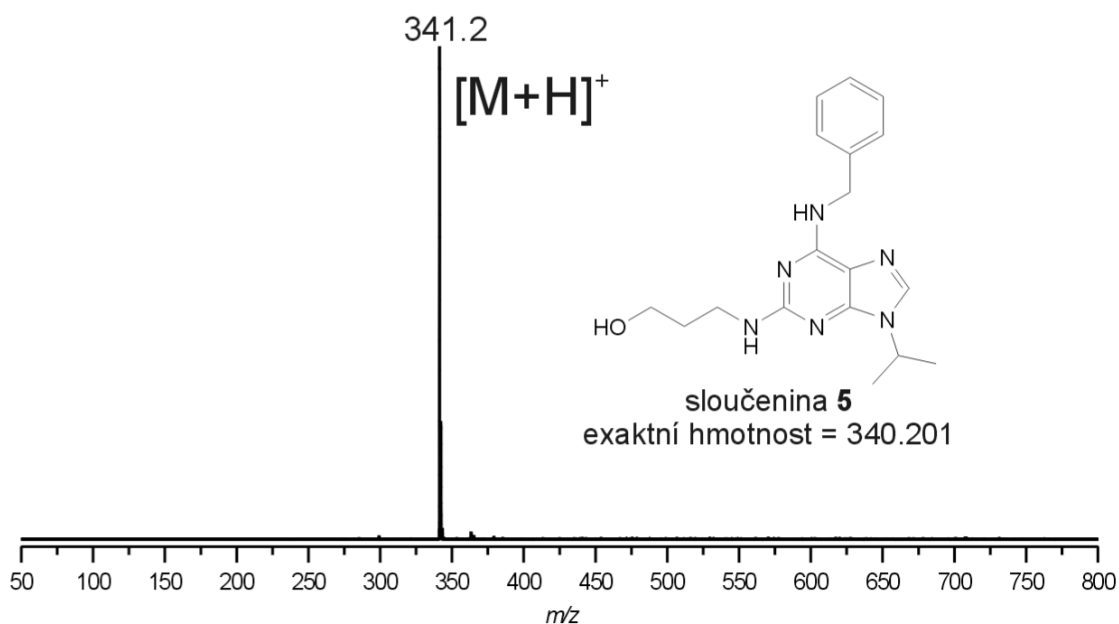
Ve druhém kroku byla provedena nukleofilní aromatická substituce atomu chloru v poloze 6 purinového kruhu sloučeniny **2**, a sice benzylaminem. Jako rozpouštědlo byl použit dimethylformamid a jako báze triethylamin. Průběh reakce byl monitorován pomocí tenkovrstvé chromatografie (TLC), přičemž k úplnému zreagování výchozího purinu **2** došlo po 3,5 hodinách. Požadovaná sloučenina **4** byla v uspokojivé čistotě získána až po přečištění surového produktu pomocí sloupcové chromatografie (silikagel; petrolether/ethyl-acetát, 1/1, v/v). Struktura látky **4** byla opět potvrzena běžnými metodami strukturní analýzy (¹H-, ¹³C-NMR, IR, GC-MS a ESI-MS). Na **Obrázku 9** je uvedeno hmotnostní spektrum prvního řádu získané technikou ESI-MS. Jak je z uvedeného obrázku patrné, tak ve spektru prvního řádu sloučeniny **4** byly pozorovány tři významné signály. Jako dominantní signál byl pozorován protonovaný molekulový

iont $[M+H]^+$ o hodnotě m/z 302. Tento signál byl doprovázen dvěma minoritními signály, a sice sodným $[M+Na]^+$ a draselným $[M+K]^+$ aduktem molekulového iontu o hodnotách m/z 324 a 340. Za zmínku rovněž stojí, že ve spektru prvního řádu nebyla pozorována tvorba vyšších asociátů, jež by mohly být předpokládány.



Obrázek 9: ESI-MS spektrum prvního řádu sloučeniny 4.

Posledním krokem cesty A byla nukleofilní aromatická substituce atomu chloru v poloze 2 purinového skeletu. Na základě získaných zkušeností byla reakce prováděna za úplného vyloučení rozpouštědla z reakční směsi, s tím, že použitý amin (v tomto případě 3-aminopropan-1-ol) byl použit v 8 molárním přebytku. Reakce probíhala při teplotě 160 °C pod ochrannou argonovou atmosférou po dobu 3 hodin. Po přečištění surového produktu pomocí sloupcové chromatografie (silikagel; chloroform/methanol, 8/1, v/v) byl získán slabě žlutý olejovitý produkt, který při teplotě -15 °C zkrystalizoval. Při určování struktury sloučeniny 5 byly opět použity běžné metody strukturní analýzy. Hmotnostní spektrum prvního řádu získané metodou ESI-MS je znázorněno na **Obrázku 10**. Jako jediný signál byl ve spektru pozorován pseudomolekulární iont $[M+H]^+$ o m/z 341. Další signály, na rozdíl od ESI-MS analýzy sloučeniny 4 (viz **Obrázek 10**), nebyly v ESI-MS spektru látky 5 pozorovány. Výsledky získané pomocí NMR spektroskopie jsou blíže diskutovány v kapitole 10.2.

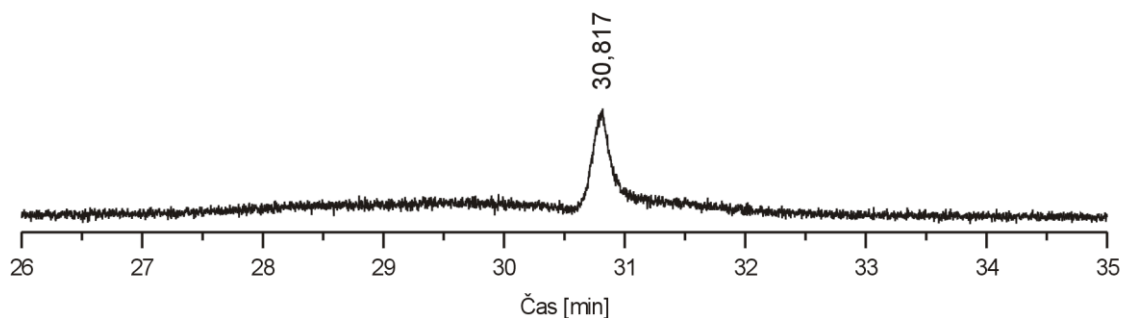


Obrázek 10: ESI-MS spektrum prvního řádu sloučeniny **5**.

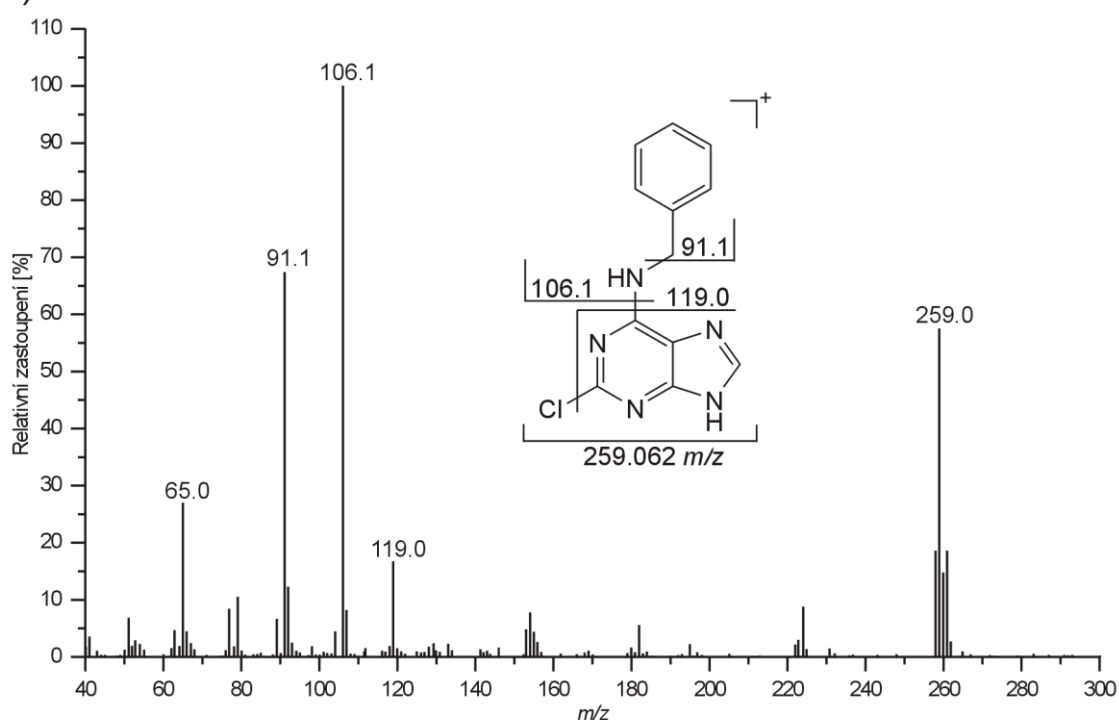
10.2 Příprava boheminu cestou B

V prvním kroku cesty B byla provedena nukleofilní aromatická substituce atomu chloru v poloze 6 purinového skeletu výchozího 2,6-dichlor-9*H*-purinu (**1**) benzylaminem. Rozpouštědlem při této reakci byl butanol, jako báze byl použit triethylamin. Reakce probíhala při teplotě 110 °C pod chlorkalciovým uzávěrem po dobu 2 hodin. Průběh reakce byl monitorován pomocí TLC. Produkt reakce (sloučenina **3**) byl získán v požadované čistotě bez nutnosti dalšího čištění. Struktura této látky byla potvrzena následujícími metodami strukturní analýzy: ¹H-, ¹³C-NMR, IR a GC-MS. Hmotnostní spektrum sloučeniny **3**, získané metodou GC-EI-MS, je znázorněno na **Obrázku 11**, přičemž na **Obrázku 11a** je znázorněn výřez chromatogramu, z něhož je patrné, že za daných podmínek (kapitola 6) odpovídal retenční čas hodnotě 30,187 min. Na **Obrázku 11b** je znázorněno hmotnostní spektrum prvního řádu získané metodou EI-MS. Kromě signálu o *m/z* 259 odpovídajícímu molekulovému iontu (M⁺), byly v hmotnostním spektru pozorovány další významné signály vznikající v důsledku fragmentace molekulového iontu v průběhu ionizačního procesu. Základním píkem komentovaného MS spektra je signál o *m/z* 106 vznikající odtržením C₇H₈N z molekuly. Dalšími významnými fragmenty jsou signály o hodnotách 91 a 119 *m/z*.

a)



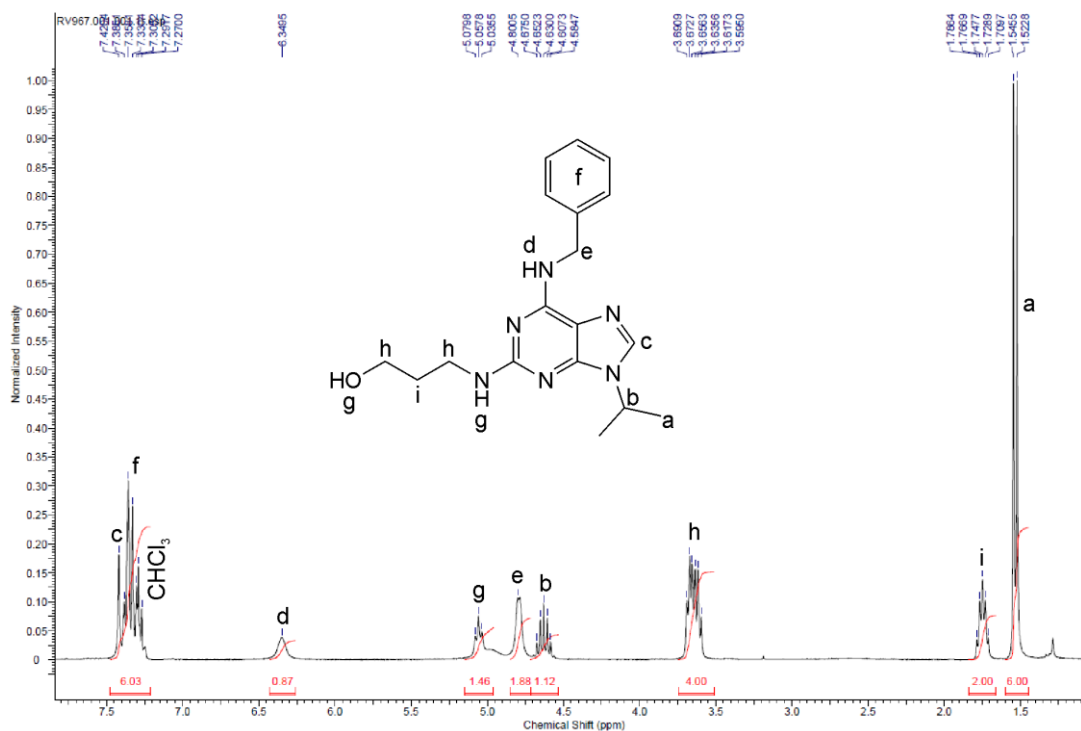
b)

**Obrázek 11:** Hmotnostní spektrum sloučeniny **3**.

Následujícím krokem byla alkylace sloučeniny **3** v poloze 9 purinového skeletu za vzniku sloučeniny **4**. Jako alkylační činidlo byl použit 2-jodpropan. Reakce probíhala v dimethylsulfoxidu s přidavkem K_2CO_3 po dobu 8 hodin při teplotě 15–20 °C. Struktura sloučeniny **4** byla potvrzena stejnými metodami jako při přípravě této sloučeniny cestou A. Zásadním rozdílem při přípravě sloučeniny **4** cestou B bylo, že nedocházelo (na rozdíl od alkylace 2,6-dichlor-9H-purinu) ke vzniku N7-alkylovaného derivátu, což bylo pravděpodobně zapříčiněno vlivem sterického bránění benzylaminového substituentu. Díky tomuto faktu zřejmě vedla cesta B k vyššímu celkovému výtěžku než cesta A.

Poslední reakce cesty B byla analogická k poslednímu kroku cesty A, který je popsán a diskutován v kapitole 10.1. V této kapitole je dále uvedena diskuze k výsledkům NMR spektroskopie sloučeniny **5**.

Po provedení NMR experimentu mohlo být jak ^1H - tak ^{13}C -NMR spektrum sloučeniny **5** porovnáno se spektrem uvedeným v literatuře ⁵². Zatímco u protonového spektra sloučeniny **5** (Obrázek 11) byla pozorována naprostá shoda s literárními údaji, tak v uhlíkovém spektru sloučeniny **5** se nepodařilo detekovat signál atomu uhlíku CH_2 ($\text{C}_6\text{NHCH}_2\text{Ph}$) pocházející z benzylaminu zavedeného na C6 purinového skeletu. Nicméně, jak vyplývá z výše uvedeného, v protonovém spektru byla přítomnost atomů vodíku (signál „e“, $\delta_{\text{exp}} = 4,80$ ppm; $\delta_{\text{lit}} = 4,75$ ppm⁵²) náležících tomuto atomu uhlíku potvrzena. V ^1H -NMR spektru sloučeniny **5** lze v oblasti 1,52–1,56 ppm pozorovat dublet pocházející z methylových skupin isopropylu navázaného na atomu dusíku v poloze 9 purinového kruhu (signál „a“). Atom vodíku patřící aminoskupině vázané na C6 purinového kruhu (signál „d“) byl pozorován v oblasti 6,34 ppm. Za zmínku stojí rovněž přítomnost atomu vodíku umístěného na purinovém kruhu (signál „c“). Jelikož se jedná o atom vodíku na atomu uhlíku, na nějž jsou vázány dva elektronegativní atomy dusíku, není překvapivé, že rezonuje při slabším magnetickém poli (7,42 ppm).



Obrázek 12: ^1H -NMR spektrum sloučeniny **5**.

11 HPLC-UV/VIS

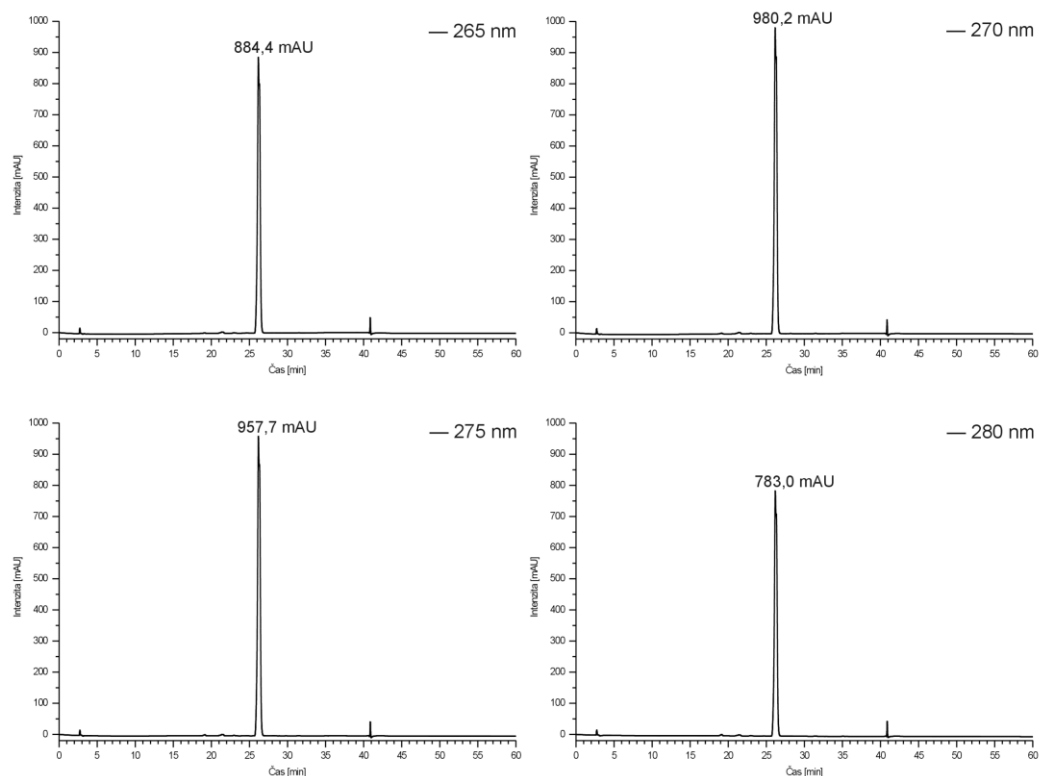
V následujících třech podkapitolách jsou popsány a graficky znázorněny výsledky analýz sloučenin **4**, **5**, **Ad1** a **Ad2**, provedených pomocí metody HPLC s UV-Vis detekcí. Příprava sloučenin **4** a **5** byla součástí této práce. Sloučeniny **Ad1** a **Ad2** byly připraveny již v minulosti na Ústavu chemie Fakulty technologické UTB ve Zlíně. Tyto sloučeniny vykazovaly vysokou inhibiční aktivitu vůči komplexu CDK2/cyklin E. U sloučeniny **Ad1** je inhibiční aktivita vůči tomuto komplexu ($IC_{50}=1,4 \mu\text{M}$) v porovnání s boheminem (sloučenina **5**) dvakrát menší, sloučenina **Ad2** se svou inhibiční aktivitou ($IC_{50}=0,2 \mu\text{M}$) blíží k roskovitinu³⁵. Z tohoto důvodu se tedy sloučeniny **Ad1** a **Ad2** staly hlavním předmětem zkoumání této práce. Důvodem provádění HPLC-UV/Vis experimentů před vlastními analýzami HPLC-MS těchto látek byla nutnost zoptimalizovat podmínky měření pro HPLC, zejména složení mobilních fází, jejich průtoku a gradientu.

11.1 HPLC-UV/Vis analýzy sloučenin **4** a **Ad1**

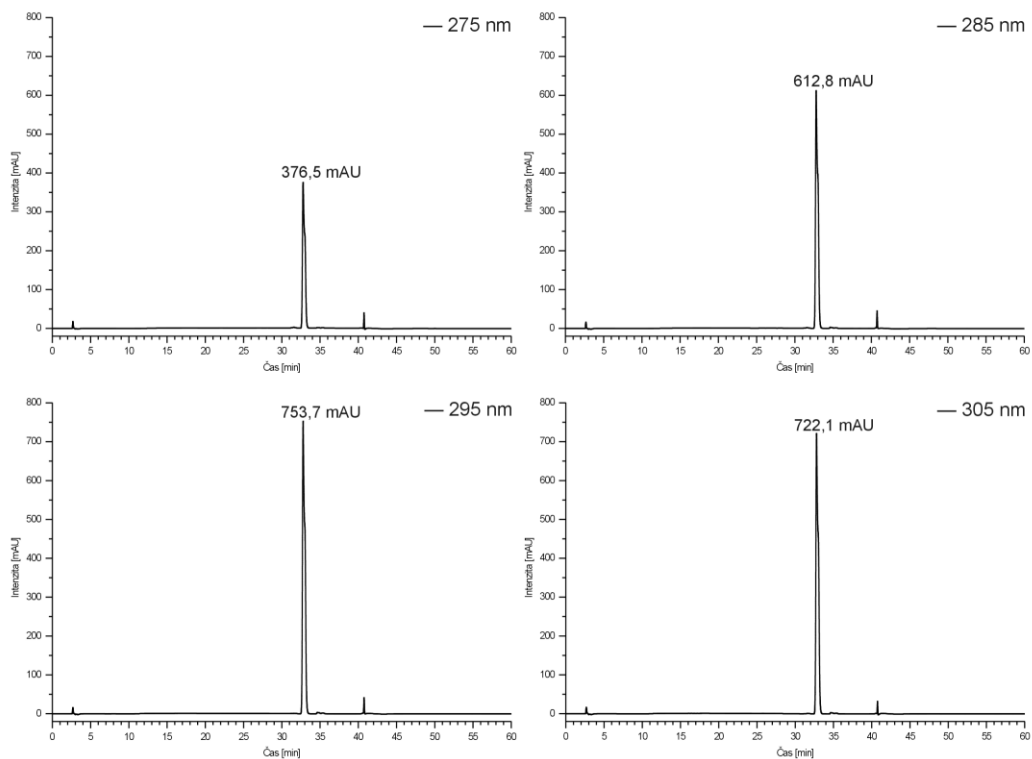
Jednotlivé analýzy sloučenin **4** a **Ad1** měly stejné parametry, proto jsou uváděny v jedné kapitole. Průtok mobilní fáze byl $0,2 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ a doba jednotlivých analýz činila 60 min. Při analýzách byly použity vzorky o koncentraci $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Při měření byla použita gradientová eluce. Její průběh je detailně popsán a graficky znázorněn v kapitole 8.3. Retenční čas sloučeniny **4** byl 26,19 min, u sloučeniny **Ad1** byla jeho hodnota 32,7 min.

Obrázek 13 znázorňuje chromatogramy získané při studiu absorbance sloučeniny **4**. Pro zjištění nejvyšší absorbance v oblasti UV/Vis byly, na základě předchozích měření, vybrány následující vlnové délky: 265, 270, 275 a 280 nm. V retenčním čase 26,19 min dosahoval pík nejvyšší intenzity 980,2 mAU při zvolené vlnové délce 270 nm.

Na **Obrázku 14** jsou uvedeny chromatogramy z jednotlivých měření studia absorbance sloučeniny **Ad1**. V retenčním čase 32,78 min se z jednotlivých měření při vlnových délkách 275, 285, 295 a 305 nm ukázala být nejvhodnější vlnová délka 295 nm, při které dosahoval pík nejvyšší intenzity, a to 753,7 mAU.



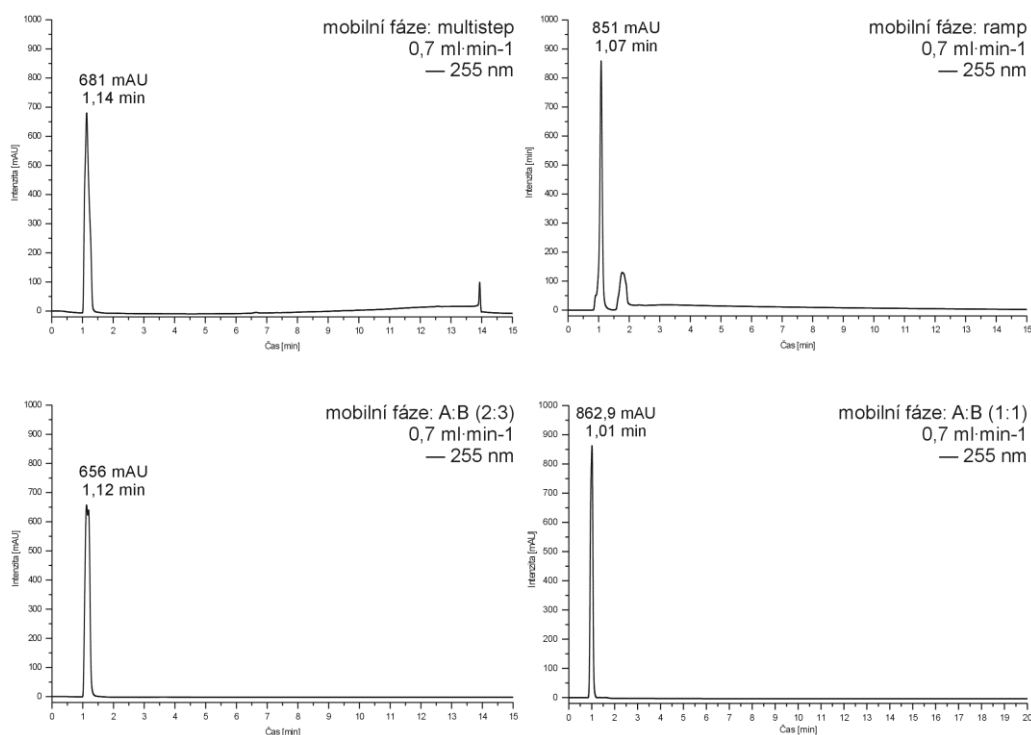
Obrázek 13: Studium absorbance sloučeniny 4.



Obrázek 14: Studium absorbance sloučeniny Ad1.

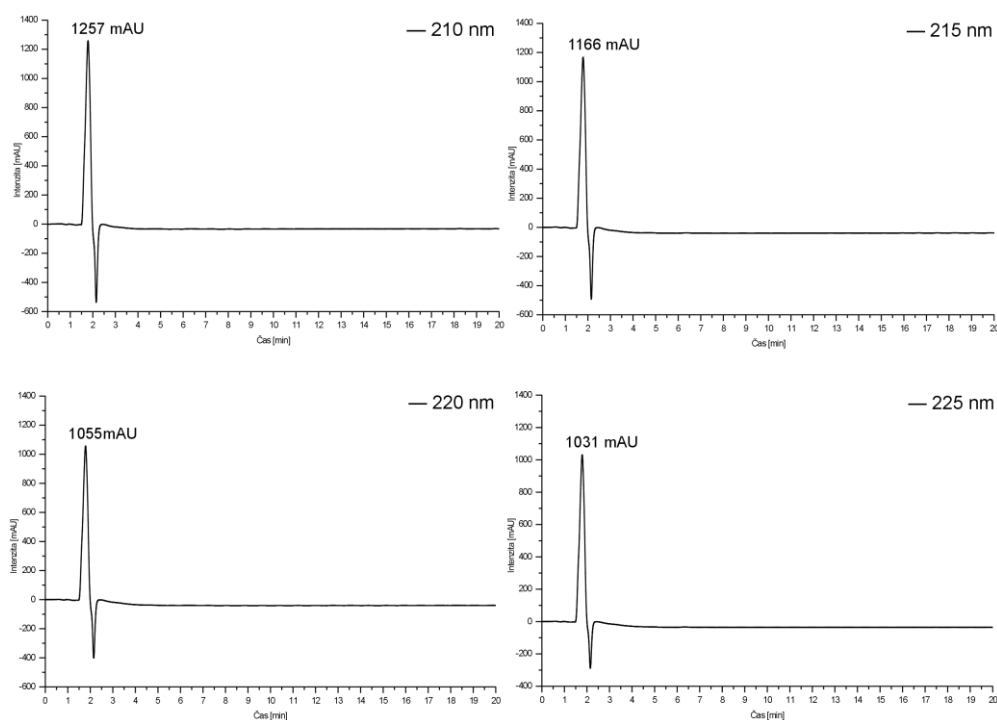
11.2 HPLC-UV/Vis analýzy sloučeniny 5

Při analýze sloučeniny **5** bylo nutné nejprve zvolit nejvhodnější složení mobilní fáze. Jako u předchozích měření byly použity deionizovaná voda s 0,1% kyseliny mravenčí jako mobilní fáze A a acetonitril s 0,1% kyseliny mravenčí jako mobilní fáze B. Doba jednotlivých analýz činila 20 min a byl zvolen průtok mobilní fáze $0,7 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ a koncentrace vzorku byla opět $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Na **Obrázku 15** jsou uvedeny chromatogramy jednotlivých měření s rozdílným složením mobilní fáze. Z obrázku vyplývá, že složení mobilní fáze nemělo výrazný vliv na retenční čas, který se u jednotlivých měření téměř nelišil. Za to se jednotlivé píky, měřené při vlnové délce 255 nm, výrazně lišily intenzitou. Nevyšší intenzita byla zaznamenána u měření, kde bylo složení mobilní fáze A:B v poměru 1:1.



Obrázek 15: Volba mobilní fáze pro HPLC/UV-Vis analýzu sloučeniny **5**.

Obrázek 16 znázorňuje chromatogramy získané při studiu absorpce sloučeniny **5**. Pro zjištění nejvyšší absorpce v oblasti UV/Vis byly vybrány na základě řady měření následující vlnové délky: 210, 215, 220 a 225 nm. V retenčním čase 26,19 min dosahoval pík nejvyšší intenzity 980,2 mAU při vlnové délce 270 nm.

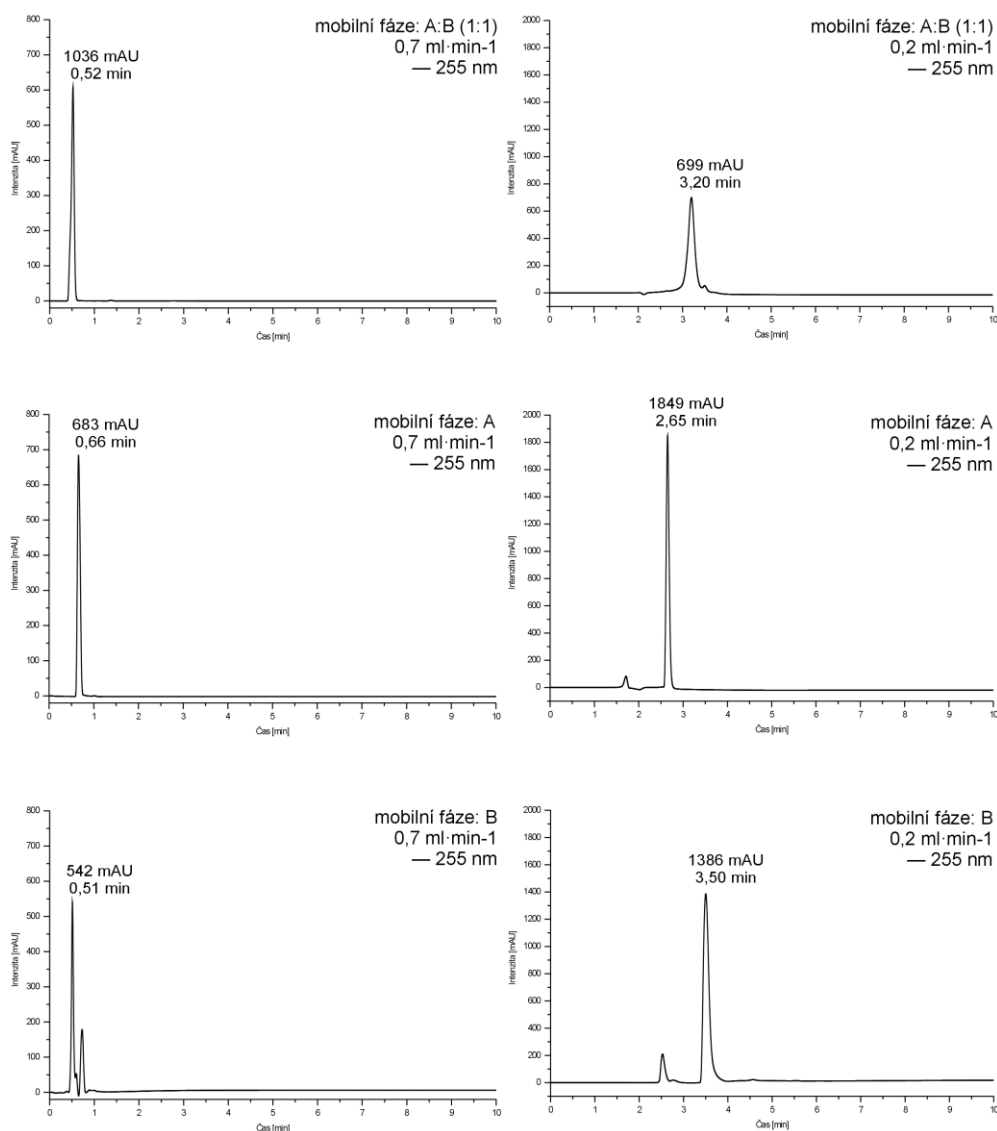


Obrázek 16: Studium absorbance sloučeniny 5.

11.3 HPLC-UV/Vis analýzy sloučeniny Ad2

Při volbě nevhodnějšího složení mobilní fáze pro HPLC-UV-Vis analýzu sloučeniny **Ad2** byly opět použity mobilní fáze shodné s mobilními fázemi v předchozích kapitolách. Doba jednotlivých analýz činila 10 min a vzorky měly koncentraci $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

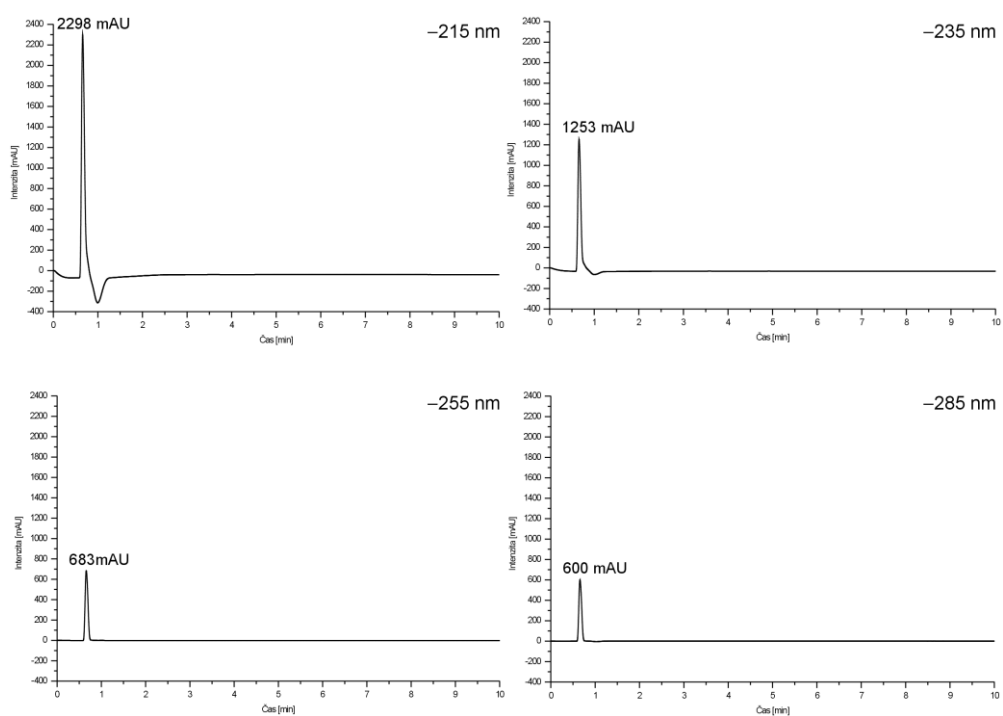
Na **Obrázku 17** jsou uvedeny chromatogramy jednotlivých měření s rozdílným složením mobilní fáze. Všechny analýzy byly měřeny při vlnové délce 255 nm. V levé části obrázku jsou pod sebou uspořádány chromatogramy z analýz při průtoku $0,7 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, v pravé části jsou záznamy z analýz s průtokem mobilní fáze $0,2 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Přičemž pro porovnání jsou vždy vedle sebe chromatogramy analýz o stejném složení mobilní fáze. Při průtoku $0,7 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ byly pozorovány jen minimální rozdíly v hodnotách retenčního času a ani intenzita píků se výrazně nelišila. Naopak při průtoku $0,2 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ byly již rozdíly při použití odlišného složení mobilní fáze patrné. Při analýze, kde eluent sestával z fází A a B v poměru 1:1, byl retenční čas 3,2 min a intenzita píku dosahovala 699 mAU. Při použití fáze B jako jediného eluentu byl retenční čas 3,50 a intenzita píku 1386 mAU. Nejvyšší intenzitu 1849 mAU měl pik v retenčním čase 2,65 min z měření, kde jako mobilní fázi byla použita jen fáze A.



Obrázek 17: Optimalizace volby mobilní fáze pro HPLC/UV-Vis analýzu sloučeniny

Ad2.

Obrázek 18 znázorňuje chromatogramy získané při studiu absorpance sloučeniny **Ad2**. Pro zjištění nejvyšší absorpance v oblasti UV/Vis byly, na základě předchozích měření, vybrány následující vlnové délky: 215, 235, 255 a 285 nm. V retenčním čase 0,66 min dosahoval pík nejvyšší intenzity 2298 mAU při zvolené vlnové délce 215 nm.



Obrázek 18: Studium absorbance sloučeniny Ad2.

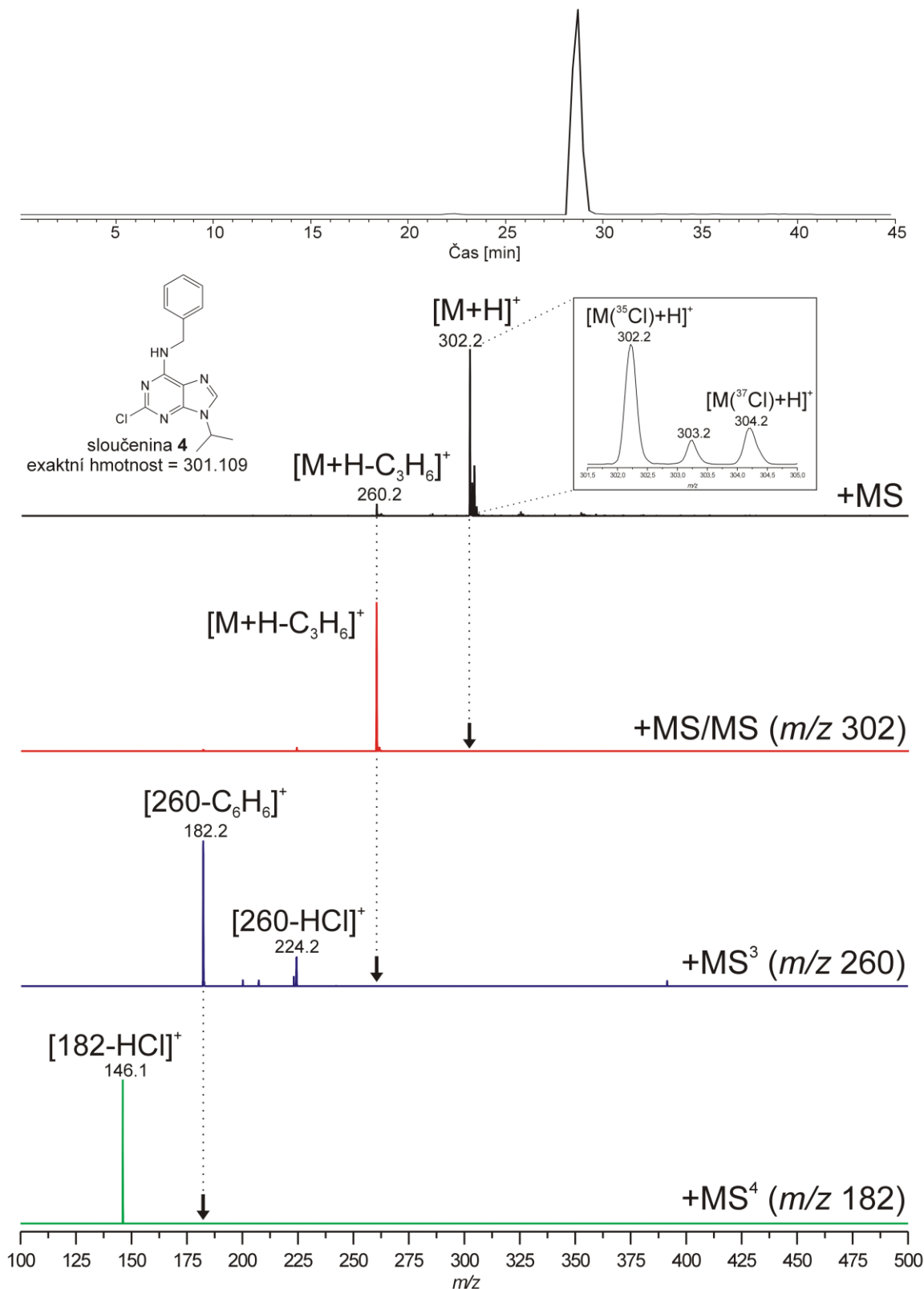
12 LC-MS/MS

Závěrečnou část předložené diplomové práce představuje série LC-MS/MS analýz sloučenin **4**, **5**, **Ad1** a **Ad2**. Cílem LC-MS/MS analýz nebylo jen získat hmotnostní spektra příslušných sloučenin (to lze ostatně provést jednodušším způsobem, a sice přímým nástřikem příslušného vzorku do hmotnostního spektrometru), ale zejména optimalizovat podmínky LC-MS analýz pro typ sloučenin, které není možné analyzovat pomocí GC-MS, a které jsou předmětem zájmu vědecko-výzkumné skupiny Dr. Víchy, do jejíž činnosti jsem se v rámci řešení této diplomové práce zapojila.

12.1 LC-MS/MS analýzy sloučenin **4** a **Ad1**

Při LC-MS/MS analýzách sloučenin **4** a **Ad1** byly pro kapalinovou chromatografii zvoleny naprosto stejné podmínky jako v případě analýz těchto látek metodou HPLC-UV/Vis (viz kapitola 9.4). Byly použity vzorky o koncentraci $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Hodnoty retenčních časů obou sloučenin získané metodou LC-MS/MS se, v porovnání s retenčními časy daných látek získaných pomocí HPLC-UV/Vis, zvýšily. Důvodem je fakt, že ionty analyzované molekuly jsou nejprve detekovány pomocí UV/Vis, jenž je součástí systému HPLC, a až poté jsou kovovou kapilárou transportovány do hmotnostního spektrometru.

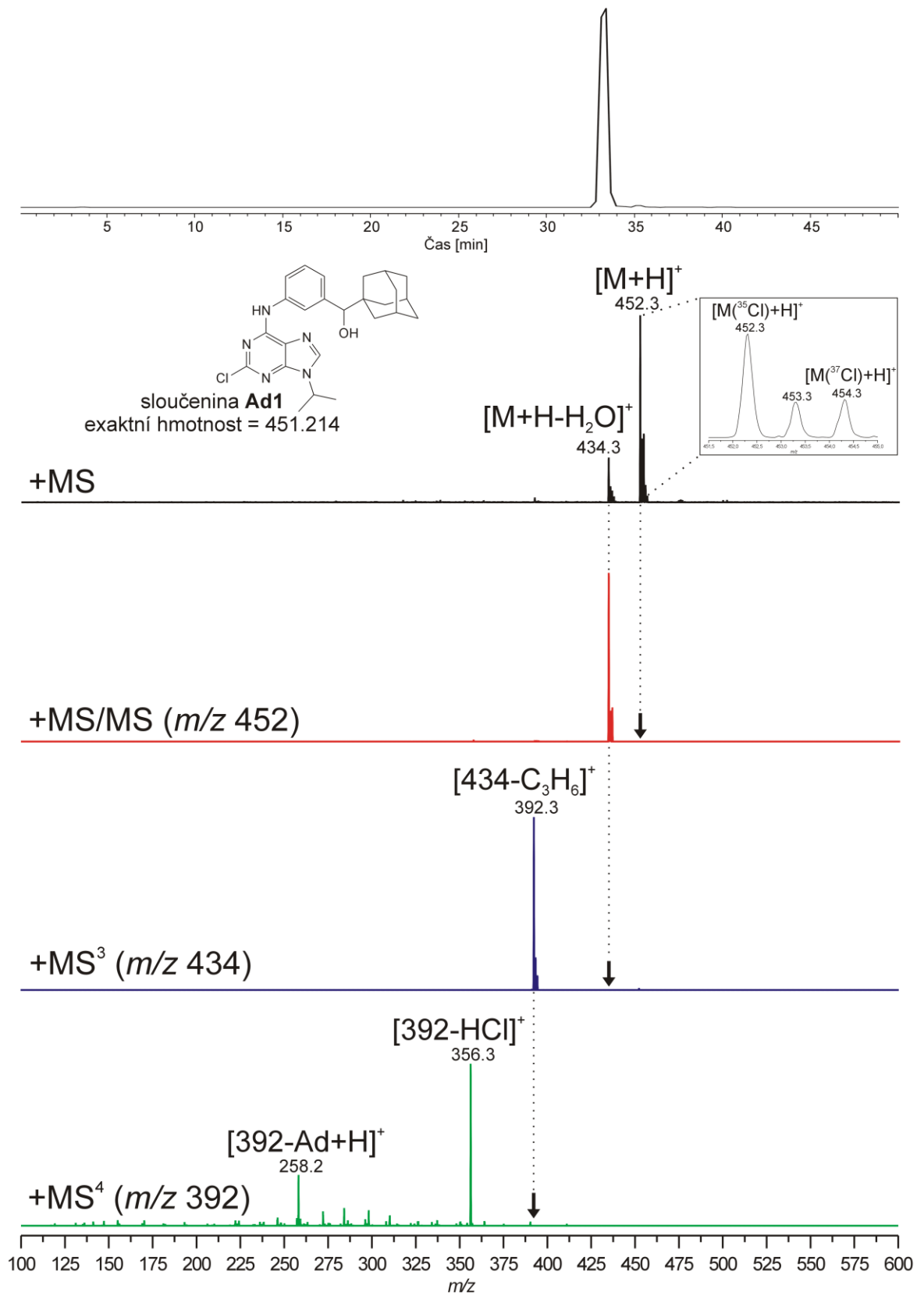
Na **Obrázku 19** je nejprve uveden chromatogram z hmotnostního spektrometru, dále spektrum prvního řádu sloučeniny **4** měřené v pozitivní polaritě, které je následované spektry tandemovými (MS/MS, MS³ a MS⁴). Ve spektru prvního řádu sloučeniny **4** byl jako dominantní pozorován signál o m/z 302, který odpovídá protonované formě molekulového iontu $[\text{M}+\text{H}]^+$. Fragmentací iontu $[\text{M}+\text{H}]^+$ byl jako jediný produktový iont pozorován signál o m/z 260, který byl rovněž v nízké intenzitě nalezen ve spektru prvního řádu, a o němž lze s určitostí prohlásit, že se jedná o fragment vznikající v průběhu ionizačního procesu, a to neutrální ztrátou C₃H₆. Při následné fragmentaci (MS³) iontu 260 m/z byly pozorovány dvě fragmentační cesty. V jedné z nich docházelo k odštěpení HCl za vzniku signálu 224 m/z a ve druhé k odtržení C₆H₆ za vzniku iontu 182 m/z . V posledním spektru uvedeném na **Obrázku 19** je znázorněna fragmentace právě tohoto signálu (182 m/z), při níž dochází k neutrální ztrátě HCl.



Obrázek 19: Výsledky LC-MS/MS analýzy sloučeniny 4.

Následně bylo přistoupeno k analýze sloučeniny **Ad1** (Obrázek 20). Stejně jako v předchozím případě je nejprve znázorněn chromatogram získaný z hmotnostního

spektrometru. Ten je opět následován jednotlivými hmotnostními spektry, tedy spektrem prvního řádu a spektry tandemovými. Ve spektru prvního řádu sloučeniny **Ad1** byly pozorovány celkem dva signály, přičemž hodnota m/z dominantního signálu (452) odpovídala protonované formě molekulového iontu $[M+H]^+$ analyzované sloučeniny. Navíc z izotopického klastru tohoto iontu bylo jednoznačně patrné, že se jedná o sloučeninu obsahující jeden atom chloru. Součástí spektra prvního řádu znázorněného na **Obrázku 20** je právě detail signálu o m/z , z něhož je zřejmé, že poměr signálů 452 a 454 m/z je přibližně 3:1, což je pro sloučeniny obsahující jeden atom chloru v molekule typické. Tyto signály tak byly přiřazeny izotopům ^{35}Cl a ^{37}Cl . Při fragmentaci iontu $[M+H]^+$ byl jako jediný pozorován iont o m/z 434, který vznikl odtržením molekuly vody z fragmentovaného iontu. Tento signál byl pozorován rovněž ve spektru prvního řádu, což znamená, že k jeho vzniku dochází také již v průběhu ionizačního procesu. Následnou fragmentací iontu 434 m/z (MS^3) došlo k neutrální ztrátě C_3H_6 z molekuly a tvorbě iontu 392 m/z . Při fragmentaci tohoto signálu pak byl pozorován vznik dvou produktových iontů, a sice 356 a 258 m/z , které vznikají neutrální ztrátou HCl , resp. 1-adamantylu z fragmentovaného signálu.



Obrázek 20: Výsledky LC-MS/MS analýzy sloučeniny **Ad1**.

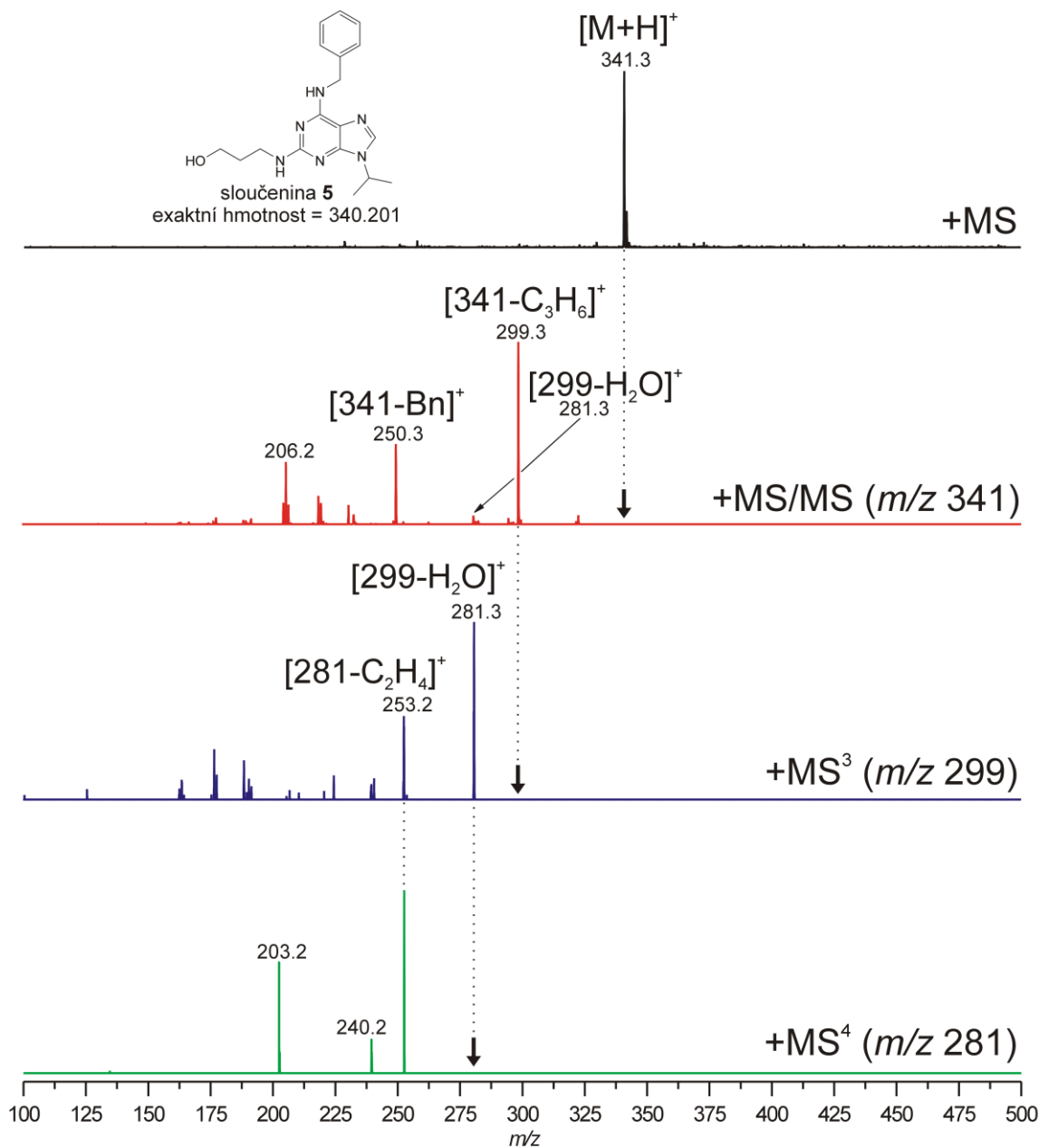
12.2 LC-MS/MS analýzy sloučenin 5 a Ad2

Při LC-MS/MS analýzách sloučenin **5** a **Ad2** byly pro kapalinovou chromatografii zvoleny následující podmínky: průtok byl nastaven na $0,2 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, doba jednotlivých analýz činila 7 min a vzorky měly koncentraci $10 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. I když se při optimalizaci ukázalo být nejvýhodnější v případě sloučeniny **5** složení mobilní fáze A:B v poměru 1:1 a v případě sloučeniny **Ad2** mobilní fáze sestávající jen z fáze A, byla pro analýzu LC-MS/MS těchto sloučenin použita mobilní fáze skládající se z fáze B. Použití mobilní fáze složené pouze z deionizované vody nebo z takové, která je složená z deionizované vody z 50 %, se totiž ukázalo být nevhodné pro detekci hmotnostním spektrometrem.

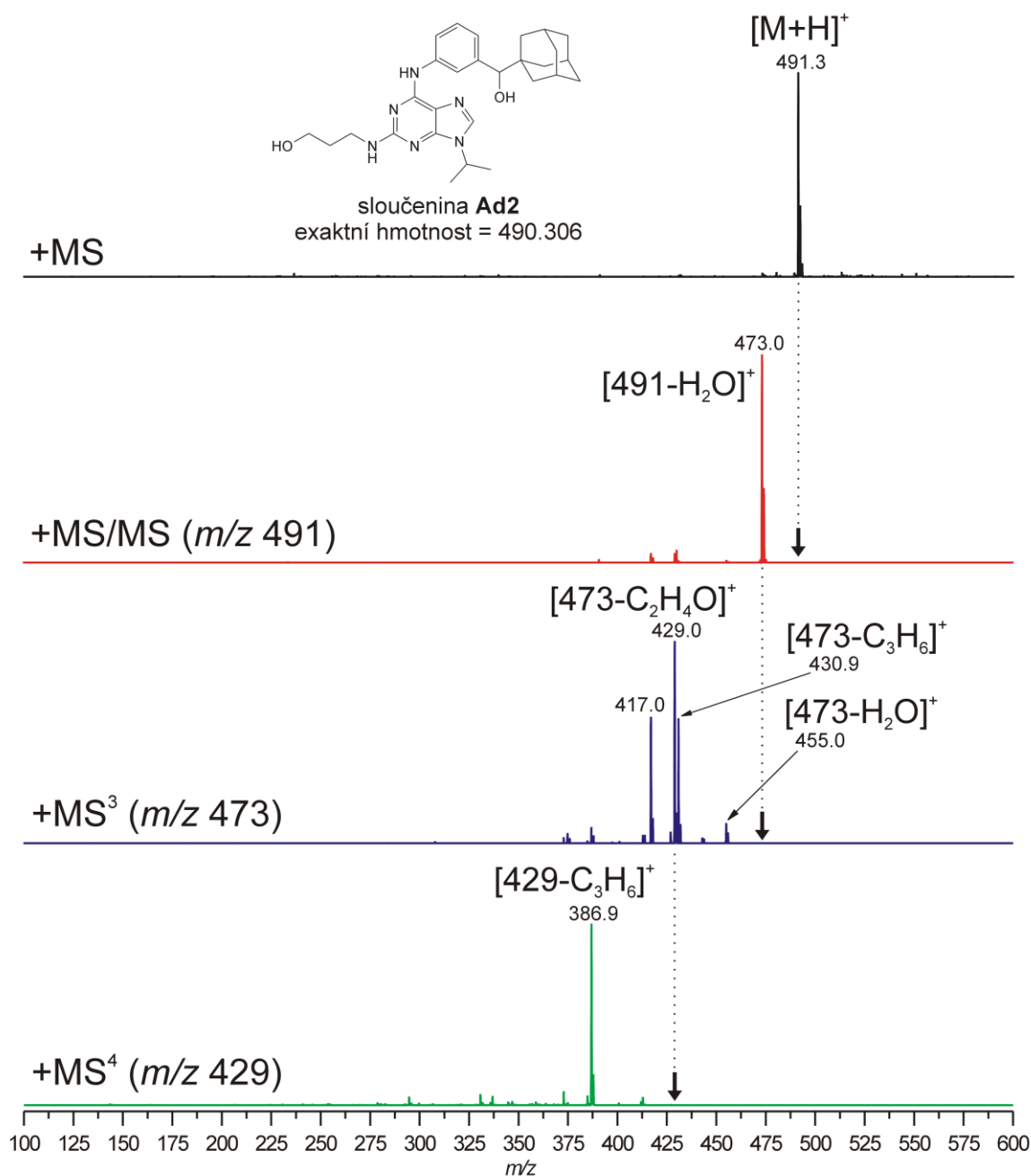
Na **Obrázku 21** jsou uvedena hmotnostní spektra získaná analýzou LC-MS/MS sloučeniny **5**. Ve spektru prvního řádu byl pozorován jediný signál, jehož hodnota m/z odpovídá protonované formě molekulového iontu $[\text{M}+\text{H}]^+$. V tandemovém spektru tohoto signálu byly pozorovány dvě základní fragmentační cesty, kdy v jedné z nich dochází k neutrální ztrátě C_3H_6 za vzniku produktového iontu $299 \text{ } m/z$, zatímco ve druhé je z výchozího signálu odtržen benzylní zbytek ($91 \text{ } m/z$) za vzniku iontu o m/z 250. Další fragmentací signálu o m/z 299 došlo nejprve, v důsledku neutrální ztráty molekuly vody k tvorbě signálu o m/z 281, z něhož vznikl následným odtržením ethenu produktový iont o m/z 253. Takto navržená fragmentační cesta byla následně potvrzena provedením MS^4 iontu $281 \text{ } m/z$, z něhož jako dominantní vzniká právě iont o m/z 253.

Jako poslední byla analýze LC-MS/MS podrobena sloučenina **Ad2** (**Obrázek 22**), kterou lze, ve srovnání s ostatními analyzovanými látkami v rámci této práce, označit za nejvýznamnější, a to zejména ve vztahu k jejím v nedávné minulosti zjištěným biologickým účinkům. Ve spektru prvního řádu byl jako jediný signál pozorován pseudomolekulární iont $[\text{M}+\text{H}]^+$ o m/z 491. Fragmentací tohoto signálu (MS/MS) byl získán signál menší o $18 \text{ } m/z$, což znamená, že z původního iontu byla odštěpena molekula vody za vzniku signálu $473 \text{ } m/z$. Za zmínku stojí, že signál $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$ nebyl v případě sloučeniny **Ad2**, na rozdíl od látky **Ad1** (viz **Obrázek 20**), pozorován ve spektru prvního řádu. Následně byly provedeny fragmentace do dalších stupňů, tedy MS^3 a MS^4 , jejichž výsledky jsou rovněž uvedeny na **Obrázku 22**. Nicméně protože bylo našim zájmem prostudovat fragmentaci této sloučeniny co možná nejdetailněji, což je pomocí LC-MS/MS poněkud obtížné (záleží na nastavení parametrů fragmentace), byla

provedena klasická ESI-MS analýza této látky, z jejíchž výsledků byla poté navržena detailní fragmentace sloučeniny **Ad2** (Obrázek 23).



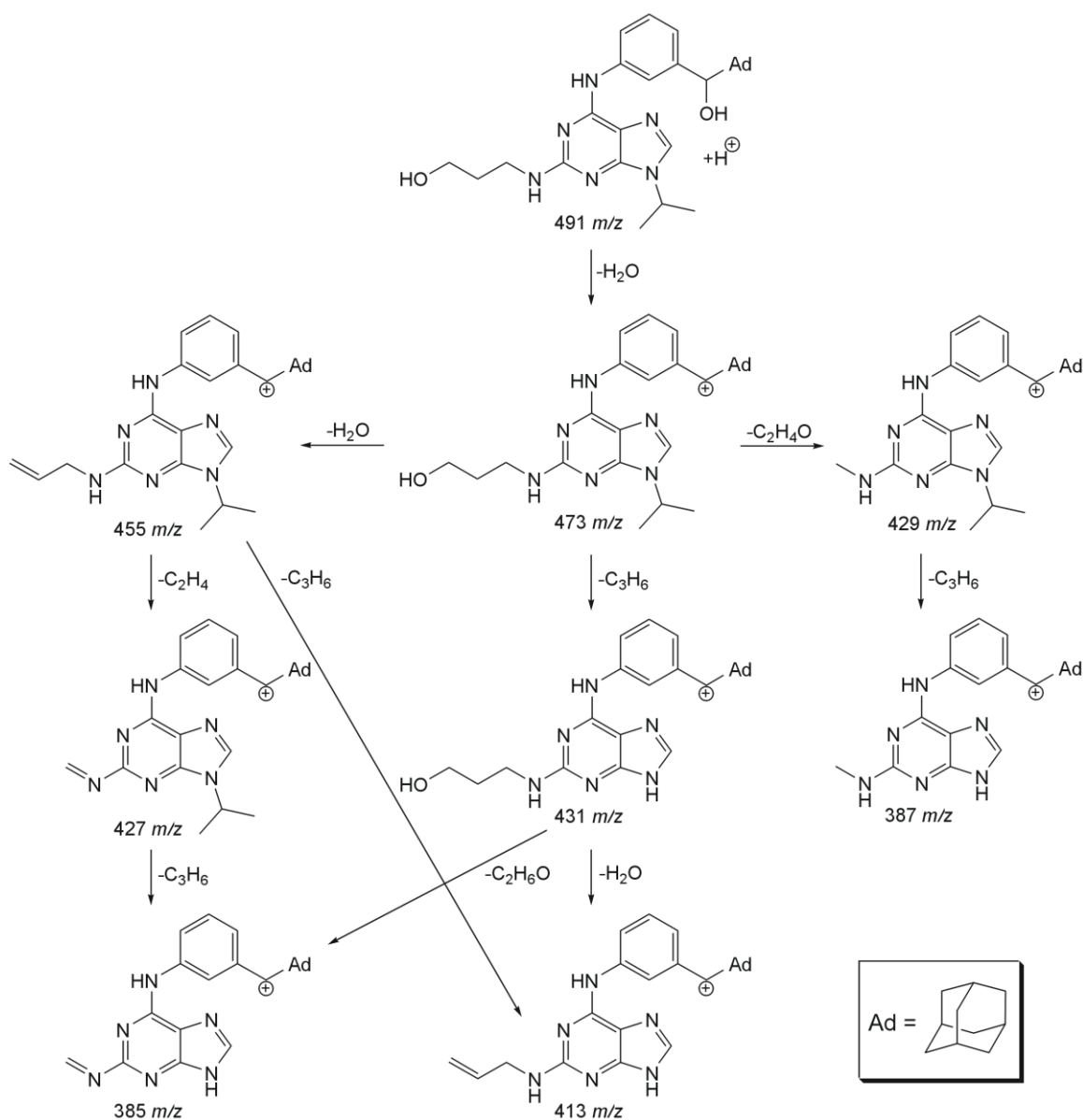
Obrázek 21: Výsledky LC-MS/MS analýzy sloučeniny 5.



Obrázek 22: Výsledky LC-MS/MS analýzy sloučeniny Ad2.

Jak je zmíněno výše fragmentací (MS/MS) signálu 491 m/z došlo k neutrální ztrátě molekuly vody za vzniku iontu o m/z 473. Jeho následnou fragmentací (MS³) byly získány celkem tři produktové ionty, a sice 455, 431 a 429 m/z , vzniklé neutrálními ztrátami molekuly vody (455 m/z), C₃H₆ (431 m/z) a C₂H₄O (429 m/z). Zatímco další fragmentace (MS⁴) signálu 429 m/z poskytovala pouze jeden produktový iont, a to 387 m/z vznikající odtržením C₃H₆ z původní molekuly, pak MS⁴ zbylých dvou signálů, tedy 455 a 431 m/z byla poněkud komplikovanější. Při fragmentaci signálu 431 m/z byl

pozorován vznik dvou různých iontů, a sice $413\ m/z$ $[431-H_2O]^+$ a $385\ m/z$ $[431-C_2H_6O]^+$. K tvorbě obou zmiňovaných signálů docházelo rovněž při fragmentaci (MS^4) iontu o m/z 455, nicméně odlišným způsobem. Signál $413\ m/z$ v tomto případě vznikl v důsledku neutrální ztráty C_3H_6 z původní molekuly. V další fragmentační cestě signálu $455\ m/z$ docházelo ke ztrátě ethenu za vzniku signálu o m/z 427, z něhož se, v důsledku neutrální ztráty C_3H_6 , tvoří iont o m/z 385. Kompletní návrh fragmentace sloučeniny **Ad2** je graficky znázorněn na **Obrázku 23**.



Obrázek 23: Návrh fragmentace sloučeniny **Ad2**.

ZÁVĚR

V rámci této práce byl připraven 3-[[6-(benzylamino)-9-isopropyl-9*H*-purin-2-yl]amino]propan-1-ol (**5**) známý také pod triviálním označením bohemín. Bohemín byl připraven dvěma různými cestami, přičemž druhá cesta (cesta B), která zahrnovala v prvním kroku nukleofilní aromatickou substituci do polohy 6 a ve druhém alkykaci výchozího 2,6-dichlor-9*H*-purinu, vedla k vyššímu celkovému výtěžku než cesta A. Bohemín byl vybrán především z důvodů blízké strukturní příbuznosti s 2,6,9-trisubstituovanými puriny obsahujícími adamantanový skelet, které byly dříve připraveny na Ústavu chemie FT UTB ve Zlíně. Ty představují klíčové sloučeniny, jež byly v rámci této práce dále studovány metodami HPLC-UV/Vis a LC-MS/MS

Při HPLC-UV/Vis analýze všech analyzovaných sloučenin byly použity vzorky o koncentraci $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Pro sloučeniny **4** a **5** použita gradientová eluce (viz. **Tabulka 4** a **Obrázek 8**), průtok mobilní fáze nastaven na $0,2 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ a doba analýzy činila 60 min. Při analýze sloučeniny **4** dosahoval pík nejvyšší intenzity 980,2 mAU při zvolené vlnové délce 270 nm v retenčním čase 26,19 min. Sloučenina **Ad1** dosahovala nejvyšší intenzity píku 753,7 mAU při zvolené vlnové délce 295 nm v retenčním čase 32,78 min. Pro analýzu sloučeniny **5** se ukázala být nejvhodnější mobilní fáze o složení A:B v poměru 1:1. Při užití tohoto eluentu dosahoval pík nejvyšší intenzity 980,2 mAU při vlnové délce 270 nm v retenčním čase 26,19 min. V retenčním čase 0,66 min dosahoval pík sloučeniny **Ad2** nejvyšší intenzity 2298 mAU při zvolené vlnové délce 215 nm za použití mobilní fáze složené z fáze A, která se ukázala být jako nejvhodnější volbou.

Při LC-MS/MS analýzách sloučenin **4** a **Ad1** byly pro kapalinovou chromatografii zvoleny naprosto stejné podmínky jako v případě analýz těchto látek metodou HPLC-UV/Vis (viz kapitola 9.4). Byly použity vzorky o koncentraci $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Hodnoty retenčních časů obou sloučenin získané metodou LC-MS/MS se, v porovnání s retenčními časy daných látek získaných pomocí HPLC-UV/Vis, zvýšily. Při LC-MS/MS analýzách sloučenin **5** a **Ad2** byly pro kapalinovou chromatografii zvoleny následující podmínky: průtok mobilní fáze, která tvořila jen fáze B, byl nastaven na $0,2 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, doba jednotlivých analýz činila 7 min, vzorky měly koncentraci $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Závěrem lze konstatovat, že se podařilo nalézt podmínky pro rychlou a efektivní analýzu 2,6,9-trisubstituovaných purinů obsahujících adamantanový skelet metodou LC-MS. Tyto podmínky tak mohou být v budoucnu využívány nejen pro analýzu reakčních

směsí a určení čistoty připravených látek, ale mohou také sloužit pro studium metabolizace vybraných 2,6,9-trisubstituovaných purinů s adamantanovým skeletem vykazujících zajímavé biologické účinky.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- 1 Arrelano, M.; Moreno, S.: Regulation of CDK/cyclin Complexes During the Cell Cycle. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 1997, **29**(4), s. 559–573.
- 2 Scheaf, R. J.; Roberts, J. M.: Regulation of G1 Phase. In: PAGANO, M. *Cell cycle control: Results and Problems in Cell Differentiation*. Berlin: Springer, 1998, s. 1-27.
- 3 Garrett, M. D.: Cell cycle control and cancer. *Curr. Sci.* 2001, **81**, s. 515-522.
- 4 Schafer, K. A.: The cell cycle: a review. *Vet. Pathol.* 1998, **35**, 461-478.
- 5 Knockaert, M.; Greengard, P.; Meijer, L.: Pharmacological inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Trends Pharmacol. Sci.* 2002, **23**(9), s. 417-425.
- 6 Fabbro, D.; Ruetz, S.; Buchdunger, E.; Cowan-Jacob, S. W.; Fendrich, G.; Liebetanz, J.; Mestan, J.; O'reilly, J.; Traxler, P.; Chaudhuri, B.; Fretz, H.; Zimmermann, J.; Meyer, T.; Caravatti, G.; Furet, P.; Manley, P. W.: Protein kinases as targets for anticancer agents: from inhibitors to useful drugs. *Pharmacol. Ther.* 2002, **93**, s. 79-98.
- 7 Grant, S. K.: Therapeutic Protein Kinase Inhibitors. *Cell. Mol. Life Sci.* 2009, **66**, s. 1163-1177.
- 8 Yap, T. A.; Molife, L.R.; Blagden, S.P.; Bono, J.S.: Targeting cell cycle kinases and kinesins in anticancer drug development. *Exp Opin Drug Discov.* 2007, **2**, s. 539-560.
- 10 Meijer, L.; Bettayeb, K.; Galons, H.: Roscovitine (Cyc202, Seliciclib). In: Yue, E., Smith, P. J.: *Inhibitors of Cyclin – dependent Kinases as Anti-tumor agents*. USA: Taylor & Francis, 2006, s. 187-226.
- 11 Meijer, L.; Borgne, A.; Mulner, O.; Chong, J. P. J.; Blow, J. J.; Inagaki, N.; Inagaki, M.; Delcros, J. G.; Moulinoux, J. P.: Biochemical and cellular effects of roscovitine, a potent and selective inhibitor of the cyclin-dependent kinases cdc2, cdk2 and cdk5. *Eur. J. Biochem.* 1997, **243**, s. 527-536.
- 12 Shapiro, G. I.: Cyclin-Dependent Kinase Pathways As Targets for Cancer Treatment. *J. Clin. Oncol.* 2006, **24**(11), s. 1770-1783.
- 13 Kryštof, V.; Strnad, M.: Inhibitory cyklin-dependentních kinas. *Chem. Listy.* 2001, **95**, s. 295-300.
- 14 McInnes, C.: Progress in the evaluation of CDK inhibitors as anti-tumor agents. *Drug. Discov. Today.* 2008, **13**(20), s. 875-881.
- 15 Manish, A. S.; Schwartz, G. K.: Cyclin dependent kinases as targets for cancer therapy. *Update Cancer Ther.* 2006, s. 311-332.
- 16 Meijer, L.; Raymond, E.: Roscovitine and other purines as kinase inhibitors. From starfish oocytes to clinical trials. *Accounts Chem. Res.* 2003, **36**, s. 417-423.
- 17 Johnson, L. N.; De Moliner, E.; Brown, N. R.; Song, H.; Barford, D.; Endicott, J. A.; Noble, M. E. M.: Structural studies with inhibitors of the cell cycle regulatory kinase cyclin-dependent protein kinase 2. *Pharmacol. Ther.* 2002, **93**, s. 113-124.
- 18 Taylor, E. C.; Osdene, T. S.; Richter, E.; Vogl, O.: Some synthetic studies on purines and related heterocycles. In: Ciba Foundation Symposium. *Chemistry and Biology of Purines*. London: J. & A. Churchill Ltd. 1957, s. 20-33.
- 19 Rastogi, S. C.: *Biochemistry*. 3rd edition. India: Tata McGraw-Hill. 2010, s. 455-462.
- 20 Rodwell, V. W.: Metabolism of Purine and Pyrimidine Nucleotides. *Biochem. Med.* 2003, s. 293-302.
- 21 Rosemeyer, H.: The Chemodiversity of Purine as a Constituent of Natural Products. *Chem. Biodivers.* 2004, **1**, s. 361-401.
- 22 Matthews, H. R.; Freedland, R.; Miesfeld, R. L.: *Biochemistry: A Short Course*. 1st edition. USA: Wiley-Liss. 1997, s. 271-289.

- 23 Joule, J. A.; Mills, K.: *Heterocyclic Chemistry*. 5th edition. UK: Wiley. 2010, s. 515-536.
- 24 Rodwell, V. W.: Structure, Function, & Replication of Informational Macromolecules. *Biochem. Med.* 2003, s. 293-302.
- 25 Legraverend, M.; Grierson, D. S.: The purines: Potent and versatile small molecule inhibitors and modulators of key biological targets. *Bioorg. Med Chem.* 2006, **14**, s. 3987-4006.
- 26 Joule, J. A.; Mills K.: *Heterocyclic Chemistry*. 4th edition. USA: Blackwell Publishing. 2000, s. 461-488.
- 27 De Azevedo W. F., Leclerc S., Meijer L., Havlíček L.; Strnad M.; Kim S. H.: Inhibition of cyclin-dependent kinases by purine analogues. *Eur. J. Biochem.* 1997, **243**, s. 518-526.
- 28 Veselý J.; Havlíček L.; Strnad M.; Blow J. J.; Donella-Deana A.; Pinna L.; Letham D. S.; Kato J.; Detivaud L.; Leclerc S.; Meijer L.: Inhibition of cyclin-dependent kinases by purine analogues. *Eur. J. Biochem.* 1994, **224**, s. 771-786.
- 29 Strnad, M.: *Růstově-regulační látky na bázi N6-substituovaných derivátů adeninu*. Olomouc. 2004. Dizertační práce. Ústav experimentální botaniky AVČR & UP Olomouc.
- 30 Libuše Stýskalová, L.; Cwiertka, K.; Nosková, V.; Janošťáková, A.; Radova, L.; Mihál, V.; Hajdúch, M.: Cytotoxická aktivita boheminu in vitro na primárních nádorových buňkách. *Klin Farmakol Farm.* 2006, **20**, s. 197–201.
- 31 Trávníček, Z.; Kryštof, V.; Šipl, M.: Zinc(III) complexes with potent cyclin-dependent kinase inhibitors derived from 6-benzylaminopurine: Synthesis, characterization, X-ray structures and biological activity. *J. Inorg. Chem.* 2006, **100**, s. 214-225.
- 32 Idowu, M. A.: Cyclin-dependent kinases as drug targets for cell growth and proliferation disorders. a role for systems biology approach in drug development. part i – cyclin-dependent kinases as drug targets in cancer. *Biotechnol. Biotechnol. Eq.* 2011, **25**(4), s. 2583-2586.
- 33 Nutley, B. P.; Raynaud, F. I.; Wilson, S. C.; Fischer, P. M.; Hayes, A.; Goddard, P. M.; McClue, S. J.; Jarman, M.; Lane, D. P.; Workman, P.: Metabolism and pharmacokinetics of the cyclin-dependent kinase inhibitor R-roscovitine in the mouse. *Mol. Cancer Ther.* 2005, **4**(1), s. 125-139.
- 34 Mackowiak, M., Kolasiewicz, W.; Markowicz-Kula, K.; Wędzony, K.: Purvalanol A, inhibitor of cyclin-dependent kinases attenuates proliferation of cells in the dentate gyrus of the adult rat hippocampus. *Pharmacol. Rep.* 2005, **57**, s. 845-849.
- 35 Kryštof, V.: *Inhibitory cyklin-dependentních kinas: Nová generace léčiv?* Olomouc. 2008. Habilitační práce. UP Olomouc.
- 36 Rouchal, M.: *Cílená modifikace biologicky aktivních látek*. Zlín. 2011. Dizertační práce. UTB ve Zlíně, Fakulta technologická.
- 37 Kryštof, V.; Lenobel, R.; Havlíček, L.; Kuzmac, M; Strnad, M.: Synthesis and Biological Activity of Olomoucine II. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2002, **12**, s. 3283–3286.
- 38 Kryštof, V.; McNaeb, I. W.; Walkinshaw, M. D.; Fischer, P. M.; Müller, P.; Vojtěšek, B.; Orság, M.; Havlíček, L.; Strnad, M.: Antiproliferative activity of olomoucine II, a novel 2,6,9-trisubstituted purine cyclin-dependent kinase inhibitor. *Cell. Mol. Life Sci.* 2005, **62**, s. 1763–1771.
- 39 Pacáková, V.: Kapalinová chromatografie. In: Štulík, K. a kol. *Analytické separační metody*. Praha: Karolinum. 2004, s. 136-171.
- 40 Sobotníková, J.; Bosáková, Z.; Čabala, R.; Coufal, P.; Pacáková, V.; Štulík, K.: Historie, současnost a perspektivy analytických separačních metod na Katedře

- analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze. *Chem. Listy*. 2010, **104**, s. 1226-1231.
- ⁴¹ Karlíček, R.: *Analytická chemie pro farmaceuty*, Praha: Karolinum, 2001, s. 145-178.
- ⁴² Harvey, D.: *Modern analytical chemistry*. USA: The McGraw-Hill Companies. 2000, s. 578-589.
- ⁴³ Weston, A.; Brown, P. R.: *Hplc a Ce: Principles and practice*. USA: W. B. Saunders Company. 1997, s. 28-35.
- ⁴⁴ Klouda P.: *Moderní analytické metody*. Ostrava: Pavel Klouda. 2003, s. 25-33.
- ⁴⁵ Snyder, L. R.; Kirkland, J. J.; Dolan, J. W.: *Introduction to modern liquid chromatography*. Canada: Wiley. 2010.
- ⁴⁶ Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. Jcu.cz [online]. [Cit.2012-04-26]. Dostupné z: http://users.prf.jcu.cz/sima/analyticka_chemie/vybranemet.htm.
- ⁴⁷ Jelínek, I.: Hmotnostní spektrometrie a její spojení s kolonovými separacemi. In: Štulík, K. a kol. *Analytické separační metody*. Praha: Karolinum. 2004, s. 210-245.
- ⁴⁸ Kogej, M.; Schalley, C. A.: Mass spectrometry and Gas Phase Chemistry of Supramolecules. In: Schalley, C. A. *Analytical Methods in Supramolecular Chemistry*. Germany: Wiley. 2007, s. 104-162.
- ⁴⁹ Legraverend, M.: Recent advances in the synthesis of purine derivatives and their precursors. *Tetrahedron*. 2008, **64**, s. 8585-8603.
- ⁵⁰ Mozingo, R.; Wolf, D. E.; Harris, D. A.; Folkers, K.: *J. Am. Chem. Soc.* 1943, **65**, s. 1013-1016.
- ⁵¹ Oumata, N.; Ferandin, Y.; Meijer, L.; Galons, H.: Practical synthesis of roscovitine and CR8. *Org. Process Res. Dev.* 2009, **13**, s. 641-644.
- ⁵² Fletcher, S.; Shahani, V. M.; Gunning, P. T.: Facile and Efficient Access to 2,6,9-Trisubstituted Purines through Sequential N9, N2 Mitsunobu Reactions. *Tetrahedron Lett.* 2009, **50**, s. 4258-4261.
- ⁵³ Merci. [Merci.cz](http://eshop.merci.cz/detail47006/chromatografy/rslc-nano-systemy-prislusenstvi-pro-ultimate-3000) [online]. [Cit.2012-05-7]. Dostupné z: <http://eshop.merci.cz/detail47006/chromatografy/rslc-nano-systemy-prislusenstvi-pro-ultimate-3000>

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

Ad	1-adamantyl
APCI	ionizace za atmosférického tlaku (z angl. atmospheric pressure chemical ionization)
APLI	laserová ionizace za atmosférického tlaku (z angl. atmospheric pressure laser ionization)
APPI	fotoionizace za atmosférického tlaku (z angl. atmospheric pressure photoionization)
ATP	adenosintrifosfát
cAMP	cyklický adenosin monofosfát
CDK	cyklin-dependentní kinasa
CI	chemická ionizace (z angl. chemical ionization)
CID	kolizí vyvolané disociace (z angl. collision-induced dissociation)
CIP/KIP	přirozený inhibitor CDKs
CKI	přirozené inhibitory cyklin-dependentních kinas
DDI	dideoxyinosin
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EA	elementární analýza
EI	ionizace elektrony (z angl. electron impact)
EI-MS	hmotnostní spektrometrie s elektronovou ionizací
ESI	elektrosprej (z angl. electrospray ionization)
ESI-MS	hmotnostní spektrometrie s elektrosprejovou ionizací
FAD ⁺	flavinadenin dinukleotid
GC-MS	plynová chromatografie s hmotnostní detekcí
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HPLC-UV/Vis	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s UV/Vis detekcí
ICC	maximální počet iontů v pasti
IC50	koncentrace látky inhibující 50 % aktivity purifikovaného enzymu
INK4	přirozený inhibitor CDK4
IR	infračervená spektroskopie
IT	iontová past (z angl. ion trap)
LC	kapalinová chromatografie
LC-MS	kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí
MALDI	ionizace laserem za účasti matrice (z angl. matrix-assisted laser

	desorption/ionization)
MS	hmotnostní spektrometrie
m/z	podíl hmotnosti a náboje
NAD ⁺	nikotinamid adenin dinukleotid
NADP ⁺	nikotinamid adenin dinukleotid fosfát
NMR	nukleární magnetická resonance
pRb	protein retinoblastomu
Q	kvadrupólový analyzátor (z angl. quadrupole)
RNA	ribonukleová kyselina
RP	reverzní chromatografie
SNAr	nukleofilní aromatická substituce
TOF	průletový analyzátor (z angl. time of flight)
tt	teplota tání
TLC	chromatografie na tenké vrstvě
UV/Vis	ultrafialová a viditelná oblast spektra

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha I: Dionex UltiMate 3000 (HPLC)

Příloha II: LC-MS

PŘÍLOHA I: DIONEX ULTIMATE 3000 (HPLC)

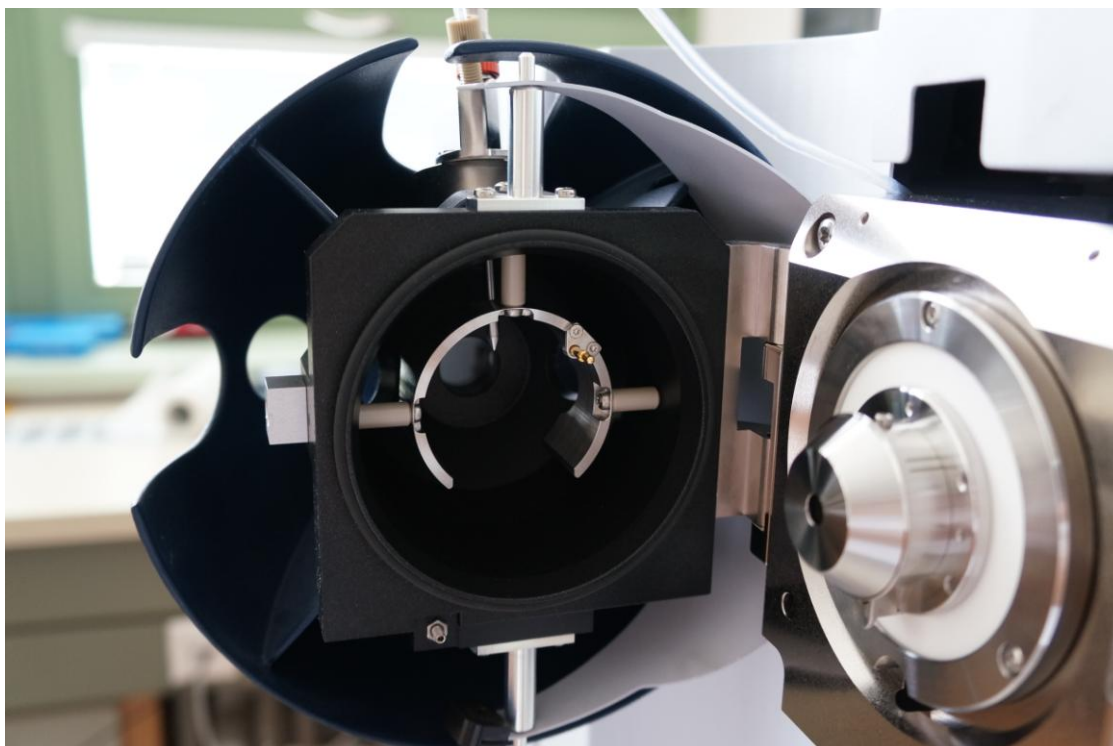


Vysokoučinný kapalinový chromatograf (HPLC) Dionex UltiMate 3000⁵². Popis zařízení:
1 – zásobníky mobilní fáze; 2 – organizér; 3 – vakuový odplyňovač a čerpadlo; 4 – automatický dávkovač vzorků; 5 – kolonový temostat a kolona; 6 – detektor.

PŘÍLOHA II: LC-MS



Vysokoučinný kapalinový chromatograf UltiMate 3000 (Dionex) spojený s hmotnostním spektrometrem s iontovou pastí amaZon X (Bruker Daltonics) vybaveným elektrosprejovým ionizačním zdrojem.



Detail ionizačního zdroje hmotnostního spektrometru amaZon X.