

UNIVERZITA KARLOVA  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra analytické chemie



Disertační práce

**Studium distribuce substituentů v derivátech  
na bázi hyaluronanu**

**Ing. Jakub Sedláček**

Školitel: doc. RNDr. Dalibor Šatínský, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Martina Hermannová, Ph.D.

Hradec Králové 2020

*Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracoval samostatně pod vedením svého školitele a konzultantky. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.*

V Hradci Králové dne

.....

Ing. Jakub Sedláček

## **PODĚKOVÁNÍ**

Děkuji svému školiteli, doc. RNDr. Daliboru Šatínskému, Ph.D., za cenné rady a trpělivost při vypracování disertační práce. Dále děkuji Mgr. Martině Hermannové, Ph.D., za odborné vedení práce a všestrannou pomoc, Mgr. Jiřímu Mrázkovi za vytvoření modelu náhodné distribuce, Mgr. Petře Liškové za poskytnutí standardů oligosacharidů hyaluronanu, Mgr. Pavlíně Halamkové a doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, CSc., za změření  $^1\text{H}$  NMR spekter, Lence Hejlové za stanovení molárních hmotností pomocí SEC-MALLS a ostatním zaměstnancům firmy Contipro a.s. za vytvoření přátelského prostředí a plodné diskuze. V neposlední řadě děkuji své rodině za vytrvalou podporu a své manželce za profesionální jazykovou korekturu.

Práce vznikla za finanční podpory Specifického vysokoškolského výzkumu SVV 260 412 a SVV 260 548.

## OBSAH

Seznam zkratk .....	6
Abstrakt.....	9
Abstract.....	10
Cíle a zadání práce.....	11
1 Úvod.....	12
2 Teoretická část.....	13
2.1 Hyaluronan .....	13
2.2 Deriváty hyaluronanu.....	15
2.3 Deacetylacetylovaný hyaluronan .....	17
2.3.1 Příprava deacetylovaného hyaluronanu.....	18
2.3.2 Stanovení stupně deacetylce .....	20
2.3.3 Stanovení distribuce substituentů podél řetězce.....	20
2.4 Štěpení deacetylovaného hyaluronanu na oligosacharidy.....	21
2.4.1 Deaminační štěpení .....	21
2.4.2 Enzymatické štěpení .....	22
2.5 Analýza oligosacharidů hyaluronanu pomocí kapalinové chromatografie.....	25
2.5.1 Iontově výměnná chromatografie .....	25
2.5.2 Hydrofilní interakční chromatografie .....	26
2.5.3 Kapalinová chromatografie na reverzní fázi .....	26
2.5.4 Derivatizace činidlem PMP .....	29
3 Experimentální část .....	31
3.1 Chemikálie a přístroje .....	31
3.2 Příprava deacetylovaného hyaluronanu .....	31
3.3 Stanovení molárních hmotností pomocí SEC-MALLS .....	33
3.4 Stanovení stupně deacetylce pomocí <sup>1</sup> H NMR spektroskopie.....	33
3.4.1 Metoda NMR,1a .....	33
3.4.2 Metoda NMR,1b.....	34
3.4.3 Metoda NMR,2.....	34
3.5 Deaminační štěpení deacetylovaného hyaluronanu.....	35
3.5.1 Vývoj metody.....	35
3.5.2 Finální metoda .....	42
3.6 Enzymatické štěpení hyaluronanu.....	45
3.7 Enzymatické štěpení deacetylovaného hyaluronanu.....	45

3.7.1	Vývoj metody.....	45
3.7.2	Finální metoda.....	46
4	Výsledky a diskuze .....	48
4.1	Deacetylace hyaluronanu.....	48
4.2	Stanovení distribuce aminoskupin pomocí deaminačního štěpení.....	52
4.2.1	Vývoj metody.....	52
4.2.2	Stupeň deacetylace .....	57
4.2.3	Distribuce aminoskupin.....	58
4.3	Stanovení distribuce aminoskupin pomocí enzymatického štěpení .....	61
4.3.1	Vývoj metody.....	61
4.3.2	Stupeň deacetylace .....	65
4.3.3	Distribuce aminoskupin.....	65
5	Závěr.....	67
6	Dodatky.....	68
7	Literatura .....	76
8	Publikační činnost .....	85

## SEZNAM ZKRATEK

### *Monosacharidy*

aMan	2,5-anhydro-D-mannosa
aMan <sub>PMP</sub>	1-deoxy-1,1-bis(1-fenyl-3-methyl-5-oxo-2-pyrazolin-4-yl)-2,5-anhydro-D-mannosa
GlcA	D-glukuronová kyselina
GlcA <sub>PMP</sub>	1-deoxy-1,1-bis(1-fenyl-3-methyl-5-oxo-2-pyrazolin-4-yl)-D-glukuronová kyselina
GlcN	D-glukosamin
GlcNAc	<i>N</i> -acetyl-D-glukosamin
GlcNAc <sub>PMP</sub>	1-deoxy-1,1-bis(1-fenyl-3-methyl-5-oxo-2-pyrazolin-4-yl)- <i>N</i> -acetyl-D-glukosamin
GlcN <sub>PMP</sub>	1-deoxy-1,1-bis(1-fenyl-3-methyl-5-oxo-2-pyrazolin-4-yl)-D-glukosamin
ΔGlcA	4,5-dehydro-D-glukuronová kyselina

### *Oligosacharidy*

aX	oligosacharidy hyaluronanu s X monosacharidovými jednotkami, které mají na neredukujícím konci GlcA a na redukujícím konci aMan; např. a <sub>4</sub> označuje GlcA–GlcNAc–GlcA–aMan
aX <sub>PMP</sub>	oligosacharidy hyaluronanu s X monosacharidovými jednotkami, které mají na neredukujícím konci GlcA a na redukujícím konci aMan <sub>PMP</sub> ; např. a <sub>4</sub> <sub>PMP</sub> označuje GlcA–GlcNAc–GlcA–aMan <sub>PMP</sub>
X <sub>PMP</sub>	oligosacharidy hyaluronanu s X monosacharidovými jednotkami, které mají na neredukujícím konci GlcA a na redukujícím konci GlcA <sub>PMP</sub> ; např. 3 <sub>PMP</sub> označuje GlcA–GlcNAc–GlcA <sub>PMP</sub>
X <sub>Y</sub> <sup>ZZ</sup>	oligosacharidy hyaluronanu s X monosacharidovými jednotkami, z nichž Y jednotek je GlcN, ZZ určuje monosacharid na neredukujícím a redukujícím konci: N odpovídá GlcNAc nebo GlcN, A odpovídá GlcA, oligosacharidy bez uvedeného ZZ mají ZZ rovno AN; např. 3 <sub>0</sub> <sup>NN</sup> označuje GlcNAc–GlcA–GlcNAc
ΔX <sub>Y</sub> <sup>ZZ</sup> <sub>PMP</sub>	oligosacharidy hyaluronanu s X monosacharidovými jednotkami, z nichž Y jednotek je GlcN, mající na neredukujícím konci ΔGlcA a na redukujícím konci GlcNAc <sub>PMP</sub> (pro Y < X/2) nebo GlcN <sub>PMP</sub> (pro Y = X/2); např. Δ <sub>4</sub> <sub>2</sub> <sup>PMP</sup> označuje ΔGlcA–GlcN–GlcA–GlcN <sub>PMP</sub>
ΔX <sub>Y</sub> <sup>ZZ</sup>	oligosacharidy hyaluronanu s X monosacharidovými jednotkami, z nichž Y jednotek je GlcN, mající na neredukujícím konci ΔGlcA, ZZ určuje monosacharid na neredukujícím a redukujícím konci: N odpovídá GlcNAc nebo GlcN, A odpovídá ΔGlcA nebo GlcA, oligosacharidy bez uvedeného ZZ mají ZZ rovno AN; např. Δ <sub>3</sub> <sub>1</sub> <sup>AA</sup> označuje ΔGlcA–GlcN–GlcA

### *Veličiny*

<i>DD</i>	stupeň deacetylace
<i>DD<sup>#</sup></i>	zdánlivý stupeň deacetylace v enzymatickém modelu náhodné distribuce
<i>i</i>	počet disacharidových jednotek
<i>M<sub>n</sub></i>	početně průměrná molární hmotnost
<i>M<sub>w</sub></i>	hmotnostně průměrná molární hmotnost
<i>M<sub>w</sub>/M<sub>n</sub></i>	disperzita molární hmotnosti
<i>R</i>	relativní zastoupení oligosacharidu
<i>RRF</i>	relativní odezvový faktor
<i>x<sub>n</sub><sup>*</sup></i>	orientační molární zlomek oligosacharidu ve směsi
<i>x<sub>i</sub>, x<sub>n</sub></i>	molární zlomek oligosacharidu ve směsi
<i>ε<sub>i</sub></i>	molární absorpční koeficient

### *Ostatní*

ACN	acetonitril
aq.	vodný roztok
BTH	bovinní testikulární hyaluronidasa
Bu	butyl
daHA	deacetylovaný hyaluronan
ESI	ionizace elektrosprejem
Et	ethyl
HA	hyaluronan
HILIC	hydrofilní interakční chromatografie
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IUPAC	Mezinárodní unie pro čistou a užitou chemii
MALLS	víceúhlový rozptyl světla
Me	methyl
MS	hmotnostní spektrometrie
NMR	nukleární magnetická rezonance
PAD	pulzní ampérometrická detekce
PMP	1-fenyl-3-methyl-2-pyrazolin-5-on
QqTOF	hmotnostní spektrometr kombinující kvadrupól a analyzátor doby letu
RP	reverzní fáze
SEC	rozměrově vylučovací chromatografie
SpHyl	hyaluronidasa ze <i>Streptococcus pneumoniae</i>

THF	tetrahydrofuran
TMSP- $d_4$	sodná sůl 3-(trimethylsilyl)propanové-2,2,3,3- $d_4$ kyseliny
TSH	hyaluronidasa z <i>Talaromyces stipitatus</i>
UHPLC	ultravysokotlaká kapalinová chromatografie
UV	ultrafialové záření



## ABSTRAKT

Instituce:	Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Školící pracoviště:	Katedra analytické chemie; Contipro a. s.
Kandidát:	Ing. Jakub Sedláček
Školitel:	doc. RNDr. Dalibor Šatínský, Ph.D.
Konzultant:	Mgr. Martina Hermannová, Ph.D.
Název dizertační práce:	Studium distribuce substituentů v derivátech na bázi hyaluronanu

Deriváty na bázi hyaluronanu nacházejí uplatnění v řadě medicínských odvětví. Přípravované deriváty bývají charakterizovány molární hmotností a stupněm substituce, nicméně tyto parametry neumožňují odlišit deriváty s rozdílnou distribucí substituentů podél řetězce, které mohou vykazovat rozdílné makroskopické vlastnosti. Z toho důvodu jsou potřebné metody, které dokážou distribuci substituentů postihnout. Předkládaná disertační práce pojednává o stanovení distribuce aminoskupiny v deacetylovaném hyaluronanu. Teoretická část začíná popisem hyaluronanu, jeho struktury a jeho derivátů. Následně se zaměřuje na deacetylovaný hyaluronan, na jeho využití, přípravu a charakterizaci, přičemž hlavní zájem je věnován jeho depolymerizaci na oligosacharidy pomocí deaminačního štěpení nebo pomocí enzymů štěpících hyaluronan. Nakonec jsou uvedeny příklady metod použitých pro analýzu oligosacharidů hyaluronanu pomocí kapalinové chromatografie. Experimentální část popisuje přípravu vzorků deacetylovaného hyaluronanu, stanovení jejich molárních hmotností rozměrově vylučovací chromatografií a stanovení jejich stupně deacetylace pomocí protonové nukleární magnetické rezonanční spektroskopie. Největší pozornost se poté soustředí na vývoj dvou metod pro stanovení distribuce aminoskupin podél řetězce. První je založena na deaminačním štěpení deacetylovaného hyaluronanu kyselinou dusitou a následné derivatizaci vzniklých oligosacharidů 3-methyl-1-fenyl-2-pyrazolin-5-onem. Druhá je založena na enzymatickém štěpení hyaluronidasou ze *Streptococcus pneumoniae* a na stejné derivatizaci. Získané směsi oligosacharidů jsou v obou metodách analyzovány pomocí kapalinové chromatografie na reverzní fázi. Následně jsou experimentální distribuce oligosacharidů porovnány s teoretickými modely náhodné distribuce. Ze srovnání vyplývá, že deacetylaci hyaluronanu neprobíhá zcela náhodně. Konkrétně deacetylaci daného *N*-acetyl-D-glukosaminu snižuje pravděpodobnost, že k deacetylaci dojde v sousední disacharidové jednotce.

## ABSTRACT

Institution:	Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové
Department:	Department of Analytical Chemistry; Contipro a. s.
Candidate:	Ing. Jakub Sedláček
Supervisor:	doc. RNDr. Dalibor Šatínský, Ph.D.
Co-supervisor:	Mgr. Martina Hermannová, Ph.D.
Title of the thesis:	Studying the distribution of substituents in derivatives based on hyaluronan

Derivatives based on hyaluronan have found applications in various areas of medicine. Prepared derivatives are commonly characterized by their molar mass and their degree of substitution, however, such parameters are unable to distinguish among derivatives with different distributions of substituents along the chain, which may exhibit different macroscopic properties. For this reason, methods to determine the distribution of substituents along the chain are needed. The presented thesis deals with the determination of distribution of amino groups in deacetylated hyaluronan. The theoretical part starts with a description of hyaluronan structure and of its derivatives. Next, the application, the preparation, and the characterization of deacetylated hyaluronan are discussed, focusing particularly on its depolymerisation into oligosaccharides using deaminative cleavage or enzymes that degrade hyaluronan. Finally, examples of liquid chromatographic methods used to analyse hyaluronan oligosaccharide are presented. The experimental part describes the preparation of samples of deacetylated hyaluronan, the determination of their molar masses using size-exclusion chromatography, and the determination of their degree of deacetylation using proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. Besides, the main attention is paid to the development of two methods to determine distribution of the amino groups. The first method is based on deaminative cleavage with nitrous acid and subsequent labelling of obtained oligosaccharides with 3-methyl-1-phenyl-2-pyrazoline-5-one. The second method is based on enzymatic cleavage with hyaluronidase from *Streptococcus pneumoniae* and the same subsequent labelling. To analyse the labelled oligosaccharides, reversed phase liquid chromatography is employed in both methods. Subsequently, the experimental oligosaccharide distributions are compared with theoretical random distribution models. The comparison indicate that deacetylation of hyaluronan does not occur completely randomly. Specifically, deacetylation of specific *N*-acetyl-D-glucosamine reduce the probability of deacetylation in the neighbouring disaccharide unit.

## **CÍLE A ZADÁNÍ PRÁCE**

Prvním cílem práce byla rešerše odborné literatury se zaměřením na analýzu distribuce substituentů v derivátech polysacharidů a na analýzu oligosacharidů hyaluronanu a jeho derivátů. Druhým cílem bylo studium distribuce aminoskupin v deacetylovaném hyaluronanu, který byl zvolen jako vhodný zástupce derivátů hyaluronanu.

# 1 ÚVOD

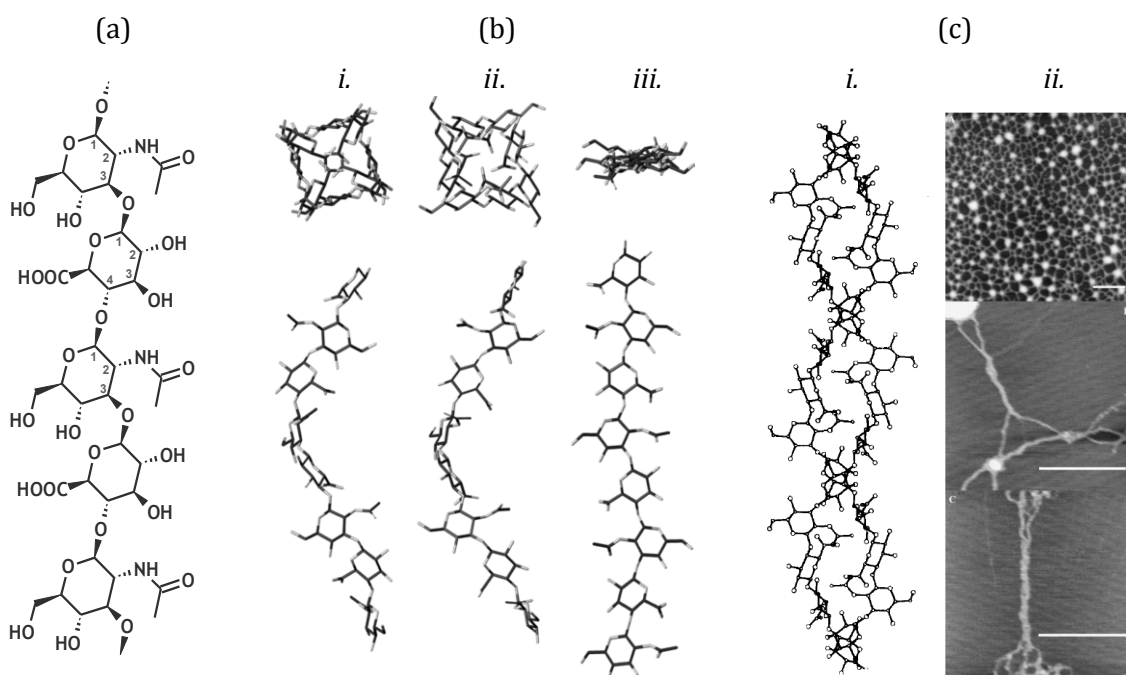
Deriváty hyaluronanu v současnosti nacházejí uplatnění v řadě medicínských odvětví (Kuo, 2006). Připravované deriváty jsou zpravidla charakterizovány molární hmotností a stupněm substituce, nicméně tyto parametry neumožňují odlišit deriváty s rozdílnou distribucí substituentů podél řetězce, které mohou vykazovat odlišné makroskopické vlastnosti. Z toho důvodu je důležité mít k dispozici metody, které jsou schopné odlišnou distribuci substituentů postihnout. Takové metody, založené na depolymerizaci, byly dosud vyvinuty pro rozličné deriváty škrobu, celulosy (Mischnick & Momcilovic, 2010), pektinu (Remoroza, Buchholt, Gruppen, & Schols, 2014) nebo xanthanu (Kool, Gruppen, Sworn, & Schols, 2013), ovšem pro deriváty hyaluronanu je jich známo pouze několik, navíc omezených na hyaluronan zesíťovaný 1,4-bis(2,3-epoxypropoxy)butanem (Kenne et al., 2013; Wende et al., 2016; Yang, Guo, Zang, & Liu, 2015).

V předkládané práci byl pro studium distribuce substituentů zvolen deacetylovaný hyaluronan, který patří mezi nejjednodušší deriváty hyaluronanu. Cílem práce bylo: (i) připravit vzorky deacetylovaného hyaluronanu s různou molární hmotností a různým stupněm deacetylace (*DD*); (ii) popsat vliv výchozí molární hmotnosti, reakční teploty a přítomnosti sulfolanu v reakční směsi na stupeň deacetylace; (iii) vyvinout metody, které by za pomoci chemické nebo enzymatické depolymerizace umožňovaly stanovit distribuci aminoskupin podél řetězce v připravených vzorcích; (iv) popsat vliv deacetylačních podmínek na distribuci aminoskupin.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 HYALURONAN

Hyaluronan (kyselina hyaluronová, HA) je přírodní lineární polysacharid, v jehož primární struktuře (**obr. 1.1a**) se pravidelně střídají D-glukuronová kyselina (GlcA) a N-acetyl-D-glukosamin (GlcNAc), spojené  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)- a  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-glykosidovými vazbami (Hirano & Hoffman, 1962). Je široce rozšířen v pojivové tkáni obratlovců (Robert, Robert, & Renard, 2010). Ve vysokých koncentracích se nachází například ve sklivci, pupeční šňůře, kůži nebo kloubní tekutině, kde v důsledku viskoelastivity a schopnosti zadržovat vodu za vzniku gelu slouží jako mazadlo a tlumič nárazů. Tyto vlastnosti jej spolu s unikátní biokompatibilitou a neimunogenitou (hyaluronan nevyvolává imunitní odpověď) předurčují pro využití v řadě medicínských odvětví: při operacích šedého zákalu, při léčbě osteoartrózy, pro zlepšení hojení ran nebo redukci vrásek (Kuo, 2006).



**Obr. 1.1** Struktura hyaluronanu: (a) primární: poly[(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glukopyranosyluronová kyselina-(1 $\rightarrow$ 3)-2-acetamido-2-deoxy- $\beta$ -D-glukopyranosyl]; (b) sekundární, příklady: *i.* šroubovice se čtyřmi disacharidy na závit v krystalové struktuře sodné soli, *ii.* šroubovice se čtyřmi disacharidy na závit z molekulárně dynamické simulace, *iii.* šroubovice se dvěma disacharidy na závit, převzato z lit. (Almond, DeAngelis, & Blundell, 2006); (c) terciární, příklady: *i.* antiparalelní dvoušroubovice v krystalové struktuře částečně protonované draselné soli, převzato z lit. (Sheehan, Gardner, & Atkins, 1977), *ii.* struktury na povrchu slídy zobrazené pomocí mikroskopie atomárních sil, převzato z lit. (Cowman et al., 2005).

Zatímco v minulosti se hyaluronan získával z kohoutích hřebínků, dnes je jeho hlavním zdrojem mikrobiální fermentace. Průmyslová produkce je nejčastěji založena na bakteriích rodu *Streptococcus*, nicméně bylo popsáno i použití bakterie *Bacillus subtilis* (Widner et al., 2005). V roce 2019 činila hodnota světového obchodu s hyaluronanem 9,1 miliardy amerických dolarů (Grand View Research, 2019). S ohledem na 26% nárůst počtu pacientů trpících osteoartrózou mezi lety 2000 a 2010 lze předpokládat, že poptávka po hyaluronanu používanému pro viskosuplementaci dále poroste (Liu, Liu, Li, Du, & Chen, 2011).

Řetězce hyaluronanu zaujímají díky nekovalentním interakcím různé sekundární a terciární struktury (Blundell, DeAngelis, & Almond, 2006), jejichž charakterizaci byla věnována řada přehledových pojednání (**tab. 1.1**). Zatímco většina badatelů označuje za sekundární strukturu konformaci řetězce (**obr. 1.1b**) vzniklou rotací jednotek GlcA a GlcNAc kolem glykosidových vazeb (Blundell, DeAngelis, & Almond, 2006; Mikelsaar & Scott, 1994; Yaffe, Almond, & Blanch, 2010), Kuo (2006) ji omezuje na vzájemnou polohu funkčních skupin a konformaci řetězce považuje již za strukturu terciární. Ostatní autoři naproti tomu za terciární strukturu považují dva a více vzájemně spojených řetězců (**obr. 1.1c**). Existence sekundární a terciární struktury hyaluronanu byla prokázána v pevné fázi rentgenovou difrakční analýzou a po depozici na povrch mikroskopii atomárních sil a elektronovou mikroskopii (Cowman, 2017), nicméně ve vodném roztoku je existence terciární struktury dosud předmětem zkoumání (Matteini et al., 2009; Yaffe, Almond, & Blanch, 2010).

**Tab. 1.1** Vybraná přehledová pojednání o sekundární a terciární struktuře hyaluronanu.

Popsané struktury	Zahrnuté období <sup>†</sup>	Počet citovaných prací <sup>†</sup>	Literatura
v pevné fázi, v roztoku, na povrchu	1944–1996	71	Lapčík, Lapčík, De Smedt, Demeester, & Chabreček (1998)
v pevné fázi, v roztoku	1953–2000	17	Sheehan & Almond (2001)
v roztoku	1991–2001	11	Day & Sheehan (2001)
v roztoku	1951–2002	35	Hardingham (2004)
v pevné fázi, v roztoku	1963–2003	56	Milas & Rinaudo (2004)
v pevné fázi, v roztoku, na povrchu	1945–2005	161	Cowman & Matsuoka (2005)
v pevné fázi, v roztoku, na povrchu	1960–2017	55	Cowman (2017)

<sup>†</sup>Počet citovaných prací a období, ze kterého pocházejí, zahrnuje pouze práce týkající se sekundární a terciární struktury hyaluronanu, nikoli všechny práce citované v pojednání.

Základní charakteristikou hyaluronanu je počet disacharidových jednotek (GlcA–GlcNAc) v řetězci (zde značený  $i$ ). Pro popis reálných vzorků, které obsahují řetězce s různým počtem disacharidových jednotek, se zavádí (Stepho, 2010) početně průměrná molární hmotnost ( $M_n$ ) a hmotnostně průměrná molární hmotnost ( $M_w$ ):

$$M_n = \frac{\sum M_j N_j}{\sum N_j} \quad (1.1)$$

$$M_w = \frac{\sum M_j^2 N_j}{\sum M_j N_j} \quad (1.2)$$

kde  $N_j$  je počet řetězců s molární hmotností  $M_j$ . Poměr  $M_w/M_n$  se nazývá disperzita molární hmotnosti a obvykle se používá spolu s  $M_w$  při charakterizaci vzorku namísto  $M_n$ . Techniky vhodné pro stanovení molárních hmotností HA shrnuli Cowman & Mendichi (2004). Mezi často používané patří rozměrově vylučovací chromatografie spojená s detekcí víceúhlového rozptylu světla (SEC-MALLS), která analyzuje celkovou distribuci molárních hmotností ve vzorku (Čožíková et al., 2017) a umožňuje určit  $M_n$  a  $M_w$  současně.

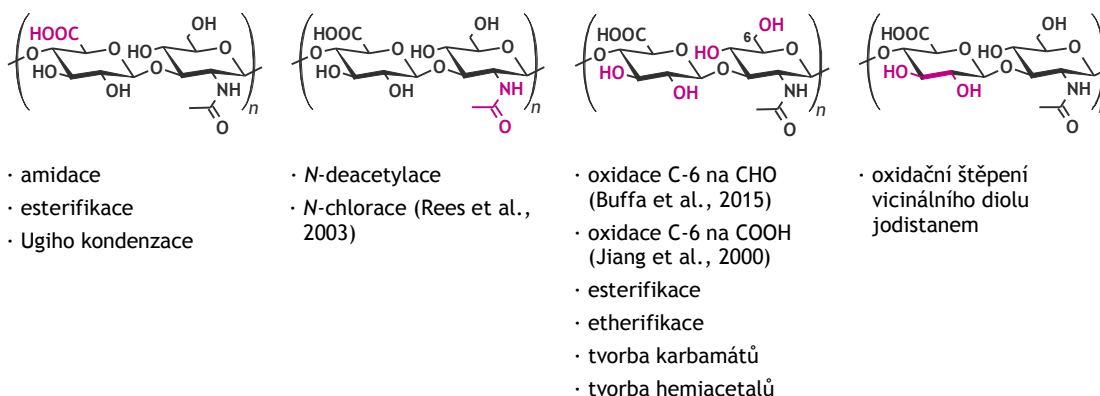
## 2.2 DERIVÁTY HYALURONANU

Deriváty hyaluronanu jsou připravovány s cílem zpomalit biodegradaci nebo změnit funkci v organismu (Schanté, Zuber, Herlin, & Vandamme, 2011; Tripodo et al., 2015). Disacharidová jednotka hyaluronanu může být derivatizována na čtyřech základních místech: na karboxylové skupině, na acetamidové skupině, na hydroxylových skupinách a na uhlíkové kostře (**obr. 1.2**). Nezávislost řetězců se při derivatizaci buď zachovává, nebo dochází k jejich kovalentnímu spojení, zesíťování.

Základní veličinou, která charakterizuje nezesíťované deriváty, je stupeň substituce, definovaný jako průměrný počet derivatizací na jednu disacharidovou jednotku (Finelli et al., 2014; Chmelař et al., 2017). Pouze u deacetylovaného hyaluronanu (Hirano, Ishigami, & Koga, 1975) se historicky dává přednost stupni deacetylace ( $DD$ ) před stupněm substituce acetylovými skupinami ( $DS_{Ac}$ ), který je s ním spojen následujícím vztahem:

$$DD = 1 - DS_{Ac} \quad (1.3)$$

Charakterizace zesíťovaných derivátů vyžaduje kromě stupně substituce použití několika dalších parametrů, jako jsou například stupeň modifikace, stupeň zesíťování a efektivita síťování (Kenne et al., 2013).



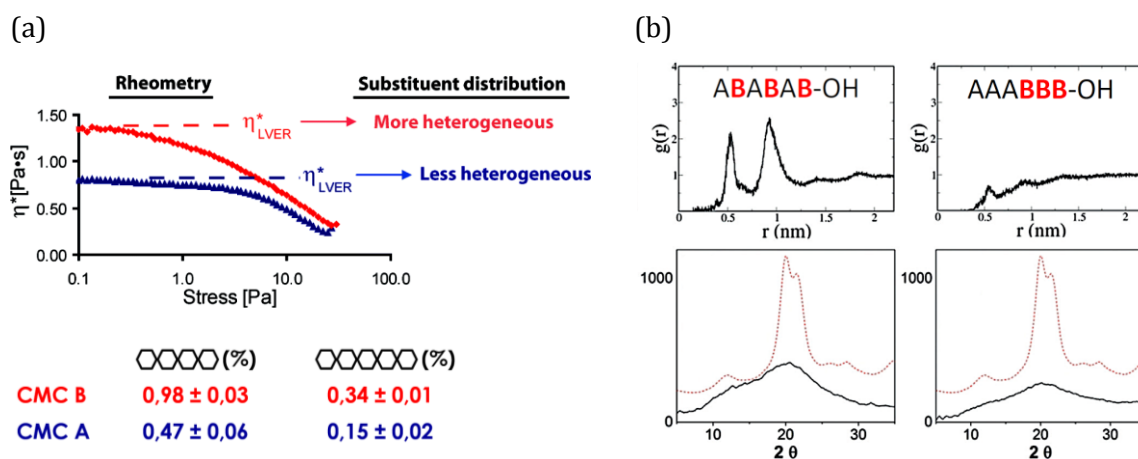
**Obr. 1.2** Možnosti derivatizace disacharidové jednotky hyaluronanu. Reakce, u nichž není uvedena citace, byly převzaty z lit. (Schanté, Zuber, Herlin, & Vandamme, 2011).

Struktura derivátů je stejně jako struktura samotného hyaluronanu hierarchická, ovšem její popis navíc zahrnuje distribuci substituentů na každé z úrovní (Mischnick & Momcilovic, 2010). Primární struktura daného derivátu je určena druhem substituentů, jejich distribucí v rámci disacharidové jednotky, stupněm substituce a jejich distribucí podél řetězce. Sekundární struktura je určena konformací řetězce a terciární je určena typem agregátů, které z derivátu vznikají, a distribucí substituentů uvnitř těchto agregátů.

Stanovení distribuce substituentů podél řetězce polysacharidů se v posledních letech věnuje značná pozornost, neboť deriváty se stejným stupněm substituce mohou vykazovat odlišné makroskopické vlastnosti (**obr. 1.3**), zapříčiněné pouze rozdílnou distribucí substituentů podél řetězce (Enebro, Momcilovic, Siika-Aho, & Karlsson, 2007; Yu et al., 2019). U malého počtu derivátů, mezi něž se řadí například chitosan (Kumirska et al., 2010), lze distribuci substituentů určit přímo z  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  NMR spekter polymerních vzorků, ovšem u zbývající většiny, do které patří i deriváty hyaluronanu, je nutné vzorek před stanovením distribuce substituentů rozštěpit na oligosacharidy (Mischnick, 2011). Nejpodrobnější protokol stanovení distribuce s využitím depolymerizace dosud popsali Mischnick & Momcilovic (2010). Jejich postup je následující: (i) analyzovaný vzorek je, pokud možno, persubstituován deuterovaným analogem substituentu, aby byla zajištěna náhodnost štěpení; (ii) vzorek je chemicky nebo enzymaticky rozštěpen na oligosacharidy, které jsou separovány, charakterizovány a kvantifikovány; (iii) získané molární zlomky oligosacharidů se porovnají s teoretickými zlomky, vypočítanými pomocí modelu náhodné distribuce substituentů; (iv) na základě srovnání se distribuce označí za náhodnou, blokovou, nebo pravidelnou (**obr. 1.4**). Vzhledem ke své pracnosti se však tento postup zřídka provádí celý. Nejčastěji se stanovení omezuje na krok (ii), jak tomu v minulosti bylo



například u hyaluronanu zesíťovaného 1,4-bis(2,3-epoxypropoxy)butanem, jehož struktura je ze všech derivátů hyaluronanu nejvíce prostudována (Kenne et al., 2013; Wende et al., 2016; Yang et al., 2015).



**Obr. 1.3** Příklady derivátů se stejným stupněm substituce, které vykazují odlišné makroskopické vlastnosti díky rozdílné distribuci substituentů podél řetězce: (a) roztok karboxymethylcelulosity B (CMC B) má vyšší viskozitu díky vyššímu podílu nesubstituované cellotetraosy a cellopentaosy v řetězci, upraveno z lit. (Enebro et al., 2007); (b) hexasacharid methylcelulosity s pravidelnou distribucí je v pevné fázi uspořádanější než hexasacharid s blokovou distribucí, jak dokládá vypočítaná radiální distribuční funkce (nahore) a jeho práškový rentgenový difraktogram (dole), A = D-glukopyranosa, B = 3-O-methyl-D-glukopyranosa, upraveno z lit. (Yu et al., 2019).

### 2.3 DEACETYLACETYLOVANÝ HYALURONAN<sup>1</sup>

Deacetylovaný hyaluronan (daHA) je jedním z nejjednodušších derivátů HA, neboť vzniká odštěpením *N*-acetylové skupiny z GlcNAc, čímž je určen jak druh substituentu, tak jeho distribuce v rámci disacharidové jednotky, a tedy pro popis primární struktury každého vzorku daHA zbývá určit jeho stupeň deacetylce a distribuci D-glukosaminových jednotek (GlcN) podél řetězce (**obr. 1.4**).

Je ceněný jako výchozí látka pro přípravu biomateriálů, jelikož umožňuje selektivní substituci na aminoskupině GlcN jednotek a jeho stupeň deacetylce může dosahovat až 100 %. Dosud byl použit k přípravě řady nezesíťovaných i zesíťovaných biomateriálů. Příklady nezesíťovaných derivátů zahrnují: (i) *N*-[<sup>3</sup>H]acetylovaný HA (Cleland, 1979; Höök, Riesenfeld, & Lindahl, 1982); (ii) rozmanité *N*-acylamidy HA (Babasola, Rees-Milton, Bebe,

<sup>1</sup> Tento oddíl byl s úpravami převzat z lit. (Sedláček, Hermannová, Šatínský, & Velebný, 2020). Přetisk tohoto článku je zařazen jako příloha II.

Wang, & Anastassiades, 2014; Bellini & Topai, 1999); (iii) částečně *N*-sulfatovaný HA, vykazující antikoagulační vlastnosti (Crescenzi, Francescangeli, Renier, & Bellini, 2002); (iv) konjugáty HA s nukleovými bázemi (Wada, Chirachanchai, Izawa, Inaki, & Takemoto, 1994; Wada, Chirachanchai, Izawa, Inaki, & Takemoto, 1995); (v) HA derivatizovaný *S*-nitrosothioloovými skupinami, z nichž se postupně uvolňuje oxid dusný (Renier & d'Este, 2013). Příklady zesíťovaných derivátů zahrnují hydrogely vytvořené z daHA: (i) Ugiho reakcí s formaldehydem a cyklohexyl izokyanátem (Crescenzi, Francescangeli, Renier et al., 2002; Crescenzi, Francescangeli, Segre et al., 2002); (ii) kondenzační reakcí s glutaraldehydem (Crescenzi, Francescangeli, Segre et al., 2002) nebo s aldehydem HA (Buffa et al., 2015); (iii) nekonventní asociací s alginátem (Oerther et al., 2000).



**Obr. 1.4** Schematické znázornění čtyř řetězců deacetylovaného hyaluronanu se stupněm deacetylce 50 %, které mají odlišnou distribuci: blokovou, více heterogenní, náhodnou nebo pravidelnou, upraveno z lit. (Mischnick & Momcilovic, 2010).

Kromě přípravy biomateriálů má daHA význam při studiu stárnutí lidské kůže, neboť jeho koncentrace v kůži roste s věkem (Longas et al., 2003; Longas, Russell & He, 1986, 1987). Navíc ve srovnání s hyaluronanem podobné molární hmotnosti vykazuje nižší viskozitu roztoků (Kim & Kim, 2011), nižší schopnost zadržovat vodu (Zhang et al., 2013) a nižší schopnost aktivovat antigen prezentující buňky (Zhang et al., 2014).

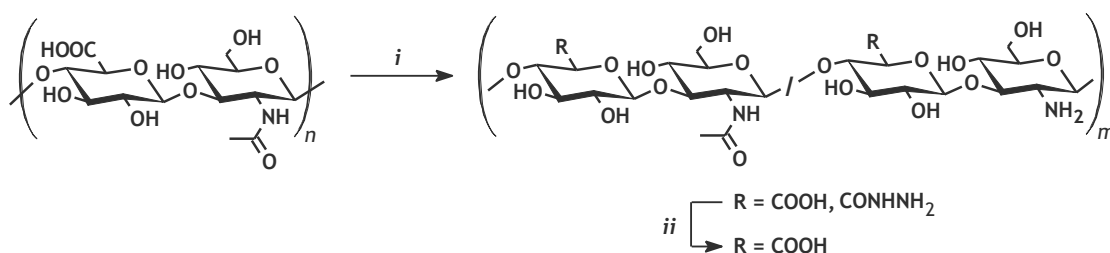
### 2.3.1 Příprava deacetylovaného hyaluronanu

#### 2.3.1.1 Chemická deacetylce

Chemická deacetylce hyaluronanu vyžaduje silně zásadité nebo kyselé prostředí a teploty od 55 °C do 105 °C. Za těchto podmínek však zejména v kyselém prostředí (Nimptsch et al., 2010; Tømmeraas & Melander, 2008) probíhá vedle deacetylce hydrolyza glykosidových

vazeb, která vede k rozsáhlé depolymerizaci, jak ukazuje následující srovnání. Zatímco při deacetylaci bází došlo k nárůstu *DD* na 79 % a k poklesu molární hmotnosti z 2000 kg mol<sup>-1</sup> na 24 kg mol<sup>-1</sup> (Zhang et al., 2013), při deacetylaci kyselinou poklesla molární hmotnost z 1200 kg mol<sup>-1</sup> na 24 kg mol<sup>-1</sup>, aniž by *DD* vzrostl na více než 1 % (Čožíková et al., 2017). Z toho důvodu se pro chemickou deacetylaci používají výhradně báze.

Zpočátku se pro deacetylaci používaly především roztoky hydroxidu sodného (Wada et al., 1994, 1995; Jeanloz & Forchielli, 1951), ovšem postupně je nahradily bezvodý N<sub>2</sub>H<sub>4</sub> (Oerther et al., 2000; Zhang et al., 2013) a N<sub>2</sub>H<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O (Babasola et al., 2014; Buffa et al., 2015; Crescenzi, Francescangeli, Renier et al., 2002), v nichž byl rozpuštěn síran hydrazinia sloužící jako katalyzátor reakce (Inoue & Kitajima, 1985). Důvodem pro nahrazení byla degradace uhlíkového skeletu GlcNAc, k níž dochází v roztocích hydroxidu sodného (Tokita & Okamoto, 1995). Naproti tomu v N<sub>2</sub>H<sub>4</sub> a N<sub>2</sub>H<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O dochází pouze k částečné konverzi karboxylových skupin v GlcA na hydrazidové skupiny (**obr. 1.5**), které lze po proběhnutí deacetylace převést zpět na karboxylové pomocí kyseliny jodičné (Shaklee & Conrad, 1984).



**Obr. 1.5** Deacetylace hyaluronanu hydrazinem s následným rozkladem hydrazidů, obecné reakční podmínky: *i*. N<sub>2</sub>H<sub>4</sub>, N<sub>2</sub>H<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, nebo N<sub>2</sub>H<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O a sulfolan, N<sub>2</sub>H<sub>6</sub>SO<sub>4</sub>, zahřívání; *ii*. HIO<sub>3</sub>, následně HI; grafické znázornění chemických vzorců odpovídá doporučení IUPAC pro polymery (Hiorns et al., 2012).

### 2.3.1.2 Enzymatická deacetylace

Enzymatická deacetylace probíhá na rozdíl od chemické deacetylace za mírných podmínek a bez významné hydrolýzy hyaluronanu, vyžaduje však enzymy zvané hyaluronan-*N*-deacetylasy, které nejsou komerčně dostupné. Dosud byly popsány čtyři zástupci této skupiny. Dvě deacetylasy izolovali Kim & Kim (2011) z *Aspergillus nidulans* a *Scopulariopsis brevicaulis* a prokázali, že jsou schopné deacetylovat hyaluronan s molární hmotností 1400 kg mol<sup>-1</sup>. Konkrétně po inkubaci s deacetylaseou z *Aspergillus nidulans* (pH 8,5, 40 °C) vzrostl *DD* na 4,2 % a po inkubaci s deacetylaseou ze *Scopulariopsis brevicaulis* (pH 7,5, 55 °C) vzrostl *DD* na 10,6 %. Třetím zástupcem je lidská hyaluronan-*N*-deacetylase, kterou charakte-

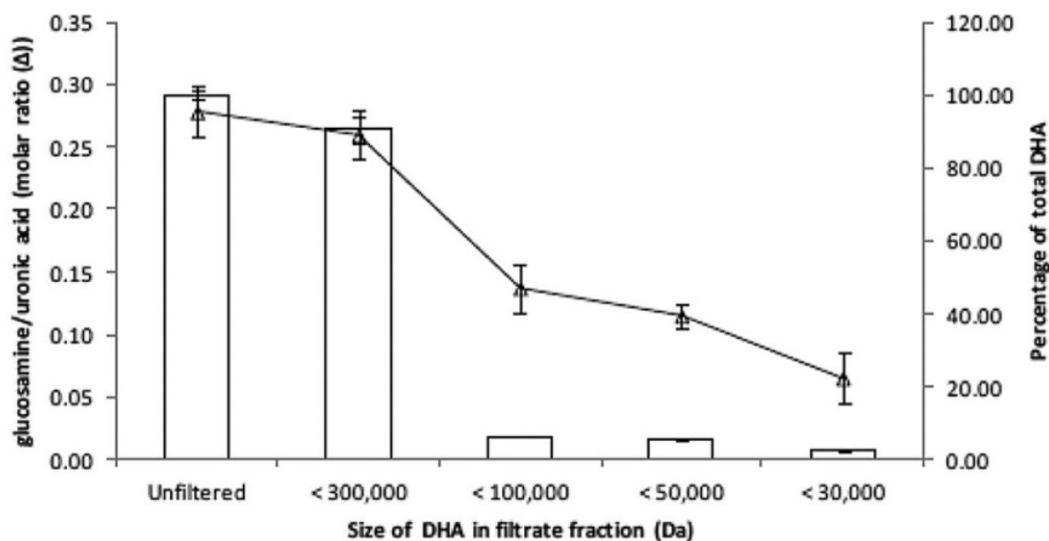
rizovali a z lidské kůže izolovali Longas et al. (2003, 2014) a Longas, Tinkle-Pereira, Dubec, & Park (2007). Její aktivita v homogenátu kůže byla demonstrována na hyaluronanu z kohoutích hřebínků (pH 7,86, 37 °C). Posledním známým zástupcem je deacetylase, která byla identifikována jako kontaminace v bovinní testikulární hyaluronidase. Bylo zjištěno, že odštěpuje acetylovou skupinu z GlcNAc na redukujícím konci oligosacharidů hyaluronanu, a její optimální pH a reakční teplota byly stanoveny na 6,0 a 40 °C (Chen et al., 2009).

### 2.3.2 Stanovení stupně deacetylace

Na stanovení stupně deacetylace (*DD*) lze nahlížet jako na dvoukrokový proces. V prvním kroku se stanoví množství GlcN nebo GlcNAc jednotek ve vzorku, přičemž podle stanovované jednotky se metody dělí na přímé, které stanovují GlcN, a nepřímé, které stanovují GlcNAc. Mezi přímé metody patří především kolorimetrie a acidimetrie, které těží z chemické reaktivity aminoskupin v jednotkách GlcN. Na druhé straně nepřímé metody zahrnují téměř výlučně <sup>1</sup>H NMR spektroskopii, jelikož signál acetylových protonů GlcNAc jednotek lze snadno odečíst z <sup>1</sup>H NMR spektra vzorku. Ve druhém kroku se množství GlcN nebo GlcNAc jednotek vydělí celkovým množstvím disacharidových jednotek, které je možné vyjádřit několika různými způsoby: (i) jako množství GlcA jednotek ve vzorku daHA (Babasola et al., 2014; Wada et al., 1994), (ii) jako množství GlcN jednotek ve zcela deacetylovaném daHA (Buffa et al., 2015; Crescenzi, Francescangeli, Renier et al., 2002), nebo (iii) jako množství GlcNAc jednotek v nativním HA (Crescenzi, Francescangeli, Renier et al., 2002; Dahl, Laurent, & Smedsrød, 1988; Wada et al., 1994; Zhang et al., 2013). Všechny metody, které byly dosud použity ke stanovení *DD*, shrnul Sedláček, Hermannová, Šatínský, & Velebný (2020).

### 2.3.3 Stanovení distribuce substituentů podél řetězce

Zatímco distribuce aminoskupin a sulfátových skupin v heparansulfátu byla v minulosti podrobně analyzována s využitím depolymerizace (Spencer, Bernanke, Buczek-Thomas, & Nugent, 2010; Westling & Lindahl, 2002), distribuce aminoskupin v příbuzném daHA byla zatím charakterizována pouze nepřímo. Babasola et al. (2014) rozdělili pomocí gelové filtrace daHA podle molární hmotnosti na frakce, u kterých stanovili *DD*. Jelikož pozorovali, že s rostoucí molární hmotností vykazují frakce vyšší hodnotu *DD* (**obr. 1.6**), navrhli hypotézu, že distribuce aminoskupin v daHA je bloková, nicméně analýzu s využitím depolymerizace, která je pro správné stanovení distribuce potřebná (Mischnick, 2011), neprovedli.



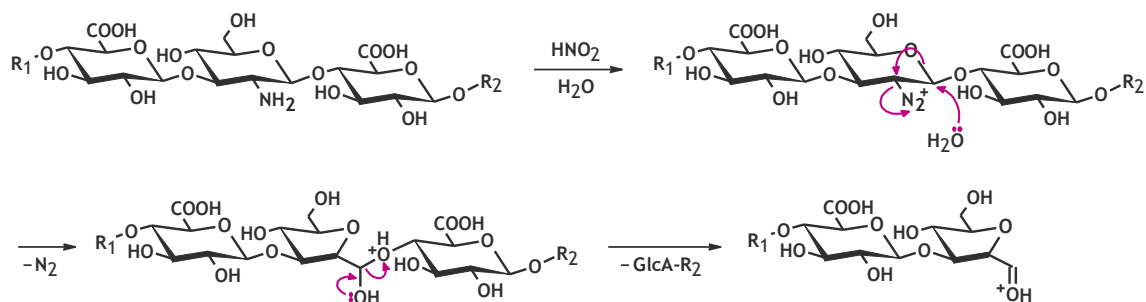
**Obr. 1.6** Závislost stupně deacetylace, vyjádřeného jako molární poměr GlcN/GlcA, na molární hmotnosti frakcí daHA získaných gelovou filtrací na polyethersulfonových centrifugačních kolonách. Převzato z lit. (Babasola et al. 2014).

## 2.4 ŠTĚPENÍ DEACETYLOVANÉHO HYALURONANU NA OLIGOSACHARIDY

### 2.4.1 Deaminační štěpení

Deaminační štěpení kyselinou dusitou generovanou *in situ* patří mezi zavedené metody depolymerizace glykosaminoglykanů (Han, Zeng, Lu, & Zhang, 2015; Riesenfeld & Rodén, 1990; Westling & Lindahl, 2002). Kyselina dusitá při něm reaguje selektivně s primární aminoskupinou hexosaminu za vzniku diazoniového kationtu, který se ve vodě rozkládá, čímž iniciuje přesmyk hexosaminu na 2,5-anhydrohexosu a štěpení přilehlé glykosidové vazby (**obr. 1.7**). Produktem štěpení jsou oligosacharidy s 2,5-anhydrohexosou na redukujícím konci, přičemž D-glukosamin se přesmykuje na 2,5-anhydro-D-mannosu (aMan) a D-galaktosamin na 2,5-anhydro-D-talosu (Porter, 1975). Na 1 mol hexosaminu se při reakci spotřebuje 1 mol kyseliny dusité (Allan & Peyron, 1995).

V souvislosti s daHA bylo deaminační štěpení zatím popsáno dvakrát. Crescenzi, Francescangeli, Renier et al. (2002) jej použili, aby daHA rozštěpili na oligosacharidy s aMan na redukujícím konci, které následně derivatizovali hydrazonem 3-methyl-2-benzothiazolinonu (Tsuji, Kinoshita, & Hoshino, 1969a, 1969b) za účelem kolorimetrického stanovení DD. A Chen et al. (2009) pomocí deaminačního štěpení identifikovali pozici GlcN jednotky v rámci deacetylovaných oligosacharidů hyaluronanu.

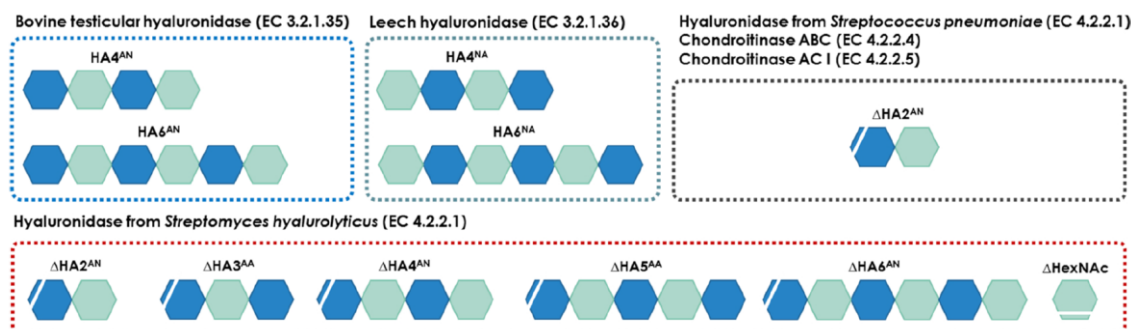


**Obr. 1.7** Pravděpodobný mechanismus deaminačního štěpení  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-glykosidové vazby mezi GlcN a GlcA v daHA kyselinou dusitou. Produktem jsou sudé oligosacharidy s 2,5-anhydro-D-mannosou (aMan) na redukujícím konci. Obdobný mechanismus navrhli Horton & Philips (1973) pro deaminační štěpení methyl-2-amino-2-deoxy- $\alpha$ -D-glukopyranosidu.

#### 2.4.2 Enzymatické štěpení

Enzymy, které přednostně štěpí hyaluronan, se nazývají hyaluronidasy a dělí se do čtyř tříd (Stern & Jedrzejak, 2006): (i) eukaryotní hydrolasy; (ii) prokaryotní lyasy; (iii) endo- $\beta$ -glukuronidasy; (iv) fungální hyaluronidasy. První třída (EC 3.2.1.35) zahrnuje endo- $\beta$ -N-acetyl-hexosaminidasy z obratlovců a hmyzích jedů, které náhodně hydrolyzují  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-glykosidové vazby HA za vzniku sudých oligosacharidů s GlcNAc na redukujícím konci, přičemž koncovým degradačním produktem je odpovídající tetrasacharid. Nejznámější představitelem této třídy je bovinní testikulární hyaluronidasa (BTH) (Kakizaki, Ibori, Kojima, Yamaguchi, & Endo, 2010). Druhou třídu (EC 4.2.2.1) tvoří bakteriální endo- $\beta$ -N-acetyl-hexosaminidasy, které štěpí  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-glykosidové vazby HA eliminačně, čímž v GlcA na neredukujícím konci vytvářejí dvojnou vazbu v poloze 4,5. Jejich koncovým produktem je zpravidla 4,5-nenasycený disacharid, jako je tomu například u hyaluronidasy ze *Streptococcus pneumoniae* (SpHyl) (Li et al., 2000), nicméně například hyaluronidasa ze *Streptomyces hyalurolyticus* štěpí HA na směs různých 4,5-nenasycených oligosacharidů (Tao et al., 2017). Na rozdíl od dvou předchozích tříd hydrolyzují endo- $\beta$ -glukuronidasy ze třetí třídy (EC 3.2.1.36)  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-glykosidové vazby HA za vzniku sudých oligosacharidů s GlcA na redukujícím konci. Tyto hydrolasy se nalézají v některých koryšcích a pijavicích a jsou schopné degradovat HA až na odpovídající disacharid (Lv et al., 2016). Čtvrtá třída hyaluronidas je definována pouze fungálním původem enzymů, neboť u hyaluronidas pocházejících z různých hub byl pozorován odlišný mechanismus štěpení. Například hyaluronidasy z *Penicillium purpurogenum* a *Talaromyces stipitatus* (TSH) štěpí  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-glykosidové vazby hydrolyticky a jejich koncovým degradačním produktem je disacharid, kdežto hyaluronidasa z *Fistulina hepatica* štěpí tytéž vazby jako lyasa eliminačně a jejím

koncovým degradačním produktem je 4,5-nenasycený tetrasacharid (Bakke, Kamei, & Obata, 2011; Bobková et al., 2018). Kromě hyaluronidas dokážou HA štěpit i některé chondroitinasy (EC 4.2.2.5) (Gu, Linhardt, Laliberté, Gu, & Zimmermann, 1995). Koncové degradační produkty zmíněných enzymů jsou zobrazeny na **obr. 1.8**.



**Obr. 1.8** Koncové degradační produkty enzymů štěpících hyaluronan. Oligosacharidy jsou označeny zkratkou HAX<sup>ZZ</sup> nebo ΔHAX<sup>ZZ</sup>, kde Δ představuje dvojnou vazbu v poloze 4,5 v monosacharidu na neredukujícím konci (bílá úsečka), X označuje počet monosacharidových jednotek a ZZ určuje monosacharid na neredukujícím a redukujícím konci: N odpovídá GlcNAc (zelený šestiúhelník), A odpovídá GlcA nebo ΔGlcA (modrý šestiúhelník), převzato z lit. (Šimek, Lemr, Hermannová, & Havlíček 2020).

Enzymy, které štěpí HA, byly v minulosti použity ke štěpení rozličných derivátů HA (**tab. 1.2**). Obecně platí, že čím je struktura derivátu odlišnější od struktury hyaluronanu, tím nižší je schopnost hyaluronidas derivát štěpit. Tento jev lze dokumentovat na štěpení hyaluronansulfátu pomocí BTH. Zatímco deriváty se stupněm substituce 1,2 a 1,8 byly štěpeny zhruba pětkrát méně než hyaluronan, derivát se stupněm substituce 3,0 nebyl štěpen prakticky vůbec (Lemmnitzer, Schiller, Becher, Möller, & Schnabelrauch, 2014). Pro posouzení selektivity enzymu je užitečné oligosacharidy získané enzymatickým štěpením derivátu analyzovat pomocí NMR spektroskopie a hmotnostní spektrometrie, nicméně taková analýza byla zatím provedena pouze pro methylester HA (Hirano et al., 2005) a pro HA zesíťovaný 1,4-bis(2,3-epoxypropoxy)butanem (Wende et al., 2016; Yang et al., 2015).

V případě daHA bylo dosud popsáno štěpení dvěma enzymy. Oerther et al. (2000) použili chondroitinasy ABC (10 U mL<sup>-1</sup>, pH 8, 37 °C, 2 h), aby daHA depolymerizovali na oligosacharidy, z nichž následně odštěpili GlcNAc, který kolorimetricky kvantifikovali. A ke stejnému účelu použili Longas et al. (1986, 1987) hyaluronidasu ze *Streptomyces hyalurolyticus* (20 U mL<sup>-1</sup>, pH 6, 60 °C, 2 h), když kvantifikovali pokles GlcNAc při deacetylaci hyaluronanu v lidské kůži.

**Tab. 1.2** Příklady derivátů hyaluronanu, které byly depolymerizovány pomocí enzymů.

Název derivátu	Struktura derivátu	Enzym	Literatura
Deacetylovaný hyaluronan		Hyaluronidasa ze <i>Streptomyces hyalurolyticus</i>	Longas et al. (1986, 1987)
		Chondroitinasa ABC	Oerther et al. (2000)
Methylester hyaluronanu		Chondroitinasa ACII z <i>Arthrobacter aurescens</i>	Hirano et al. (2005)
		Chondroitinasa ACI z <i>Flavobacterium heparinum</i>	Hirano et al. (2005)
Hexanoylhyaluronan		Bovinní testikulární hyalurononidasa	Šmejkalová et al. (2012)
Aldehyd hyaluronanu		Bovinní testikulární hyalurononidasa	Šedová et al. (2013)
Hyaluronan-sulfát		Bovinní testikulární hyalurononidasa	Lemmnitzer et al. (2014)
Hyaluronan zesíťovaný 1,4-bis(2,3-epoxypropoxy)butanem		Chondroitinasa ACII z <i>Arthrobacter aurescens</i>	Kenne et al. (2013)
		Chondroitinasa ABC z <i>Proteus vulgaris</i>	Wende et al. (2016)
		Hyaluronidasa z <i>Bacillus</i> sp. A50	Yang et al. (2015)



## 2.5 ANALÝZA OLIGOSACHARIDŮ HYALURONANU POMOCÍ KAPALINOVÉ CHROMATOGRRAFIE

Metody použité pro separaci oligosacharidů hyaluronanu shrnuli Capila & Sasisekharan (2004), Malavaki, Kanakis, Theocharis, Lamari, & Karamanos (2007) a Šimek et al. (2020). Kromě kapilární elektroforézy a rozměrově vylučovací chromatografie (SEC) se používá iontově výměnná chromatografie, hydrofilní interakční chromatografie (HILIC) a kapalinová chromatografie na reverzní fázi (RP-HPLC).

### 2.5.1 Iontově výměnná chromatografie

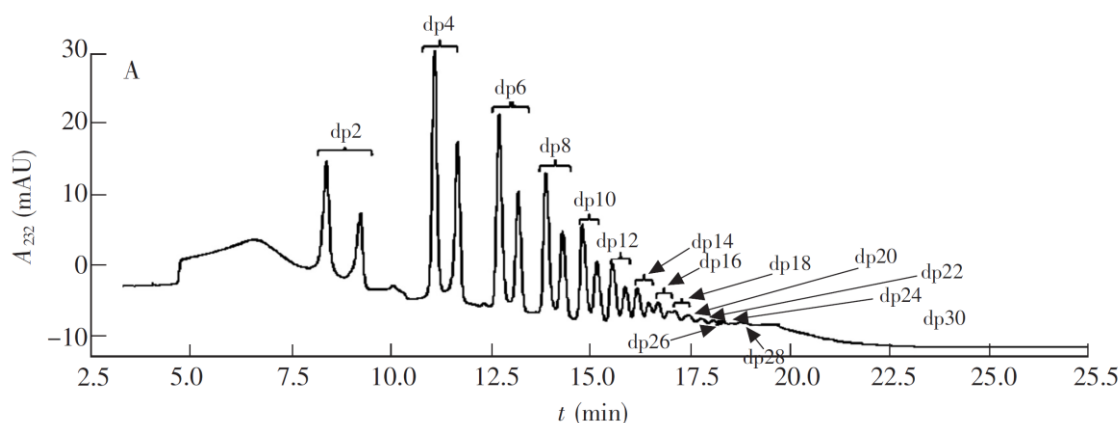
Iontově výměnná chromatografie má nejčastěji podobu aniontově výměnné kapalinové chromatografie, při níž jako stacionární fáze slouží slabě bazické anexy ( $-NR_2$ ,  $-NH_2$ ) a eluce probíhá gradientem iontové síly (**tab. 1.3**). Silně bazické anexy ( $-NR_3^+$ ) se někdy používají pro preparativní chromatografii (Blundell & Almond, 2006; He et al., 2020). Detekce oligosacharidů bývá založena buď na pulzní amperometrické detekci (PAD), nebo na absorpci záření o vlnové délce 210 nm amidovou vazbou v GlcNAc, případně na absorpci záření o vlnové délce 232 nm dvojnou vazbou v 4,5-nenasycených oligosacharidech.

**Tab. 1.3** Příklady metod použitých pro separaci oligosacharidů hyaluronanu pomocí aniontově výměnné kapalinové chromatografie.

Kolona	Gradient	Průtok	Detekce	Literatura
CarboPac PA1 (250 × 4 mm)	26–1300 mM NaCl v 0,1 M NaOH aq.	1,0 mL/min	UV 232 nm	Lauder, Huckerby, & Nieduszynski (2000)
YMC NH <sub>2</sub> (250 × 4 mm)	16–800 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> aq.	1,0 mL/min	UV 210 nm	Tawada et al. (2002)
YMC-Pack PA-03 (250 × 4,6 mm)	16–1000 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> aq.	1,0 mL/min	UV 210 nm	Sugahara et al. (2003)
YMC Polyamine II (250 × 4,6 mm)	100–246 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> aq.	1,0 mL/min	UV 215 nm	Kakizaki et al. (2010)
CarboPac PA200 (250 × 3 mm)	200–900 mM CH <sub>3</sub> COONa v 0,1 M NaOH aq.	0,5 mL/min	PAD	Rothenhöfer, Grundmann, Bernhardt, Matysik, & Buschauer (2015)

## 2.5.2 Hydrofilní interakční chromatografie

Na hydrofilní interakční chromatografii lze pohlížet jako na chromatografii na normální fázi s vodnými mobilními fázemi (Alpert, 1990). Její použití pro oligosacharidy HA je zatím omezeno na několik málo příkladů. Vigliano, Bianchera, Bettini, & Elviri (2013) analyzovali 4,5-nenasycené oligosacharidy od disacharidu ( $\Delta 2_0$ ) po oktasacharid ( $\Delta 8_0$ ) na koloně HILIC 3  $\mu\text{m}$  ( $75 \times 2,1$  mm) od firmy Phenomenex za použití gradientu 20 mM mravenčanu amonného o pH 2,5 (5–50%) v acetonitrilu. Wu, Liu, & Zhang (2015) vyzkoušeli separaci 4,5-nenasycených oligosacharidů na čtyřech HILIC kolonách s různými stacionárními fázemi. Zatímco kolona Cosmosil HILIC 5  $\mu\text{m}$ , 120 Å ( $250 \times 4,6$  mm) s vázanou triazolovou fází se ukázala pro dělení oligosacharidů nevhodná, na koloně Acchrom X-Amide 5  $\mu\text{m}$  ( $250 \times 4,6$  mm) s vázanou amidovou fází, na koloně SeQuant ZIC-HILIC 5  $\mu\text{m}$ , 200 Å ( $100 \times 2,1$  mm) s vázanou zwitterionickou fází (**obr. 1.9**) a na koloně Luna HILIC 3  $\mu\text{m}$ , 200 Å ( $150 \times 2,0$  mm) s vázanou diolovou fází bylo dosaženo dobrého rozlišení.



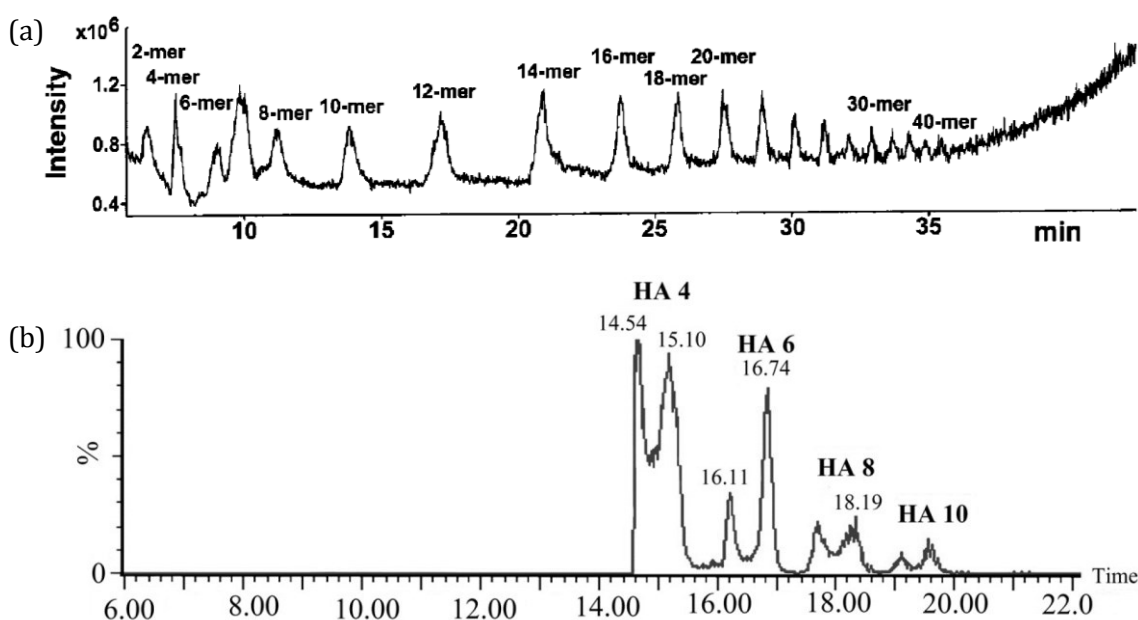
**Obr. 1.9** Separace 4,5-nenasycených oligosacharidů hyaluronanu na koloně SeQuant ZIC-HILIC 5  $\mu\text{m}$ , 200 Å ( $100 \times 2,1$  mm) při 30 °C, oligosacharidy tvoří dvojpík odpovídající  $\alpha$ - a  $\beta$ -anomerům, převzato z lit. (Wu et al., 2015).

## 2.5.3 Kapalinová chromatografie na reverzní fázi

Nederivatizované oligosacharidy HA mají na stacionárních fázích C18 malou retenci. Tento problém lze vyřešit: (i) použitím ion-párového činidla; (ii) použitím stacionární fáze kombinující separační módy (angl. „mixed mode“); (iii) použitím stacionární fáze s alkyly kratšími než C18; (iv) předkolonovou derivatizací oligosacharidů.

Použití ion-párového činidla patří mezi nejstarší a stále používané postupy pro zvýšení retence nederivatizovaných oligosacharidů (**tab. 1.4**). Capila & Sasisekharan (2004) uvádějí ve svém přehledu dva příklady, kdy byly oligosacharidy HA rozděleny na koloně C18 za

použití tetrabutylamonium hydroxidu ( $\text{Bu}_4\text{NOH}$ ) jako ion-párového činidla. V prvním případě (Chun, Koob, & Eyre, 1988) byly při pH 7,6 rozděleny 4,5-nenasycený tetrasacharid ( $\Delta 4_0$ ) a hexasacharid ( $\Delta 6_0$ ), ve druhém případě (Cramer & Bailey, 1991) byly při pH 9,0 rozděleny analyty od tetrasacharidu ( $4_0$ ) po dodekasacharid ( $12_0$ ). Nadto Luu, Chen, & Isayeva (2013) použili pro separaci 4,5-nenasycených oligosacharidů směs 10 mM tetrabutylamonium fosfátu (pH 7,35) s acetonitrilem (83:17, v/v). Stejného efektu docílil Volpi (2007) přidavkem 15 mM tributylaminu do roztoku octanu amonného, což mu umožnilo při pH 7,0 rozdělit oligosacharidy od disacharidu ( $2_0$ ) až po tetrakontasacharid ( $40_0$ ) a pro jejich detekci využít hmotnostní spektrometr (**obr. 1.10a**), jehož použití spolu s kvartérními aminy není vhodné z důvodu značných paměťových efektů.



**Obr. 1.10** Celkové iontové chromatogramy (ESI-) nederivatizovaných oligosacharidů hyaluronanu: (a) na koloně Gemini C18 3  $\mu\text{m}$ , 110  $\text{\AA}$  (150  $\times$  4,6 mm) při pH 7,0 a použití tributylaminu jako ion-párového činidla, převzato z lit. (Volpi, 2007); (b) na koloně Jupiter Proteo 4  $\mu\text{m}$ , 90  $\text{\AA}$  (250  $\times$  4,6 mm) při pH 2,7, oligosacharidy tvoří dvojpík odpovídající  $\alpha$ - a  $\beta$ -anomerům, převzato z lit. (Bobková et al., 2018).

Příkladem kolon se stacionární fází kombinující separační módy (**tab. 1.4**) jsou kolony Acquity BEH Amide 1,7  $\mu\text{m}$ , 130  $\text{\AA}$  (100  $\times$  2,1 mm) s vázanou amidovou fází a XSelect CSH C18 1,7  $\mu\text{m}$ , 130  $\text{\AA}$  (50  $\times$  2,1 mm) s nabitým povrchem stacionární fáze, na kterých byly analyzovány krátké oligosacharidy HA při 45  $^{\circ}\text{C}$  s využitím gradientu acetonitrilu (He et al., 2020; Lv et al., 2016).

**Tab. 1.4** Příklady metod použitých pro separaci oligosacharidů hyaluronanu pomocí kapalinové chromatografie na reverzní fázi.

Kolona	Mobilní fáze	Gradient	Průtok	Detekce	Literatura
<i>Stacionární fáze C18 a mobilní fáze s ion-párovým činidlem</i>					
Ultrasphere ODS 5 μm (250 × 4,6 mm)	A: 10 mM Bu <sub>4</sub> NOH a 8 mM H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> v H <sub>2</sub> O/ ACN 80 : 20 (pH 7,6)  B: 10 mM Bu <sub>4</sub> NOH a 6 mM H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> v H <sub>2</sub> O/ ACN 40 : 60 (pH 7,5)	0–5 % B	1,0 mL/min	UV 232 nm	Chun et al. (1988)
Hamilton PRP-1 C18 5 μm (150 × 4,1 mm)	40 mM Bu <sub>4</sub> NOH aq. (pH 9,0)/ACN 80 : 20	–	0,8 mL/min	UV 276 nm	Cramer & Bailey (1991)
Gemini C18 3 μm, 110 Å (150 × 4,6 mm)	A: 15 mM Bu <sub>3</sub> N a 50 mM CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> v H <sub>2</sub> O/ACN 80 : 20 (pH 7,0)  B: 15 mM Bu <sub>3</sub> N a 50 mM CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> v H <sub>2</sub> O/ACN 35 : 65 (pH 7,0)	0–100 % B	0,3 mL/min	ESI-MS (–)	Volpi (2007)
Nova Pak C18 (150 × 3,9 mm)	10 mM (Bu <sub>4</sub> N)H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> aq. (pH 7,35)/ACN 83 : 17	–	0,5 mL/min	UV 232 nm	Luu et al. (2013)
<i>Stacionární fáze kombinující separační módy</i>					
Acquity BEH Amide 1,7 μm, 130 Å (100 × 2,1 mm)	A: 0,1 M HCOONH <sub>4</sub> aq. B: ACN	0–95 % B	0,3 mL/min	ESI-MS (–)	Lv et al. (2016)
XSelect CSH C18 1,7 μm, 130 Å (50 × 2,1 mm)	A: 0,1 M HCOONH <sub>4</sub> aq. B: ACN	0–90 % B	0,3 mL/min	ESI-MS (–)	He et al. (2020)
<i>Stacionární fáze s alkyly kratšími než C18</i>					
LiChrospher 100 RP-8 5 μm, 100 Å (125 × 4 mm)	H <sub>2</sub> O/ACN 96 : 4	–	0,5 mL/min	UV 194 nm	Alkrad et al. (2002)
Nucleosil 100-7 C2 7 μm, 100 Å (250 × 2 mm)	2,5 % THF v MeOH	–	0,2 mL/min	ESI-MS (–)	Kühn et al. (2003)

**Tab. 1.4** Pokračování.

Kolona	Mobilní fáze	Gradient	Průtok	Detekce	Literatura
<i>Stacionární fáze s alkyly kratšími než C18</i>					
Jupiter Proteo (C12) 4 μm, 90 Å (250 × 4,6 mm)	A: 0,1 % HCOOH aq. B: MeOH	Není uveden	0,5 mL/min	ESI-MS (-)	Bobková et al. (2018); Smirnou et al. (2015)

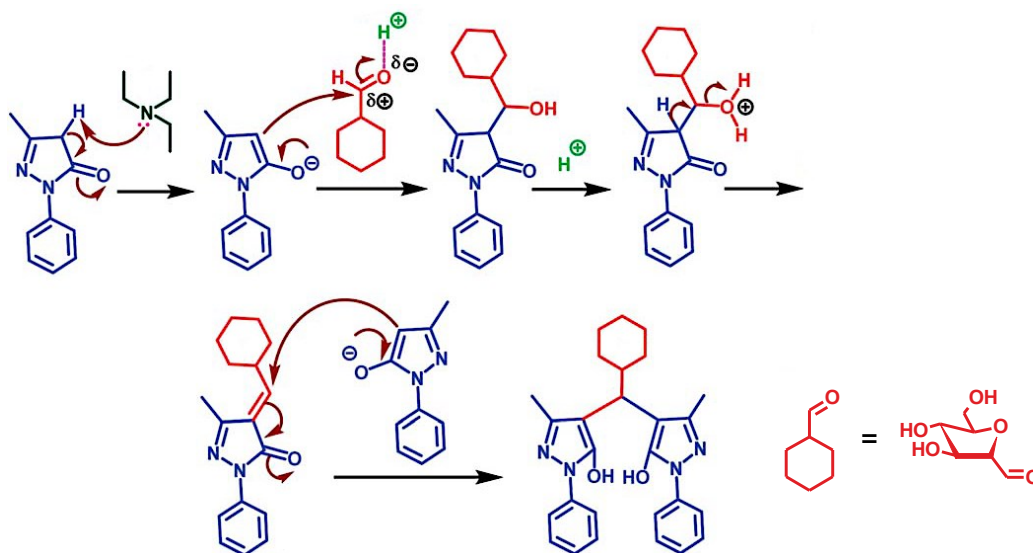
Kromě přídavku ion-párového činidla do mobilní fáze a použití „mix-mode“ kolony lze retenci nederivatizovaných oligosacharidů zvýšit použitím stacionární fáze s alkyly kratšími než C18 (**tab. 1.4**), případně snížením pH mobilní fáze pod  $pK_a$  karboxylových skupin v GlcA ( $pK_a \approx 3,2$ ; Tømmeraas & Wahlund, 2009). Příkladem je separace 4,5-nenasycených oligosacharidů od tetrasacharidu ( $\Delta 4_0$ ) po dodekasacharid ( $\Delta 12_0$ ) a nasycených od tetrasacharidu ( $2_0$ ) po dekasacharid ( $10_0$ ) při pH 2,7 (0,1% HCOOH ve vodě) na koloně Jupiter Proteo, která obsahuje vázanou fázi C12 (Bobková et al., 2018; Smirnou et al., 2015). Tento přístup umožňuje stejně jako HILIC od sebe oddělit i anomery oligosacharidů (**obr. 1.10b**). Ještě kratší alkylové řetězce C8 (Alkrad, Merstani, & Neubert, 2002) a C2 (Kühn, Raith, Sauerland, & Neubert, 2003) jsou vhodné pro aplikace, kde není nutné úplné oddělení jednotlivých oligosacharidů.

Předkolonová derivatizace oligosacharidů obecně umožňuje: (i) zvýšení retence a změnu selektivity na reverzní fázi; (ii) zvýšení vlnové délky pro UV detekci. Činidla vhodná pro derivatizaci sacharidů shrnul Harvey (2011). V případě oligosacharidů HA byla dosud v souvislosti s RP-HPLC popsána pouze pokolonová derivatizace 2-kyanacetamidem, díky níž bylo možné oligosacharidy detekovat při vlnové délce 276 nm (Cramer & Bailey, 1991) namísto při 210 nm, kde absorbuje amidová vazba v GlcNAc.

#### 2.5.4 Derivatizace činidlem PMP

Derivatizace redukujících sacharidů 1-fenyl-3-methyl-2-pyrazolin-5-onem (PMP) probíhá ve dvou krocích a vyžaduje bazické prostředí. Nejprve se první molekula PMP aduje 1,2-adicí na aldehydickou skupinu sacharidu, následně se druhá molekula PMP aduje 1,4-adicí na vzniklý enon (**obr. 1.11**). Jako báze zpravidla slouží NaOH (Bai et al., 2015; Han et al., 2015), ovšem v případě uronových kyselin nebo fukosy je reakce selektivnější při použití méně bazického triethylaminu (Zhang, Zhang, Wang, & Huang, 2011) nebo tributylaminu

(Myron, Siddiquee, Azad, & Yong, 2014). Po derivatizaci lze sacharidy analyzovat pomocí RP-HPLC na kolonách s vázanou fází C18 (Zhang et al., 2011) a detekovat při vlnové délce 245 nm (Bai et al., 2015). Nevýhodou je nutnost použít nadbytek činidla PMP, které může interferovat při následné analýze, proto se vzorek před analýzou extrahuje  $\text{CHCl}_3$ .



**Obr. 1.11** Pravděpodobný mechanismus derivatizace 2,5-anhydro-D-mannosy (aMan) dvěma molekulami 1-fenyl-3-methyl-2-pyrazolin-5-onu (PMP), jako báze je použit triethylamin, upraveno z lit. (Kumar, Maurya, Gupta, & Shukla, 2014).

## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 CHEMIKÁLIE A PŘÍSTROJE

Sodná sůl kyseliny hyaluronové (> 95%), oligosacharidy hyaluronanu (> 95%), hyaluronidasa z *Talaromyces stipitatus* (TSH) a hyaluronidasa ze *Streptococcus pneumoniae* (SpHyl) byly poskytnuty firmou Contipro, a. s. (Dolní Dobrouč, ČR). Ostatní chemikálie byly koupeny od komerčních dodavatelů a použity bez dalšího čištění. Bovinní testikulární hyaluronidasa (BTH) byla zakoupena u firmy Finepharm S.A. (Polsko). Hydrochlorid D-glukosaminu (> 99%), monohydrát hydrazinu (98%), sulfolan (99%), kyselina octová ( $\geq 99,7\%$ ), jodid sodný ( $\geq 99,5\%$ ), D<sub>2</sub>O (99,9%), sodná sůl 3-(trimethylsilyl)propanové-2,2,3,3-*d*<sub>4</sub> kyseliny (TMSp-*d*<sub>4</sub>, 98%), dusitan sodný ( $\geq 99\%$ ), 3-methyl-1-fenyl-2-pyrazolin-5-on (PMP, 99%), dihydrát dihydrogenfosforečnanu sodného (> 98%) a azid sodný ( $\geq 99,5\%$ ) byly zakoupeny u firmy Sigma-Aldrich (USA). Kyselina sírová (96%), kyselina chlorovodíková ( $\geq 37\%$ ), octan amonný (99,6%), chlorid sodný (99,8%), hydrogenuhličitán sodný (99,8%), hydroxid sodný (> 98%), ethyl-acetát ( $\geq 99,7\%$ ), methanol (> 99,5%), chloroform (> 99,5%) a isopropylalkohol ( $\geq 99,7\%$ ) byly zakoupeny u firmy Lach-ner, s. r. o. (ČR). Kyselina jodičná (99,5%) byla zakoupena u firmy Acros Organics (USA). Acetonitril HiPerSolv Chromanorm ( $\geq 99,9\%$ ) byl zakoupen u firmy VWR International, LLC. (USA). Pro všechny experimenty byla použita deionizovaná voda (konduktivita < 1,5  $\mu\text{S cm}^{-1}$ ).

Pro homogenizaci sraženin byl použit Ultra-Turrax T 18 (IKA-Werke, SRN). Pro filtraci mobilních fází a sraženin sloužily filtry Nylaflo s póry o velikosti 0,2  $\mu\text{m}$  (Pall Corporation, USA) uchycené do polysulfonového filtračního nástavce Nalgene (Thermo Fisher Scientific, USA). Lyofilizace byla provedena na lyofilizátoru Christ Alpha 2-4 LSC (B. Braun Biotech International, SRN). Pro míchání a zahřívání vzorků byl použit třepaný inkubátor NB-205LF (N-Biotek Co., Ltd., Korea) nebo magnetická míchačka MS-H-Pro Plus (Scilogex, LLC., USA) s olejovou lázní. Všechny roztoky byly před měřením na kapalinovém chromatografu přefiltrovány přes nylonový stříkačkový filtr Acrodisc 13 mm s póry o velikosti 0,22  $\mu\text{m}$  (Pall Corporation, USA). Ultrafiltrace byla provedena na celulosových membránách Hydrosart s limitem nominální molární hmotnosti 2 kDa (Sartorius AG, SRN), které byly uchyceny do držáku Centramate PE s tangenciálním tokem (Pall Corporation, USA).

### 3.2 PŘÍPRAVA DEACETYLOVANÉHO HYALURONANU

Příprava vycházela z postupů popsanych v literatuře (Babasola et al., 2014; Buffa et al., 2015). Sodná sůl kyseliny hyaluronové (1,03 g) byla rozpuštěna v N<sub>2</sub>H<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O (80 mL) nebo

ve směsi  $\text{N}_2\text{H}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$  (40 mL) a sulfolanu (40 mL), k roztoku byla přidána koncentrovaná kyselina sírová (32  $\mu\text{L}$ ) a směs byla zahřívána 42 h pod dusíkovou atmosférou na danou teplotu (**tab. 2.1**). Surový produkt byl následně vysrážen přidávkem isopropylalkoholu, homogenizován, odfiltrován a ponechán v digestoři uschnout. Pouze pokud nedošlo k vysrážení produktu, byla reakční směs odpařena na rotační vakuové odparce. Po vysušení byl produkt rozpuštěn v 0,83 M vodné kyselině octové na roztok o koncentraci 6,5 mg  $\text{mL}^{-1}$ , který byl vložen do ledové lázně. K roztoku byl pomalu přidáván 0,5 M vodný roztok kyseliny jodičné, dokud se jeho barva neustálila na červenohnědé. Po 2 h míchání byla nezreagovaná kyselina jodičná rozložena 4,4 M roztokem jodidu sodného a vzniklý jód byl extrahován ethyl-acetátem. Vodná fáze byla oddělena, zředěna vodou a ultrafiltrována proti roztoku solí ( $\text{NaHCO}_3$  1,0 g  $\text{L}^{-1}$ ,  $\text{NaCl}$  8,8 g  $\text{L}^{-1}$ ) a následně proti vodě, dokud konduktivita permeátu neklesla pod 10  $\mu\text{S cm}^{-1}$ . Deacetylovaný HA byl z roztoku získán lyofilizací.

**Tab. 2.1** Reakční podmínky deacetylce a hmotnostní výtěžky deacetylovaného HA.

Vzorek	$M_{w,\text{HA}}$ ( $\text{kg mol}^{-1}$ )	Činidlo	$t$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	$m_{\text{daHA}}$ (mg)
S1	200	$\text{N}_2\text{H}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$	55	953
S2	200	$\text{N}_2\text{H}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ /sulfolan	55	998
S3	200	$\text{N}_2\text{H}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$	65	928
S4	200	$\text{N}_2\text{H}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ /sulfolan	65	900
S5	200	$\text{N}_2\text{H}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$	75	882
S6	200	$\text{N}_2\text{H}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ /sulfolan	75	927
S7	200	$\text{N}_2\text{H}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$	85	510
S8	200	$\text{N}_2\text{H}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ /sulfolan	85	770
S9	460	$\text{N}_2\text{H}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$	55	942
S10	460	$\text{N}_2\text{H}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ /sulfolan	55	898
S11	460	$\text{N}_2\text{H}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$	65	936
S12	460	$\text{N}_2\text{H}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ /sulfolan	65	976
S13	460	$\text{N}_2\text{H}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$	75	805
S13 <sub>100mg</sub> <sup>†</sup>	460	$\text{N}_2\text{H}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$	75	85
S13 <sub>Na2SO4</sub> <sup>‡</sup>	460	$\text{N}_2\text{H}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$	75	940
S14	460	$\text{N}_2\text{H}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ /sulfolan	75	885
S15	460	$\text{N}_2\text{H}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$	85	945
S16	460	$\text{N}_2\text{H}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ /sulfolan	85	842
S17	460	$\text{N}_2\text{H}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$	95	633
S18	460	$\text{N}_2\text{H}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ /sulfolan	95	702
S19	2 200	$\text{N}_2\text{H}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$	65	843
S20	2 200	$\text{N}_2\text{H}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ /sulfolan	65	855

<sup>†</sup>Příprava vzorku S13<sub>100mg</sub> se od přípravy S13 lišila navázkou HA, která činila 100 mg.

<sup>‡</sup>Příprava vzorku S13<sub>Na2SO4</sub> se od přípravy S13 lišila přidávkem 561 mg  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  do reakční směsi.



### 3.3 STANOVENÍ MOLÁRNÍCH HMOTNOSTÍ POMOCÍ SEC-MALLS

Stanovení bylo provedeno podle postupu popsaného pro HA (Čožíková et al., 2017). Nejistoty přidružené výsledkům byly vypočteny ze tří opakování nástřiku.

### 3.4 STANOVENÍ STUPNĚ DEACETYLACE POMOCÍ <sup>1</sup>H NMR SPEKTROSKOPIE

Protonová NMR spektra byla změřena v kyvetách Aldrich ColorSpec (Sigma-Aldrich Co., USA) na spektrometrech Varian S500 (499,87 MHz pro <sup>1</sup>H, Varian, Inc., USA) a Bruker Avance III 500 (500,13 MHz pro <sup>1</sup>H, Bruker Corporation, USA) a zpracována v softwaru Mnova 6.0.2 (Mestrelab Research SL, Španělsko).

#### 3.4.1 Metoda NMR,1a

Vzorek HA nebo daHA (10,0 mg) byl rozpuštěn v D<sub>2</sub>O (750 μL) obsahující TMSP-*d*<sub>4</sub> (1,44 mg mL<sup>-1</sup>), roztok byl převeden do kyvety a na spektrometru Varian S500 bylo při 75 °C (Babasola et al., 2014) změřeno jeho <sup>1</sup>H NMR spektrum. Spektrum bylo rozšířeno lineární predikcí na 64k datových bodů, doplněno nulami na 128k datových bodů, vynásobeno exponenciální apodizační funkcí (0,80 Hz) a byla provedena korekce základní linie. Chemické posuny byly vztaženy k chemickému posunu vnitřního standardu TMSP-*d*<sub>4</sub> (0,00 ppm). Ze spekter byly odečteny integrální intenzity acetylových protonů GlcNAc jednotek *I*<sub>CH<sub>3</sub></sub> (1,80–2,30 ppm) a anomerních protonů *I*<sub>CH</sub> (4,35–4,75 ppm pro HA, 4,40–4,90 ppm pro daHA), z nichž byl podle vzorce (2.1) vypočítán *DD*<sub>NMR,1a</sub> (%):

$$DD_{\text{NMR},1a} = \left[ 1 - \left( \frac{I_{\text{CH}}}{I_{\text{CH}_3}} \right)_{\text{HA}} \cdot \left( \frac{I_{\text{CH}_3}}{I_{\text{CH}}} \right)_{\text{daHA}} \right] \cdot 100 \quad (2.1)$$

Místo teoretické hodnoty  $(I_{\text{CH}}/I_{\text{CH}_3})_{\text{HA}} = 0,667$  byla pro výpočet použita hodnota  $(I_{\text{CH}}/I_{\text{CH}_3})_{\text{HA}} = 0,683 \pm 0,005$  stanovená na třech vzorcích HA (**tab. 2.2**). Hodnota relativní standardní nejistoty integrálních intenzit byla odhadnuta na 2 % a kombinovaná nejistota *DD*<sub>NMR,1a</sub> byla vypočítána jako odmocnina ze sumy druhých mocnin jednotlivých příspěvků.

**Tab. 2.2** Vzorky HA použité pro stanovení hodnoty  $(I_{\text{CH}}/I_{\text{CH}_3})_{\text{HA}}$ .

Vzorek	<i>M</i> <sub>w,HA</sub> (kg mol <sup>-1</sup> )	<i>M</i> <sub>w,HA</sub> / <i>M</i> <sub>n,HA</sub>
HyA-280914	13,34	1,60
HyA-131014	18,99	1,58
SH-II-250810	37,91	1,47

### 3.4.2 Metoda NMR,1b

Z  $^1\text{H}$  NMR spektra získaného postupem popsaným v metodě NMR,1a byla odečtena integrální intenzita acetylových protonů GlcNAc jednotek  $I_{\text{CH}_3}$  (1,80–2,30 ppm), vyjádřená relativně k integrální intenzitě methylových protonů TMSP- $d_4$  (–0,20–0,20 ppm), jejíž hodnota byla nastavena na 1,0 (**obr. 3.1**). Porovnáním hodnoty HA a daHA byl podle vzorce (2.2) vypočítán  $DD_{\text{NMR},1b}$  (%):

$$DD_{\text{NMR},1b} = \left[ 1 - \frac{(I_{\text{CH}_3})_{\text{daHA}}}{(I_{\text{CH}_3})_{\text{HA}}} \right] \cdot 100 \quad (2.2)$$

Stejně jako v metodě NMR,1a byla hodnota relativní standardní nejistoty integrálních intenzit odhadnuta na 2 % a kombinovaná nejistota  $DD_{\text{NMR},1a}$  vypočítána jako odmocnina ze sumy druhých mocnin jednotlivých příspěvků.

### 3.4.3 Metoda NMR,2

Vzorek daHA (10,0 mg) byl rozpuštěn v  $\text{D}_2\text{O}$  (750  $\mu\text{L}$ ) obsahující TMSP- $d_4$  (1,44 mg  $\text{mL}^{-1}$ ) a byl k němu přidán 8,5% roztok NaOH v  $\text{D}_2\text{O}$  (100  $\mu\text{L}$ ) obsahující TMSP- $d_4$  (1,44 mg  $\text{mL}^{-1}$ ), aby byl výsledný hmotnostní zlomek NaOH 1 % (Buffa et al., 2015). Roztok byl převeden do kyvety a na spektrometru Bruker Avance III 500 bylo při laboratorní teplotě změřeno jeho  $^1\text{H}$  NMR spektrum. Spektrum bylo rozšířeno lineární predikcí na 64k datových bodů, doplněno nulami na 128k datových bodů, vynásobeno exponenciální apodizační funkcí (0,50 Hz) a byla provedena korekce základní linie. Chemické posuny byly vztaženy k chemickému posunu vnitřního standardu TMSP- $d_4$  (0,00 ppm). Ze spektra byly odečteny integrální intenzity anomerních protonů  $I_{\text{CH}}$  (4,35–4,68 ppm) a protonu sousedícího s aminoskupinou  $I_{\text{CHNH}_2}$  (2,70–2,86 ppm), z nichž byl podle vzorce (2.3) vypočítán  $DD_{\text{NMR},2}$ :

$$DD_{\text{NMR},2} = 2 \left( \frac{I_{\text{CHNH}_2}}{I_{\text{CH}}} \right)_{\text{daHA}} \cdot 100 \quad (2.3)$$

Hodnota relativní standardní nejistoty  $I_{\text{CH}}$  byla odhadnuta na 2 % a  $I_{\text{CHNH}_2}$  na 5 %, s ohledem na očekávané ovlivnění  $I_{\text{CHNH}_2}$  šumem. Kombinovaná nejistota  $DD_{\text{NMR},2}$  byla vypočítána jako odmocnina ze sumy druhých mocnin jednotlivých příspěvků.

### 3.5 DEAMINAČNÍ ŠTĚPENÍ DEACETYLOVANÉHO HYALURONANU

#### 3.5.1 Vývoj metody

##### Metoda 1a

K roztoku (100  $\mu\text{L}$ ) hydrochloridu D-glukosaminu ve vodě o koncentraci 1 mg mL<sup>-1</sup> byl přidán 2% vodný roztok kyseliny octové (500  $\mu\text{L}$ ), 1,0 M vodný roztok kyseliny sírové (142  $\mu\text{L}$ ) a 5,5 M vodný roztok NaNO<sub>2</sub> (358  $\mu\text{L}$ ). Směs byla míchána 15 min při laboratorní teplotě. Potom byla neutralizována 0,3 M roztokem NaOH (1 mL), byl k ní přidán 1,0 M roztok NaOH (100  $\mu\text{L}$ ) a 0,5 M roztok PMP v methanolu (500  $\mu\text{L}$ ) a po důkladném promíchání vortexem byla zahřívána 60 min v olejové lázni na 70 °C (Han et al., 2015). Po ochlazení byla směs neutralizována třemi kapkami 37% HCl a extrahována CHCl<sub>3</sub> (3 × 2 mL). Vodná fáze byla přefiltrována přes nylonový stříkačkový filtr Acrodisc 13 mm s póry o velikosti 0,22  $\mu\text{m}$  do HPLC vialky a změřena pomocí HPLC-UV a UPLC-UV/MS.

##### HPLC-UV metoda

Systém:	Alliance e2695 Separations Module s UV-vis detektorem 2489 (obojí Waters Corporation, USA)
Analytická kolona:	Atlantis dC18 5 $\mu\text{m}$ , 100 Å, 250 × 4,6 mm (Waters Corporation, USA)
Teplota kolony:	30 °C
Teplota vzorků:	10 °C
Objem nástřiku:	10 $\mu\text{L}$
Průtok mobilní fáze:	1 mL min <sup>-1</sup>
Mobilní fáze A:	10 mM CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> pH 5,0
Mobilní fáze B:	Acetonitril
Detekce:	245 nm
Gradient:	

Čas (min)	Mobilní fáze A (%)	Mobilní fáze B (%)
0	80	20
40	75	25
70	75	25
72	50	50
82	50	50
90	80	80

##### UPLC-UV/MS metoda

Systém:	Acquity UPLC I-class s UPLC TUV detektorem a s hmotnostním spektrometrem Synapt G1 HDMS (vše Waters Corporation, USA)
Kolona:	Jupiter C18 5 $\mu\text{m}$ , 300 Å, 250 × 4,6 mm (Phenomenex, USA)
Teplota kolony:	Laboratorní

Teplota vzorků:	10 °C
Objem nástřiku:	5 µL
Průtok mobilní fáze:	0,5 mL min <sup>-1</sup>
Mobilní fáze A:	10 mM CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> pH 5,0
Mobilní fáze B:	Acetonitril
Gradient:	Stejný jako v HPLC-UV metodě
UV detekce:	245 nm
MS detekce:	Pro analýzu byla použita ionizace elektrosprejem v pozitivním módu (ESI <sup>+</sup> ) s následujícím nastavením parametrů (Šmejkalová et al., 2012):
	Mass range: 50–2000
	Scan rate: 1 Hz
	Spray capillary voltage: 3,0 kV
	Source temperature: 100 °C
	Desolvation temperature: 250 °C
	Sampling cone voltage: 100 V
	Extraction cone: 5 V
	Cone gas flow (N <sub>2</sub> ): 100 L h <sup>-1</sup>
	Desolvation gas flow (N <sub>2</sub> ): 800 L h <sup>-1</sup>

### **Metoda 1b**

K roztoku (100 µL) hydrochloridu D-glukosaminu ve vodě o koncentraci 1 mg mL<sup>-1</sup> byl přidán 1,0 M vodný roztok kyseliny sírové (142 µL) a 5,5 M vodný roztok NaNO<sub>2</sub> (358 µL). Směs byla míchána 15 min při laboratorní teplotě, potom byla alkalizována 1,0 M roztokem NaOH (300 µL) a byl k ní přidán 0,5 M roztok PMP v methanolu (500 µL). Další postup byl stejný jako v metodě 1a.

### **Metoda 1c**

K roztoku (100 µL) hydrochloridu D-glukosaminu ve vodě o koncentraci 1 mg mL<sup>-1</sup> byl přidán 1,8 M vodný roztok kyseliny octové (500 µL) a 5,5 M vodný roztok NaNO<sub>2</sub> (22 µL). Směs byla míchána 90 min při laboratorní teplotě (Chen et al., 2009), potom byla alkalizována 1,0 M roztokem NaOH (1 mL) a byl k ní přidán 0,5 M roztok PMP v methanolu (500 µL). Další postup byl stejný jako v metodě 1a. HPLC-UV měření bylo zopakováno po 15 h pro ověření stability vzorku. Vzorek byl mezi měřeními uchováván v autosampleru (10 °C/tma).

## Metoda 2a

Hydrochlorid D-glukosaminu (1,0 mg, 4,64  $\mu\text{mol}$ ) byl rozpuštěn v 1,8 M vodném roztoku kyseliny octové (500  $\mu\text{L}$ ), k roztoku byl přidán 5,5 M vodný roztok  $\text{NaNO}_2$  (22  $\mu\text{L}$ ) a směs byla míchána 90 min při laboratorní teplotě. Potom byla neutralizována 1,0 M roztokem  $\text{NaOH}$  (1000  $\mu\text{L}$ ), byl k ní přidán  $\text{MeOH}$  (1,0 mL) a PMP (440 mg, 2,53 mmol), byla alkalizována 10 M roztokem  $\text{NaOH}$  (90  $\mu\text{L}$ ) a po důkladném promíchání vortexem zahřívána 60 min v olejové lázni na 70 °C. Po ochlazení byla směs neutralizována 37%  $\text{HCl}$  (115  $\mu\text{L}$ ) a extrahována  $\text{CHCl}_3$  (5  $\times$  2 mL). Vodná frakce byla přefiltrována do HPLC vialky a změřena pomocí HPLC-UV.

### HPLC-UV metoda

Systém:	Alliance e2695 Separations Module s UV-vis detektorem 2489 (obojí Waters Corporation, USA)
Analytická kolona:	Atlantis dC18 5 $\mu\text{m}$ , 100 Å, 250 $\times$ 4,6 mm (Waters Corporation, USA)
Teplota kolony:	30 °C
Teplota vzorků:	10 °C
Objem nástřiku:	10 $\mu\text{L}$
Průtok mobilní fáze:	1 mL $\text{min}^{-1}$
Mobilní fáze A:	10 mM $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ pH 5,0
Mobilní fáze B:	Acetonitril
Detekce:	245 nm
Gradient:	

Čas (min)	Mobilní fáze A (%)	Mobilní fáze B (%)
0	75	25
25	60	40
30	60	40
32	20	80
38	20	80
40	75	25
54	75	25

## Metoda 2b

Hydrochlorid D-glukosaminu (1,0 mg, 4,64  $\mu\text{mol}$ ) nebo vzorek daHA S8 (1,0 mg) byl rozpuštěn v 1,8 M vodném roztoku kyseliny octové (500  $\mu\text{L}$ ), k roztoku byl přidán 5,5 M vodný roztok  $\text{NaNO}_2$  (22  $\mu\text{L}$ ) a směs byla míchána 90 min při laboratorní teplotě. Potom byla neutralizována 1,0 M roztokem  $\text{NaOH}$  (600  $\mu\text{L}$ ), byl k ní přidán  $\text{MeOH}$  (1,0 mL) a PMP (440 mg, 2,53 mmol), byla alkalizována 10 M roztokem  $\text{NaOH}$  (150  $\mu\text{L}$ ) a po důkladném promíchání vortexem zahřívána 60 min v olejové lázni na 70 °C. Po ochlazení byla směs

neutralizována 37% HCl (115  $\mu$ L) a extrahována  $\text{CHCl}_3$  ( $5 \times 2$  mL). Vodná frakce byla přefiltrována do HPLC vialky a změřena pomocí HPLC-UV a UPLC-UV/MS.

#### *HPLC-UV metoda*

Stejná jako v metodě 2a.

#### *UPLC-UV/MS metoda*

Systém: Acquity UPLC I-class s UPLC TUV detektorem a s hmotnostním spektrometrem Synapt G1 HDMS (vše Waters Corporation, USA)

Kolona: Jupiter Proteo 4  $\mu$ m, 90 Å, 250  $\times$  4,6 mm (Phenomenex, USA)

Teplota kolony: Laboratorní

Teplota vzorků: 10 °C

Objem nástřiku: 5  $\mu$ L

Průtok mobilní fáze: 0,5 mL min<sup>-1</sup>

Mobilní fáze A: 10 mM  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  pH 5,0

Mobilní fáze B: Acetonitril

UV detekce: 245 nm

MS detekce: Pro analýzu byla použita ionizace elektrosprejem v pozitivním módu (ESI<sup>+</sup>) s následujícím nastavením parametrů (Šmejkalová et al., 2012):

Mass range: 50–2000

Scan rate: 1 Hz

Spray capillary voltage: 3,0 kV

Source temperature: 100 °C

Desolvation temperature: 250 °C

Sampling cone voltage: 100 V

Extraction cone: 5 V

Cone gas flow ( $\text{N}_2$ ): 100 L h<sup>-1</sup>

Desolvation gas flow ( $\text{N}_2$ ): 800 L h<sup>-1</sup>

#### Gradient:

Čas (min)	Mobilní fáze A (%)	Mobilní fáze B (%)
0	75	25
25	60	40
30	60	40
32	20	80
38	20	80
40	75	25
54	75	25

### Metoda 3a

Hydrochlorid D-glukosaminu (1,0 mg, 4,64  $\mu\text{mol}$ ) byl rozpuštěn v 1,8 M vodném roztoku kyseliny octové (200  $\mu\text{L}$ ), k roztoku byl přidán 5,5 M vodný roztok  $\text{NaNO}_2$  (10  $\mu\text{L}$ ) a směs byla míchána 90 min při laboratorní teplotě. Potom byla reakce zastavena přidávkem 1,0 M roztoku  $\text{NaOH}$  (120  $\mu\text{L}$ ) a voda byla odpařena proudem dusíku. K odparku byly postupně přidány PMP (100 mg, 0,58 mmol),  $\text{MeOH}$  (100  $\mu\text{L}$ ),  $\text{H}_2\text{O}$  (100  $\mu\text{L}$ ) a  $\text{Et}_3\text{N}$  (100  $\mu\text{L}$ , 0,72 mmol) a po důkladném promíchání vortexem byla směs zahřívána 60 min na 60 °C v třepaném inkubátoru. Po ochlazení byly ke směsi přidány  $\text{H}_2\text{O}$  (400  $\mu\text{L}$ ) a  $\text{NaCl}$  (30 mg) a směs byla extrahována  $\text{CHCl}_3$  (5  $\times$  700  $\mu\text{L}$ ). Vodná frakce byla přefiltrována do HPLC vialky a změřena pomocí HPLC-UV.

#### HPLC-UV metoda

Systém: Alliance e2695 Separations Module s UV-vis detektorem 2489 (obojí Waters Corporation, USA)  
Analytická kolona: Jupiter Proteo 4  $\mu\text{m}$ , 90 Å, 250  $\times$  4,6 mm (Phenomenex, USA)  
Teplota kolony: 30 °C  
Teplota vzorků: 10 °C  
Objem nástřiku: 10  $\mu\text{L}$   
Průtok mobilní fáze: 1  $\text{mL min}^{-1}$   
Mobilní fáze A: 10 mM  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  pH 5,0  
Mobilní fáze B: Acetonitril  
Detekce: 245 nm

#### Gradient:

Čas (min)	Mobilní fáze A (%)	Mobilní fáze B (%)
0	75	25
25	60	40
30	60	40
32	20	80
38	20	80
40	75	25
54	75	25

### Metoda 3b

Vzorek daHA S2 (1,0 mg) nebo S8 (1,0 mg) byl rozpuštěn v 1,8 M vodném roztoku kyseliny octové (200  $\mu\text{L}$ ), k roztoku byl přidán 5,5 M vodný roztok  $\text{NaNO}_2$  (10  $\mu\text{L}$ ) a směs byla míchána 90 min nebo 24 h při laboratorní teplotě. Potom byla reakce zastavena přidávkem 1,0 M roztoku  $\text{NaOH}$  (120  $\mu\text{L}$ ) a 13,3  $\mu\text{L}$  výsledného roztoku v případě vzorku S2 nebo 5  $\mu\text{L}$  výsledného roztoku v případě vzorku S8 bylo odpipetováno do HPLC vialky obsahující 1 mL

H<sub>2</sub>O (koncentrace přibližně 40 µg mL<sup>-1</sup> pro vzorek S2 a 15 µg mL<sup>-1</sup> pro vzorek S8). Roztoky byly změřeny pomocí UPLC-MS.

#### UPLC-MS metoda

Systém: Acquity UPLC I-class s hmotnostním spektrometrem Synapt G2-Si (obojí Waters Corporation, USA)  
 Kolona: Jupiter Proteo 4 µm, 90 Å, 250 × 4,6 mm (Phenomenex, USA)  
 Teplota kolony: Laboratorní  
 Teplota vzorků: 10 °C  
 Objem nástřiku: 5 µL  
 Průtok mobilní fáze: 0,5 ml min<sup>-1</sup>  
 Mobilní fáze A: 0,1 % HCOOH v H<sub>2</sub>O  
 Mobilní fáze B: Acetonitril  
 MS detekce: Pro analýzu byla použita ionizace elektrosprejem v negativním módu (ESI<sup>-</sup>) s následujícím nastavením parametrů (Čožíková et al., 2017):

Mass range: 50–1850	Nebulizer gas (N <sub>2</sub> ): 6,0 bar
Scan rate: 1 Hz	Trap collision voltage: 4,0 V
Spray capillary voltage: 2,7 kV	Transfer collision voltage: 2,0 V
Source temperature: 100 °C	Trap gas flow (Ar): 2,0 mL min <sup>-1</sup>
Desolvation temperature: 500 °C	Cell gas flow (He): 180,0 mL min <sup>-1</sup>
Sampling cone voltage: 60 V	Drift gas flow (N <sub>2</sub> ): 90,0 mL min <sup>-1</sup>
Source offset: 80 V	Wave height: 40,0 V
Cone gas flow (N <sub>2</sub> ): 50 L h <sup>-1</sup>	Wave velocity: 600 m s <sup>-1</sup>
Desolvation gas flow (N <sub>2</sub> ): 800 L h <sup>-1</sup>	

#### Gradient:

Čas (min)	Mobilní fáze A (%)	Mobilní fáze B (%)
0	100	0
3	100	0
33	70	30
34	20	80
36	20	80
37	100	0
45	100	0

Pro stanovení elementárního složení iontů (**tab. D1**) byla koncentrace finálního roztoku vzorku S2 zvýšena na 150 µg mL<sup>-1</sup> a koncentrace finálního roztoku vzorku S8 byla zvýšena na 45 µg mL<sup>-1</sup>. Pro kalibraci *m/z* pomocí LockSpray byl použit leucin-enkefalin (*m/z* 554,2615, [M-H]<sup>-</sup>).



### Metoda 3c

Oktadekasacharid (1,0 mg, 0,29  $\mu\text{mol}$ ) nebo eikosasacharid (1,0 mg, 0,26  $\mu\text{mol}$ ) s GlcNAc na redukujícím konci byl rozpuštěn v 1,8 M vodném roztoku kyseliny octové (200  $\mu\text{L}$ ), k roztoku byl přidán 5,5 M vodný roztok  $\text{NaNO}_2$  (10  $\mu\text{L}$ ) a směs byla míchána 90 min při laboratorní teplotě. Potom byla reakce zastavena přidávkem 1,0 M roztoku  $\text{NaOH}$  (120  $\mu\text{L}$ ) a 16  $\mu\text{L}$  výsledného roztoku bylo odpipetováno do HPLC vialky obsahující 1 mL  $\text{H}_2\text{O}$  (koncentrace přibližně 48  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Pro porovnání byla provedena referenční příprava, v níž bylo 10  $\mu\text{L}$  vodného roztoku  $\text{NaNO}_2$  nahrazeno 10  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$ . Roztoky byly změřeny pomocí UPLC-MS jako v metodě 3b.

### Metoda 4a

Vzorek daHA S8 (1,0 mg) byl rozpuštěn v 1,8 M vodném roztoku kyseliny octové (200  $\mu\text{L}$ ), k roztoku byl přidán 5,5 M vodný roztok  $\text{NaNO}_2$  (10  $\mu\text{L}$ ) a směs byla míchána 90 min při laboratorní teplotě. Potom byla reakce zastavena přidávkem 1,0 M roztoku  $\text{NaOH}$  (120  $\mu\text{L}$ ) a voda byla odpařena proudem dusíku. K odparku byly postupně přidány PMP (100 mg, 0,58 mmol),  $\text{MeOH}$  (100  $\mu\text{L}$ ),  $\text{H}_2\text{O}$  (100  $\mu\text{L}$  nebo 200  $\mu\text{L}$ ) a  $\text{Et}_3\text{N}$  (50  $\mu\text{L}$ , 75  $\mu\text{L}$  nebo 100  $\mu\text{L}$ ) a po důkladném promíchání vortexem byla směs zahřívána 60 min na 60  $^\circ\text{C}$  v třepaném inkubátoru. Po ochlazení byly ke směsi přidány  $\text{H}_2\text{O}$  (500  $\mu\text{L}$  nebo 400  $\mu\text{L}$ ) a  $\text{NaCl}$  (30 mg) a směs byla extrahována  $\text{CHCl}_3$  ( $5 \times 700 \mu\text{L}$ ). Vodná frakce byla přefiltrována do HPLC vialky a změřena pomocí HPLC-UV.

#### *HPLC-UV metoda*

System:	Alliance e2695 Separations Module s UV-vis detektorem 2489 (obojí Waters Corporation, USA)
Analytická kolona:	Jupiter Proteo 4 $\mu\text{m}$ , 90 $\text{Å}$ , 250 $\times$ 4,6 mm (Phenomenex, USA)
Teplota kolony:	60 $^\circ\text{C}$
Teplota vzorků:	10 $^\circ\text{C}$
Objem nástřiku:	10 $\mu\text{L}$
Průtok mobilní fáze:	1 $\text{mL min}^{-1}$
Mobilní fáze A:	10 mM $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ pH 5,0
Mobilní fáze B:	Acetonitril
Detekce:	245 nm

Gradient:

Čas (min)	Mobilní fáze A (%)	Mobilní fáze B (%)
0	90	10
10	80	20
18	79	21
30	60	40
32	25	75
36	25	75
38	90	10
50	90	10

#### Metoda 4b

Vzorek daHA S8 (1,0 mg) byl rozpuštěn v 1,8 M vodném roztoku kyseliny octové (200  $\mu$ L), k roztoku byl přidán 5,5 M vodný roztok NaNO<sub>2</sub> (10  $\mu$ L) a směs byla míchána 90 min při laboratorní teplotě. Potom byla reakce zastavena přidavkem 1,0 M roztoku NaOH (120  $\mu$ L) a voda byla odpařena proudem dusíku. K odparku byly postupně přidány H<sub>2</sub>O (200  $\mu$ L), Et<sub>3</sub>N (100  $\mu$ L), MeOH (100  $\mu$ L) a PMP (100 mg, 0,58 mmol) a po důkladném promíchání vortexem byla směs zahřívána 60 min na 60 °C v třepaném inkubátoru. Po ochlazení byly ke směsi přidány H<sub>2</sub>O (400  $\mu$ L) a NaCl (30 mg) a směs byla extrahována CHCl<sub>3</sub> (5  $\times$  700  $\mu$ L). Další postup byl stejný jako v metodě 4a.

#### Metoda 4c

Vzorek daHA S8 (1,0 mg) byl rozpuštěn v 1,8 M vodném roztoku kyseliny octové (200  $\mu$ L), k roztoku byl přidán 5,5 M vodný roztok NaNO<sub>2</sub> (10  $\mu$ L) a směs byla míchána 90 min při laboratorní teplotě. Potom byla reakce zastavena přidavkem 1,0 M roztoku NaOH (120  $\mu$ L) a voda byla odpařena proudem dusíku. K odparku byly postupně přidány H<sub>2</sub>O (200  $\mu$ L), MeOH (100  $\mu$ L) a Et<sub>3</sub>N (100  $\mu$ L) a směs byla míchána za dané teploty po danou dobu (**tab. 3.5**). Potom byl ke směsi přidán PMP (100 mg, 0,58 mmol) a po důkladném promíchání vortexem byla zahřívána 60 min na 60 °C v třepaném inkubátoru. Po ochlazení byly ke směsi přidány H<sub>2</sub>O (400  $\mu$ L) a NaCl (30 mg) a směs byla extrahována CHCl<sub>3</sub> (5  $\times$  700  $\mu$ L). Další postup byl stejný jako v metodě 4a.

#### 3.5.2 Finální metoda

Vzorek daHA (1,0 mg) byl rozpuštěn v 1,8 M vodném roztoku kyseliny octové (200  $\mu$ L), k roztoku byl přidán 5,5 M vodný roztok NaNO<sub>2</sub> (10  $\mu$ L) a směs byla míchána 90 min při laboratorní teplotě. Potom byla reakce zastavena přidavkem 1,0 M roztoku NaOH (120  $\mu$ L)

a voda byla odpařena proudem dusíku. K odparku byly postupně přidány H<sub>2</sub>O (200 µL), MeOH (100 µL) a Et<sub>3</sub>N (100 µL) a směs byla míchána 60 min při laboratorní teplotě. Potom byl ke směsi přidán PMP (100 mg, 0,58 mmol) a po důkladném promíchání vortexem byla zahřívána 60 min na 60 °C v třepaném inkubátoru. Po ochlazení byly ke směsi přidány H<sub>2</sub>O (400 µL) a NaCl (30 mg) a směs byla extrahována CHCl<sub>3</sub> (5 × 700 µL). Vodná frakce byla přefiltrována do HPLC vialky a změřena pomocí HPLC-UV.

#### HPLC-UV metoda

Systém: Alliance e2695 Separations Module s UV-vis detektorem 2489 (obojí Waters Corporation, USA)  
 Analytická kolona: Jupiter Proteo 4 µm, 90 Å, 250 × 4,6 mm (Phenomenex, USA)  
 Teplota kolony: 60 °C  
 Teplota vzorků: 10 °C  
 Objem nástřiku: 10 µL  
 Průtok mobilní fáze: 1 mL min<sup>-1</sup>  
 Mobilní fáze A: 10 mM CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> pH 5,0  
 Mobilní fáze B: Acetonitril  
 Detekce: 245 nm

#### Gradient:

Čas (min)	Mobilní fáze A (%)	Mobilní fáze B (%)
0	90	10
10	80	20
18	79	21
30	60	40
32	25	75
36	25	75
38	90	10
50	90	10

Pro stanovení elementárního složení iontů (**tab. D2**) bylo 30 µL finálního roztoku vzorku S8 zředěno 970 µL H<sub>2</sub>O a změřeno pomocí UPLC-MS jako v metodě 3b. Pro kalibraci *m/z* pomocí LockSpray byl použit leucin-enkefalin (*m/z* 554,2615, [M-H]<sup>-</sup>).

Z ploch oligosacharidů odečtených z HPLC-UV chromatogramu byl podle vzorce (2.4) vypočítán  $DD_{\text{HPLC},1}$  (%):

$$DD_{\text{HPLC},1} = \frac{\sum_{i=1}^k \left( \frac{A_i}{RRF_i} \right)}{\sum_{i=1}^k \left( i \cdot \frac{A_i}{RRF_i} \right)} \cdot 100, \quad (2.4)$$

kde  $A_i$  je plocha  $\text{GlcA}_{\text{PMP}}$  nebo lichého oligosacharidu s  $\text{GlcA}_{\text{PMP}}$  na redukujícím konci (**tab. D3**),  $i$  je počet disacharidových jednotek v původním sudém oligosacharidu s aMan na redukujícím konci ( $i = 1$  pro  $\text{GlcA}_{\text{PMP}}$ ,  $i = 2$  pro  $3_{\text{PMP}}$ , ...) a  $RRF_i$  je relativní odezvoový faktor oligosacharidu vůči  $\text{GlcA}_{\text{PMP}}$ , vyjádřený jako podíl molárních absorpčních koeficientů:

$$RRF_i = \frac{\varepsilon_i}{\varepsilon_1}, \quad (2.5)$$

kde  $\varepsilon_1$  je molární absorpční koeficient  $\text{GlcA}_{\text{PMP}}$  a  $\varepsilon_i$  jsou molární absorpční koeficienty lichých oligosacharidů derivatizovaných PMP. Pro oligosacharidy od trisacharidu ( $i = 2$ ) po pentadekasacharid ( $i = 8$ ) byly hodnoty  $RRF_i$  stanoveny šestibodovou kalibrací s použitím standardů (**tab. 2.3**) a pro delší oligosacharidy ( $i \geq 9$ ), jejichž standardy nebyly dostupné, byla použita hodnota  $RRF_i = 0,91$ . Hodnota relativní standardní nejistoty  $A_i$  byla odhadnuta na 15 % a kombinovaná nejistota  $DD_{\text{HPLC},1}$  byla vypočítána pomocí Kragtenova algoritmu (Kragten, 1994).

**Tab. 2.3** Retenční časy ( $t_R$ ) a relativní odezvové faktory ( $RRF_i$ )  $\text{GlcA}_{\text{PMP}}$  a oligosacharidů s  $\text{GlcA}_{\text{PMP}}$  na redukujícím konci ( $i$  označuje počet disacharidových jednotek v původním sudém oligosacharidu).

Zkratka	$i$	$t_R$ (min)	$RRF_i$
$\text{GlcA}_{\text{PMP}}$	1	$25,58 \pm 0,02$	1,00
$3_{\text{PMP}}$	2	$18,39 \pm 0,03$	$1,03 \pm 0,01$
$5_{\text{PMP}}$	3	$16,33 \pm 0,03$	$1,05 \pm 0,01$
$7_{\text{PMP}}$	4	$14,91 \pm 0,03$	$1,06 \pm 0,02$
$9_{\text{PMP}}$	5	$13,74 \pm 0,03$	$1,07 \pm 0,01$
$11_{\text{PMP}}$	6	$12,74 \pm 0,03$	$1,04 \pm 0,01$
$13_{\text{PMP}}$	7	$11,86 \pm 0,03$	$0,90 \pm 0,02$
$15_{\text{PMP}}$	8	$11,05 \pm 0,02$	$0,92 \pm 0,04$

Experimentální distribuce aminoskupin byla získána v podobě souboru molárních zlomků jednotlivých oligosacharidů normalizací ploch píků ( $A_i$ ) pomocí vzorce (2.6):

$$x_i = \frac{\frac{A_i}{RRF_i}}{\sum_{i=1}^k \left( \frac{A_i}{RRF_i} \right)} \quad (2.6)$$

*Ukázkový výpočet  $DD_{\text{HPLC},1}$*

Ve vzorku S18 byly pro  $\text{GlcA}_{\text{PMP}}$ ,  $3_{\text{PMP}}$ ,  $5_{\text{PMP}}$ ,  $7_{\text{PMP}}$ ,  $9_{\text{PMP}}$  a  $11_{\text{PMP}}$  nalezeny plochy  $7,939 \cdot 10^6$ ,  $5,665 \cdot 10^6$ ,  $2,017 \cdot 10^6$ ,  $0,629 \cdot 10^6$ ,  $0,199 \cdot 10^6$  a  $0,068 \cdot 10^6$  (**tab. D3**), které byly spolu s  $RRF_i$  (**tab. 2.3**) dosazeny do vzorce (2.4):

$$DD_{\text{HPLC},1} = \frac{\left(\frac{7,939}{1,00} + \frac{5,665}{1,03} + \frac{2,017}{1,05} + \frac{0,629}{1,06} + \frac{0,199}{1,07} + \frac{0,068}{1,04}\right) \cdot 10^6}{\left(1 \cdot \frac{7,939}{1,00} + 2 \cdot \frac{5,665}{1,03} + 3 \cdot \frac{2,017}{1,05} + 4 \cdot \frac{0,629}{1,06} + 5 \cdot \frac{0,199}{1,07} + 6 \cdot \frac{0,068}{1,04}\right) \cdot 10^6} \cdot 100$$

Postupnými úpravy bylo získáno:

$$DD_{\text{HPLC},1} = \frac{7,939 + 5,5 + 1,921 + 0,593 + 0,186 + 0,065}{7,939 + 11 + 5,763 + 2,374 + 0,930 + 0,392} \cdot 100$$

$$DD_{\text{HPLC},1} = \frac{16,204}{28,398} \cdot 100$$

$$DD_{\text{HPLC},1} = 57,1 \%$$

### 3.6 ENZYMATICKÉ ŠTĚPENÍ HYALURONANU

Sodná sůl kyseliny hyaluronové (1,0 mg,  $M_{w,HA} = 2\,200 \text{ kg mol}^{-1}$ ) byla rozpuštěna v 10 mM octanovém pufru o pH 5,3 obsahujícím 30 mM NaCl (300  $\mu\text{L}$ ), k roztoku byl přidán roztok BTH ve stejném pufru (2,8  $\mu\text{L}$ , 5,5  $\mu\text{L}$ , 11  $\mu\text{L}$  nebo 22  $\mu\text{L}$ , které odpovídaly přibližně 25 U, 50 U, 100 U nebo 200 U) a směs byla zahřívána 24 h na 37 °C v třepaném inkubátoru. Potom byl ke směsi přidán 1,0 M roztok NaOH (3,0  $\mu\text{L}$ ) a byla míchána 60 min při laboratorní teplotě. Následně byla směs částečně neutralizována 35% HCl (3,25  $\mu\text{L}$ ), byl k ní přidán MeOH (100  $\mu\text{L}$ ), Et<sub>3</sub>N (100  $\mu\text{L}$ ) a PMP (100 mg, 0,58 mmol) a po důkladném promíchání vortexem byla zahřívána 60 min na 60 °C v třepaném inkubátoru. Po ochlazení byl ke směsi přidán NaCl (60 mg) a byla extrahována CHCl<sub>3</sub> (5 × 700  $\mu\text{L}$ ). Vodná frakce byla přefiltrována do HPLC vialky a změřena pomocí HPLC-UV jako v oddíle 3.5.2.

### 3.7 ENZYMATICKÉ ŠTĚPENÍ DEACETYLOVANÉHO HYALURONANU

#### 3.7.1 Vývoj metody

##### Metoda 5a

Vzorek daHA (1,0 mg) byl rozpuštěn v 10 mM octanovém pufru o pH 5,3 obsahujícím 30 mM NaCl (1,0 mL), k roztoku byl přidán roztok BTH ve stejném pufru (19  $\mu\text{L}$ , přibližně 300 U) a směs byla zahřívána 24 h na 37 °C v třepaném inkubátoru. Potom bylo 15  $\mu\text{L}$  roztoku odebráno a zředěno 1,0 mL H<sub>2</sub>O. Výsledný roztok byl změřen pomocí UPLC-MS jako v metodě 3b. Normalizací ploch pík oligosacharidů odečtených z extrahovaných iontových chromatogramů byly vypočítány orientační molární zlomky jednotlivých oligosacharidů ve směsi ( $x_n^*$ ).

### **Metoda 5b**

Vzorek daHA (1,0 mg) byl rozpuštěn v 50 mM citrátovém pufru o pH 3,0 (1,0 mL), k roztoku byl přidán roztok TSH v H<sub>2</sub>O (10 µL, přibližně 180 U) a směs byla zahřívána 24 h na 37 °C v třepaném inkubátoru. Potom bylo 15 µL roztoku odebráno a zředěno 1,0 mL H<sub>2</sub>O. Další postup byl stejný jako v metodě 5a.

### **Metoda 5c**

Vzorek daHA (1,0 mg) byl rozpuštěn v H<sub>2</sub>O (1,0 mL), k roztoku byl přidán roztok SpHyl (20 µL, přibližně 150 U) ve směsi (1:1, v/v) glycerolu a 50 mM fosfátového pufru o pH 8,0 obsahujícího 500 mM NaCl a směs byla zahřívána 2 h na 37 °C v třepaném inkubátoru. Potom bylo 20 µL roztoku odebráno a zředěno 980 µL H<sub>2</sub>O. Další postup byl stejný jako v metodě 5a.

### **Metoda 5d**

Vybraný oligosacharid (1,0 mg) byl rozpuštěn v H<sub>2</sub>O (175 µL), k roztoku byl přidán roztok SpHyl (25 µL, přibližně 190 U) ve směsi (1 : 1, v/v) glycerolu a 50 mM fosfátového pufru o pH 8,0 obsahujícího 500 mM NaCl a směs byla zahřívána 2 h na 37 °C v třepaném inkubátoru. Potom byly 2 µL roztoku odebrány a zředěny 1,0 mL H<sub>2</sub>O. Výsledný roztok byl změřen pomocí UPLC-MS jako v metodě 3b.

### **3.7.2 Finální metoda**

Vzorek daHA (1,0 mg) byl rozpuštěn v H<sub>2</sub>O (175 µL), k roztoku byl přidán roztok SpHyl (25 µL, přibližně 190 U) ve směsi (1 : 1, v/v) glycerolu a 50 mM fosfátového pufru o pH 8,0 obsahujícího 500 mM NaCl a směs byla zahřívána 2 h na 37 °C v třepaném inkubátoru. Potom byly ke směsi postupně přidány MeOH (100 µL), PMP (100 mg, 0,58 mmol) a Et<sub>3</sub>N (100 µL) a po důkladném promíchání vortexem byla zahřívána 60 min na 60 °C v třepaném inkubátoru. Po ochlazení byla směs extrahována CHCl<sub>3</sub> (2 × 700 µL), 100 µL získané vodné fáze bylo zředěno H<sub>2</sub>O (400 µL), okyseleno 3,5% HCl (12 µL) a znovu extrahováno CHCl<sub>3</sub> (700 µL). Nakonec bylo 200 µL vodné fáze zředěno 200 µL H<sub>2</sub>O a výsledný roztok byl změřen pomocí HPLC-UV jako v oddíle 3.5.2.

Pro stanovení elementárního složení iontů (**tab. D4**) bylo 100 µL finálního roztoku vzorku S13 zředěno 300 µL H<sub>2</sub>O a změřeno pomocí UPLC-MS jako v metodě 3b, jen s tím rozdílem, že byl použit pozitivní mód ionizace. Pro kalibraci *m/z* pomocí LockSpray byl použit leucin-enkefalin (*m/z* 556,2771, [M+H]<sup>+</sup>).

Z ploch oligosacharidů odečtených z HPLC-UV chromatogramu byl podle vzorce (2.7) vypočítán  $DD_{\text{HPLC},2}$  (%):

$$DD_{\text{HPLC},2} = \frac{A_{\Delta 2,1,\text{PMP}} + A_{\Delta 4,1,\text{PMP}} + 2A_{\Delta 4,2,\text{PMP}} + 3A_{\Delta 8,3,\text{PMP}}}{\frac{1}{RRF} \cdot A_{\Delta 2,0,\text{PMP}} + A_{\Delta 2,1,\text{PMP}} + 2A_{\Delta 4,1,\text{PMP}} + 2A_{\Delta 4,2,\text{PMP}} + 4A_{\Delta 8,3,\text{PMP}}} \cdot 100, \quad (2.7)$$

kde  $A_{\Delta X_Y,\text{PMP}}$  ( $= A_n$ ) je plocha oligosacharidu  $\Delta X_Y,\text{PMP}$  ( $= n$ ) (**tab. D5**) a  $RRF$  je relativní odezvoový faktor  $\Delta 2_{0,\text{PMP}}$  vůči  $\Delta 4_{1,\text{PMP}}$ , vypočítaný jako podíl molárních absorpčních koeficientů ( $RRF = 1,38$ ). Hodnota relativní standardní nejistoty  $A_n$  byla odhadnuta na 15 % a kombinovaná nejistota  $DD_{\text{HPLC},2}$  byla vypočítána pomocí Kragtenova algoritmu (Kragten, 1994).

Experimentální distribuce aminoskupin byla získána v podobě souboru molárních zlomků oligosacharidů normalizací ploch píků  $A_n$  pomocí vzorce (2.8):

$$x_n = \frac{\frac{A_n}{RRF_n}}{\sum_{n=1}^k \left( \frac{A_n}{RRF_n} \right)}, \quad (2.8)$$

kde  $n$  označuje 4,5-nenasycený oligosacharid  $\Delta X_Y,\text{PMP}$ . Pro  $n = \Delta 2_{0,\text{PMP}}$  je  $RRF = 1,38$ , pro jiná  $n$  je  $RRF = 1$ .

## 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 4.1 DEACETYLACE HYALURONANU

Deacetylaci hyaluronanu o různé hmotnostně průměrné molární hmotnosti ( $M_{w,HA}$ ) byla provedena při několika teplotách v  $N_2H_4 \cdot H_2O$  a ve směsi  $N_2H_4 \cdot H_2O$ /sulfolan 1 : 1. Připravené vzorky daHA byly nejprve charakterizovány průměrnými parametry: distribucí molárních hmotností a stupněm deacetylaci (**tab. 3.1**).

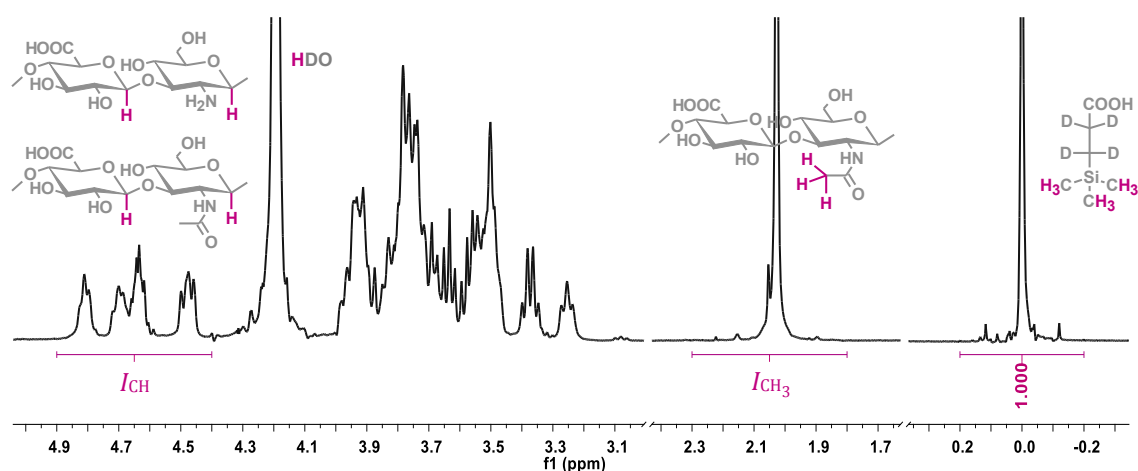
Hmotnostně průměrná molární hmotnost ( $M_w$ ) a disperzita molární hmotnosti ( $M_w/M_n$ ) byly stanoveny pomocí SEC-MALLS. Z výsledků byl patrný značný pokles molární hmotnosti během deacetylaci, který byl ve shodě s dřívějšími pozorováními (Babasola et al., 2014; Zhang et al., 2013). Výchozí molární hmotnost  $200 \text{ kg mol}^{-1}$  klesla v závislosti na podmínkách deacetylaci na  $4\text{--}22 \text{ kg mol}^{-1}$  a výchozí molární hmotnost  $460 \text{ kg mol}^{-1}$  klesla na  $3\text{--}88 \text{ kg mol}^{-1}$ , přičemž většina vzorků připravených ve směsi  $N_2H_4 \cdot H_2O$ /sulfolan 1 : 1, kromě těch deacetylovaných při  $55 \text{ }^\circ\text{C}$ , vykazovala vyšší hodnoty  $M_w$  a  $M_w/M_n$  než vzorky připravené v  $N_2H_4 \cdot H_2O$ .

Stupeň deacetylaci ( $DD$ ) vzorků byl určen pomocí  $^1\text{H}$  NMR spektroskopie postupem nepřímým (Babasola et al., 2014) a přímým (Buffa et al., 2015). Nepřímé stanovení (**obr. 3.1**) bylo založeno na porovnání integrálních intenzit acetylových protonů ( $I_{CH_3}$ ) před deacetylací a po deacetylaci. Jako reference byl zvolen buď signál anomerních protonů ( $DD_{NMR,1a}$ ), nebo signál methylových protonů vnitřního standardu  $\text{TMSP-}d_4$  ( $DD_{NMR,1b}$ ). Aby bylo možné signál anomerních protonů správně integrovat, bylo nutné spektrum měřit za zvýšené teploty ( $75 \text{ }^\circ\text{C}$ ), neboť při laboratorní teplotě byl částečně překryt zbytkovým signálem rozpouštědla HDO. Přímé stanovení (**obr. 3.2**) využívalo pro určení  $DD_{NMR,2}$  integrální intenzitu protonu sousedícího s aminoskupinou ( $I_{CHNH_2}$ ) a překryvu signálu anomerních protonů se signálem HDO zamezovalo zvýšením pH roztoku (1% NaOD).

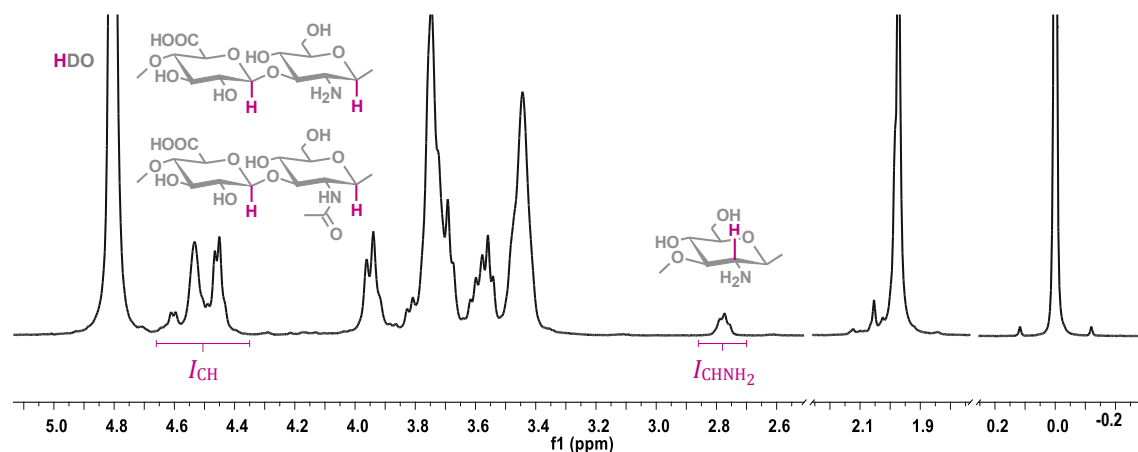
Hodnoty  $DD$  stanovené popsány metodami ( $DD_{NMR,1a}$ ,  $DD_{NMR,1b}$ ,  $DD_{NMR,2}$ ) byly porovnány pomocí Blandových–Altmanových diagramů (Giavarina, 2015). Zatímco mezi hodnotami  $DD_{NMR,1a}$  a  $DD_{NMR,1b}$  byla nalezena systematická odchylka (**obr. 3.3a**), mezi hodnotami  $DD_{NMR,1a}$  a  $DD_{NMR,2}$  byla nalezena odchylka proporcionální (**obr. 3.3b**). Podhodnocení  $DD_{NMR,1b}$  bylo nejspíše způsobeno tím, že byl za referenci zvolen signál, který nepocházel z daHA, nýbrž z nízkomolekulárního vnitřního standardu  $\text{TMSP-}d_4$ . Na druhé straně rozdíl mezi  $DD_{NMR,1a}$  a  $DD_{NMR,2}$  lze připsat tomu, že k integrální intenzitě  $I_{CH_3}$  přispívá několik signálů acetylových skupin s odlišným chemickým posunem, kdežto integrální intenzita  $I_{CHNH_2}$  odpovídá jedinému signálu. Acetylové skupiny s odlišným chemickým posunem totiž



mohou poskytovat mírně odlišné odezvy kvůli své rozdílné mobilitě a tím zkreslovat hodnotu  $I_{CH_3}$ . V souladu s touto hypotézou byl nárůst počtu signálů přispívajících k  $I_{CH_3}$  doprovázen zvětšením rozdílu mezi  $DD_{NMR,1a}$  a  $DD_{NMR,2}$  (**obr. 3.4**). Jinou příčinou rozdílu mezi  $DD_{NMR,1a}$  a  $DD_{NMR,2}$  by mohla být nižší mobilita acetylových protonů v  $D_2O$  oproti 1% NaOD. Zatímco při 85 °C v  $D_2O$  činila mobilita acetylových protonů hyaluronanu pouze 74 % z mobility protonů sukcinátu (Milas & Rinaudo, 2004), při 25 °C v 1% NaOD dosáhla hodnoty 97 % (Ret, Steiner, Gentilini, & Knaus, 2019).



**Obr. 3.1**  $^1H$  NMR spektrum (500 MHz) deacetylovaného hyaluronanu v  $D_2O$  s vnitřním standardem TMSP- $d_4$  změřené při 75 °C, vyznačené integrální intenzity byly použity pro výpočet  $DD_{NMR,1a}$  a  $DD_{NMR,1b}$ . Upraveno z lit. (Sedláček et al., 2019).

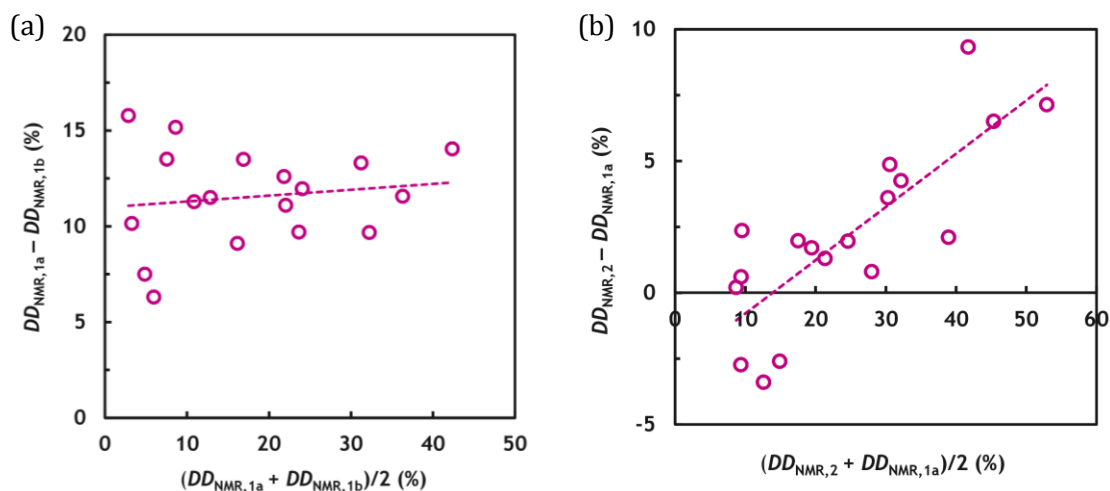


**Obr. 3.2**  $^1H$  NMR spektrum (500 MHz) deacetylovaného hyaluronanu v 1% roztoku NaOD s vnitřním standardem TMSP- $d_4$  změřené při laboratorní teplotě, vyznačené integrální intenzity byly použity pro výpočet  $DD_{NMR,2}$ . Upraveno z lit. (Sedláček et al., 2019).

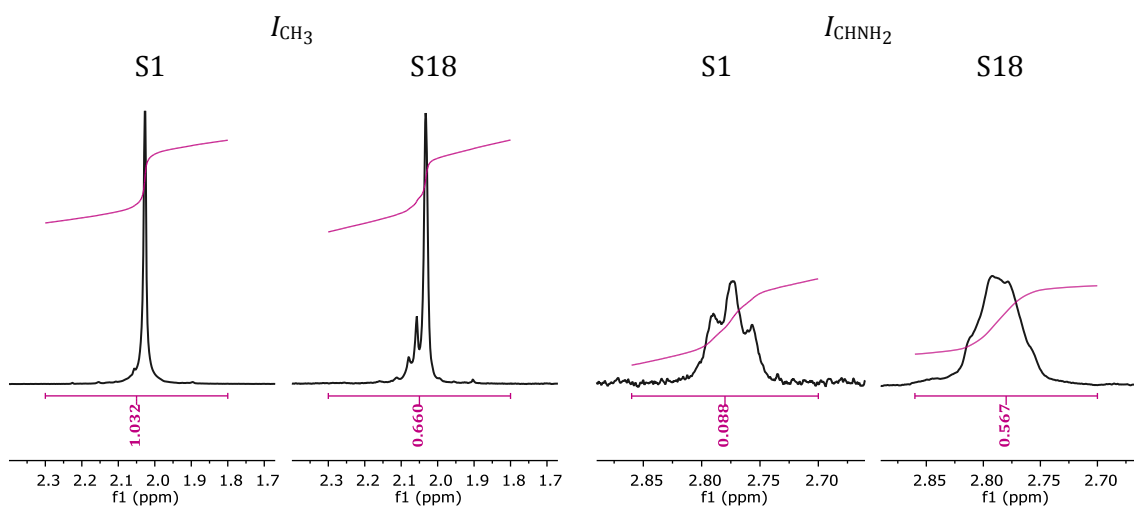
**Tab. 3.1** Charakterizace připravených vzorků deacetylovaného hyaluronanu pomocí SEC-MALLS ( $M_w$  a  $M_w/M_n$ ),  $^1\text{H}$  NMR spektroskopie ( $DD_{\text{NMR},1a}$ ,  $DD_{\text{NMR},1b}$  a  $DD_{\text{NMR},2}$ ) a HPLC-UV po deaminačním štěpení ( $DD_{\text{HPLC},1}$ ) a po enzymatickém štěpení ( $DD_{\text{HPLC},2}$ ). Podrobnosti jsou uvedeny v textu.

Vzorek	$M_{w,\text{HA}}$ ( $\text{kg mol}^{-1}$ )	Činidlo	$t$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	$M_w$ ( $\text{kg mol}^{-1}$ )	$M_w/M_n$	$DD_{\text{NMR},1a}$ (%)	$DD_{\text{NMR},1b}$ (%)	$DD_{\text{NMR},2}$ (%)	$DD_{\text{HPLC},1}$ (%)	$DD_{\text{HPLC},2}$ (%)
S1	200	$\text{N}_2\text{H}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$	55	$21,9 \pm 0,2$	$1,42 \pm 0,04$	$8,6 \pm 2,7$	$1,1 \pm 2,0$	$8,8 \pm 0,5$	$17,7 \pm 0,4$	$6,4 \pm 1,0$
S2	200	$\text{N}_2\text{H}_4\cdot\text{H}_2\text{O}/\text{sulfolan}$	55	$12,7 \pm 0,3$	$1,61 \pm 0,11$	$9,1 \pm 2,7$	$2,8 \pm 2,0$	$9,7 \pm 0,5$	$19,1 \pm 0,5$	$8,1 \pm 1,2$
S3	200	$\text{N}_2\text{H}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$	65	$7,5 \pm 0,1$	$1,58 \pm 0,06$	$14,3 \pm 2,5$	$0,8 \pm 2,0$	$10,9 \pm 0,6$	$22,3 \pm 0,6$	$9,9 \pm 1,4$
S4	200	$\text{N}_2\text{H}_4\cdot\text{H}_2\text{O}/\text{sulfolan}$	65	$21,3 \pm 0,3$	$1,90 \pm 0,10$	$18,6 \pm 2,4$	$7,1 \pm 1,9$	$20,3 \pm 1,1$	$24,4 \pm 0,7$	$18,3 \pm 2,2$
S5	200	$\text{N}_2\text{H}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$	75	$15,8 \pm 0,1$	$1,66 \pm 0,05$	$20,7 \pm 2,3$	$11,6 \pm 1,8$	$22,0 \pm 1,2$	$24,4 \pm 0,7$	$21,2 \pm 2,8$
S6	200	$\text{N}_2\text{H}_4\cdot\text{H}_2\text{O}/\text{sulfolan}$	75	$15,4 \pm 0,1$	$1,74 \pm 0,07$	$27,6 \pm 2,1$	$16,5 \pm 1,7$	$28,4 \pm 1,5$	$31,0 \pm 1,0$	$26,4 \pm 4,7$
S7	200	$\text{N}_2\text{H}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$	85	$4,4 \pm 0,1$	$1,31 \pm 0,07$	$28,5 \pm 2,1$	$18,8 \pm 1,7$	$32,1 \pm 1,7$	$36,4 \pm 1,2$	$25,3 \pm 5,0$
S8	200	$\text{N}_2\text{H}_4\cdot\text{H}_2\text{O}/\text{sulfolan}$	85	$9,8 \pm 0,2$	$1,59 \pm 0,08$	$37,9 \pm 1,8$	$24,6 \pm 1,5$	$40,0 \pm 2,2$	$43,4 \pm 1,6$	$35,1 \pm 8,0$
S9	460	$\text{N}_2\text{H}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$	55	$63,7 \pm 0,1$	$1,61 \pm 0,01$	$10,7 \pm 2,6$	$-5,0 \pm 2,1$	$8,0 \pm 0,4$	$17,8 \pm 0,4$	$5,9 \pm 1,0$
S10	460	$\text{N}_2\text{H}_4\cdot\text{H}_2\text{O}/\text{sulfolan}$	55	$41,8 \pm 0,1$	$2,28 \pm 0,02$	$8,3 \pm 2,7$	$-1,8 \pm 2,1$	$10,7 \pm 0,6$	$18,6 \pm 0,4$	$8,7 \pm 1,3$
S11	460	$\text{N}_2\text{H}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$	65	$43,0 \pm 0,1$	$1,90 \pm 0,03$	$16,2 \pm 2,4$	$1,0 \pm 2,0$	$13,6 \pm 0,7$	$19,5 \pm 0,4$	$10,8 \pm 1,5$
S12	460	$\text{N}_2\text{H}_4\cdot\text{H}_2\text{O}/\text{sulfolan}$	65	$87,6 \pm 0,4$	$1,80 \pm 0,03$	$16,5 \pm 2,4$	$5,3 \pm 1,9$	$18,5 \pm 1,0$	$20,7 \pm 0,5$	$16,2 \pm 2,1$
S13	460	$\text{N}_2\text{H}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$	75	$14,4 \pm 0,1$	$2,01 \pm 0,04$	$23,6 \pm 2,2$	$10,2 \pm 1,8$	$25,6 \pm 1,4$	$26,0 \pm 0,7$	$24,6 \pm 3,4$
S14	460	$\text{N}_2\text{H}_4\cdot\text{H}_2\text{O}/\text{sulfolan}$	75	$21,7 \pm 0,1$	$2,61 \pm 0,05$	$28,1 \pm 2,1$	$15,5 \pm 1,7$	$33,0 \pm 1,8$	$32,1 \pm 1,0$	$30,9 \pm 4,9$
S15	460	$\text{N}_2\text{H}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$	85	$6,6 \pm 0,1$	$1,61 \pm 0,02$	$30,1 \pm 2,0$	$18,1 \pm 1,7$	$34,3 \pm 1,8$	$33,2 \pm 1,0$	$31,2 \pm 4,6$
S16	460	$\text{N}_2\text{H}_4\cdot\text{H}_2\text{O}/\text{sulfolan}$	85	$17,1 \pm 0,3$	$2,63 \pm 0,05$	$37,1 \pm 1,8$	$27,4 \pm 1,5$	$46,4 \pm 2,5$	$42,6 \pm 1,4$	$40,6 \pm 6,9$
S17	460	$\text{N}_2\text{H}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$	95	$3,1 \pm 0,1$	$1,33 \pm 0,02$	$42,1 \pm 1,7$	$30,5 \pm 1,4$	$48,6 \pm 2,6$	$49,7 \pm 1,6$	$37,5 \pm 6,6$
S18	460	$\text{N}_2\text{H}_4\cdot\text{H}_2\text{O}/\text{sulfolan}$	95	$3,7 \pm 0,1$	$1,41 \pm 0,01$	$49,4 \pm 1,5$	$35,3 \pm 1,3$	$56,5 \pm 3,0$	$57,1 \pm 2,0$	$46,9 \pm 5,6$

$DD$  vzorků obecně vzrůstal se zvýšením teploty deacetylace a při použití směsi sulfolanu a  $N_2H_4 \cdot H_2O$  namísto čistého  $N_2H_4 \cdot H_2O$  (**tab. 3.1**). Toto pozorování lze vysvětlit tím, že zředění protického  $N_2H_4 \cdot H_2O$  aprotickým sulfolanem snížilo množství vodíkových vazeb mezi molekulami hydrazinu, čímž došlo ke zvýšení nukleofility volných elektronových párů na hydrazinu, který se v důsledku toho stal silnějším deacetylačním činidlem.



**Obř. 3.3** Blandovy–Altmanovy diagramy porovnávající hodnoty  $DD$  získané třemi různými metodami využívajícími  $^1H$  NMR spektroskopii: (a)  $DD_{NMR,1a}$  vs.  $DD_{NMR,1b}$ ; (b)  $DD_{NMR,2}$  vs.  $DD_{NMR,1a}$ . Upraveno z lit. (Sedláček et al., 2019).



**Obř. 3.4** Porovnání integrálních intenzit  $I_{CH_3}$  a  $I_{CHNH_2}$  pro vzorky S1 a S18. Intenzita  $I_{CH_3}$  byla použita pro výpočet  $DD_{NMR,1a}$  (8,6 % pro S1 a 49,4 % pro S18) a intenzita  $I_{CHNH_2}$  byla použita pro výpočet  $DD_{NMR,2}$  (8,8 % pro S1 a 56,5 % pro S18). Nárůst počtu signálů přispívajících k  $I_{CH_3}$  je doprovázen zvětšením rozdílu mezi  $DD_{NMR,1a}$  a  $DD_{NMR,2}$ .


## 4.2 STANOVENÍ DISTRIBUCE AMINOSKUPIN POMOCÍ DEAMINAČNÍHO ŠTĚPENÍ

Postup stanovení distribuce aminoskupin pomocí deaminačního štěpení byl následující: (i)  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-glykosidové vazby mezi GlcN a GlcA byly rozštěpeny *in situ* generovanou kyselinou dusitou za vzniku sudých oligosacharidů s 2,5-anhydro-D-mannosou (aMan) na redukujícím konci (**obr. 1.7**); (ii) oligosacharidy byly na redukujícím konci derivatizovány dvěma molekulami 1-fenyl-3-methyl-2-pyrazolin-5-onu (PMP) a separovány pomocí HPLC-UV; (iii) z ploch píků oligosacharidů korigovaných pomocí relativních odezvových faktorů ( $RRF_i$ ) byl vypočítán  $DD_{HPLC,1}$ , který byl porovnán s  $DD_{NMR,2}$ ; (iv) v případě shody  $DD$  byly experimentální molární zlomky oligosacharidů získané normalizací ploch píků porovnány s teoretickými molárními zlomky vypočítanými na základě náhodné distribuce aminoskupin.

### 4.2.1 Vývoj metody

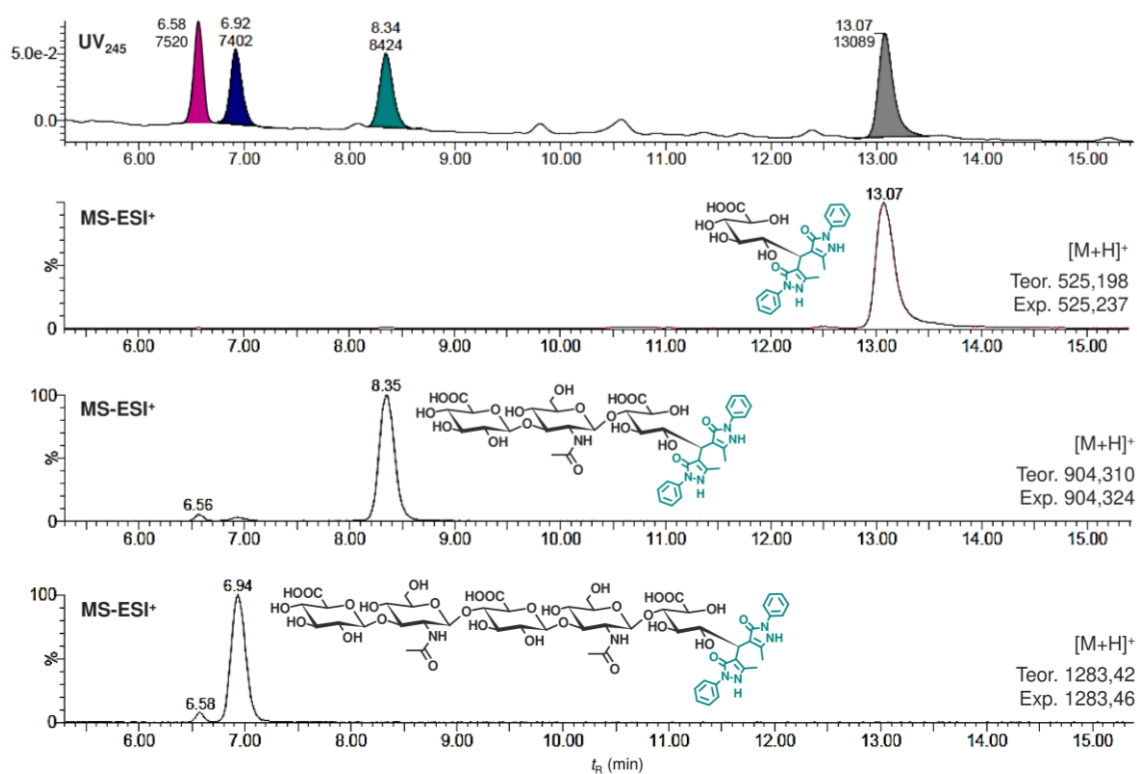
Prvním krokem bylo ověření popsaných podmínek deaminačního štěpení a následné derivatizace (Han et al., 2015) na roztoku hydrochloridu GlcN (metoda 1a). Jelikož uvedená metoda neposkytla 2,5-anhydro-D-mannosu se dvěma jednotkami PMP ( $aMan_{PMP}$ ), bylo deaminační štěpení vyzkoušeno jednak bez kyseliny octové (metoda 1b), jednak bez kyseliny sírové (metoda 1c) za podmínek blízkých těm, které byly použity pro deaminaci deacetylovaných oligosacharidů hyaluronanu (Chen et al., 2009). Očekávaný produkt  $aMan_{PMP}$  byl pomocí UHPLC-ESI-QqTOF-MS detekován (**tab. 3.2**) pouze ve vzorku připraveném metodou 1c. Jeho stabilita v roztoku byla ověřena pomocí HPLC-UV. Po 15 h bylo nalezeno přibližně 96 % původního množství. Vzhledem k neúměrně dlouhému retenčnímu času píku  $aMan_{PMP}$  (40,8 min v HPLC-UV metodě a 61,4 min v UPLC-UV/MS metodě), byl chromatografický gradient pro další analýzy upraven.

**Tab. 3.2** Charakterizace  $aMan_{PMP}$  pomocí ESI-QqTOF-MS v pozitivním módu ionizace.

Zkratka	Symbol	Vzorec	Ion	$m/z$	
				Teor.	Exp.
$aMan_{PMP}$		$C_{26}H_{28}N_4O_6$	$[M+H]^+$	493,21	493,25
			$[M+Na]^+$	515,19	515,23

Následujícím krokem bylo ověření reakčních podmínek na 1 mg hydrochloridu GlcN (metoda 2a). Pík  $aMan_{PMP}$  ve zkrácené HPLC-UV metodě eluoval v čase 16,7 min, přičemž čistota produktu vypočítaná normalizací ploch píků činila 64 %. Protože zvýšení koncentrace hydroxidu sodného při derivatizační reakci (metoda 2b) vedlo k poklesu

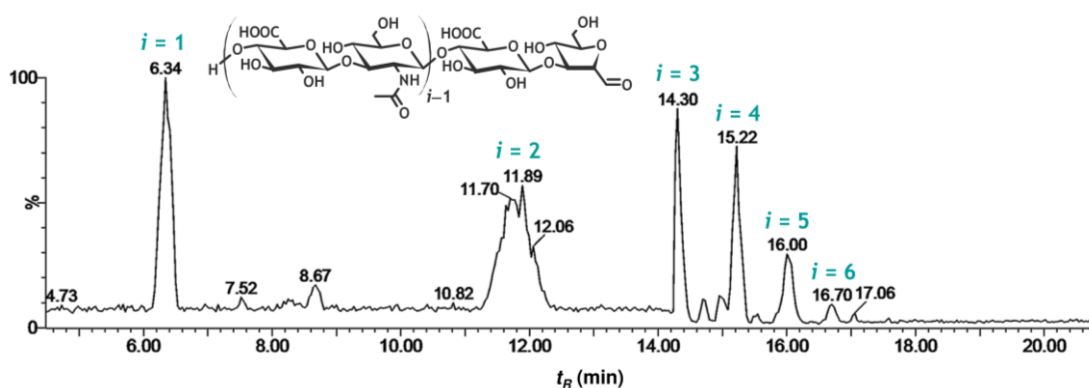
chromatografické čistoty na 55 %, byl pro derivatizaci zvolen méně bazický triethylamin (Zhang et al., 2011). Ještě před nahrazením hydroxidu sodného triethylaminem ( $\text{Et}_3\text{N}$ ) byla však metoda 2b vyzkoušena na vzorku S8. Místo očekávaných sudých oligosacharidů s  $\text{aMan}_{\text{PMP}}$  na redukujícím konci byly pomocí UHPLC-ESI-QqTOF-MS v pozitivním módu ionizace detekovány liché oligosacharidy s  $\text{GlcA}_{\text{PMP}}$  na redukujícím konci (**obr. 3.5**), což nasvědčovalo tomu, že se jednotky  $\text{aMan}$ , podobně jako jednotky  $\text{GlcNAc}$  (Blundell & Almond, 2006), ze sudých oligosacharidů HA v bazickém prostředí odštěpují. Zvýšení koncentrace hydrochloridu  $\text{GlcN}$  při deaminačním štěpení z  $1,9 \text{ mg mL}^{-1}$  na  $4,8 \text{ mg mL}^{-1}$  a použití triethylaminu místo hydroxidu sodného při derivatizaci (metoda 3a) se projevilo zvýšením chromatografické čistoty produktu  $\text{aMan}_{\text{PMP}}$  na 87 %.



**Obr. 3.5** Výřezy z UV-245 nm chromatogramu a extrahovaných iontových chromatogramů ( $\text{ESI}^+$ ) vzorku S8 změřeného metodou 2b. První pík je směsí  $7_{\text{PMP}}$  ( $m/z$  831,794,  $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ ) a  $9_{\text{PMP}}$  ( $m/z$  1021,35,  $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ ), druhý odpovídá  $5_{\text{PMP}}$  ( $m/z$  1283,46,  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ), třetí  $3_{\text{PMP}}$  ( $m/z$  904,324,  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) a čtvrtý  $\text{GlcA}_{\text{PMP}}$  ( $m/z$  525,237,  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ).

V dalším kroku byly upravené reakční podmínky vyzkoušeny na vzorcích S2 a S8. Nejprve byl ověřen vznik sudých oligosacharidů s  $\text{aMan}$  na redukujícím konci při deaminačním štěpení (metoda 3b). Zatímco ve směsi připravené deaminačním štěpením vzorku S8 ( $DD_{\text{NMR},2} = 40,0 \%$ ) byly pomocí UHPLC-ESI-QqTOF-MS v negativním módu ionizace

nalezeny převážně oligosacharidy s aMan na redukujícím konci (**obr. 3.6**), ve směsi připravené deaminačním štěpením vzorku S2 ( $DD_{\text{NMR},2} = 9,7\%$ ) byly kromě oligosacharidů s aMan na redukujícím konci významně zastoupeny i oligosacharidy s GlcNAc na redukujícím konci (**tab. 3.3**). Obě skupiny oligosacharidů byly charakterizovány elementárním složením iontů (**tab. D1**). Deacetylované oligosacharidy, jejichž přítomnost by nasvědčovala neúplnému proběhnutí deaminačního štěpení, nebyly ani v jedné směsi detekovány. Nadto složení směsi získané po 24 h deaminačního štěpení se významně nelišilo od složení směsi získané po 90 min, což dále potvrdilo úplné proběhnutí deaminačního štěpení.



**Obr. 3.6** Výřez z celkového iontového chromatogramu (ESI-) vzorku S8 změřeného metodou 3b. V chromatogramu převažují oligosacharidy s aMan na redukujícím konci, jejichž obecná struktura je znázorněna nad chromatogramem.

**Tab. 3.3** Plochy píků sudých oligosacharidů s aMan ( $A_{\text{aMan}}$ ) nebo s GlcNAc ( $A_{\text{GlcNAc}}$ ) na redukujícím konci nalezené ve vzorcích S2 a S8 pomocí metody 3b. Relativní zastoupení nežádoucích oligosacharidů s GlcNAc na redukujícím konci ( $R$ ) bylo pro daný počet disacharidových jednotek ( $i$ ) vypočítáno podle vztahu:  $R_i = 100 \times A_{\text{GlcNAc},i} / (A_{\text{aMan},i} + A_{\text{GlcNAc},i})$ .

$i$	S2			S8		
	$A_{\text{aMan}}$ (a.u.)	$A_{\text{GlcNAc}}$ (a.u.)	$R$ (%)	$A_{\text{aMan}}$ (a.u.)	$A_{\text{GlcNAc}}$ (a.u.)	$R$ (%)
1	2 000	–†	0,0	16 300	–†	0,0
2	2 600	1 700	39,5	31 300	1 300	4,0
3	1 500	1 600	51,6	7 100	800	10,1
4	2 000	1 500	42,9	5 800	400	6,5
5	2 900	1 100	27,5	5 000	200	3,9
6	1 600	800	33,3	1 700	100	5,6
7	600	250	29,4	200	–†	0,0
8	400	150	27,3	50	–†	0,0
9	300	100	25,0	–†	–†	–†
10	200	50	20,0	–†	–†	–†
11	100	–†	0,0	–†	–†	–†

†Oligosacharid nebyl pomocí UHPLC-ESI-QqTOF-MS v negativním módu ionizace detekován.

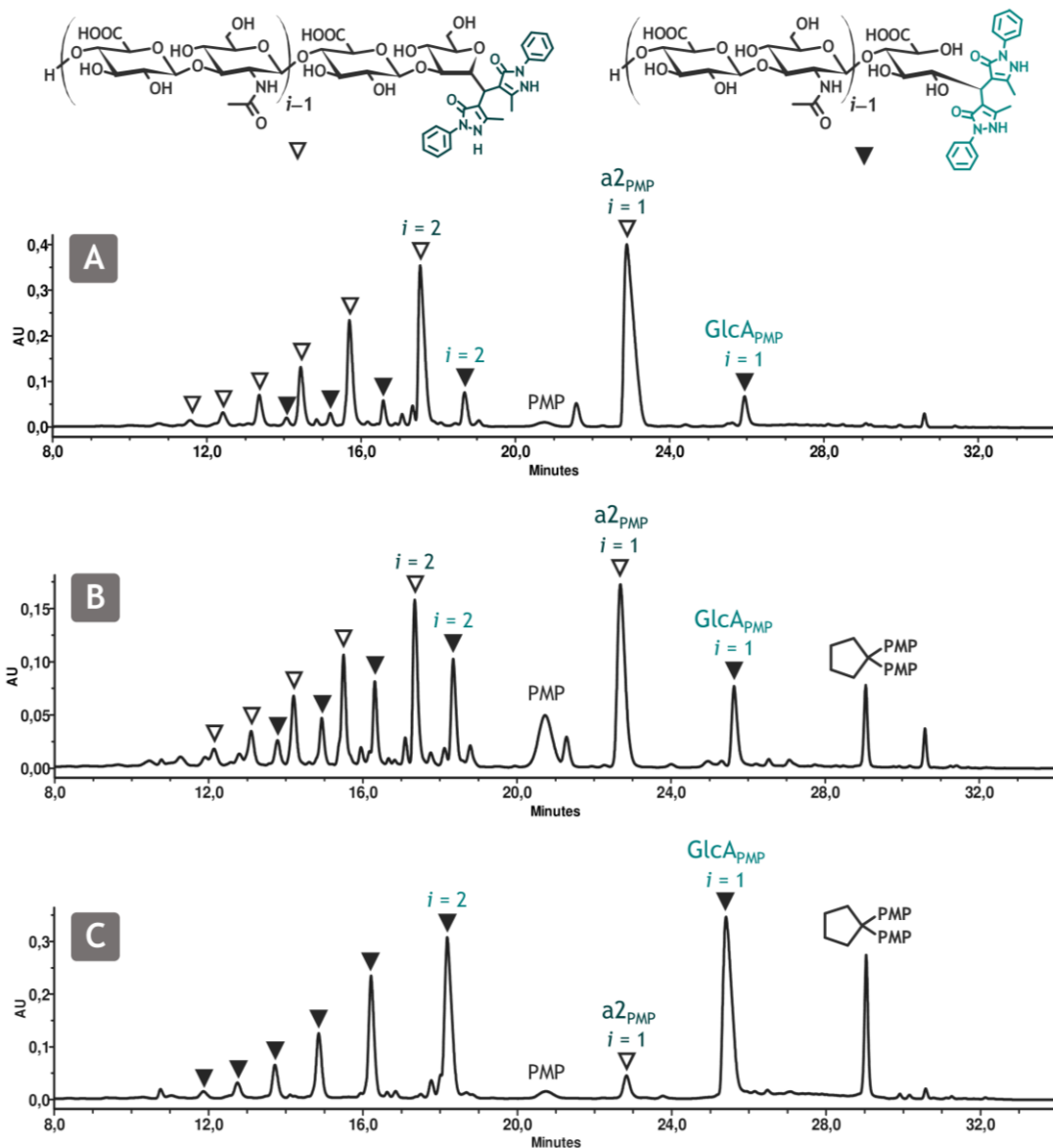
Původ oligosacharidů s GlcNAc na redukujícím konci zůstal nejasný. Hydrolýzou dlouhých oligosacharidů s GlcNAc na redukujícím konci ( $i > 20$ ) zřejmě nevznikají, neboť, jak bylo ověřeno (metoda 3c), tyto oligosacharidy jsou až po eikosasacharid ( $i = 10$ ) v prostředí kyseliny dusité stabilní. Nepodléhají ani hydrolýze, ani deacetylaci. Je možné, že oligosacharidy s GlcNAc na redukujícím konci vznikají hydrolýzou dlouhých oligosacharidů s aMan na redukujícím konci, ovšem tuto hypotézu nebylo možné ověřit kvůli nedostupnosti standardů těchto oligosacharidů.

Po ověření průběhu deaminačního štěpení bylo přikročeno k optimalizaci derivatizační reakce na vzorku S8. Byly vyzkoušeny čtyři různé objemy vody a triethylaminu (**tab. 3.4**), přičemž pořadí přidavku činidel bylo následující: PMP → MeOH → H<sub>2</sub>O → Et<sub>3</sub>N (metoda 4a). Jelikož ve všech případech byly kromě sudých oligosacharidů s aMan<sub>PMP</sub> na redukujícím konci nalezeny též liché oligosacharidy s GlcA<sub>PMP</sub> na redukujícím konci (**obr. 3.7a**), bylo vyzkoušeno odlišné pořadí přidavku činidel. Zatímco pořadí H<sub>2</sub>O → Et<sub>3</sub>N → MeOH → PMP (metoda 4b) poskytlo směs obou typů oligosacharidů (**obr. 3.7b**), v případě pořadí H<sub>2</sub>O → MeOH → Et<sub>3</sub>N → PMP (metoda 4c) byly až na a<sub>2PMP</sub> získány výhradně liché oligosacharidy s GlcA<sub>PMP</sub> na redukujícím konci (**obr. 3.7c**). Protože se přes veškerou snahu nepodařilo oligosacharidy s aMan na redukujícím konci kvantitativně převést na oligosacharidy s aMan<sub>PMP</sub> na redukujícím konci, bylo rozhodnuto, že budou detekovány v podobě lichých oligosacharidů s GlcA<sub>PMP</sub> na redukujícím konci, na něž v prostředí triethylaminu téměř kvantitativně přecházejí. Za tímto účelem byly optimalizovány teplota a čas štěpení triethylaminem (**tab. 3.5**). Jako nejvhodnější bylo zvoleno míchání při laboratorní teplotě po dobu 60 min.

**Tab. 3.4** Relativní plochy sudých oligosacharidů s aMan<sub>PMP</sub> na redukujícím konci nalezené ve vzorku S8 v závislosti na objemu vody ( $V_{H_2O}$ ) a objemu triethylaminu ( $V_{Et_3N}$ ), použitých pro derivatizaci metodou 4a s pořadím přidavku činidel PMP → MeOH → H<sub>2</sub>O → Et<sub>3</sub>N. Relativní zastoupení nežádoucích lichých oligosacharidů s GlcA<sub>PMP</sub> na redukujícím konci je vyjádřeno jako poměr ploch píků a<sub>2PMP</sub> a GlcA<sub>PMP</sub>.

$V_{H_2O}$ ( $\mu$ L)	$V_{Et_3N}$ ( $\mu$ L)	Relativní plocha píku oligosacharidu <sup>†</sup> (%)						Poměr ploch a <sub>2PMP</sub> a GlcA <sub>PMP</sub>
		a <sub>2PMP</sub>	a <sub>4PMP</sub>	a <sub>6PMP</sub>	a <sub>8PMP</sub>	a <sub>10PMP</sub>	a <sub>12PMP</sub>	
100	100	47,2	24,9	14,6	7,8	4,0	1,5	12,0 : 1
100	75	47,1	24,4	14,8	7,9	4,1	1,6	6,9 : 1
100	50	47,3	24,1	14,8	8,0	4,1	1,7	7,6 : 1
200	100	46,5	24,9	14,8	7,9	4,1	1,7	11,6 : 1

<sup>†</sup>Oligosacharidy jsou označeny zkratkou a<sub>X</sub>PMP, kde a označuje aMan, X je počet monosacharidových jednotek a PMP značí derivatizaci dvěma jednotkami PMP na redukujícím konci.



**Obr. 3.7** Výřezy z UV-245 nm chromatogramů vzorku S8 změřeného třemi metodami: (a) metoda 4a, pořadí přidavku činidel PMP → MeOH → H<sub>2</sub>O → Et<sub>3</sub>N; (b) metoda 4b, pořadí přidavku činidel H<sub>2</sub>O → Et<sub>3</sub>N → MeOH → PMP; (c) metoda 4c, pořadí přidavku činidel H<sub>2</sub>O → MeOH → Et<sub>3</sub>N → PMP.

Finální metoda měla oproti výše popsanému postupu, využívajícímu roztok hydroxidu sodného (metoda 2b), výhodu selektivnějšího průběhu štěpící reakce. Vzniklé oligosacharidy s  $GlcA_{PMP}$  na redukujícím konci byly charakterizovány jednak elementárním složením iontů (**tab. D2**), jednak porovnáním retenčních časů s retenčními časy standardů (**tab. 2.3**). Standardy byly též použity pro určení relativních odezvových faktorů ( $RRF_i$ ) jednotlivých oligosacharidů vůči  $GlcA_{PMP}$ , které byly zahrnuty do výpočtu stupně deacetylce ( $DD_{HPLC,1}$ ).

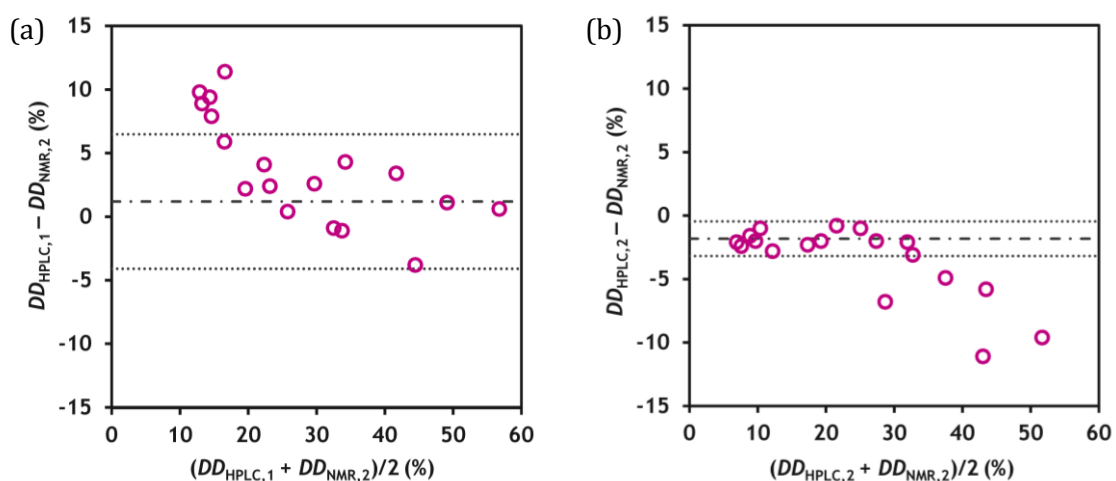


**Tab. 3.5** Poměr ploch  $a_{2\text{PMP}}$  a  $\text{GlcA}_{\text{PMP}}$  ve vzorku S8 v závislosti na teplotě ( $T$ ) a čase ( $t$ ) použitých pro štěpení oligosacharidů triethylaminem metodou 4c s pořadím přidavku činidel  $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{MeOH} \rightarrow \text{Et}_3\text{N} \rightarrow \text{PMP}$ .

$T$ (°C)	$t$ (min)	Poměr ploch $a_{2\text{PMP}}$ a $\text{GlcA}_{\text{PMP}}$
lab. t.	30	1 : 4,6
lab. t.	60	1 : 9,0
60	15	1 : 9,9
60	60	1 : 9,0

#### 4.2.2 Stupeň deacetylace

Finální metodou byl stanoven stupeň deacetylace ( $DD_{\text{HPLC},1}$ ) připravených vzorků daHA (**tab. 3.1**). Výpočet  $DD_{\text{HPLC},1}$  byl založen na porovnání odezvy jednotek GlcN, představované čitatelem vzorce (2.4), s odezvou všech disacharidových jednotek v daném vzorku daHA, představované jmenovatelem vzorce (2.4). Zatímco čítec byl prostým součtem korigovaných ploch oligosacharidů, jelikož každý detekovaný oligosacharid (**obr. 3.7c**) odpovídal jedné jednotce GlcN v původním vzorku daHA, jmenovatel byl součtem součinů korigovaných ploch a počtu disacharidových jednotek v daném oligosacharidu. Obdobný přístup použili Han et al. (2015) při výpočtu stupně acetylace chitosanu, když odezvu jednotek GlcNAc dělili odezvou všech sacharidových jednotek ve vzorku.



**Obr. 3.8** Blandovy–Altmanovy diagramy porovnávající: (a) hodnoty  $DD_{\text{HPLC},1}$  s hodnotami  $DD_{\text{NMR},2}$ ; (b) hodnoty  $DD_{\text{HPLC},2}$  s hodnotami  $DD_{\text{NMR},2}$ . Průměr (— · —) a 95% meze shody (· · ·) vyjádřené jako  $\pm 2,12\sigma$  (Ludbrook, 2010) byly v případě (a) vypočítány pro vzorky s  $DD_{\text{NMR},2} \geq 20\%$  a v případě (b) pro vzorky s  $DD_{\text{NMR},2} \leq 30\%$ .

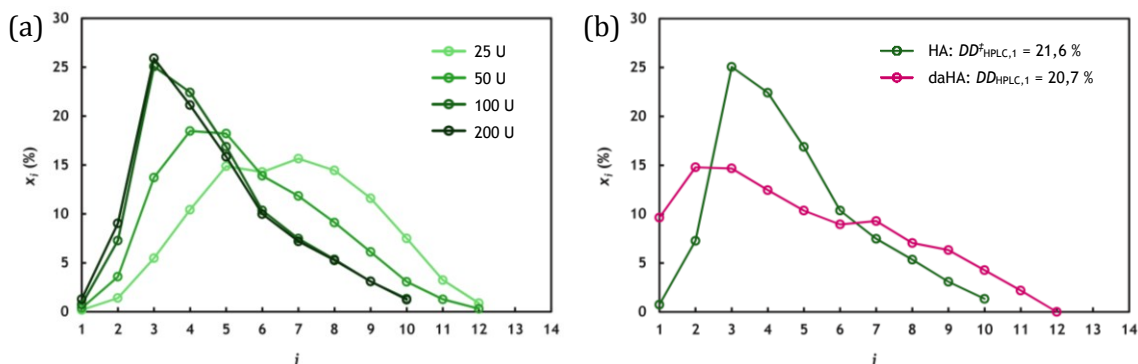
Získané hodnoty  $DD_{\text{HPLC},1}$  byly pomocí Blandova–Altmanova diagramu (Giavarina, 2015) porovnány s hodnotami  $DD_{\text{NMR},2}$  (**obr. 3.8a**). U vzorků s  $DD_{\text{NMR},2} \geq 20\%$  byly hodnoty  $DD_{\text{HPLC},1}$  v dobré shodě s hodnotami  $DD_{\text{NMR},2}$  (všechny body ležely v mezích shody), naproti tomu u vzorků s  $DD_{\text{NMR},2} < 20\%$  byly hodnoty  $DD_{\text{HPLC},1}$  oproti hodnotám  $DD_{\text{NMR},2}$  nadhodnocené až dvojnásobně. Tento rozdíl byl připsán významnému množství sudých oligosacharidů s GlcNAc na redukujícím konci nalezenému ve vzorcích s  $DD_{\text{NMR},2} < 20\%$  (**tab. 3.3**).

#### 4.2.3 Distribuce aminoskupin

Jelikož byla ve vzorcích daHA s ohledem na homogenitu reakční směsi při deacetylaci (Mischnick & Momcilovic, 2010) očekávána náhodná distribuce aminoskupin, byly pro porovnání s experimentem vytvořeny dva modely náhodné distribuce.

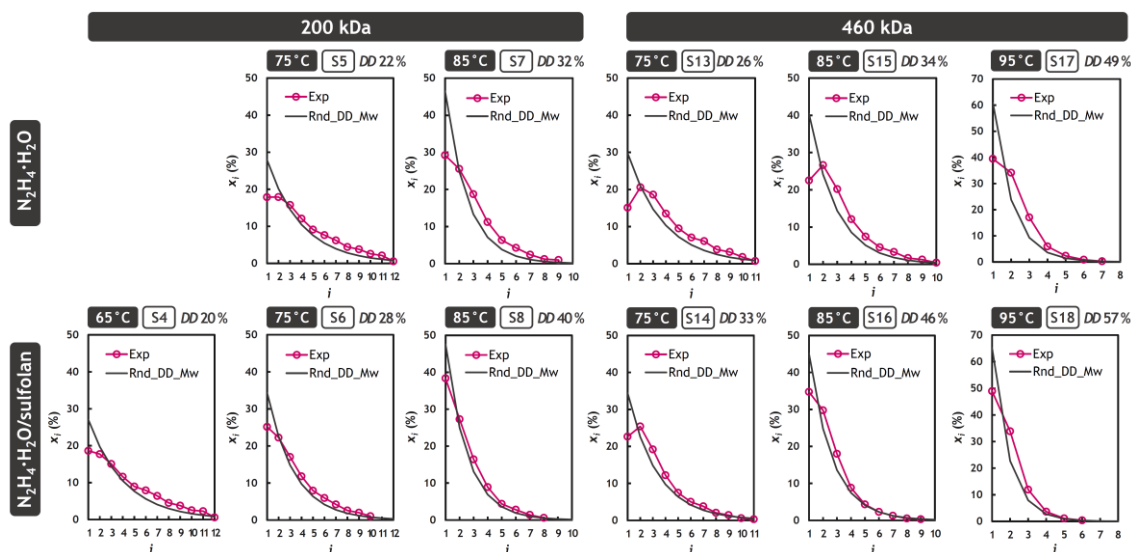
První model byl založen na enzymatickém štěpení HA bovinní testikulární hyaluronidasou (BTH), která štěpí HA náhodně na sudé oligosacharidy s GlcNAc na redukujícím konci (Stern & Jedrzejak, 2006). Pro simulaci různých hodnot  $DD$  byl HA hydrolyzován BTH o enzymové aktivitě 25–200 U a vzniklé sudé oligosacharidy byly působením hydroxidu sodného převedeny na liché oligosacharidy s GlcA na redukujícím konci (Blundell & Almond, 2006), které byly derivatizovány PMP a analyzovány pomocí HPLC-UV, jako kdyby pocházely ze vzorku daHA. Hodnoty zdánlivého  $DD^{\#}_{\text{HPLC},1}$ , vypočítané podle vzorce (2.4), činily 14,9 %, 18,0 %, 21,6 % a 22,0 % pro aktivitu enzymu 25 U, 50 U, 100 U a 200 U. Ze srovnání molárních zlomků lichých oligosacharidů získaných při aktivitách 100 U a 200 U (**obr. 3.9a**) vyplynulo, že při 200 U bylo dosaženo maximálního rozštěpení HA, a že tedy zvýšení zdánlivého  $DD^{\#}_{\text{HPLC},1}$  nad 22 % není možné. Protože mezi připravenými vzorky daHA nebyl takový, který by vykazoval  $DD_{\text{HPLC},1} \leq 22\%$  (podmínka použitelnosti enzymatického modelu) a zároveň měl  $DD_{\text{NMR},2} \geq 20\%$  (podmínka shody  $DD_{\text{HPLC},1}$  s  $DD_{\text{NMR},2}$ ), byl pro porovnání zvolen vzorek S12, který splňoval podmínku použitelnosti enzymatického modelu ( $DD_{\text{HPLC},1} = 20,7\%$ ) a jeho  $DD_{\text{NMR},2}$  byl blízký mezní hodnotě ( $DD_{\text{NMR},2} = 18,5\%$ ). Na základě porovnání molárních zlomků oligosacharidů získaných deaminačním a enzymatickým štěpením (**obr. 3.9b**) byly rozlišeny dvě skupiny oligosacharidů: u oligosacharidů s  $i \leq 6$  byly rozdíly způsobeny především nenáhodným průběhem enzymatického štěpení a o distribuci aminoskupin ve vzorku S12 nic nevypovídaly, u oligosacharidů s  $i \geq 7$  rozdíly nasvědčovaly rozmístění aminoskupin ve větších vzdálenostech, než jaké by odpovídaly náhodné distribuci. Příčinou nenáhodného průběhu enzymatického štěpení oligosacharidů s  $i \leq 6$  byly: (i) pokles hydrolytické aktivity BTH na úkor transglykosylační aktivity s klesajícím počtem disacharidových jednotek v oligosacharidu (Deschrevel, Tranchepain,

& Vincent, 2008); (ii) skutečnost, že nejkratším oligosacharidem, který BTH dokáže hydrolyzovat, je hexasacharid (Stern & Jedrzejewski, 2006). Vzhledem ke značným omezením enzymatického modelu byl vytvořen matematický model.

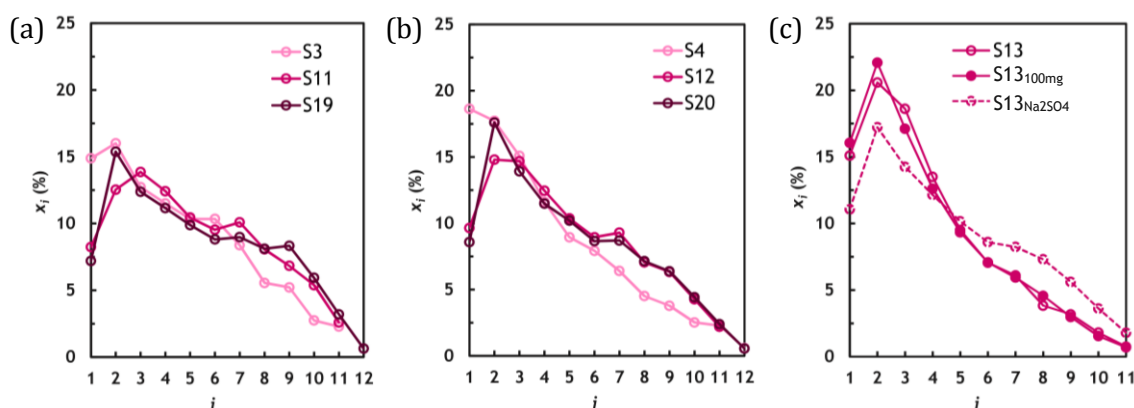


**Obr. 3.9** Model náhodné distribuce aminokupin založený na enzymatickém štěpení hyaluronanu bovinní testikulární hyaluronidasou: (a) závislost molárních zlomků lichých oligosacharidů na aktivitě enzymu; (b) porovnání molárních zlomků lichých oligosacharidů získaných deaminačním štěpením vzorku S12 a enzymatickým štěpením hyaluronanu při aktivitě enzymu 100 U.

Druhý model byl čistě matematický (Sedláček et al., 2019). Z  $DD_{\text{NMR},2}$  a molární hmotnosti byly pro každý vzorek daHA s  $DD_{\text{NMR},2} \geq 20\%$  vypočítány teoretické molární zlomky lichých oligosacharidů odpovídající náhodné distribuci aminokupin a takto získané zlomky byly porovnány se zlomky stanovenými experimentálně (**obr. 3.10**). Nezávisle na výchozí molární hmotnosti HA ( $M_{w,\text{HA}}$ ) a reakčních podmínkách deacetylace se experimentální molární zlomky blížily teoreticky předpovězeným zlomkům. Nejlepší shoda experimentu s teorií byla nalezena u vzorků připravených za vysokých teplot ve směsi  $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ /sulfolan 1 : 1, tedy u vzorků S8, S16 a S18. Jelikož u všech vzorků byly experimentálně stanovené zlomky  $\text{GlcA}_{\text{PMP}}$  ( $i = 1$ ) nižší, a zlomky  $5_{\text{PMP}}$  ( $i = 3$ ) a  $7_{\text{PMP}}$  ( $i = 4$ ) naopak vyšší, než by odpovídalo náhodné distribuci aminokupin podél řetězce daHA, byl učiněn závěr, že distribuce aminokupin v chemicky deacetylovaném HA není náhodná, nýbrž vychýlená ve prospěch větších vzdáleností. Jinými slovy, byl-li daný  $\text{GlcNAc}$  deacetylován, k další deacetylaci došlo spíše ob jednu a více disacharidových jednotek než v sousední disacharidové jednotce. Pouze pro úplnost bylo obdobné porovnání provedeno pro vzorky daHA s  $DD_{\text{NMR},2} < 20\%$ . Shoda experimentálních molárních zlomků s teoretickými byla u těchto vzorků výrazně horší (**obr. D1**).



**Obř. 3.10** Porovnání experimentálních molárních zlomků oligosacharidů získaných deaminačním štěpením (Exp) s teoretickými zlomky odpovídajícími náhodné distribuci aminoskupin (Rnd\_DD\_Mw) pro vzorky daHA s  $DD_{NMR,2} \geq 20\%$ . U každého vzorku je uvedena výchozí molární hmotnost HA, činidlo, reakční teplota a výsledný  $DD_{NMR,2}$ . Převzato z lit. (Sedláček et al., 2019).



**Obř. 3.11** Porovnání molárních zlomků oligosacharidů získaných deaminačním štěpením: (a) vzorků připravených z HA o různé molární hmotnosti ( $M_{w,HA} = 200 \text{ kg mol}^{-1}$ ,  $460 \text{ kg mol}^{-1}$  a  $2200 \text{ kg mol}^{-1}$  pro S3, S11 a S19) při  $65\text{ }^\circ\text{C}$  v  $\text{N}_2\text{H}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ ; (b) vzorků připravených z HA o různé molární hmotnosti ( $M_{w,HA} = 200 \text{ kg mol}^{-1}$ ,  $460 \text{ kg mol}^{-1}$  a  $2200 \text{ kg mol}^{-1}$  pro S4, S12 a S20) při  $65\text{ }^\circ\text{C}$  ve směsi  $\text{N}_2\text{H}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ /sulfolan 1 : 1; (c) vzorků připravených z HA ( $M_{w,HA} = 460 \text{ kg mol}^{-1}$ ) při  $75\text{ }^\circ\text{C}$  v  $\text{N}_2\text{H}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$  nominální metodou (S13), z desetinné navážky HA (S13<sub>100mg</sub>) a v přítomnosti  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  o koncentraci  $7,1 \text{ mg mL}^{-1}$  (S13<sub>Na2SO4</sub>).

Za účelem popsání vlivu různých parametrů na distribuci aminoskupin byly vyzkoušeny tři změny v deacetylační reakci: (i) zvýšení výchozí molární hmotnosti HA na  $M_{w,HA} = 2\ 200 \text{ kg mol}^{-1}$  (vzorky S19 a S20); (ii) snížení navážky HA v přípravě vzorku S13 z 1,03 g na 100 mg

(vzorek S13<sub>100mg</sub>); (iii) přídavek síranu sodného (7,1 mg mL<sup>-1</sup>) do přípravy vzorku S13 (vzorek S13<sub>Na2SO4</sub>). Zatímco vliv výchozí molární hmotnosti a navážky HA na distribuci aminoskupin byl nevýznamný (**obr. 3.11**), přídavek síranu sodného se projevil poklesem  $DD_{\text{HPLC},1}$  z 26,0 % na 21,7 % a vychýlením distribuce směrem k větším vzdálenostem mezi aminoskupinami, což nasvědčovalo tomu, že síran sodný potlačil katalytický vliv síranu hydrazinia, přítomného v reakční směsi (Inoue & Kitajima, 1985).

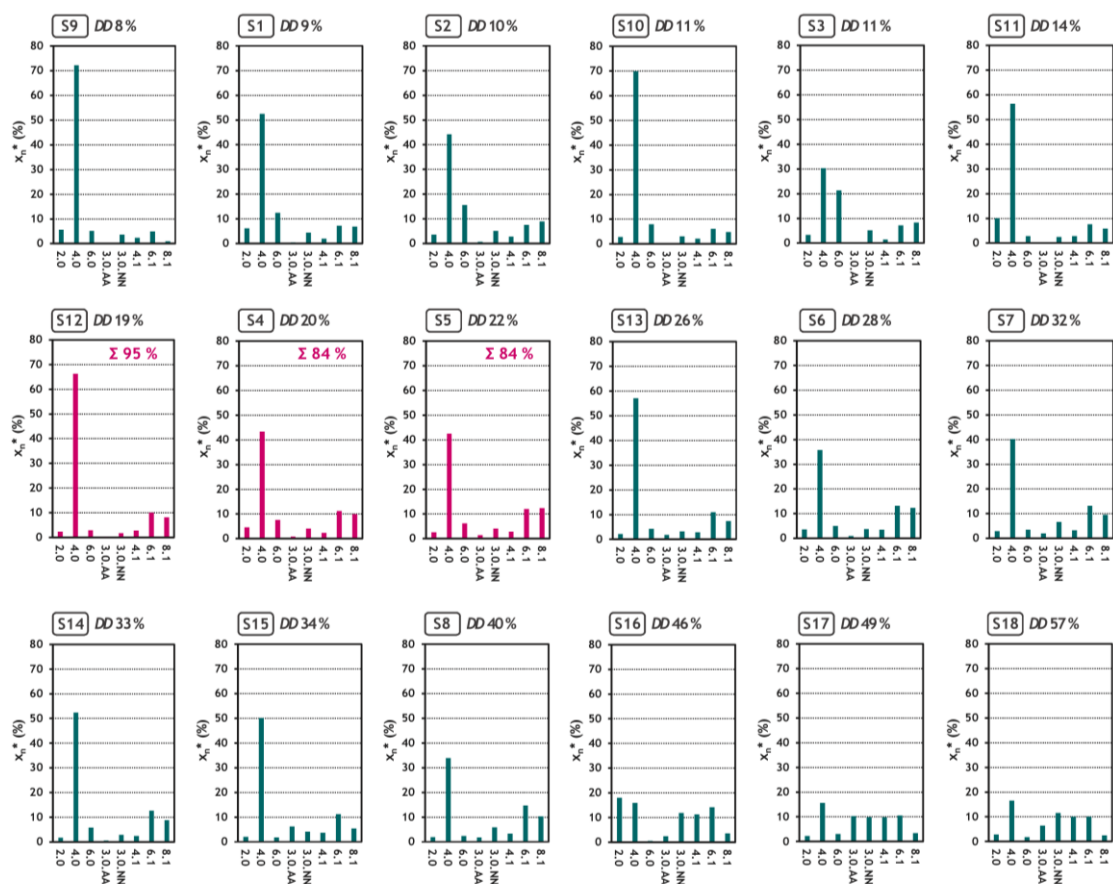
### 4.3 STANOVENÍ DISTRIBUCE AMINOSKUPIN POMOCÍ ENZYMATICKÉHO ŠTĚPENÍ

Postup stanovení distribuce aminoskupin pomocí enzymatického štěpení byl obdobný jako u deaminačního štěpení, jen s tím rozdílem, že směs oligosacharidů byla z daHA získána působením enzymu.

#### 4.3.1 Vývoj metody

Prvním krokem bylo nalezení vhodného enzymu, který by daHA štěpil na jednoduchou směs oligosacharidů. Vzorky daHA byly rozštěpeny bovinní testikulární hyaluronidasou (BTH), hyaluronidasou z *Talaromyces stipitatus* (TSH) a hyaluronidasou ze *Streptococcus pneumoniae* (SpHyl) a výsledné směsi oligosacharidů byly analyzovány pomocí UHPLC-ESI-QqTOF-MS v negativním módu ionizace (metody 5a–c). Pro vyhodnocení enzymatického štěpení byly zvoleny oligosacharidy, jejichž orientační molární zlomek ( $x_n^*$ ) byl větší než 10 % alespoň u jednoho vzorku. Zastoupení těchto oligosacharidů bylo vztaženo k rostoucímu  $DD_{\text{NMR},2}$  (**obr. 3.12–3.14**) a pro vzorky s  $DD_{\text{NMR},2}$  kolem 20 % (S12, S4 a S5) byl vypočítán jejich sumární orientační molární zlomek. Zatímco pro BTH a TSH činil sumární zlomek osmi oligosacharidů 85–94 % a 87–97 %, pro SpHyl činil sumární zlomek sedmi oligosacharidů 94–95 %. Z testovaných enzymů tedy SpHyl poskytoval nejjednodušší směsi oligosacharidů, a byl proto vybrán pro stanovení distribuce aminoskupin.

Dalším krokem bylo zhodnocení selektivity enzymatické aktivity enzymu SpHyl. Několik deacetylovaných oligosacharidů bylo tímto enzymem rozštěpeno a výsledné směsi byly analyzovány pomocí UHPLC-ESI-QqTOF-MS v negativním módu ionizace (metoda 5d). Z výsledků (**tab. 3.6**) vyplynulo, že SpHyl neštěpí  $\beta$ -(1→4)-glykosidovou vazbu mezi GlcN a GlcA, nýbrž že štěpí  $\beta$ -(1→4)-glykosidovou vazbu mezi GlcA a GlcNAc za (ve směru od redukujícího konce) disacharidovou jednotkou, v níž se nachází GlcN.



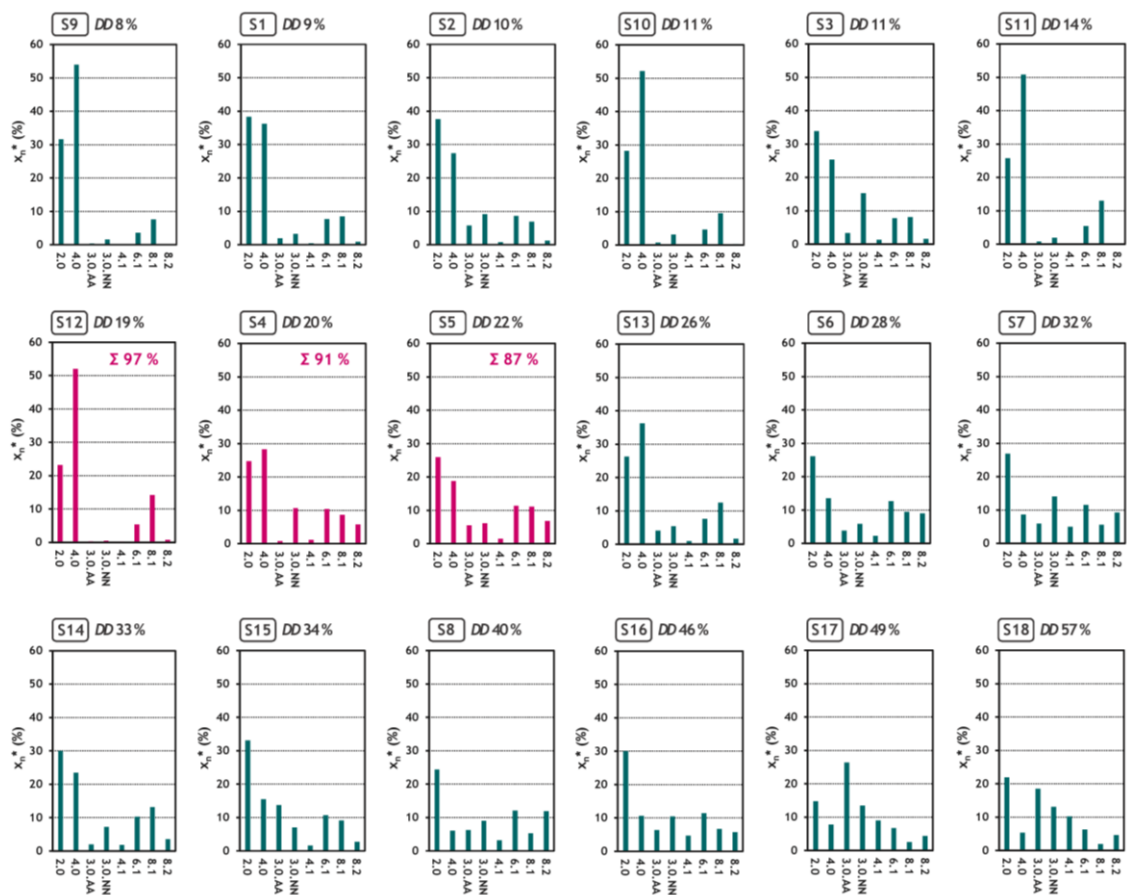
**Obř. 3.12** Zastoupení vybraných oligosacharidů ve směsích získaných štěpením vzorků daHA enzymem BTH (metoda 5a). Oligosacharidy jsou označeny zkratkou X.Y.ZZ (= X<sub>Y</sub><sup>ZZ</sup>), kde X označuje počet monosacharidových jednotek, Y označuje počet GlcN jednotek a ZZ určuje monosacharid na neredukujícím a redukuujícím konci (N odpovídá GlcNAc nebo GlcN, A odpovídá GlcA). Oligosacharidy bez uvedeného ZZ mají ZZ = AN. Barevně odlišené vzorky byly použity pro porovnání enzymů. U každého vzorku je uveden  $DD_{NMR,2}$ .

**Tab. 3.6** Štěpení vybraných deacetylovaných oligosacharidů enzymem SpHyl (metoda 5d).

Výchozí oligosacharid		Produkty
Zkratka <sup>†</sup>	Izomer	Zkratka <sup>†</sup>
$\Delta 4_1$	$\Delta\text{GlcA-GlcN-GlcA-GlcNAc}$	Pouze výchozí
$\Delta 6_2$	$\Delta\text{GlcA-GlcN-GlcA-GlcN-GlcA-GlcNAc}$	Pouze výchozí
$6_1$	$\text{GlcA-GlcNAc-GlcA-GlcN-GlcA-GlcNAc}$	$2_0 + \Delta 4_1^\ddagger$
$8_1$	$\text{GlcA-GlcNAc-GlcA-GlcN-(GlcA-GlcNAc)}_2$	$2_0 + \Delta 4_1^\ddagger + \Delta 2_0$
$10_1$	$\text{GlcA-GlcNAc-GlcA-GlcN-(GlcA-GlcNAc)}_3$	$2_0 + \Delta 4_1^\ddagger + \Delta 2_0$

<sup>†</sup>Oligosacharidy jsou označeny zkratkou  $\Delta X_Y$ , kde  $\Delta$  představuje dvojnou vazbu v poloze 4,5 v monosacharidu na neredukujícím konci, X označuje počet monosacharidových jednotek a Y označuje počet GlcN jednotek.

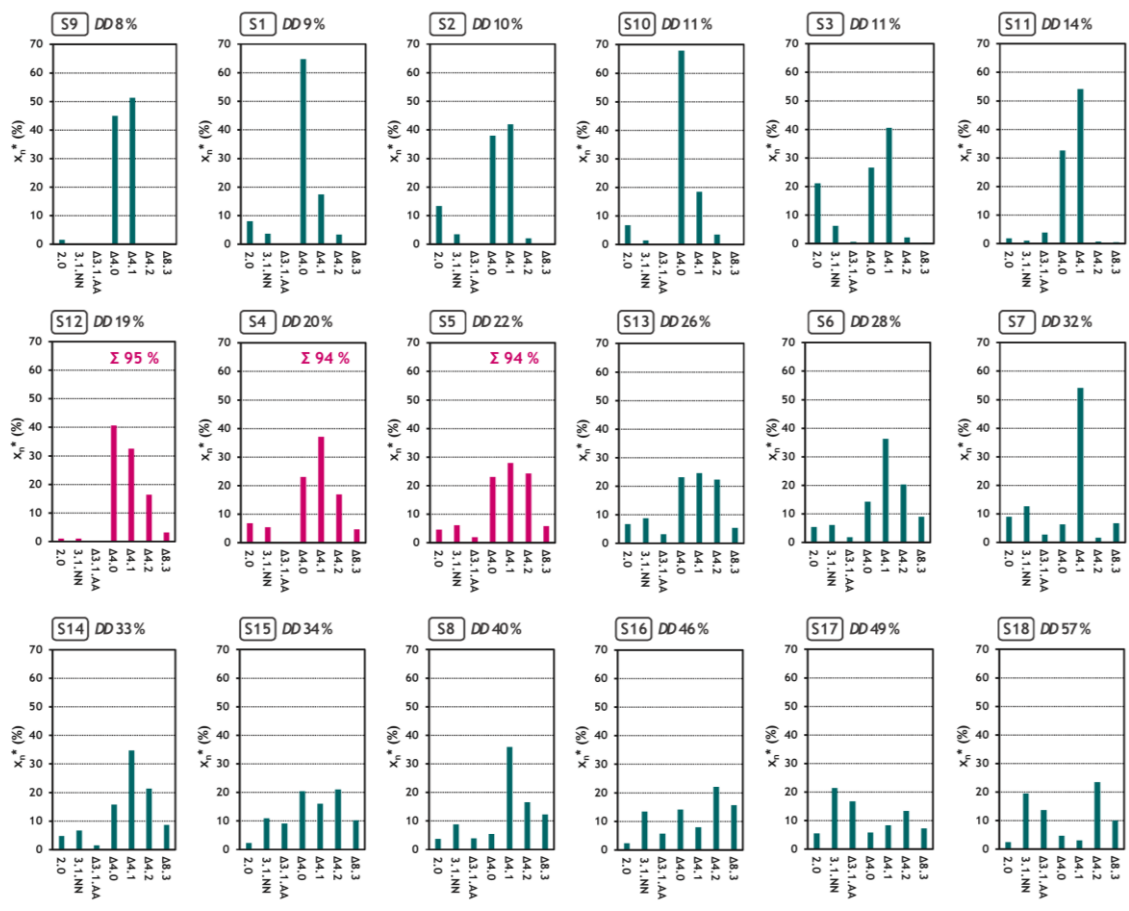
<sup>‡</sup>Jedná se o stejný izomer, jako byl testován, tj.  $\Delta\text{GlcA-GlcN-GlcA-GlcNAc}$ .



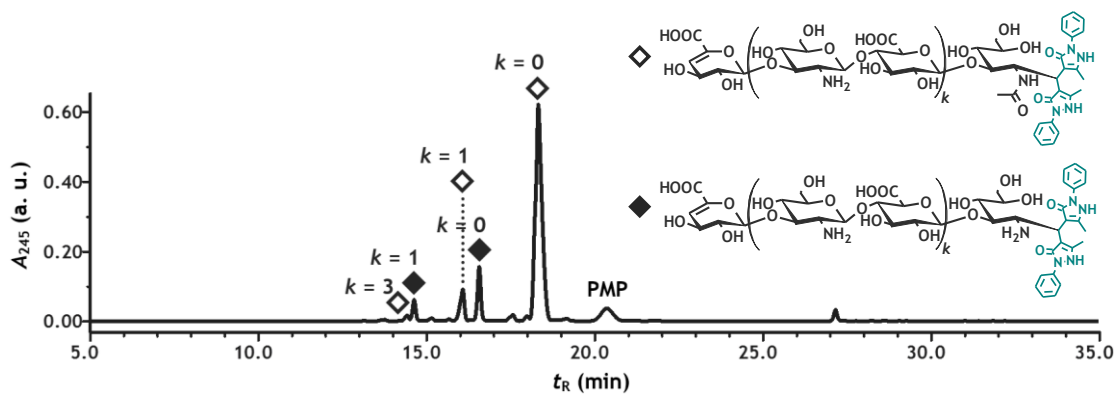
**Obr. 3.13** Zastoupení vybraných oligosacharidů ve směsích získaných štěpením vzorků daHA enzymem TSH (metoda 5b). Oligosacharidy jsou označeny zkratkou X.Y.ZZ (=  $X_Y^{ZZ}$ ), kde X označuje počet monosacharidových jednotek, Y označuje počet GlcN jednotek a ZZ určuje monosacharid na neredukujícím a redukujícím konci (N odpovídá GlcNAc nebo GlcN, A odpovídá GlcA). Oligosacharidy bez uvedeného ZZ mají ZZ = AN. Barevně odlišené vzorky byly použity pro porovnání enzymů. U každého vzorku je uveden  $DD_{NMR,2}$ .

V posledním kroku byla provedena derivatizace oligosacharidů činidlem PMP. Při pořadí přidavku činidel  $MeOH \rightarrow PMP \rightarrow Et_3N$  byla získána směs 4,5-nenasycených oligosacharidů se dvěma jednotkami PMP na redukujícím konci (**obr. 3.15**), které byly charakterizovány elementárním složením iontů (**tab. D4**). Kvůli nedostupnosti standardů byl stanoven a do výpočtu stupně deacetylce ( $DD_{HPLC,2}$ ) zahrnut pouze relativní odezvový faktor ( $RRF$ ) 4,5-nenasyceného disacharidu  $\Delta 2_{0,PMP}$  vůči 4,5-nenasycenému tetracharidu  $\Delta 4_{1,PMP}$ .





**Obř. 3.14** Zastoupení vybraných oligosacharidů ve směsích získaných štěpením vzorků daHA enzymem SpHyl (metoda 5c). Oligosacharidy jsou označeny zkratkou  $\Delta X.Y.ZZ$  (=  $\Delta X_Y^{ZZ}$ ), kde  $\Delta$  představuje dvojnou vazbu v poloze 4,5 v monosacharidu na neredukujícím konci, X označuje počet monosacharidových jednotek, Y označuje počet GlcN jednotek a ZZ určuje monosacharid na neredukujícím a redukujícím konci (N odpovídá GlcNAc nebo GlcN, A odpovídá  $\Delta$ GlcA). Oligosacharidy bez uvedeného ZZ mají ZZ = AN. Barevně odlišené vzorky byly použity pro porovnání enzymů. U každého vzorku je uveden  $DD_{NMR,2}$ .



**Obř. 3.15** Výřez z UV-245 nm chromatogramu vzorku S14 změřeného finální metodou. Upraveno z lit. (Sedláček et al., 2019).



### 4.3.2 Stupeň deacetylace

Finální metodou byl stanoven stupeň deacetylace ( $DD_{\text{HPLC},2}$ ) připravených vzorků daHA (**tab. 3.1**). Výpočet  $DD_{\text{HPLC},2}$  byl stejně jako výpočet  $DD_{\text{HPLC},1}$  založen na porovnání odezvy jednotek GlcN, představované čitatelem vzorce (2.7), s odezvou všech disacharidových jednotek v daném vzorku daHA, představované jmenovatelem vzorce (2.7).

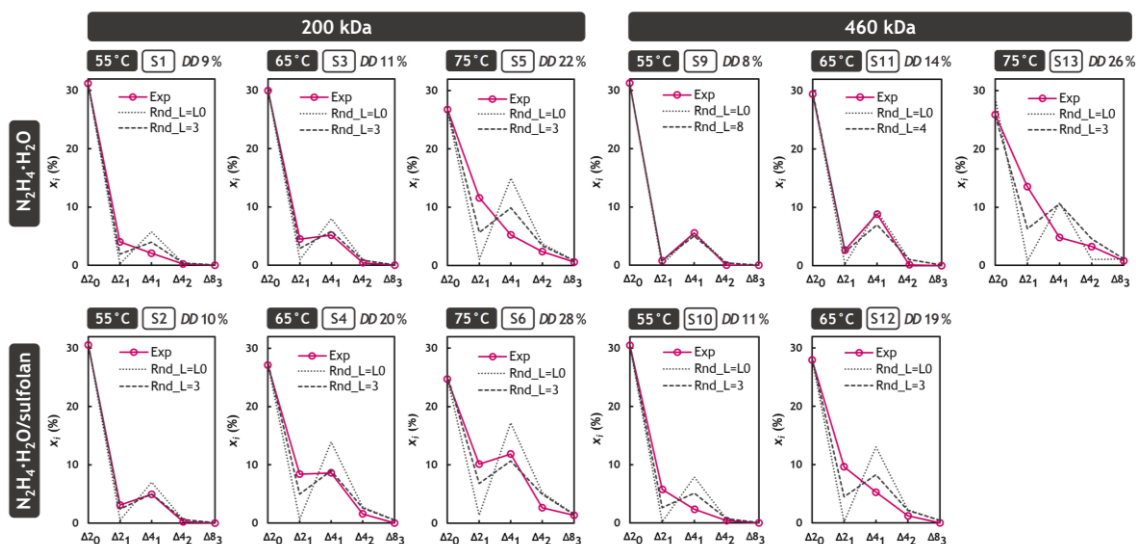
Získané hodnoty  $DD_{\text{HPLC},2}$  byly pomocí Blandova–Altmanova diagramu (Giavarina, 2015) porovnány s hodnotami  $DD_{\text{NMR},2}$  (**obr. 3.8b**). U vzorků s  $DD_{\text{NMR},2} \leq 30\%$  byly hodnoty  $DD_{\text{HPLC},2}$  v dobré shodě s hodnotami  $DD_{\text{NMR},2}$  (všechny body ležely v mezích shody), naproti tomu u vzorků s  $DD_{\text{NMR},2} > 30\%$  byly hodnoty  $DD_{\text{HPLC},2}$  oproti hodnotám  $DD_{\text{NMR},2}$  podhodnocené kvůli neschopnosti enzymu SpHyl štěpit  $\beta$ -(1→4)-glykosidovou vazbu mezi GlcN a GlcA, která se u těchto vzorků vyskytuje častěji než u vzorků s  $DD_{\text{NMR},2} \leq 30\%$ .

### 4.3.3 Distribuce aminoskupin

Pro porovnání s experimentálními výsledky byl vytvořen matematický model (Sedláček et al., 2019) náhodné distribuce aminoskupin ve dvou variantách. První varianta ( $\text{Rnd\_L=L0}$ ) předpokládala, že řetězce daHA o délce dané molární hmotností jsou enzymem SpHyl štěpeny postupně od redukujícího konce. Druhá varianta ( $\text{Rnd\_L=i}$ ) předpokládala, že štěpení začíná na náhodném místě uvnitř řetězce a následně pokračuje jako v první variantě (Mai, Vo, & Meere, 2018), což bylo v modelu realizováno předštěpením řetězce o délce dané molární hmotností na fragmenty délky  $L = i$ , kde  $i \geq 3$ . Řetězce kratší než  $2L$  nebyly v tomto modelu štěpeny a při výběru místa štěpení bylo zohledněno zjištění, že SpHyl neštěpí  $\beta$ -(1→4)-glykosidovou vazbu mezi GlcN a GlcA (oddíl 4.3.1).

Pro každý vzorek daHA s  $DD_{\text{NMR},2} \leq 30\%$  byly oběma variantami modelu vypočítány teoretické molární zlomky oligosacharidů odpovídající náhodné distribuci aminoskupin a takto získané zlomky byly porovnány se zlomky stanovenými experimentálně (**obr. 3.16, tab. D6**). Nezávisle na výchozí molární hmotnosti HA ( $M_{w,HA}$ ) a reakčních podmínkách deacetylace se experimentální molární zlomky blížily teoreticky předpovězeným zlomkům. Největší rozdíl mezi teorií a experimentem byl pozorován u molárních zlomů  $\Delta_{2,1,\text{PMP}}$  a  $\Delta_{4,1,\text{PMP}}$ . Varianta  $\text{Rnd\_L=L0}$  oproti experimentu zlomek  $\Delta_{2,1,\text{PMP}}$  podhodnocovala a zlomek  $\Delta_{4,1,\text{PMP}}$  naopak nadhodnocovala, neboť v tomto modelu vznikal  $\Delta_{2,1,\text{PMP}}$ , pouze když k deacetylaci došlo na redukujícím konci řetězce. Varianta  $\text{Rnd\_L=i}$ , v níž chování enzymu SpHyl více odpovídalo dosavadním poznatkům, zmíněný rozdíl poněkud zmenšila, nicméně zcela jej neodstranila, což bylo spolu s nadhodnocením zlomku  $\Delta_{4,2,\text{PMP}}$  oproti experimentu

považováno za důkaz, že byl-li daný GlcNAc deacetylován, k další deacetylaci došlo spíše ob jednu a více disacharidových jednotek než v sousední disacharidové jednotce. Pouze pro úplnost bylo obdobné porovnání provedeno pro vzorky daHA s  $DD_{\text{NMR},2} > 30\%$ . Shoda experimentálních molárních zlomků s teoretickými byla u těchto vzorků překvapivě podobná jako u první skupiny (**obr. D2**).



**Obř. 3.16** Porovnání experimentálních molárních zlomků oligosacharidů získaných enzymatickým štěpením (Exp) s teoretickými zlomky odpovídajícími náhodné distribuci aminoskupin bez předštěpení (Rnd\_L=L0) a s předštěpením (Rnd\_L=i) pro vzorky daHA s  $DD_{\text{NMR},2} \leq 30\%$ . U každého vzorku je uvedena výchozí molární hmotnost HA, činidlo, reakční teplota a výsledný  $DD_{\text{NMR},2}$ . Pro zvýšení přehlednosti byl spodní index PMP ve zkratkách oligosacharidů vynechán a molární zlomek  $\Delta_{20,\text{PMP}}$  vydělen třemi. Převzato z lit. (Sedláček et al., 2019).

Příčina pozorovaného odchýlení distribuce aminoskupin v daHA od náhodného rozložení nebyla zatím nalezena. Lze předpokládat, že na výslednou distribuci aminoskupin mají vliv inter- a intramolekulární interakce existující během deacetylace, ovšem přesné vysvětlení by vyžadovalo znalost dosud nestudovaného mechanismu deacetylace HA. Na základě literatury lze pouze konstatovat, že v prostředí  $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  jsou jak karboxylové skupiny, tak aminoskupiny deprotonovány, jelikož  $\text{p}K_a(\text{RNH}_3^+) < 0,7$  v  $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (Bauer & Gaillochot, 1978), a že deacetylace probíhá přes tetraedrický intermediát, jehož stabilitu sterickým bráněním ovlivňuje 3-O-substituent (Inoue & Kitajima, 1985), tedy zbytek řetězce vázaný  $\beta$ -(1→3)-glykosidovou vazbou na daný GlcNAc.

## 5 ZÁVĚR

Pro studium distribuce substituentů byl zvolen deacetylovaný HA (daHA), který patří mezi nejjednodušší deriváty HA. Deacetylace HA byla provedena ve dvou prostředích ( $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  a  $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ /sulfolan 1 : 1) při teplotách od 55 °C do 95 °C. Pomocí SEC-MALLS byly stanoveny hmotnostně průměrná molární hmotnost ( $M_w$ ) a disperzita molární hmotnosti ( $M_w/M_n$ ) připravených vzorků. Z výsledků byl patrný výrazný pokles molární hmotnosti během deacetylace. Stupeň deacetylace ( $DD$ ) vzorků byl určen třemi metodami pomocí  $^1\text{H}$  NMR spektroskopie, přičemž nejsprávnější hodnoty poskytla metoda založená na přímém stanovení  $DD$  z integrální intenzity protonu sousedícího s aminoskupinou ( $DD_{\text{NMR},2}$ ).

Následně byly vyvinuty dvě depolymerizační metody využívající HPLC-UV pro stanovení distribuce aminoskupin v daHA. První byla založená na deaminačním štěpení kyselinou dusitou generovanou *in situ*, druhá na enzymatickém štěpení hyaluronidasou ze *Streptococcus pneumoniae*. Obě metody kromě určení distribuce umožňovaly též stanovení  $DD$ , čehož bylo využito pro ověření jejich správnosti srovnáním s hodnotami  $DD_{\text{NMR},2}$ . Deaminační štěpení poskytlo dobrou shodu pro vzorky s  $DD_{\text{NMR},2} \geq 20 \%$ , naopak enzymatické štěpení poskytlo dobrou shodu pro vzorky s  $DD_{\text{NMR},2} \leq 30 \%$ . Experimentální distribuce aminoskupin získané oběma metodami byly porovnány s teoretickým modelem náhodné distribuce. V obou případech vzorky vykazovaly nižší blokovost distribuce, než by odpovídalo náhodné distribuci. Z toho bylo usouzeno, že byl-li daný GlcNAc deacetylován, k další deacetylaci došlo spíše ob jednu a více disacharidových jednotek než v sousední disacharidové jednotce. Lze předpokládat, že příčinou tohoto vychýlení distribuce byly inter- a intramolekulární interakce existující během deacetylace, ovšem přesné vysvětlení by vyžadovalo znalost mechanismu deacetylace HA, který zatím čeká na prostudování.

## 6 DODATKY

**Tab. D1** Porovnání teoretických hodnot  $m/z$  iontů sudých oligosacharidů s aMan nebo s GlcNAc na redukujícím konci s hodnotami změřenými pomocí UHPLC-ESI-QqTOF-MS v negativní módu ionizace. Převzato z lit. (Sedláček et al., 2019).<sup>†</sup>

Zkratka	$i$	Vzorec	Ion	$m/z$		
				Teor.	Exp.	$\Delta$ (ppm)
a2	1	C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> O <sub>11</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	337,0771	337,0776	-1,5
a4	2	C <sub>26</sub> H <sub>39</sub> N <sub>1</sub> O <sub>22</sub>	[M+H <sub>2</sub> O-H] <sup>-</sup>	734,2069	734,2009	8,2
a6	3	C <sub>40</sub> H <sub>60</sub> N <sub>2</sub> O <sub>33</sub>	[M+H <sub>2</sub> O-2H] <sup>2-</sup>	556,1514	556,1533	-3,4
a8	4	C <sub>54</sub> H <sub>81</sub> N <sub>3</sub> O <sub>44</sub>	[M+H <sub>2</sub> O-2H] <sup>2-</sup>	745,7071	745,7097	-3,5
a10	5	C <sub>68</sub> H <sub>102</sub> N <sub>4</sub> O <sub>55</sub>	[M+H <sub>2</sub> O-2H] <sup>2-</sup>	935,2628	935,2655	-2,9
a12	6	C <sub>82</sub> H <sub>123</sub> N <sub>5</sub> O <sub>66</sub>	[M+H <sub>2</sub> O-2H] <sup>2-</sup>	1124,8186	1124,8192	-0,5
a14	7	C <sub>96</sub> H <sub>144</sub> N <sub>6</sub> O <sub>77</sub>	[M-2H] <sup>2-</sup>	1305,3690	1305,3672	1,4
a16	8	C <sub>110</sub> H <sub>165</sub> N <sub>7</sub> O <sub>88</sub>	[M+H <sub>2</sub> O-2H] <sup>2-</sup>	1503,9300	1503,9357	-3,8
a18	9	C <sub>124</sub> H <sub>186</sub> N <sub>8</sub> O <sub>99</sub>	[M-3H] <sup>3-</sup>	1122,6510	1122,6542	-2,9
a20	10	C <sub>138</sub> H <sub>207</sub> N <sub>9</sub> O <sub>110</sub>	[M-3H] <sup>3-</sup>	1249,0215	1249,0223	-0,6
a22	11	C <sub>152</sub> H <sub>228</sub> N <sub>10</sub> O <sub>121</sub>	[M-3H] <sup>3-</sup>	1375,3920	1375,3955	-2,5
4 <sub>0</sub>	2	C <sub>28</sub> H <sub>44</sub> N <sub>2</sub> O <sub>23</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	775,2257	775,2260	-0,4
6 <sub>0</sub>	3	C <sub>42</sub> H <sub>65</sub> N <sub>3</sub> O <sub>34</sub>	[M-2H] <sup>2-</sup>	576,6646	576,6647	-0,2
8 <sub>0</sub>	4	C <sub>56</sub> H <sub>86</sub> N <sub>4</sub> O <sub>45</sub>	[M-2H] <sup>2-</sup>	766,2204	766,2201	0,4
10 <sub>0</sub>	5	C <sub>70</sub> H <sub>107</sub> N <sub>5</sub> O <sub>56</sub>	[M-2H] <sup>2-</sup>	955,7761	955,7748	1,4
12 <sub>0</sub>	6	C <sub>84</sub> H <sub>128</sub> N <sub>6</sub> O <sub>67</sub>	[M-2H] <sup>2-</sup>	1145,3318	1145,3328	-0,9
14 <sub>0</sub>	7	C <sub>98</sub> H <sub>149</sub> N <sub>7</sub> O <sub>78</sub>	[M-2H] <sup>2-</sup>	1334,8876	1334,8907	-2,3
16 <sub>0</sub>	8	C <sub>112</sub> H <sub>170</sub> N <sub>8</sub> O <sub>89</sub>	[M-3H] <sup>3-</sup>	1015,9596	1015,9608	-1,2
18 <sub>0</sub>	9	C <sub>126</sub> H <sub>191</sub> N <sub>9</sub> O <sub>100</sub>	[M-3H] <sup>3-</sup>	1142,3301	1142,3295	0,5
20 <sub>0</sub>	10	C <sub>140</sub> H <sub>212</sub> N <sub>10</sub> O <sub>111</sub>	[M-3H] <sup>3-</sup>	1268,7006	1268,7010	-0,3

<sup>†</sup>Symbolické znázornění struktury oligosacharidů: = GlcA, = GlcNAc, = aMan.

**Tab. D2** Porovnání teoretických hodnot  $m/z$  iontů  $\text{GlcA}_{\text{PMP}}$  a lichých oligosacharidů s  $\text{GlcA}_{\text{PMP}}$  na redukujícím konci s hodnotami změřenými pomocí UHPLC-ESI-QqTOF-MS v negativní módu ionizace. Převzato z lit. (Sedláček et al., 2019).<sup>†</sup>

Zkratka	$i$	Vzorec	Ion	$m/z$		
				Teor.	Exp.	$\Delta$ (ppm)
$\text{GlcA}_{\text{PMP}}$	1	$\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{N}_4\text{O}_8$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	523,1829	523,1840	-2,1
$3_{\text{PMP}}$	2	$\text{C}_{40}\text{H}_{49}\text{N}_5\text{O}_{19}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	902,2943	902,2952	-1,0
$5_{\text{PMP}}$	3	$\text{C}_{54}\text{H}_{70}\text{N}_6\text{O}_{30}$	$[\text{M}-2\text{H}]^{2-}$	640,1990	640,1993	-0,5
$7_{\text{PMP}}$	4	$\text{C}_{68}\text{H}_{91}\text{N}_7\text{O}_{41}$	$[\text{M}-2\text{H}]^{2-}$	829,7547	829,7560	-1,6
$9_{\text{PMP}}$	5	$\text{C}_{82}\text{H}_{112}\text{N}_8\text{O}_{52}$	$[\text{M}-2\text{H}]^{2-}$	1019,3105	1019,3106	-0,1
$11_{\text{PMP}}$	6	$\text{C}_{96}\text{H}_{133}\text{N}_9\text{O}_{63}$	$[\text{M}-3\text{H}]^{3-}$	805,5748	805,5767	-2,4
$13_{\text{PMP}}$	7	$\text{C}_{110}\text{H}_{154}\text{N}_{10}\text{O}_{74}$	$[\text{M}-3\text{H}]^{3-}$	931,9453	931,9468	-1,6
$15_{\text{PMP}}$	8	$\text{C}_{124}\text{H}_{175}\text{N}_{11}\text{O}_{85}$	$[\text{M}-3\text{H}]^{3-}$	1058,3158	1058,3180	-2,1

<sup>†</sup>Symbolické znázornění struktury oligosacharidů: = GlcA, = GlcNAc, =  $\text{GlcA}_{\text{PMP}}$ .

**Tab. D3** Plochy GlcA<sub>PMP</sub> a lichých oligosacharidů s GlcA<sub>PMP</sub> na redukujícím konci nalezené ve vzorcích daHA pomocí HPLC-UV po deaminačním štěpení.

Vzorek	$A_i$ ( $10^6$ a. u.)											
	GlcA <sub>PMP</sub>	3 <sub>PMP</sub>	5 <sub>PMP</sub>	7 <sub>PMP</sub>	9 <sub>PMP</sub>	11 <sub>PMP</sub>	13 <sub>PMP</sub>	15 <sub>PMP</sub>	17 <sub>PMP</sub>	19 <sub>PMP</sub>	21 <sub>PMP</sub>	23 <sub>PMP</sub>
S1	0,127	0,138	0,133	0,147	0,129	0,149	0,105	0,092	0,103	0,070	0,064	0,027
S2	0,257	0,2925	0,255	0,292	0,241	0,261	0,194	0,157	0,164	0,105	0,077	0,022
S3	0,452	0,501	0,403	0,372	0,338	0,327	0,229	0,155	0,144	0,076	0,063	-
S4	1,064	1,044	0,898	0,706	0,550	0,472	0,329	0,236	0,196	0,131	0,118	0,031
S5	1,440	1,489	1,325	1,036	0,791	0,640	0,449	0,328	0,277	0,188	0,155	0,040
S6	2,592	2,364	1,828	1,295	0,879	0,641	0,391	0,243	0,188	0,100	-	-
S7	2,705	2,438	1,806	1,105	0,631	0,410	0,202	0,104	0,084	-	-	-
S8	4,736	3,473	2,109	1,167	0,579	0,357	0,153	0,066	-	-	-	-
S9	0,068	0,103	0,104	0,106	0,099	0,090	0,102	0,084	0,071	0,060	0,031	-
S10	0,148	0,219	0,226	0,220	0,195	0,170	0,175	0,149	0,128	0,101	0,061	-
S11	0,174	0,273	0,305	0,279	0,238	0,210	0,192	0,157	0,131	0,104	0,050	-
S12	0,376	0,595	0,597	0,517	0,435	0,364	0,327	0,252	0,225	0,151	0,078	-
S13	1,051	1,477	1,348	0,999	0,711	0,512	0,382	0,245	0,201	0,114	0,047	-
S14	1,740	2,012	1,535	0,997	0,615	0,402	0,262	0,143	0,100	0,042	0,020	-
S15	2,182	2,660	2,038	1,246	0,774	0,460	0,288	0,149	0,109	0,039	-	-
S16	3,911	3,454	2,110	1,053	0,524	0,267	0,127	0,053	0,032	-	-	-
S17	5,277	4,706	2,378	0,841	0,337	0,117	0,031	-	-	-	-	-
S18	7,939	5,665	2,017	0,629	0,199	0,068	-	-	-	-	-	-
S19	0,111	0,245	0,199	0,184	0,164	0,142	0,125	0,115	0,117	0,083	0,045	0,009
S20	0,247	0,522	0,417	0,351	0,316	0,259	0,226	0,189	0,167	0,116	0,063	0,014
S13 <sub>100mg</sub>	1,614	2,288	1,792	1,349	1,009	0,742	0,538	0,422	0,272	0,141	0,064	-
S13 <sub>Na2SO4</sub>	0,563	0,903	0,755	0,657	0,556	0,455	0,377	0,341	0,260	0,167	0,083	-

**Tab. D4** Porovnání teoretických hodnot  $m/z$  iontů sudých 4,5-nenasycených oligosacharidů s hodnotami změřenými pomocí UHPLC-ESI-QqTOF-MS v pozitivním módu ionizace.† Převzato z lit. (Sedláček et al., 2019).

Zkratka	$k$	Vzorec	Ion	$m/z$		
				Teor.	Exp.	$\Delta$ (ppm)
$\Delta 2_{0,PMP}$	0	$C_{34}H_{39}N_5O_{12}$	$[M+H]^+$	710,2673	710,2676	-0,4
$\Delta 4_{1,PMP}$	1	$C_{46}H_{58}N_6O_{22}$	$[M+2H]^{2+}$	524,1880	524,1902	-4,2
$\Delta 8_{3,PMP}$	3	$C_{70}H_{96}N_8O_{42}$	$[M+2H]^{2+}$	861,2889	861,2892	-0,3
$\Delta 2_{1,PMP}$	0	$C_{32}H_{37}N_5O_{11}$	$[M+H]^+$	668,2568	668,2585	-2,5
$\Delta 4_{2,PMP}$	1	$C_{44}H_{56}N_6O_{21}$	$[M+2H]^{2+}$	503,1828	503,1848	-4,0

†Symbolické znázornění struktury oligosacharidů:  $\blacklozenge$  =  $\Delta$ GlcA,  $\blacklozenge$  = GlcA,  $\blacksquare$  = GlcN,  $\blacksquare^{PMP}$  = GlcN<sub>PMP</sub>,

$\blacksquare^{PMP}$  = GlcNAc<sub>PMP</sub>.

**Tab. D5** Plochy sudých 4,5-nenasycených oligosacharidů se dvěma jednotkami PMP na redukujícím konci nalezené ve vzorcích daHA pomocí HPLC-UV po štěpení enzymem SpHyl.

Vzorek	$A_n$ ( $10^6$ a. u.)				
	$\Delta 2_{0,PMP}$	$\Delta 2_{1,PMP}$	$\Delta 4_{1,PMP}$	$\Delta 4_{2,PMP}$	$\Delta 8_{3,PMP}$
S1	14,283	0,437	0,218	0,028	-
S2	15,421	0,376	0,599	0,028	-
S3	9,318	0,335	0,387	0,030	-
S4	10,725	0,802	0,824	0,150	-
S5	9,519	0,996	0,450	0,201	0,048
S6	9,779	0,967	1,135	0,251	0,130
S7	7,296	0,258	1,660	0,068	0,110
S8	6,726	0,905	1,104	0,312	0,247
S9	17,173	0,097	0,736	-	-
S10	12,221	0,558	0,226	0,038	-
S11	12,762	0,280	0,924	0,015	-
S12	10,267	0,853	0,467	0,106	-
S13	7,804	0,984	0,349	0,236	0,057
S14	8,456	1,107	0,817	0,415	0,137
S15	6,909	1,187	0,344	0,328	0,096
S16	5,109	1,146	0,290	0,432	0,183
S17	4,710	0,893	0,205	0,372	0,136
S18	2,828	0,819	0,086	0,374	0,110



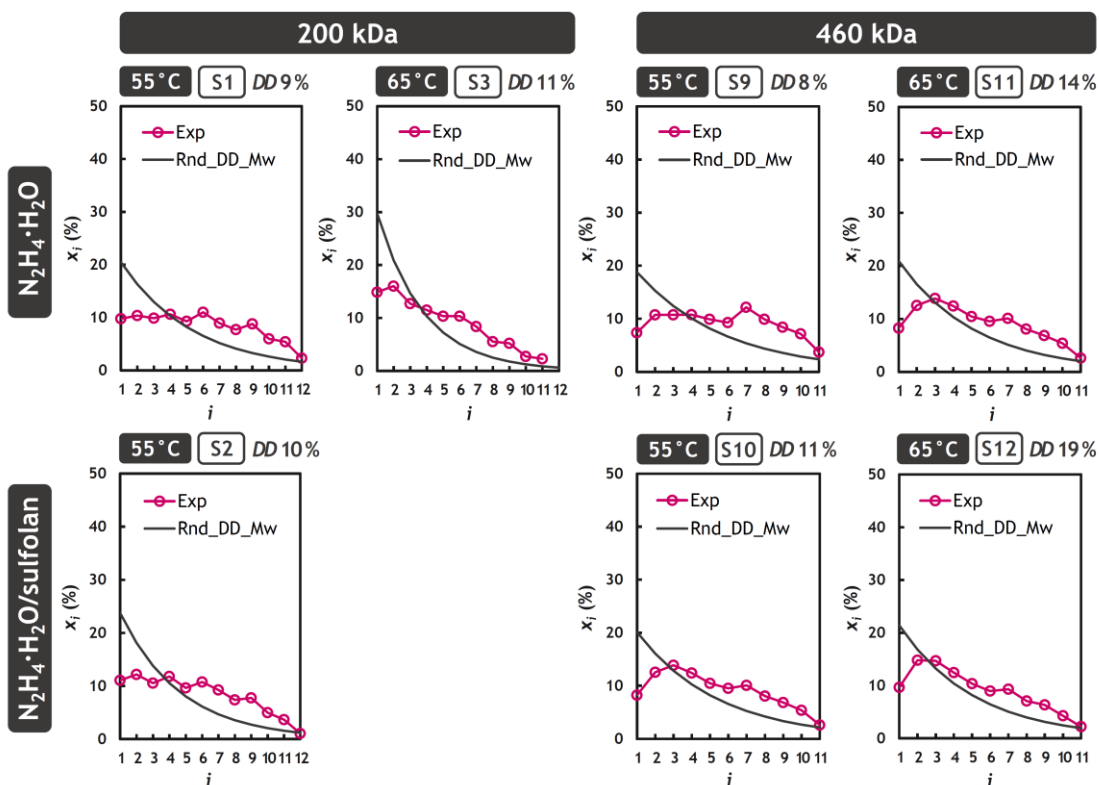
**Tab. D6** Porovnání experimentálních molárních zlomků oligosacharidů získaných enzymatickým štěpením (Exp) s teoretickými zlomky odpovídajícími náhodné distribuci aminoskupin bez předštěpení (Rnd\_L=L0) a s předštěpením (Rnd\_L=i) pro vzorky daHA s  $DD_{\text{NMR},2} \leq 30$  %. Pro zvýšení přehlednosti byl spodní index PMP ve zkratkách oligosacharidů vynechán. Převzato z lit. (Sedláček et al., 2019).

$x_n$ (%)	S1			S2			S3		
	Exp	L=L <sub>0</sub>	L=3	Exp	L=L <sub>0</sub>	L=3	Exp	L=L <sub>0</sub>	L=3
$\Delta 8_3$	0,00	0,02	0,02	0,00	0,04	0,04	0,00	0,07	0,07
$\Delta 4_2$	0,22	0,39	0,39	0,23	0,61	0,59	0,40	0,87	0,82
$\Delta 4_1$	2,06	5,74	3,96	4,92	7,01	4,97	5,16	7,97	5,79
$\Delta 2_1$	4,00	0,24	1,91	3,09	0,47	2,37	4,47	0,94	2,89
$\Delta 2_0$	93,72	93,61	93,71	91,76	91,87	92,02	89,98	90,13	90,42

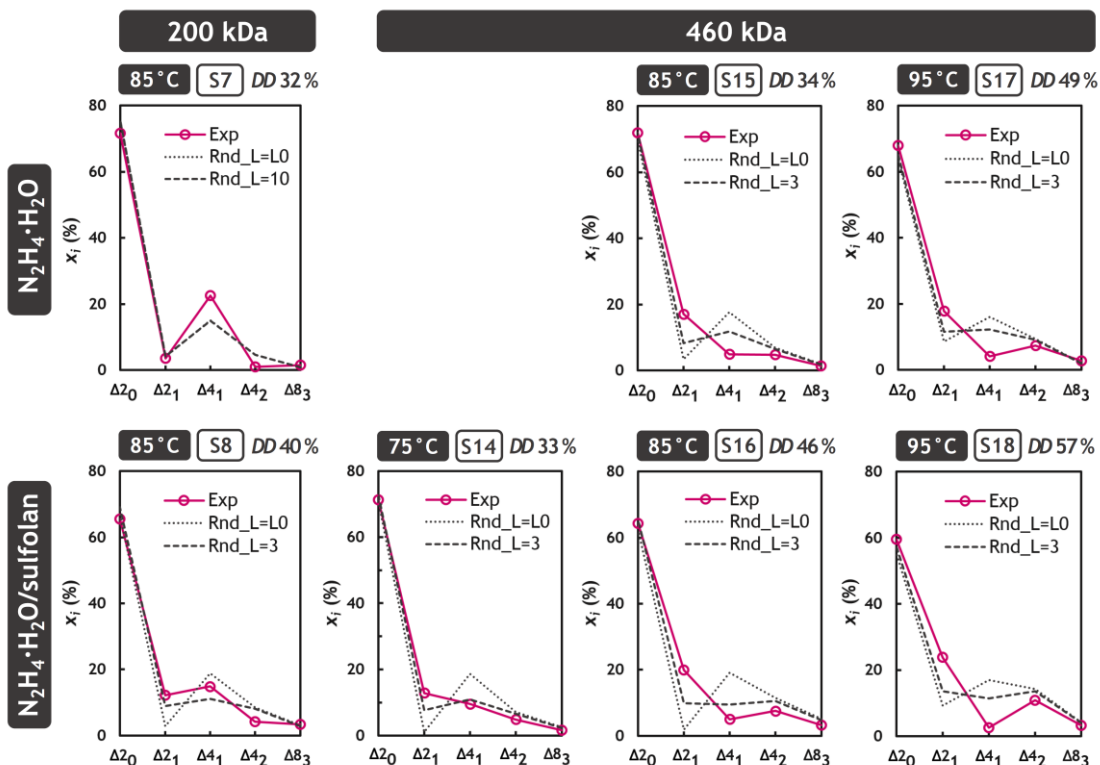
$x_n$ (%)	S4			S5			S6		
	Exp	L=L <sub>0</sub>	L=3	Exp	L=L <sub>0</sub>	L=3	Exp	L=L <sub>0</sub>	L=3
$\Delta 8_3$	0,00	0,55	0,53	0,56	0,82	0,79	1,36	1,54	1,45
$\Delta 4_2$	1,57	2,74	2,61	2,34	3,71	3,39	2,62	5,26	4,96
$\Delta 4_1$	8,63	13,94	9,01	5,23	14,98	9,88	11,86	17,22	10,64
$\Delta 2_1$	8,40	0,64	4,96	11,59	1,04	5,63	10,11	1,33	6,80
$\Delta 2_0$	81,40	82,13	82,89	80,28	79,45	80,32	74,05	74,66	76,15

$x_n$ (%)	S9			S10			S11		
	Exp	L=L <sub>0</sub>	L=8	Exp	L=L <sub>0</sub>	L=3	Exp	L=L <sub>0</sub>	L=4
$\Delta 8_3$	0,00	0,02	0,02	0,00	0,06	0,06	0,00	0,12	0,12
$\Delta 4_2$	0,00	0,36	0,39	0,39	0,67	0,70	0,15	1,07	1,05
$\Delta 4_1$	5,54	5,54	4,98	2,34	7,84	5,10	8,83	9,33	6,98
$\Delta 2_1$	0,73	0,08	0,74	5,76	0,16	2,59	2,67	0,21	2,36
$\Delta 2_0$	93,73	94,01	93,87	91,50	91,27	91,55	88,35	89,27	89,50

$x_n$ (%)	S12			S13		
	Exp	L=L <sub>0</sub>	L=3	Exp	L=L <sub>0</sub>	L=3
$\Delta 8_3$	0,00	0,43	0,41	0,79	1,08	1,11
$\Delta 4_2$	1,19	2,22	2,15	3,24	1,01	4,55
$\Delta 4_1$	5,26	13,04	8,28	4,79	10,75	10,60
$\Delta 2_1$	9,62	0,17	4,47	13,51	0,76	6,31
$\Delta 2_0$	83,92	84,14	84,69	77,67	86,40	77,42



**Obr. D1** Porovnání experimentálních molárních zlomků oligosacharidů získaných deaminačním štěpením (Exp) s teoretickými zlomky odpovídajícími náhodné distribuci aminoskupin (Rnd\_DD\_Mw) pro vzorky daHA s  $DD_{NMR,2} < 20\%$ . U každého vzorku je uvedena výchozí molární hmotnost HA, činidlo, reakční teplota a výsledný  $DD_{NMR,2}$ . Převzato z lit. (Sedláček et al., 2019).



**Obř. D2** Porovnání experimentálních molárních zlomků oligosacharidů získaných enzymatickým štěpením (Exp) s teoretickými zlomky odpovídajícími náhodné distribuci aminoskupin bez předštěpení (Rnd\_L=L0) a s předštěpením (Rnd\_L=i) pro vzorky daHA s  $DD_{NMR,2} > 30\%$ . U každého vzorku je uvedena výchozí molární hmotnost HA, činidlo, reakční teplota a výsledný  $DD_{NMR,2}$ . Pro zvýšení přehlednosti byl spodní index PMP ve zkratkách oligosacharidů vynechán. Převzato z lit. (Sedláček et al., 2019).

## 7 LITERATURA

Citace a odkazy v textu byly zpracovány podle citační normy časopisu *Carbohydrate Polymers*.

- Alkrad, J. A., Merstani, Y., & Neubert, R. H. H. (2002). New approaches for quantifying hyaluronic acid in pharmaceutical semisolid formulations using HPLC and CZE. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *30*, 913–919.
- Allan, G. G., & Peyron, M. (1995). Molecular weight manipulation of chitosan I: kinetics of depolymerization by nitrous acid. *Carbohydrate Research*, *277*, 257–272.
- Almond, A., DeAngelis, P. L., & Blundell, C. D. (2006). Hyaluronan: the local solution conformation determined by NMR and computer modeling is close to a contracted left-handed 4-fold helix. *Journal of Molecular Biology*, *358*, 1256–1269.
- Alpert, A. J. (1990). Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds. *Journal of Chromatography A*, *499*, 177–196.
- Babasola, O., Rees-Milton, K. J., Bebe, S., Wang, J., & Anastassiades, T. P. (2014). Chemically modified *N*-acylated hyaluronan fragments modulate proinflammatory cytokine production by stimulated human macrophages. *Journal of Biological Chemistry*, *289*, 24779–24791.
- Bai, W., Fang, X., Zhao, W., Huang, S., Zhang, H., & Qian, M. (2015). Determination of oligosaccharides and monosaccharides in Hakka rice wine by precolumn derivation high-performance liquid chromatography. *Journal of Food and Drug Analysis*, *23*, 645–651.
- Bakke, M., Kamei, J., & Obata, A. (2011). Identification, characterization, and molecular cloning of a novel hyaluronidase, a member of glycosyl hydrolase family 16, from *Penicillium* spp. *FEBS Letters*, *585*, 115–120.
- Bauer, D., & Gaillochet, P. (1978). Anhydrous hydrazine and water–hydrazine mixtures. In J. J. Lagowski (Ed.). *The Chemistry of Nonaqueous Solvents, Volume V-A: Principles and Basic Solvents* (pp. 251–275). Elsevier Inc.
- Bellini, D., & Topai, A. (1999). Amides of Hyaluronic Acid and the Derivatives Thereof and a Process for Their Preparation, U.S. Patent 10/220,853, July 6, 1999.
- Blundell, C. D., & Almond, A. (2006). Enzymatic and chemical methods for the generation of pure hyaluronan oligosaccharides with both odd and even numbers of monosaccharide units. *Analytical Biochemistry*, *353*, 236–247.
- Blundell, C. D., DeAngelis, P. L., & Almond, A. (2006). Hyaluronan: the absence of amide–carboxylate hydrogen bonds and the chain conformation in aqueous solution are incompatible with stable secondary and tertiary structure models. *Biochemical Journal*, *396*, 487–498.
- Bobková, L., Smirnou, D., Krčmář, M., Kulhánek, J., Hermannová, M., Franke, L., et al. (2018). Discovery and characteristic of hyaluronidases from filamentous fungi. *Current Biotechnology*, *7*, 2–9.

- Buffa, R., Šedová, P., Basarabová, I., Moravcová, M., Wolfová, L., Bobula, T., et al. (2015).  $\alpha,\beta$ -Unsaturated aldehyde of hyaluronan – Synthesis, analysis and applications. *Carbohydrate Polymers*, *134*, 293–299.
- Capila, I., & Sasisekharan, R. (2004). Methods for analysis of hyaluronan and its fragments. In H. G. Garg, & C. A. Hales (Eds.). *Chemistry and Biology of Hyaluronan* (pp. 21–40). Elsevier Science.
- Cleland, R. L. (1979). Binding of hyaluronic acid oligosaccharides by cartilage proteoglycan. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *87*, 1140–1145.
- Cowman, M. K. (2017). Hyaluronan and hyaluronan fragments. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, *74*, 1–59.
- Cowman, M. K., & Matsuoka, S. (2005). Experimental approaches to hyaluronan structure. *Carbohydrate Research*, *340*, 791–809.
- Cowman, M. K., & Mendichi, R. (2004). Methods for determination of hyaluronan molecular weight. In H. G. Garg, & C. A. Hales (Eds.). *Chemistry and Biology of Hyaluronan* (pp. 41–69). Elsevier Science.
- Cowman, M. K., Spagnoli, C., Kudasheva, D., Li, M., Dyal, A., Kanai, S., et al. (2005). Extended, relaxed, and condensed conformations of hyaluronan observed by atomic force microscopy. *Biophysical Journal*, *88*, 590–602.
- Cramer, J. A., & Bailey, L. C. (1991). A reversed-phase ion-pair high-performance liquid chromatography method for bovine testicular hyaluronidase digests using postcolumn derivatization with 2-cyanoacetamide and ultraviolet detection. *Analytical Biochemistry*, *196*, 183–191.
- Crescenzi, V., Francescangeli, A., Renier, D., & Bellini, D. (2002). New cross-linked and sulfated derivatives of partially deacetylated hyaluronan: Synthesis and preliminary characterization. *Biopolymers*, *64*, 86–94.
- Crescenzi, V., Francescangeli, A., Segre, A. L., Capitani, D., Mannina, L., Renier, D., et al. (2002). NMR structural study of hydrogels based on partially deacetylated hyaluronan. *Macromolecular Bioscience*, *2*, 272–279.
- Čožíková, D., Šílová, T., Moravcová, V., Šmejkalová, D., Pepeliaev, S., Velebný, V., et al. (2017). Preparation and extensive characterization of hyaluronan with narrow molecular weight distribution. *Carbohydrate Polymers*, *160*, 134–142.
- Dahl, L. B., Laurent, T. C., & Smedsrød, B. (1988). Preparation of biologically intact radioiodinated hyaluronan of high specific radioactivity: Coupling of  $^{125}\text{I}$ -tyraminecellobiose to amino groups after partial *N*-deacetylation. *Analytical Biochemistry*, *175*, 397–407.
- Day, A. J., & Sheehan, J. K. (2001). Hyaluronan: polysaccharide chaos to protein organisation. *Current Opinion in Structural Biology*, *11*, 617–622.
- Deschrevel, B., Tranchepain, F., & Vincent, J.-C. (2008). Chain-length dependence on the kinetics of the hyaluronan hydrolysis catalyzed by bovine testicular hyaluronidase. *Matrix Biology*, *27*, 475–486.

- Enebro, J., Momcilovic, D., Siika-Aho, M., & Karlsson, S. (2007). A new approach for studying correlations between the chemical structure and the rheological properties in carboxymethyl cellulose. *Biomacromolecules*, *8*, 3253–3257.
- Finelli, I., Chiessi, E., Oddo, L., Galesso, D., Renier, D., & Paradossi, G. (2014). Collective dynamics and transient behavior of partially hydrophobic hyaluronic acid chains. *Macromolecular Chemistry and Physics*, *215*, 140–147.
- Giavarina, D. (2015). Understanding Bland Altman analysis. *Biochemia Medica*, *25*, 141–151.
- Grand View Research (2019). Hyaluronic acid market size, share & trends analysis report by application (dermal fillers, osteoarthritis (single injection, three injection, five injection), ophthalmic, vesicoureteral reflux), by region, and segment forecasts, 2020–2027, URL: <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/hyaluronic-acid-market> (accessed: 17. 10. 2020)
- Gu, K., Linhardt, R. J., Laliberté, M., Gu, K., & Zimmermann, J. (1995). Purification, characterization and specificity of chondroitin lyases and glycuronidase from *Flavobacterium heparinum*. *Biochemical Journal*, *312*, 569–577.
- Han, Z., Zeng, Y., Lu, H., & Zhang, L. (2015). Determination of the degree of acetylation and the distribution of acetyl groups in chitosan by HPLC analysis of nitrous acid degraded and PMP labeled products. *Carbohydrate Research*, *413*, 75–84.
- Hardingham, T. (2004). Solution properties of hyaluronan. In H. G. Garg, & C. A. Hales (Eds.). *Chemistry and Biology of Hyaluronan* (pp. 1–20). Elsevier Science.
- Harvey, D. J. (2011). Derivatization of carbohydrates for analysis by chromatography; electrophoresis and mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, *879*, 1196–1225.
- He, J., Huang, H., Zou, X., Wang, Y., Du, G., & Kang, Z. (2020). Construction of saturated odd- and even-numbered hyaluronan oligosaccharide building block library. *Carbohydrate Polymers*, *231*, Article 115700.
- Hiorns, R. C., Boucher, R. J., Duhlev, R., Hellwich, K.-H., Hodge, P., Jenkins, A. D., et al. (2012). A brief guide to polymer nomenclature (IUPAC technical report). *Pure and Applied Chemistry*, *84*, 2167–2169.
- Hirano, K., Sakai, S., Ishikawa, T., Avci, F. Y., Linhardt, R. J., & Toida, T. (2005). Preparation of the methyl ester of hyaluronan and its enzymatic degradation. *Carbohydrate Research*, *340*, 2297–2304.
- Hirano, S., & Hoffman, P. (1962). The hexosaminidic linkage of hyaluronic acid. *Journal of Organic Chemistry*, *27*, 395–398.
- Hirano, S., Ishigami, M., & Koga, Y. (1975). Depolymerization and de-*N*-acetylation of glycosaminoglycuronans by the action of alkali in the presence of sodium borohydride. *Connective Tissue Research*, *3*, 73–79.
- Höök, M., Riesenfeld, J., & Lindahl, U. (1982). *N*-[<sup>3</sup>H]Acetyl-labeling, a convenient method for radiolabeling of glycosaminoglycans. *Analytical Biochemistry*, *119*, 236–245.

- Horton, D., & Philips, K. (1973). The nitrous acid deamination of glycosides and acetates of 2-amino-2-deoxy-D-glucose. *Carbohydrate Research*, 30, 367–374.
- Chen, F., Kakizaki, I., Yamaguchi, M., Kojima, K., Takagaki, K., & Endo, M. (2009). Novel products in hyaluronan digested by bovine testicular hyaluronidase. *Glycoconjugate Journal*, 26, 559–566.
- Chmelař, J., Kotzianová, A., Hermannová, M., Šuláková, R., Šmejkalová, D., Kulhánek, J., et al. (2017). Evaluating the degree of substitution of water-insoluble acyl derivatives of hyaluronan using Raman spectroscopy: method development and comparison with gas chromatography and <sup>1</sup>H NMR. *Analytical Methods*, 9, 232–239.
- Chun, L. E., Koob, T. J., & Eyre, D. R. (1988). Quantitation of hyaluronic acid in tissues by ion-pair reverse-phase high-performance liquid chromatography of oligosaccharide cleavage products. *Analytical Biochemistry*, 171, 197–206.
- Inoue, Y., & Kitajima, K. (1985). A mechanistic consideration of the hydrazinolysis of 3-O-substituted 2-acetamido-2-deoxy-D-hexopyranosyl and -D-hexitol residues in the absence and presence of hydrazinium sulfate. *Carbohydrate Research*, 135, 342–347.
- Jeanloz, R. W., & Forchielli, E. (1951). Studies on hyaluronic acid and related substances: IV. Periodate oxidation. *Journal of Biological Chemistry*, 190, 537–546.
- Jiang, B., Drouet, E., Milas, M., & Rinaudo, M. (2000). Study on TEMPO-mediated selective oxidation of hyaluronan and the effects of salt on the reaction kinetics. *Carbohydrate Research*, 327, 455–461.
- Kakizaki, I., Ibori, N., Kojima, K., Yamaguchi, M., & Endo, M. (2010). Mechanism for the hydrolysis of hyaluronan oligosaccharides by bovine testicular hyaluronidase. *FEBS Journal*, 277, 1776–1786.
- Kenne, L., Gohil, S., Nilsson, E. M., Karlsson, A., Ericsson, D., Kenne, A. H., et al. (2013). Modification and cross-linking parameters in hyaluronic acid hydrogels – definitions and analytical methods. *Carbohydrate Polymers*, 91, 410–418.
- Kim, C.-H., & Kim, J.-I. (2011). Deacetylation Hydrolase of Hyaluronic Acid, Hyaluronic Acid Deacetylated by Same and Derivative Thereof. U.S. Patent 13/703,619, June 10, 2011.
- Kool, M. M., Gruppen, H., Sworn, G., & Schols, H. A. (2013). Comparison of xanthans by the relative abundance of its six constituent repeating units. *Carbohydrate Polymers*, 98, 914–921.
- Kragten, J. (1994). Calculating standard deviations and confidence intervals with a universally applicable spreadsheet technique. *Analyst*, 119, 2161–2165.
- Kühn, A. V., Raith, K., Sauerland, V., & Neubert, R. H. (2003). Quantification of hyaluronic acid fragments in pharmaceutical formulations using LC-ESI-MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 30, 1531–1537.
- Kumar, A., Maurya, S., Gupta, M. K., & Shukla, R. D. (2014). Amphiphile catalysed selective synthesis of 4-amino alkylated-1H-pyrazol-5-ol via Mannich aromatization preferred to the Knoevenagel–Michael type reaction in water. *RSC Advances*, 4, 57953–57957.

- Kumirska, J., Czerwicka, M., Kaczyński, Z., Bychowska, A., Brzozowski, K., Thöming, J., et al. (2010). Application of spectroscopic methods for structural analysis of chitin and chitosan. *Marine Drugs*, *8*, 1567–1636.
- Kuo, J. W. (2006). *Practical Aspects of Hyaluronan Based Medical Products*. CRC Press.
- Lapčík, L. Jr., Lapčík, L., De Smedt, S., Demeester, J., & Chabreček, P. (1998). Hyaluronan: preparation, structure, properties, and applications. *Chemical Reviews*, *98*, 2663–2684.
- Lauder, R. M., Huckerby, T. N., & Nieduszynski, I. A. (2000). A fingerprinting method for chondroitin/dermatan sulfate and hyaluronan oligosaccharides. *Glycobiology*, *10*, 393–401.
- Lemmnitzer, K., Schiller, J., Becher, J., Möller, S., & Schnabelrauch, M. (2014). Improvement of the digestibility of sulfated hyaluronans by bovine testicular hyaluronidase: a UV spectroscopic and mass spectrometric study. *BioMed Research International*, *2014*, 986594.
- Li, S., Kelly, S., Lamani, E., Ferraroni, M., & Jedrzejewski, M. (2000). Structural basis of hyaluronan degradation by *Streptococcus pneumoniae* hyaluronate lyase. *EMBO Journal*, *15*, 1228–1240.
- Liu, L., Liu, Y., Li, J., Du, G., & Chen, J. (2011). Microbial production of hyaluronic acid: current state, challenges, and perspectives. *Microbial Cell Factories*, *10*, 99.
- Longas, M. O., Burden, J. D., Lesniak, J., Booth, R. M., McPencow, J. A., & Park, J. I. (2003). Hyaluronic acid *N*-deacetylase assay in whole skin. *Biomacromolecules*, *4*, 189–192.
- Longas, M. O., Russell, C. S., & He, X.-Y. (1986). Chemical alterations of hyaluronic acid and dermatan sulfate detected in aging human skin by infrared spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – General Subjects*, *884*, 265–269.
- Longas, M. O., Russell, C. S., & He, X.-Y. (1987). Evidence for structural changes in dermatan sulfate and hyaluronic acid with aging. *Carbohydrate Research*, *159*, 127–136.
- Longas, M. O., Tinkle-Pereira, J. M., Dubec, S., & Park, J. I. (2007). Hyaluronic acid *N*-deacetylase revealed. *Glycobiology*, *17*, 1270.
- Longas, M. O., Tinkle-Pereira, J. M., Cheairs, K., Ojo, T. O., Enane, F., & Warner, D. (2014). Purification of human skin *N*-deacetylase. *Glycobiology*, *24*, 1162.
- Ludbrook, J. (2010). Confidence in Altman-Bland plots: a critical review of the method of differences. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, *37*, 143–149.
- Luu, H.-M. D., Chen, A., & Isayeva, I. S. (2013). Comparative stability of the bioresorbable ferric crosslinked hyaluronic acid adhesion prevention solutions. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, *101B*, 1006–1013.
- Lv, M., Wang, M., Cai, W., Hao, W., Yuan, P., & Kang, Z. (2016). Characterisation of separated end hyaluronan oligosaccharides from leech hyaluronidase and evaluation of angiogenesis. *Carbohydrate Polymers*, *142*, 309–316.



- Mai, V. Q., Vo, T. T., & Meere, M. (2018). Modelling hyaluronan degradation by *Streptococcus pneumoniae* hyaluronate lyase. *Mathematical Biosciences*, *303*, 126–138.
- Malavaki, C. J., Kanakis, I., Theocharis, A. D., Lamari, F. N., & Karamanos, N. K. (2007). Hyaluronan determination: biological significance & analytical tools. *Current Pharmaceutical Analysis*, *3*, 117–128.
- Matteini, P., Dei, L., Carretti, E., Volpi, N., Goti, A., & Pini, R. (2009). Structural behavior of highly concentrated hyaluronan. *Biomacromolecules*, *10*, 1516–1522.
- Mikelsaar, R. H., & Scott, J. E. (1994). Molecular modelling of secondary and tertiary structures of hyaluronan, compared with electron microscopy and NMR data. Possible sheets and tubular structures in aqueous solution. *Glycoconjugate Journal*, *11*, 65–71.
- Milas, M., & Rinaudo, M. (2004). Characterization and properties of hyaluronic acid (hyaluronan). In S. Dumitriu (Ed.). *Polysaccharides: Structural Diversity and Functional Versatility* (pp. 535–549). CRC Press.
- Mischnick, P. (2011). Mass spectrometric characterization of oligo- and polysaccharides and their derivatives. In M. Hakkarainen (Ed.). *Mass Spectrometry of Polymers – New Techniques. Advances in Polymer Science*, *248*. (pp. 105–174). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Mischnick, P., & Momcilovic, D. (2010). Chemical structure analysis of starch and cellulose derivatives. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, *64*, 117–210.
- Myron, P., Siddiquee, S., Azad, S. A., & Yong, Y. S. (2014). Tributylamine facilitated separations of fucosylated chondroitin sulfate (Fucs) by high performance liquid chromatography (HPLC) into its component using 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone (PMP) derivatization. *Journal of Chromatography & Separation Techniques*, *6*, 1000256.
- Nimptsch, K., Süß, R., Riemer, T., Nimptsch, A., Schnabelrauch, M., & Schiller, J. (2010). Differently complex oligosaccharides can be easily identified by matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight mass spectrometry directly from a standard thin-layer chromatography plate. *Journal of Chromatography A*, *1217*, 3711–3715.
- Oerther, S., Maurin, A. C., Payan, E., Hubert, P., Lapique, F., Presle, N., et al. (2000). High interaction alginate – Hyaluronate associations by hyaluronate deacetylation for the preparation of efficient biomaterials. *Biopolymers*, *54*, 273–281.
- Ohya, T., & Kaneko, Y. (1970). Novel hyaluronidase from streptomycetes, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Enzymology*, *198*, 607–609.
- Porter, W. H. (1975). Application of nitrous acid deamination of hexosamines to the simultaneous GLC determination of neutral and amino sugars in glycoproteins. *Analytical Biochemistry*, *63*, 27–43.
- Rees, M. D., Hawkins, C. L., & Davies, M. J. (2003). Hypochlorite-mediated fragmentation of hyaluronan, chondroitin sulfates, and related *N*-acetyl glycosamines: Evidence for chloramide intermediates, free radical transfer reactions, and site-specific fragmentation. *Journal of the American Chemical Society*, *125*, 13719–13733.

- Remoroza, C., Buchholt, H. C., Gruppen, H., & Schols, H. A. (2014). Descriptive parameters for revealing substitution patterns of sugar beet pectins using pectolytic enzymes. *Carbohydrate Polymers*, *101*, 1205–1215.
- Renier, D., & d'Este, M. (2013). Hyaluronic Acid Derivatives Containing Groups Able to Release NO. U.S. Patent 13/757,720, February 1, 2013.
- Ret, D., Steiner, G., Gentilini, S., & Knaus, S. (2019). Exact determination of the degree of substitution of high molar mass hyaluronan by controlling the conformation in solution. *Carbohydrate Polymers*, *204*, 124–130.
- Riesenfeld, J., & Rodén, L. (1990). Quantitative analysis of *N*-sulfated, *N*-acetylated, and unsubstituted glucosamine amino groups in heparin and related polysaccharides. *Analytical Biochemistry*, *188*, 383–389.
- Robert, L., Robert, A.-M., & Renard, G. (2010). Biological effects of hyaluronan in connective tissues, eye, skin, venous wall. Role in aging. *Pathologie Biologie*, *58*, 187–198.
- Rothenhöfer, M., Grundmann, M., Bernhardt, G., Matysik, F. M., & Buschauer, A. (2015). High performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD) for the sensitive determination of hyaluronan oligosaccharides. *Journal of Chromatography B*, *988*, 106–115
- Sedláček, J., Hermannová, M., Mrázek, J., Buffa, R., Lišková, P., Šatínský, D., et al. (2019). Insight into the distribution of amino groups along the chain of chemically deacetylated hyaluronan. *Carbohydrate Polymers*, *225*, Article 115156.
- Sedláček, J., Hermannová, M., Šatínský, D., & Velebný, V. (2020). Current analytical methods for the characterization of *N*-deacetylated hyaluronan: A critical review. *Carbohydrate Polymers*, *249*, Article 116720.
- Shaklee, P. N., & Conrad, H. E. (1984). Hydrazinolysis of heparin and other glycosaminoglycans. *Biochemical Journal*, *217*, 187–197.
- Sheehan, J. K., & Almond, A. (2001). Hyaluronan: static, hydrodynamic, and molecular dynamic views. *Glycoforum*, *5*, A8. URL: <http://glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA21/HA21E.html> (accessed: 18. 10. 2020).
- Sheehan, J. K., Gardner, K. H., & Atkins, E. D. T. (1977). Hyaluronic acid: a double-helical structure in the presence of potassium at low pH and found also with the cations ammonium, rubidium, and caesium. *Journal of Molecular Biology*, *117*, 113–135.
- Schanté, C. E., Zuber, G., Herlin, C., & Vandamme, T. F. (2011). Chemical modifications of hyaluronic acid for the synthesis of derivatives for a broad range of biomedical applications. *Carbohydrate Polymers*, *85*, 469–489.
- Smirnou, D., Krčmář, M., Kulhánek, J., Hermannová, M., Bobková, L., Franke, L., et al. (2015). Characterization of hyaluronan-degrading enzymes from yeasts. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *177*, 700–712.
- Spencer, J. L., Bernanke, J. A., Buczek-Thomas, J. A., & Nugent, M. A. (2010). A computational approach for deciphering the organization of glycosaminoglycans. *PLoS One*, *5*, e9389.

- Stepito, R. F. (2010). Dispersity in polymer science (IUPAC Recommendation 2009). *Polymer International*, 59, 23–24.
- Stern, R., & Jedrzejewski, M. J. (2006). Hyaluronidases: their genomics, structures, and mechanisms of action. *Chemical Reviews*, 106, 818–839.
- Sugahara, K. N., Murai, T., Nishinakamura, H., Kawashima, H., Saya, H., & Miyasaka, M. (2003). Hyaluronan oligosaccharides induce CD44 cleavage and promote cell migration in CD44-expressing tumor cells. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 32259–32265.
- Šedová, P., Buffa, R., Kettou, S., Huerta-Angeles, G., Hermannová, M., Leierová, V., et al. (2013). Preparation of hyaluronan polyaldehyde – a precursor of biopolymer conjugates. *Carbohydrate Research*, 371, 8–15.
- Šimek, M., Lemr, K., Hermannová, M., & Havlíček, V. (2020). Analysis of hyaluronan and its derivatives using chromatographic and mass spectrometric techniques. *Carbohydrate Polymers*, 250, Article 117014.
- Šmejkalová, D., Hermannová, M., Šuláková, R., Průšová, A., Kučerík, J., & Velebný, V. (2012). Structural and conformational differences of acylated hyaluronan modified in protic and aprotic solvent system. *Carbohydrate Polymers*, 87, 1460–1466.
- Tao, L., Song, F., Xu, N., Li, D., Linhardt, R. J., & Zhang, Z. (2017). New insights into the action of bacterial chondroitinase AC I and hyaluronidase on hyaluronic acid. *Carbohydrate Polymers*, 158, 85–92.
- Tawada, A., Masa, T., Oonuki, Y., Watanabe, A., Matsuzaki, Y., & Asari, A. (2002). Large-scale preparation, purification, and characterization of hyaluronan oligosaccharides from 4-mers to 52-mers. *Glycobiology*, 12, 421–426.
- Tokita, Y., & Okamoto, A. (1995). Hydrolytic degradation of hyaluronic acid. *Polymer Degradation and Stability*, 48, 269–273.
- Tømmeraas, K., & Melander, C. (2008). Kinetics of hyaluronan hydrolysis in acidic solution at various pH values. *Biomacromolecules*, 9, 1535–1540.
- Tømmeraas, K., & Wahlund, P.-O. (2009). Poly-acid properties of biosynthetic hyaluronan studied by titration. *Carbohydrate Polymers*, 77, 194–200.
- Tripodo, G., Trapani, A., Torre, M. L., Giammona, G., Trapani, G., & Mandracchia, D. (2015). Hyaluronic acid and its derivatives in drug delivery and imaging: recent advances and challenges. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 97, 400–416.
- Tsuji, A., Kinoshita, T., & Hoshino, M. (1969a). Analytical chemical studies on amino sugars. II. Determination of hexosamines using 3-methyl-2-benzothiazolone hydrazone hydrochloride. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 17, 1505–1510.
- Tsuji, A., Kinoshita, T., & Hoshino, M. (1969b). Microdetermination of hexosamines. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 17, 217–218.

- Vigliano, M., Bianchera, A., Bettini, R., & Elviri, L. (2013). Determination of hyaluronic acid in a chitosan-based formulation by RP C18 and HILIC LC-ESI-MS: An evaluation of matrix effect. *Chromatographia*, *76*, 1761–1766.
- Volpi, N. (2007). On-line HPLC/ESI-MS separation and characterization of hyaluronan oligosaccharides from 2-mers to 40-mers. *Analytical Chemistry*, *79*, 6390–6397.
- Wada, T., Chirachanchai, S., Izawa, N., Inaki, Y., & Takemoto, K. (1994). Synthesis and properties of hyaluronic acid conjugated nucleic acid analogs: 1. Synthesis of deacetylhyaluronan and introduction of nucleic acid bases. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, *9*, 429–447.
- Wada, T., Chirachanchai, S., Izawa, N., Inaki, Y., & Takemoto, K. (1995). Synthesis of hyaluronan derivatives containing nucleic acid bases. In C. Gebelein, & C. E. Carraher Jr. (Eds.). *Industrial Biotechnological Polymers* (pp. 121–174). CRC Press.
- Wende, F. J., Gohil, S., Mojarradi, H., Gerfaud, T., Nord, L. I., Karlsson, A., et al. (2016). Determination of substitution positions in hyaluronic acid hydrogels using NMR and MS based methods. *Carbohydrate Polymers*, *136*, 1348–1357.
- Westling, C., & Lindahl, U. (2002). Location of N-unsubstituted glucosamine residues in heparan sulfate. *Journal of Biological Chemistry*, *277*, 49247–49255.
- Widner, B., Behr, R., Von Dollen, S., Tang, M., Heu, T., Sloma, A., et al. (2005). Hyaluronic acid production in *Bacillus subtilis*. *Applied and Environmental Microbiology*, *71*, 3747–3752.
- Wu, C.-L., Liu, J.-F., & Zhang, Z.-Q. (2014). Hydrophilic interaction liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry for analysis of glycosaminoglycan oligosaccharides. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, *43*, 1198–1202.
- Yaffe, N. R., Almond, A., & Blanch, E. W. (2010). A new route to carbohydrate secondary and tertiary structure using Raman spectroscopy and Raman optical activity. *Journal of the American Chemical Society*, *132*, 10654–10655.
- Yang, B., Guo, X., Zang, H., & Liu, J. (2015). Determination of modification degree in BDDE-modified hyaluronic acid hydrogel by SEC/MS. *Carbohydrate Polymers*, *131*, 233–239.
- Yu, Y., Tyrikos-Ergas, T., Zhu, Y., Fittolani, G., Bordoni, V., Singhal, A., et al. (2019). Systematic hydrogen-bond manipulations to establish polysaccharide structure – property correlations. *Angewandte Chemie International Edition*, *58*, 13127–13132.
- Zhang, W., Mu, H., Dong, D., Wang, D., Zhang, A., & Duan, J. (2014). Alteration in immune responses toward N-deacetylation of hyaluronic acid. *Glycobiology*, *24*, 1334–1342.
- Zhang, W., Mu, H., Zhang, A., Cui, G., Chen, H., Duan, J., et al. (2013). A decrease in moisture absorption-retention capacity of N-deacetylation of hyaluronic acid. *Glycoconjugate Journal*, *30*, 577–583.
- Zhang, Y., Zhang, P., Wang, Z., & Huang, L. (2011). An innovative derivatization method for simultaneous determination of uronic acids and neutral and amino sugars in coexisting samples by HPLC-ESI-MS/MS<sup>2</sup>. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, *34*, 1754–1771.

## 8 PUBLIKAČNÍ ČINNOST

### ČLÁNKY

Sedláček, J., Hermannová, M., Mrázek, J., Buffa, R., Lišková, P., Šatínský, D., et al. (2019). Insight into the distribution of amino groups along the chain of chemically deacetylated hyaluronan. *Carbohydrate Polymers*, 225, Article 115156. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115156>. **IF<sub>2020</sub> 7,182**. (Příloha I.)

Sedláček, J., Hermannová, M., Šatínský, D., & Velebný, V. (2020). Current analytical methods for the characterization of *N*-deacetylated hyaluronan: A critical review. *Carbohydrate Polymers*, 249, Article 116720. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116720>. **IF<sub>2020</sub> 7,182**. (Příloha II.)

### POSTERY

Sedláček, J., Hermannová, M., Šatínský, D., & Velebný, V. (2017). Determination of the degree of deacetylation of *N*-deacetylated hyaluronan using HPLC-UV. 6. ročník České chromatografické školy – HPLC 2017 (Rožnov pod Radhoštěm, Česká republika).