

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra fyziky a fyzikální chemie

**Optimalizace preparativní LC-MS metody frakcionace  
oligosacharidů hyaluronanu**

Diplomová práce

Bc. Martina Dvořáková

Vedoucí diplomové práce: Doc. Ing. Alice Lázníčková, CSc.

Konzultant diplomové práce: Mgr. Martina Hermannová, Ph.D.

Hradec Králové

2012/2013

Ráda bych poděkovala Mgr. Martině Hermannové, Ph.D. za odborné vedení a poskytování rad při provádění experimentálních analýz a své školitelce Doc. Ing. Alici Lázníčkové, CSc. za ochotnou pomoc při zpracování diplomové práce. V neposlední řadě děkuji firmě Contipro Pharma, a.s. a jejím pracovníkům za možnost podílet se na výzkumu kyseliny hyaluronové.

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

## **ABSTRAKT**

**Univerzita Karlova v Praze**

**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**

**Katedra fyziky a fyzikální chemie**

**Kandidát: Bc. Martina Dvořáková**

**Školitel: Doc. Ing. Alice Lázníčková, CSc.**

**Konzultant: Mgr. Martina Hermannová, Ph.D.**

**Název diplomové práce: Optimalizace preparativní LC-MS metody frakcionace oligosacharidů hyaluronanu**

Tato diplomová práce se zabývá optimalizací LC-MS analýzy oligosacharidů hyaluronanu v preparativním módu. Teoretická část stručně shrnuje dostupné informace o biologických a chemických vlastnostech kyseliny hyaluronové. Kyselina hyaluronová je snadno enzymaticky degradovatelná prostřednictvím savčích hyaluronidáz za vzniku oligosacharidů hyaluronanu, které mohou být biologicky aktivní v závislosti na jejich molekulové hmotnosti. K separaci a purifikaci oligosacharidů hyaluronanu se nejčastěji využívá vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Nové analytické metody založené na kombinaci separačních technik s hmotnostní spektrometrií umožňují snadnou a velmi citlivou identifikaci složitých oligosacharidových směsí. V experimentální části jsme se zabývali optimalizací podmínek ionizace oligosacharidů hyaluronanu v negativním a pozitivním módu. Nejprve jsme se zaměřili na nastavení napětí na kapiláře, napětí na sample cone, desolvatační teploty, průtoku desolvatačního plynu a průtoku cone gas. V MS spektrech 4-, 6-, 8- a 10- sacharidu hyaluronanu jsme sledovali vznik jednonásobně a dvojnásobně nabitých iontů a porovnávali jejich výslednou intenzitu. Na základě naměřených výsledků jsme si ověřili, že analýza oligosacharidů hyaluronanu v negativním módu je výrazně citlivější než v pozitivním módu. V dalším kroku jsme provedli optimalizaci složení eluentů v preparativním módu. Zjistili jsme, že přidání 0,1 % kys. mravenčí podporuje vznik negativních iontů, přidání 0,1 % amoniaku podporuje vznik pozitivních iontů, nejlepších výsledků jsme dosáhli při použití 100% metanolu.

## **ABSTRACT**

**Charles University in Prague**

**Faculty of Pharmacy in Hradec Králové**

**Department of Biophysic and Physical Chemistry**

**Candidate: Bc. Martina Dvořáková**

**Supervisor: Doc. Ing. Alice Lázníčková, CSc.**

**Consultant: Mgr. Martina Hermannová, Ph.D.**

**Title of diploma thesis: Optimization of preparative LC-MS method for fractionation of oligosaccharides of hyaluronanu**

This diploma thesis deals with optimization of LC-MS method for analysis of hyaluronan oligosaccharides in preparative mode. The theoretical part summarizes available information about biological and chemical properties of hyaluronic acid. Hyaluronic acid is easily enzymatically degradable by mammalian hyaluronidases that produce hyaluronan oligosaccharides. The biological function of these degradation products depend on their molecular weight. High-performance liquid chromatography is mainly used for separation and purification of hyaluronan oligosaccharides. A new method for the determination of hyaluronan oligosaccharides is based on a combination of separation techniques and mass spectrometry. The experimental part deals with optimization of ionisation conditions for electrospray ionization mass spectrometry in positive and negative ion mode. In the first step, we focused on setting of capillary voltage, cone voltage, desolvation temperature, flow rate of desolvation gas and cone gas. In the MS spectra of 4-, 6-, 8- a 10- oligosaccharides of hyaluronan, we observed the presence of singly and doubly charged ions and compared their intensity. LC-MS analysis of hyaluronan oligosaccharides in negative ion mode was more sensitive than in positive ion mode. In the next step, we focused on the optimization of eluent compositions in preparative mode. Addition of 0,1 % formic acid enhanced the production of negative ions and addition of 0,1 % ammonia enhanced the production of positive ions. The best results were achieved using 100% methanol.

# Obsah

1. Úvod.....	8
2. Cíl práce.....	8
3. Kyselina hyaluronová .....	10
3.1 Výskyt HA .....	10
3.2 Chemicko-fyzikální vlastnosti .....	11
3.3 Biologické účinky HA.....	11
3.4 Syntéza HA .....	13
3.5 Degradace HA.....	13
3.6 Enzymatická degradace.....	14
3.7 Hyaladheriny .....	16
3.7.1 CD44.....	17
3.7.2 RHAMM.....	18
3.7.3 HARE.....	19
3.7.4 LYVE-1 .....	19
3.8 Klinické využití HA .....	20
3.8.1 Využití HA v oftalmologii.....	21
3.8.2 Využití HA v kosmetologii a plastické chirurgii .....	21
3.8.3 Využití HA v revmatologii .....	22
3.8.4 Využití HA při hojení .....	23
3.9 Analýza HA.....	25
3.9.1 Separace a purifikace HA .....	25
3.9.2 Identifikace HA.....	26
4. Materiál a metody .....	30
4.1 Chemikálie .....	30
4.2 Přístroje .....	30

4.3	Příprava vzorků a roztoků .....	32
4.3.1	Příprava vzorků OHA .....	32
4.3.2	Příprava kalibračních roztoků OHA .....	32
4.3.3	Příprava vzorků OHA pro zjištění výtěžnosti.....	32
4.3.4	Příprava mobilních fází pro LC-MS analýzu OHA .....	33
4.3.5	Příprava eluentů pro make-up pumpu.....	33
4.4	Metody a pracovní postupy .....	35
4.4.1	Separace OHA .....	35
4.4.2	Optimalizace LC-MS analýzy OHA v analytickém módu .....	36
4.4.3	Kalibrace a určení LOD a LOQ .....	37
4.4.4	Optimalizace LC-MS analýzy OHA v preparativním módu .....	40
5.	Výsledky a diskuze .....	41
5.1	Optimalizace LC-MS analýzy OHA v analytickém módu .....	41
5.1.1	Optimalizace napětí na sample cone.....	41
5.1.2	Optimalizace napětí na kapiláře.....	45
5.1.3	Optimalizace desolvatační teploty a průtoku desolvatačního plynu.....	46
5.1.4	Optimalizace průtoku cone gas.....	50
5.1.5	Optimalizované parametry.....	52
5.2	Kalibrace a určení LOD a LOQ .....	55
5.3	Optimalizace LC-MS analýzy OHA v preparativním módu.....	56
6.	Závěr .....	58
7.	Seznam zkratk .....	59
8.	Seznam literatury .....	61
9.	Přílohy.....	65

# 1. Úvod

Kyselina hyaluronová (HA) je známa od roku 1934, kdy byla poprvé objevena a izolována ze sklivce skotu Karlem Meyerem a Johnem Palmerem. Na počátku 50. let byla poprvé použita v pekařském průmyslu jako náhrada vaječného bílku. Od té doby našla uplatnění v řadě nejrůznějších lékařských odvětví např. v oftalmologii, kosmetologii, v plastické chirurgii nebo při léčbě osteoartritidy (Nečas, a další, 2008). HA se vyznačuje mimořádnými biologickými účinky, které mohou být velmi odlišné v závislosti na její struktuře a molekulové hmotnosti. Z těchto důvodů je nutné zajistit vysokou chemickou čistotu HA a získat dostatečné informace o absorpci, distribuci a eliminaci HA aplikované do lidského organismu. Nové analytické metody umožňují snadnou a velmi citlivou identifikaci hyaluronových sloučenin. Obrovský význam v poslední době zaznamenala hmotnostní spektrometrie využívající měkkých ionizačních technik, především MALDI-TOF MS a ESI-MS. Velkou výhodou ESI je možnost přímého spojení s vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií, takže během jediné analýzy dochází k rychlé separaci a identifikaci složitých oligosacharidových směsí.

## 2. Cíl práce

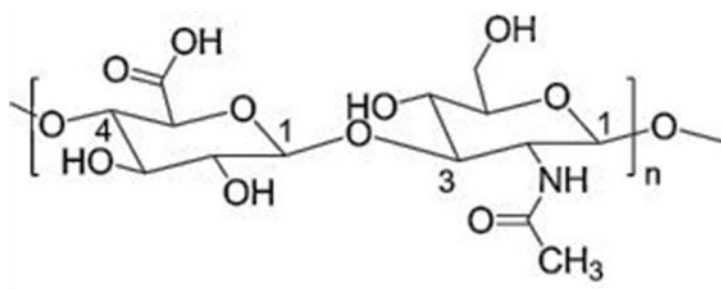
Teoretická část této diplomové práce se zbývá základními poznatky o kyselině hyaluronové, jejím využití a metodách analýzy. Hlavním cílem experimentální části je optimalizace podmínek LC-MS analýzy při purifikaci a frakcionaci oligosacharidů hyaluronanu (OHA). V prvním kroku je sledován vliv parametrů iontového zdroje na efektivitu ionizace OHA. Důraz je kladen na nastavení napětí na kapiláře, napětí na sample cone, desolvatační teploty, průtoku desolvatačního plynu a průtoku cone gas. Po optimalizaci těchto podmínek v analytickém módu je v dalším kroku sledován vliv složení eluentů na výslednou ionizaci OHA v preparativním módu.



# **Teoretická část**

### 3. Kyselina hyaluronová

Kyselina hyaluronová je lineární vysokomolekulární glykosaminoglykan tvořený opakujícími se disacharidovými jednotkami D-glukuronové kyseliny a *N*-acetyl-D-glukosaminu střídavě spojenými  $\beta(1\rightarrow4)$  a  $\beta(1\rightarrow3)$  glykosidickými vazbami (Obrázek 1). HA se v organismu přirozeně vyskytuje ve formě soli nejčastěji jako hyaluronát sodný. Struktura HA ve fyziologickém roztoku je dána kombinací chemické struktury disacharidových jednotek, intermolekulárními vodíkovými vazbami a interakcemi s rozpouštědlem. Axiálně uspořádané vodíkové atomy tvoří nepolární část molekuly, zatímco polární část molekuly je tvořena ekvatoriálně uspořádanými hydroxylovými a karboxylovými skupinami. Sekundární struktura HA má charakter spirálovitě stočené cívky, terciální struktura zaujímá energeticky výhodnější formu  $\beta$ -skládaného listu stabilizovaného pomocí interakcí mezi hydrofóbními částmi molekuly a vnitřními vodíkovými vazbami. Ve vodných roztocích dochází na základě vzájemné agregace mezi molekulami HA ke vzniku složitých molekulárních sítí (Brown, a další, 2005; Hascall, a další, 1997).



D-glukuronová kyselina

*N*-acetyl-D-glukosamin

**Obrázek 1** Struktura kyseliny hyaluronové (převzato z Schanté, a další, 2011).

#### 3.1 Výskyt HA

HA je syntetizována ve formě vysokomolekulárního polymeru, který se může skládat až z 10 000 disacharidových jednotek o molekulové hmotnosti okolo  $4 \times 10^6$  Da. V lidském těle je HA široce zastoupena v extracelulární matrix většiny tkání, zejména v pojivové, epiteliální a nervové. Největší množství HA, přibližně 50% celkového obsahu je přítomno v kůži, okolo 0,5 mg/g v dermis a 0,1 mg/g v epidermis. Vysoké koncentrace HA jsou dále zastoupeny ve sklivci lidského oka 0,1-0,4 mg/g, v synoviální

tekutině vyplňující kloubní dutiny 3-4 mg/ml a v pupečníku 4 mg/g (Hascall, a další, 1997; Nečas, a další, 2008).

HA se vyskytuje nejen v organismu obratlovců, ale byla objevena také u některých druhů bakterií, příkladem mohou být streptokoky skupiny C a A, především *Streptococcus equisimilis* nebo *Streptococcus pyogenes* a některé druhy rodu *Pasteurella*. HA vytváří okolo bakterie pouzdro, které znesnadňuje rozpoznání cizorodého agens prostřednictvím imunitního systému hostitele a napomáhá jeho šíření do okolních tkání (Weigel, 2004).

### **3.2 Chemicko-fyzikální vlastnosti**

HA se vyznačuje velmi dobrou rozpustností ve vodě za vzniku viskózních roztoků. Výsledná viskoelastická závisí nejen na její molekulové hmotnosti a koncentraci, ale také na pH a iontové síle okolního prostředí. Hodnota pKa kyseliny hyaluronové je 2,9, změnou pH k fyziologickým hodnotám lze ovlivnit rozsah ionizace hyaluronových řetězců a tím i reologické vlastnosti této sloučeniny. V řadě lékařských odvětví je HA využívána jako vysoce hygroskopický a viskoelastický materiál, který je velmi dobře tolerován lidským organismem a podléhá rychlému enzymatickému rozkladu za tvorby bezpečných degradačních produktů (Schiraldi, a další, 2010).

### **3.3 Biologické účinky HA**

Kyselina hyaluronová má velmi odlišné biologické účinky v závislosti na její molekulové hmotnosti. Vysokomolekulární HA je důležitou strukturální molekulou extracelulární matrix, díky svým viskoelastickým vlastnostem a schopnosti dobře přijímat vodu z okolního prostředí se uplatňuje při hydrataci tkání a udržování osmotické rovnováhy. V kloubních pouzdrech plní funkci lubrikačního materiálu a materiálu adsorbujícího nárazy z okolního prostředí (Nečas, a další, 2008). Dále se vysokomolekulární HA vyznačuje anti-angiogenními, protizánětlivými a imunosupresivními vlastnostmi. Většina protizánětlivých účinků přisuzovaných HA je spojena s receptorem CD44. Tyto účinky závisí na délce hyaluronového řetězce a schopnosti propojení většího počtu molekul CD44 na povrchu buňky. Prostřednictvím pokusů s izolovanými molekulami CD44 bylo zjištěno, že spojení několika receptorových molekul CD44 je schopna pouze vysokomolekulární HA na rozdíl od nízkomolekulární, která tuto funkci nemá. Na základě této odlišnosti je možné

vysvětlit schopnost vysokomolekulární HA podílet se na modulaci protizánětlivých procesů, podporovat klidový stav buněk a integritu tkání (Bollyky, a další, 2012).

Nízkomolekulární HA hraje roli v řadě fyziologických a patologických dějů, významně se podílí na buněčné adhezi, migraci a proliferaci, a navíc zasahuje do procesu zánětu, angiogeneze a tumorigeneze. Ukázalo se, že velmi citlivým ukazatelem zánětlivých stavů je velikost molekuly HA. Zatímco ve zdravé tkáni je charakteristická přítomnost vysokomolekulární HA o molekulové hmotnosti vyšší než 1000 kDa, při poškození tkáně dochází působením endogenních a mikrobiálních hyaluronidáz, mechanických vlivů a oxidativního stresu k degradaci vysokomolekulární HA a následnému hromadění nízkomolekulární HA o molekulové hmotnosti nižší než 250 kDa a krátkých HA oligomerů o molekulové hmotnosti pod 30 kDa (Bollyky, a další, 2012). V počáteční fázi zánětu vzniká nízkomolekulární HA tvořená z 1000-1250 sacharidových jednotek, která podporuje vznik prozánětlivých cytokinů s chemotaktickým účinkem a napomáhá migraci monocytů a leukocytů z periferní krve do místa poškození. Během reparačního procesu dochází k postupnému odstraňování nízkomolekulární HA a k novotvorbě pojivových tkání a krevních kapilár. Na obnově tkání a angiogenezi se významně podílejí oligomery HA tvořené 6-20 sacharidovými jednotkami, které zlepšují proliferaci a migraci endoteliálních buněk, podporují proliferaci fibroblastů a zvyšují syntézu kolagenu. Angiogeneze se také významně uplatňuje během nádorového procesu. Vznik krevních cév zajišťuje nádoru dostatečný přísun živin a kyslíku a tím umožňuje nárůst nádorové masy a tvorbu metastáz. Oligomery HA produkované nádorovými buňkami mohou působit přímým angiogenním účinkem nebo mohou zvyšovat expresi některých dalších angiogenních faktorů jako např. matrixmetaloproteáz. Nové poznatky poukazují na možnou souvislost mezi invazí nádoru a proteolytickým štěpením receptoru CD44 na jeho povrchu. Aktivní produkce hyaluronidáz způsobuje vznik fragmentů HA tvořených 10-40 sacharidovými jednotkami, které podporují vlastní štěpení receptoru CD44 a vedou k narušení signálních drah mezi nádorovou buňkou a extracelulární matrix. Výsledkem je neregulovaná buněčná proliferace a progresse nádoru (Stern, a další, 2006).

### 3.4 Syntéza HA

HA je neustále syntetizována a uvolňována fibroblasty, keratinocyty, chondrocyty a dalšími specializovanými buňkami ECM. Na rozdíl od většiny glykosaminoglykanů, které jsou syntetizovány v Golgiho aparátu, dochází k její syntéze na vnitřní straně cytoplasmatické membrány. Hyaluronan syntáza (HAS) je integrální membránový protein syntetizující lineární polymerový řetězec postupným připojováním kyseliny glukuronové a *N*-acetylglukosaminu. U člověka byly popsány tři isoformy hyaluronan syntázy - HAS-1, HAS-2 a HAS-3. Tyto isoformy se vzájemně liší svými kinetickými vlastnostmi a délkou vznikajícího hyaluronového řetězce. Během syntézy dochází k postupnému protlačování rostoucího řetězce skrze membránu do extracelulárního prostoru, kde může vytvářet komplexy s proteiny (Sadowitz, a další, 2011; Spicer, a další, 1998).

### 3.5 Degradace HA

Obrat HA v tkáních obratlovců je velmi vysoký. Tělo dospělého člověka obsahuje okolo 15 g HA, přičemž denně podléhá přeměně okolo 5g. Biologický poločas HA v krevním řečišti se pohybuje okolo 2 až 5 minut. Biodegradace hyaluronanu je převážně enzymatický proces probíhající za účasti hyaluronidáz (Stern, 2000). Bližší studium katabolismu HA odhalilo tři odlišné degradační dráhy. První způsob zahrnuje lokální buněčnou degradaci, při níž se uplatňují receptory CD44 a RHAMM (receptor HA zprostředkávající motilitu). Během tohoto procesu jsou vysokomolekulární polymery HA z extracelulární matrix připojeny k povrchu buňky za účasti receptoru CD44 a enzymu HYAL2. HYAL2 zahajuje štěpení HA za vzniku fragmentů o velikosti 20 kDa tvořených přibližně z 50 disacharidových jednotek. Následně jsou tyto fragmenty pohlceny buňkou za tvorby endozomů, které se spojují s lysozomy. V lysozomech degradace HA pokračuje pomocí enzymu HYAL1. HYAL1 štěpí hyaluronové fragmenty za vzniku tetrasacharidů, které jsou dále degradovány pomocí  $\beta$ -exoglukosidáz až na jednotlivé monosacharidy (Stern, a další, 2006; Slíva, a další, 2009). Druhá degradační cesta probíhá na úrovni tkání, zahrnuje uvolnění HA z extracelulární matrix do lymfatického a cévního systému, její vychytávání receptorově zprostředkovaným mechanismem a následné rozložení v játrech, ledvinách a pravděpodobně také v slezině. Důležitými receptory účastníci se tohoto procesu jsou HARE (receptor HA pro endocytózu), LYVE-1 (endoteliální receptor

HA v lymfatických cévách) a layilin. Poslední možností degradace je neenzymatické štěpení HA pomocí volných radikálů vznikajících během oxidativních procesů (Stern, a další, 2006).

### 3.6 Enzymatická degradace

Savčí hyaluronidázy patří mezi hyaluronoglukosaminidázy (EC 3.2.1.35), které hydrolyticky štěpí  $\beta(1\rightarrow4)$  vazbu mezi *N*-acetyl-D-glukosaminem a D-glukuronovou kyselinou. Přestože získaly své jméno od schopnosti štěpit HA, není HA jejich jediným substrátem, uplatňují se také při degradaci dalších látek jako je chondroitin a chondroitin sulfát. Pro kmen kroužkovic je charakteristická přítomnost hyaluronoglukuronidáz (EC 3.2.1.36), které hydrolyticky štěpí  $\beta(1\rightarrow3)$  glykosidické vazby. U některých bakterií jako například *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus pyogenes* a *Clostridium perfringens* se vyskytují hyaluronát lyázy (EC 4.2.2.1), které napomáhají šíření bakteriální infekce hostitelskými tkáněmi a znesnadňují jejich rozpoznání imunitním systémem. Tyto enzymy štěpí HA na principu eliminační reakce za vzniku dvojné vazby (IUBMB Enzyme Nomenclature, Stern, 2000).

U člověka bylo identifikováno šest různých hyaluronidáz HYAL 1, HYAL2, HYAL3, HYAL4, PH20 a HYALP1. Geny kódující enzymy HYAL1, HYAL2 a HYAL3 leží na krátkém raménku chromozomu 3 (3p21.3). HYAL1 a HYAL2 představují hlavní enzymy podílející se na katabolismu HA, mohou fungovat nezávisle na sobě nebo může být jejich činnost vzájemně koordinována, nicméně aktivita obou enzymů je neodmyslitelně spojena s receptorem CD44. HYAL2 je připojena pomocí glykosylphosphatidylinositolové kotvy k vnějšímu povrchu cytoplasmatické membrány a zahajuje štěpení vysokomolekulární HA z ECM. HYAL2 je přítomna téměř ve všech tkání kromě mozku, má mnohem nižší hyaluronidázovou aktivitu ve srovnání s HYAL1 a její pH optimum se pohybuje okolo pH 4. HYAL1 je lyzozomální enzym štěpící HA, která byla internalizována do buňky za vzniku disacharidů a tetrasacharidů. Je přítomna především v parenchymatózních orgánech, jako jsou játra, ledviny, slezina a srdce, dále byla také identifikována v lidské plasmě a moči. Mutace genu kódujícího HYAL1 jsou spojené s mukopolisacharidózou typu IX. HYAL3 je nejvýrazněji exprimována ve varlatech a kostní dřeni. Funkce tohoto enzymu nebyla dosud zcela objasněna (Stern, 2007; Noble, a další, 2011).

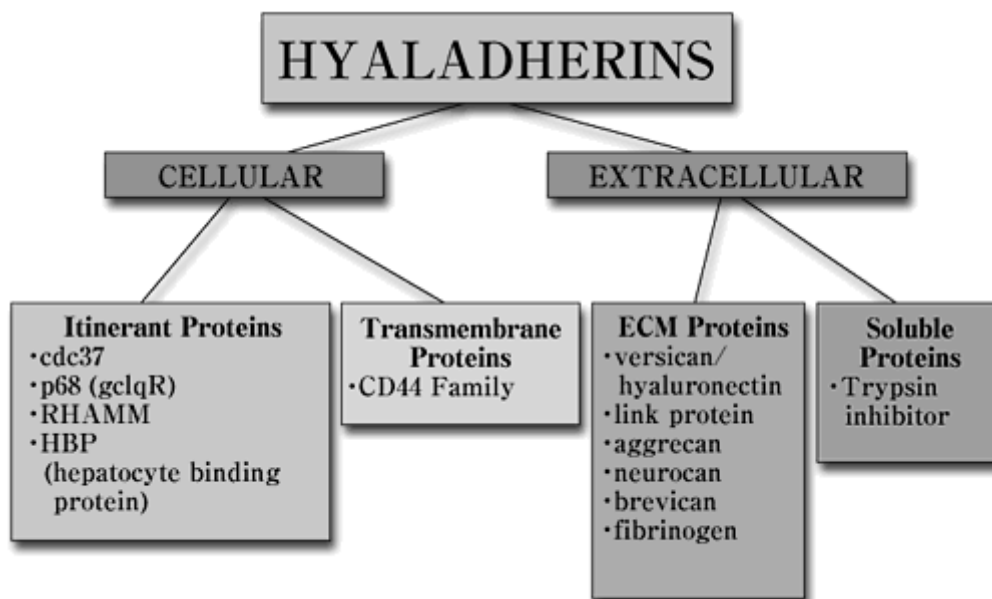
Významem savčích hyaluronidáz se podrobně zabývaly studie zkoumající odchylky u myši deficientních v genech pro jednotlivé druhy hyaluronidáz. Bylo prokázáno, že u HYAL1 deficientních myši docházelo k pomalému rozvoji osteoartritidy bez výrazného zvýšení plasmatické nebo tkáňové hladiny HA, u HYAL2 deficientních myši se objevily skeletální a hematologické anomálie provázené až desetinásobným zvýšením hladiny HA v plasmě. U HYAL3 deficientních myši nebyly objeveny žádné výrazné změny ve fenotypovém projevu. Sérové hladiny HA, histologické vyšetření kloubů a jednotlivých orgánů nevykazovaly podstatnější rozdíly. Tyto výsledky naznačují, že HYAL3 se nijak signifikantně nepodílí na degradaci HA (Duterme, a další, 2009).

Geny kódující enzymy HYAL4, PH-20 a HYALP1 jsou lokalizovány na dlouhém raménku chromozomu 7 (7q31.3). HYALP1 je kódována pseudogenem, který obsahuje atypický stop kodon způsobující, že u člověka nedochází k produkci aktivního enzymu. HYAL4 vykazuje vysokou substrátovou specifitu k chondroitin sulfátu, naopak HA štěpí jen velmi obtížně. Jedná se o první chondroitin sulfát hydrolázu identifikovanou v tkáni obratlovců. Schopnost štěpit chondroitin sulfát je pozorována i u některých dalších hyaluronidáz, jako je HYAL1 and PH-20, ale tyto enzymy degradují chondroitin sulfát ve srovnání s HA výrazně pomaleji (Stern, 2000; Csoka, a další, 2001).

PH-20 je známa také pod názvem SPAM1 (sperm adhesion molecule 1). Tento enzym má významnou roli během oplození, při pronikání spermie vrstvami obklopujícími oocyt. PH-20 je připojena pomocí glykosylphosphatidylinositolové kotvy k buněčnému povrchu spermie a k vnitřní akrozomální membráně. Při pronikání spermie mezi folikulární buňky corona radiata se PH-20 uplatňuje jako hydrolytický enzym lokálně degradující extracelulární matrix bohatou na HA. V okamžiku kontaktu spermie se zónou pellucidou PH-20 zprostředkovává buněčnou signalizaci vedoucí k nárůstu intracelulárního vápníku v cytoplazmě spermie. Samotný nárůst intracelulárního vápníku není dostatečný k vyvolání akrosomální reakce, ale může plnit synergistickou funkci s glykoproteiny zona pellucida, které napomáhají uvolnění proteolytických enzymů z akrosomu a usnadňují prostup spermie k buněčné membráně oocytu. Pomocí velmi citlivých metod bylo zjištěno, že PH-20 není specifická pouze pro spermie, ale byla také detekována v ženském pohlavním traktu, v prsní tkáni, placentě, v tkáni plodu, a také u některých zhoubných nádorů (Stern, 2000; Cherr, a další, 2001).

### 3.7 Hyaladheriny

Hyaladheriny jsou heterogenní skupina proteinů vyznačující se schopností vázat HA. Mezi nejvýznamnější zástupce řadíme CD44, RHAMM, TSG-6, agrekan, LYVE1, HARE a některé další. Na základě jejich lokalizace je můžeme rozdělit na proteiny nacházející se intracelulárně, na povrchu buněk nebo v extracelulární matrix (Obrázek 2) (Noble, a další, 2011).



**Obrázek 2** Rozdělení proteinů vázajících HA podle intracelulární nebo extracelulární lokalizace (převzato z Tolg, a další, 2004).

U většiny hyaladherinů se objevuje obdobná strukturální doména zodpovědná za vazbu HA, jedná se o strukturu tvořenou přibližně ze 100 aminokyselin označovanou také jako tzv. link module. Tato spojovací doména byla poprvé popsána u vazebného proteinu (link proteinu), který se podílí na stabilizaci proteoglykanových agregátů v kloubní chrupavce. Podobný strukturální motiv byl objeven v G1-doméně proteoglykanů chondroitin sulfátu, agrekanu, versikanu, neurokanu a brevikanu, nacházejících se jako stavební složka v některých tkáních např. mozku, kůži nebo krevních cévách. Nejlépe prostudována byla prostorová struktura vazebné domény u TSG-6 (tumor necrosis factor-stimulated gene-6). Pomocí NMR bylo zjištěno, že je složená ze dvou  $\alpha$ -helixů a třech antiparalelně uspořádaných  $\beta$ -skládaných listů. Tento model byl následně použit jako vzorová předloha i pro ostatní zástupce hyaladherinů (Day, 2001).



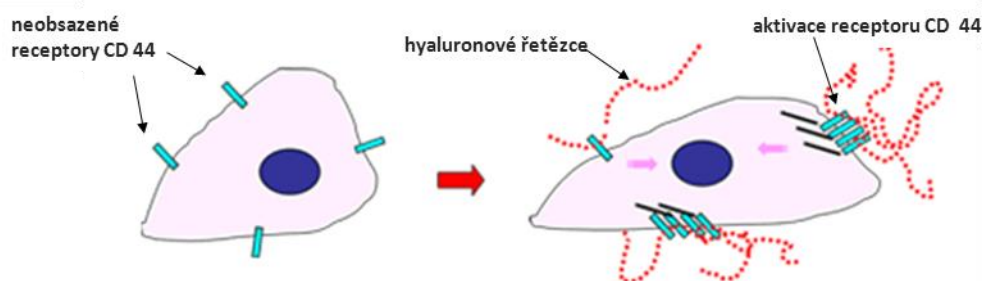
### 3.7.1 CD44

CD44 je hlavním receptorem schopným vázat HA, vyskytuje se na celé řadě buněk a kromě HA může interagovat i s dalšími molekulami, jako je kolagen, fibronektin, osteopontin, některé růstové faktory nebo matrix metaloproteinázy (MMPs) (Misra, a další, 2011). Tento receptor se podílí na řadě důležitých funkcí zahrnující buněčnou adhezi a migraci, transdukcii signálu mezi buňkou a extracelulární matrix, regulaci apoptózy a zejména receptorově zprostředkovanou internalizaci HA (Knudson, a další, 2004b).

CD44 patří mezi transmembránové glykoproteiny tvořené čtyřmi funkčními doménami. Distální část extracelulární domény sestává ze 100 aminokyselin, za stabilizaci toho aminokyselinového řetězce zodpovídají tři disulfidické vazby mezi cysteiny. Důležitým místem umožňujícím navázání HA je uskupení čtyř bazických aminokyselin (Arg-41, Tyr-42, Arg-78, Tyr-79). Proximální část extracelulární domény představuje primární místo alternativního sestřihu CD44 mRNA, které vede k produkci různých izoform proteinu CD44. V závislosti na typu buněk může být tato část substituována postranními řetězci chondroitin sulfátu nebo heparan sulfátu. Transmembránová doména je složena z 22 aminokyselin, prostupuje jedenkrát cytoplasmatickou membránou a pravděpodobně zodpovídá za interakci CD44 s tzv. lipidovými rafty, které tvoří mikrodomény v cytoplasmatické membráně a vyznačují se vysokým obsahem cholesterolu, sfingolipidů a glykolipidů. Cytoplasmatická doména je u většiny izoform CD44 tvořena ze 72 aminokyselin, obsahuje potenciální místa pro fosforylaci serinu, SH3 doménu a několik strukturálních motivů umožňujících propojení receptoru CD44 s cytoskeletálním systémem buňky za účasti intracelulárních proteinů (Knudson, a další, 2004b).

S ohledem na vazbu HA existuje protein CD44 ve třech základních stavech: nevážící HA, nevážící HA pokud nedojde k aktivaci prostřednictvím fyziologických podnětů a konstitutivně vážící HA (Misra, a další, 2011). U jaderných krevních buněk, stejně jako u embryonálních, endoteliálních nebo nádorových buněk je neobsazený receptor CD44 aktivován navázáním HA, čímž dochází k extracelulárnímu seskupení receptorů CD44 (Obrázek 3). Tento proces vede k intracelulárním dějům zahrnujícím aktivaci tyrosinkináz, jako jsou Src kináza a Rho kináza, které umožňují aktivaci dalších signálních molekul a zesilují propojení CD44 s cytoskeletálním systémem

buňky. Ve tkáních, kde je HA všudypřítomná, představují klidový stav buněk receptory CD44 seskupené a obsazené vysokomolekulárními řetězci HA. Pro tyto buňky je transdukce signálu zahájena narušením interakce mezi CD44 a HA, což se projeví uvolněním shlukování CD44. Tento proces může nastat během enzymatické degradace HA, v přítomnosti rozpustného CD44 nebo malých hyaluronových oligosacharidů, které konkurují vysokomolekulární HA při vazbě na receptor CD44. Interakce mezi CD44 a HA mohou významně ovlivňovat přežívání buněk a jejich citlivost k apoptóze. Bylo zjištěno, že přidání hyaluronových oligosacharidů k buněčným kulturám vede k produkci oxidu dusnatého. Oxid dusnatý způsobuje narušení regulace phosphatidylinositol-3 kinázy a napomáhá aktivaci apoptotických drah (Knudson, a další, 2004a; Knudson, a další, 2004b).



**Obrázek 3** Aktivace receptoru CD44 navázáním HA (převzato z Knudson, a další, 2004a).

### 3.7.2 RHAMM

RHAMM (receptor HA zprostředkovávající motilitu) je také znám pod názvem IHABP (intracelulární protein vázající HA) a na základě CD klasifikace získal označení CD168. Tento receptor patří mezi atypické hyaladheriny, které jsou lokalizovány jednak intracelulárně, jednak jsou extracelulárně připojené k buněčnému povrchu (Tolg, a další, 2004). RHAMM je spirálovitě stočený protein obsahující na karboxylovém konci aminokyselinovou sekvenci bohatou na bazické aminokyseliny, která zodpovídá za vazbu HA. Tato sekvence obsahuje tzv. B(X)<sub>7</sub>B motiv, kde B představuje bazické aminokyseliny lysin nebo arginin, které jsou odděleny sedmi jinými aminokyselinami (Yang, a další, 1994). Extracelulární RHAMM byl detekován na řadě buněk, jako jsou fibroblasty, endoteliální buňky, B- a T-lymfocyty a na některých nádorových buňkách. Hlavní funkcí této formy RHAMM je zprostředkování buněčné adheze a motility.

Navázání HA vede k spuštění signalizačních drah zahrnující aktivaci tyrozinkináz, zejména src a FAK (focal adhesion kinase), které hrají důležitou roli v organizaci cytoskeletonu a pravděpodobně jsou schopny vyvolat přestavbu vláken aktinu a podílet se na buněčné motilitě (Assmann, a další, 1999; Tolg, a další, 2004). Intracelulární RHAMM se nachází v různých buněčných kompartmentech, jako je cytosol, jádro, cytoskeleton a centrozom. RHAMM lokalizovaný v centrozomu se podílí na stabilizaci mikrotubulů, tvorbě dělicího vřeténka a prostřednictvím interakce s dyneinem napomáhá pohybu látek a organel uvnitř buňky (Slevin, a další, 2007).

### **3.7.3 HARE**

HARE (receptor HA pro endocytózu), také známý jako stabilin-2, se nachází na sinusoidálních endoteliálních buňkách jater, sleziny a lymfatických uzlin. Rozlišujeme dvě izoformy, které se od sebe liší svojí molekulovou hmotností, větší izoforma o molekulové hmotnosti 315 kDa a menší izoforma o molekulové hmotnosti 190 kDa. Zastoupení obou izoform je rozdílné v různých tkáních. Glykosylovaná menší izoforma je více zastoupena na buňkách jater a interaguje účinněji s menšími molekulami HA, větší izoforma je početněji zastoupena na buňkách sleziny a lymfatických uzlin a interaguje ochotněji s vysokomolekulární HA. Hlavní funkcí receptoru HARE je zprostředkovat vychytávání HA z krevního a lymfatického systému prostřednictvím endocytózy. Následně je buňkou internalizovaná HA přenesena do lysozomů, kde podléhá enzymatické degradaci (Lepperdinger, a další, 2004).

### **3.7.4 LYVE-1**

LYVE-1 (endoteliální receptor HA v lymfatických cévách) je blízce příbuzný s CD44, nachází se primárně na lymfatických endoteliálních buňkách, dále je přítomný na sinusoidálních endoteliálních buňkách jater a sleziny a některých formách aktivovaných makrofágů. Obdobně jako HARE zodpovídá LYVE-1 za odstraňování HA z lymfatického systému. Ve srovnání s HARE je rychlost příjmu HA pomocí LYVE-1 výrazně pomalejší, proto se usuzuje, že LYVE-1 má v lymfatickém systému spíše úlohu koreceptoru než hlavního receptoru, případně může plnit i další funkce při zprostředkování buněčné adheze a migrace (Lepperdinger, a další, 2004).

### 3.8 Klinické využití HA

Kyselina hyaluronová byla objevena v roce 1934 Karlem Meyerem a Johnem Palmerem. Své jméno získala spojením slova řeckého původu hyalos označující sklo a názvu uronová kyselina (Nečas, a další, 2008). Nejprve se HA vyráběla extrakcí z živočišných tkání, především z kohoutích hřebínků, ze sklivce skotu a lidského pupečníku. Tyto metody izolace jsou časově náročné, drahé a málo výtěžné, navíc použití tkání živočišného původu sebou nese značné etické problémy. V 80. letech se pro průmyslové účely začala postupně využívat HA produkovaná některými druhy mikroorganismů. Prvními komerčně využívanými druhy bakterií se stali *Streptococcus zooepidemicus* a *Streptococcus equi*, u kterých se přirozeně vyskytuje enzym hyaluronan syntáza vytvářející okolo bakterie polysacharidové pouzdro tvořené převážně HA. Bakteriální fermentací vzniká vysokomolekulární HA o průměrné molekulové hmotnosti 1-2 MDa, která je následně purifikována, tak aby došlo k odstranění bakteriálních toxinů a pyrogenů. Dalšími potenciálními kandidáty pro průmyslovou výrobu HA jsou geneticky modifikované bakteriální kmeny. *Bacillus subtilis* je v průmyslu široce využíván k získávání produktů hydrolytických enzymů. Tento druh byl geneticky upraven vnesením genu *hasA* izolovaného ze *Streptococcus equisimilis*. *Bacillus subtilis* je považován za bezpečný bakteriální kmen, který netvoří pro pacienta nebezpečné exotoxiny a endotoxiny, ani neprodukuje hyaluronidázy, které by mohly degradovat nasyntetizovanou HA, navíc jeho velkou výhodou je snadná kultivovatelnost v průmyslovém měřítku (Kogan, a další, 2006; Schiraldi, a další, 2010).

V medicíně je HA používána nejen ve své přirozeně se vyskytující lineární formě, ale v mnoha případech jsou hyaluronové řetězce upravovány pomocí chemických modifikací nebo zesíťovacích reakcí. Při zesíťování dochází k tvorbě kovalentních vazeb mezi hyaluronovými řetězci za vzniku trojrozměrných sítí. Tyto produkty jsou označovány jako hydrogely a vyznačují se lepšími mechanickými vlastnostmi a vyšší odolností vůči chemické a enzymatické hydrolýze. Hlavním cílem chemických derivatizačních reakcí jsou karboxylové a hydroxylové skupiny. Předpokládá se, že nejnadhěji reagují hydroxylové skupiny umístěné na uhlíku C6 *N*-acetyl-*D*-glukosaminu. Využity mohou být také aminoskupiny po předchozím odstranění acetylové skupiny (Schanté, a další, 2011; Schiraldi, a další, 2010).

První ve vodě nerozpustné zesíťované deriváty HA byly vyvinuty v 80. letech a získaly označení hylan gely. Hylan B gel vzniká reakcí divinylsulfonu s hydroxylovými skupinami HA v alkalickém prostředí. Gelové částice jsou vysoce stabilní a elastické, díky čemuž mohou být aplikovány tenkou jehlou do měkkých tkání a zvětšovat nebo vyplňovat potřebné prostory. Na rozdíl od přírodního HA přetrvávají v místě podání až 12 měsíců, přičemž si zachovávají vysokou biokompabilitu v lidském organismu. Běžně se využívají v plastické chirurgii, při léčbě kloubních degenerativních onemocnění nebo k prevenci nežádoucích pooperačních srůstů po chirurgických zákrocích (Balazs, 2004).

### **3.8.1 Využití HA v oftalmologii**

HA se přirozeně vyskytuje v lidském oku, nachází se ve sklivci, v epitelu rohovky, ve spojivkách a slzných žlázách. Z hlediska oftalmologie má HA důležitou roli v procesu hojení, významně ovlivňuje migraci epiteliálních buněk rohovky, a navíc působí proti oxidativnímu poškození buněk způsobenému volnými radikály. Jedním z nejpoužívanějších přípravků v očním lékařství je Healon, jedná se o viskoelastický fyziologický roztok 1% hyaluronátu sodného, který byl vyvinut jako náhrada sklivce při očních operacích. Jeho unikátních vlastností je využíváno hlavně k ochraně jemných tkání oka před mechanickým poškozením během operace šedého zákalu, transplantace rohovky nebo implantace nitrooční čočky. HA je také přidávána do očních kapek a roztoků určených k léčbě syndromu suchých očí. Na trhu jsou nejnověji dostupné kontaktní čočky obohacené o HA, která na povrchu oka vytváří rovnoměrný zvlhčující film zajišťující dostatečnou hydrataci a zlepšující pohodlí nošení kontaktních čoček (Schiraldi, a další, 2010; Rah, 2011).

### **3.8.2 Využití HA v kosmetologii a plastické chirurgii**

Během procesu stárnutí a při dlouhodobém vystavování slunečnímu záření dochází k postupné degradaci HA v kůži, která tvoří až polovinu celkového množství HA v lidském organismu. HA se podílí na udržování kožní homeostázy, hraje důležitou roli ve stimulaci migrace a proliferace epidermálních buněk. Velké množství kosmetických přípravků obsahuje HA pro její hygroskopické účinky. HA vytváří na pokožce zvláčňující hydratační vrstvu, obnovuje kožní elasticitu a chrání před škodlivým účinkem UV záření. Pro korekci hlubších vrásek a jizev je efektivnější

aplikovat HA intradermálně ve formě gelů, které mají trvalejší účinky než kolagenové preparáty. Mezi nejpoužívanější výplňové materiály patří Restylane a Hylaform, známý také pod označením hylan B gel. Zatímco Hylaform obsahuje HA připravovanou extrakcí z kuřecích hřebínků, Restylane je vyráběn z HA získávané bakteriální fermentací a reagující s 1,4-butandioldiglycidyl etherem. Podání obou preparátů může vést ke vzniku kožního podráždění v důsledku přítomnosti proteinových residuí. Výrobce je deklarován nižší obsah živočišných proteinů u bakteriální HA, ve skutečnosti ale bylo zjištěno, že tyto preparáty obsahují vysoké množství bílkovin z fermentačního média, které taktéž mohou vést k alergickým reakcím (Kogan, a další, 2006; Schiraldi, a další, 2010).

### **3.8.3 Využití HA v revmatologii**

HA je přítomna v kloubní chrupavce jako součást velkých proteoglykanovým komplexů, které umožňují reverzibilní stlačení chrupavky a napomáhají tlumení otřesů pocházejících z okolního prostředí. Hyaluronové řetězce jsou společně s chondroitinsulfátem a keratansulfátem navázány na osovou strukturu proteoglykanu agrekanu. Výživa kloubní chrupavky je zajištěna prostřednictvím synoviální tekutiny, která obsahuje velké množství vysokomolekulární HA o molekulové hmotnosti 4-5 MDa a koncentraci 2,5-2,7 g/l. Tato endogenní HA je aktivně produkována sinovialocyty vystélající vnitřní stranu kloubních pouzder. Složitá hyaluronová síť ovlivňuje pohyblivost ostatních složek v kloubní tekutině, vytváří lubrikační vrstvu a snižují vzájemné tření mezi plochami kloubů (Lüllmann-Rauch, 2012; Dylevský, 2009).

Mechanické vlastnosti synoviální tekutiny prochází změnami během stárnutí a vlivem některých revmatologických onemocnění. Při osteoartróze, nejčastějším degenerativním postižení kloubní chrupavky, dochází k snížení koncentrace a molekulové hmotnosti HA. Pokles viskoelasticity vede k poškození vnitřní vrstvy kloubního pouzdra a rychlejšímu opotřebování kloubů, které se projevuje bolestivostí a omezenou pohyblivostí. V 60. letech byla poprvé formulována myšlenka aplikovat HA injekčně přímo do postiženého kloubu a tím obnovit fyzikálně-chemické funkce synoviální tekutiny. Nejprve se předpokládalo se, že k zmírnění symptomů osteoartrózy je nutné podávat hyaluronové preparáty o molekulové hmotnosti vyšší než u endogenní HA, ale následné klinické studie potvrdily obdobné účinky i u preparátů s nižší

molekulovou hmotností v rozmezí 0,5-0,7 MDa. Poločas intraartikulárně podané HA se pohybuje jen okolo 17 hodin. Mechanismus účinku je založen na obnově reologických vlastností synoviální tekutiny, stimulaci endogenní syntézy HA a protizánětlivém působení. HA má schopnost vázat se na receptory zánětlivých buněk a tím snižovat jejich aktivitu a produkci prozánětlivých cytokinů, zároveň se podílí na inaktivaci reaktivních forem kyslíku a vazbou na receptory chondrocytů zabraňuje degradaci kloubní chrupavky. K zmírnění příznaků osteoartrózy jsou nejčastěji doporučovány léčivé přípravky Hyalgan a Synvisc podávané ve formě nitrokloubních injekcí. Hyalgan je přírodní polymer složený z 1% roztoku hyaluronátu sodného. Patří mezi preparáty s nižší molekulovou hmotností v rozmezí 500-730 kDa, u kterých se spíše uplatňují farmakologické účinky před vlastním mechanickým působením. Synvisc (Hylan G-F 20) je tvořen směsí chemicky modifikovaných hyaluronových derivátů, rozpustného hylanu A a nerozpustného gelovitého hylanu B. Díky vysokému obsahu hylanu A o molekulové hmotnosti 6 MDa má tento přípravek obdobné vlastnosti jako synoviální tekutina a déle setrvává v místě aplikace přibližně okolo 2-8 dní. Proto se také usuzuje, že je vhodnější pro obnovu mechanických vlastností a zvýšení viskozity kloubní tekutiny (Pavelka, 2005).

### **3.8.4 Využití HA při hojení**

HA se vyznačuje různými strukturálními a regulačními funkcemi v průběhu hojení akutních a chronických poranění. V prvotní fázi poškození dochází k zvýšené syntéze vysokomolekulární HA, která se významně podílí na obnově buněčné a tkáňové integrity. Tato HA vytváří polymerní opěrnou síť a napomáhá přilákání a zachycení buněk účastnících se počáteční zánětlivé odpovědi. Důležitým předpokladem hojivého procesu je odstranění odumřelého a cizorodého materiálu ze zánětlivého ložiska prostřednictvím fagocytů. V důsledku aktivní produkce hyaluronidáz dochází k postupné degradaci vysokomolekulární HA za vzniku degradačních produktů, které ovlivňují další fáze reparačního procesu, jako je formování granulační tkáně, tvorba krevních kapilár, reepitelizace a následná remodelace. V poslední době se rozšířilo použití léčivých přípravků na bázi hyaluronátu sodného k léčbě špatně se hojících chronických defektů, jako jsou např. diabetické defekty nebo bérceové vředy. Bylo prokázáno, že místně podávané hyaluronové preparáty urychlují hojení a snižují ukládání kolagenu, čímž eliminují tvorbu jizev (Burd, 2004; Slonková, a další, 2010).

S procesem hojení úzce souvisí použití HA v tkáňovém inženýrství. Jedny z nejprostudovanějších materiálů jsou deriváty HA připravované prostřednictvím esterifikačních reakcí. Nejčastěji se jedná o etyl a benzyl estery hyaluronanu, známé také pod označením HYAFF, které se obvykle využívají k výrobě membrán, vláken nebo nosičů určených pro řízené uvolňování léčiv. Stupeň esterifikace těchto derivátů významně ovlivňuje jejich výslednou pevnost, rozpustnost ve vodě a délku přetrvávání v lidském organismu. HYAFF materiály se obecně vyznačují velmi dobrou biologickou odbouratelností, díky této vlastnosti mohou být použity k výrobě scaffoldů v tkáňovém inženýrství. Úkolem scaffoldu je vytvořit podpůrnou polymerní síť, která je osazena vhodnými buňkami nebo bioaktivními molekulami a napomáhá obnově a regeneraci poškozených tkání. Struktura polymerního nosiče připomíná architekturu ECM a vytváří vhodné prostředí pro proliferaci a diferenciaci buněk. Zároveň je důležité zajistit pórovitost těchto materiálů, tak aby docházelo k snadnému transportu živin a odstraňování odpadních látek (Schiraldi, a další, 2010; Burd, 2004). V regenerativní medicíně se běžně využívá kombinace HYAFF materiálů s autologními chondrocyty při léčbě těžkých kloubních defektů, případně kombinace s autologními fibroblasty nebo keratinocyty v terapii popálenin a hlubokých kožních poranění (Vindigni, a další, 2009).



## 3.9 Analýza HA

### 3.9.1 Separace a purifikace HA

Gelová permeační chromatografie (GPC), iontovýměnná chromatografie (IEC) nebo chromatografie na reverzních fázích s použitím iontových párových činidel (RPIP HPLC) jsou jedny z nejčastěji používaných metod separace a purifikace oligosacharidů hyaluronanu (OHA). GPC umožňuje separaci OHA podle velikosti molekul na principu rozdělování analytu mezi mobilní fázi a stacionární fázi tvořenou pórovitými gelovými částicemi. V důsledku hlubšího pronikání do póru gelu jsou menší molekuly OHA na koloně zadržovány déle než větší molekuly. Tato metoda umožňuje rozseparování nižších OHA tvořených 4-16 sacharidovými jednotkami, pro vyšší OHA (>18-sacharid) je patrná křížová kontaminace mezi píky a často musí být k rozdělení jednotlivých složek směsi použito dalších analytických metod (Capila, a další, 2004).

IEC je založena na principu výměny iontů mezi mobilní fází a stacionární fází tvořenou iontoměničem. Pro analýzu OHA se běžně používají iontoměniče obsahující bazické aminoskupiny, které jsou v prostředí okyselené mobilní fáze protonovány a umožňují výměnu protiiontu nejčastěji  $\text{OH}^-$  za záporně nabitě molekuly OHA. Další využívanou metodou založenou na principu IEC je vysokoúčinná aniontová chromatografie (HPAEC) určená k separaci neutrálních a kyselých oligosacharidů. HPAEC probíhá za silně alkalického pH, při kterém OHA snadno podléhají degradačním reakcím. Degradaci OHA je možné zabránit přidáním tetrahydroboritanu způsobujícího redukci OHA na alditoly, které jsou vůči alkalickému pH stabilnější. Tato metoda poskytuje nejlepší rozlišení u OHA tvořených 6-12 sacharidovými jednotkami. Kombinací GPC a HPAEC je možné rozseparovat OHA až po 34-sacharid (Capila, a další, 2004).

RPIP HPLC je využívána především při analýze OHA v biologických vzorcích, např. při separaci 4-sacharidů a 6-sacharidů vzniklých působením bakteriálních hyaluronidáz. Tato metoda je založena na použití reverzní fáze C18. Separace OHA probíhá při pH 7,6, v gradientu acetonitrilu a v přítomnosti iontového párového činidla hydroxidu tetrabutylamonného. K následné detekci jsou nejčastěji používány univerzální refraktometrické detektory, spektrofotometrické detektory nebo pulzní ampérometrické detektory (Capila, a další, 2004).

## 3.9.2 Identifikace HA

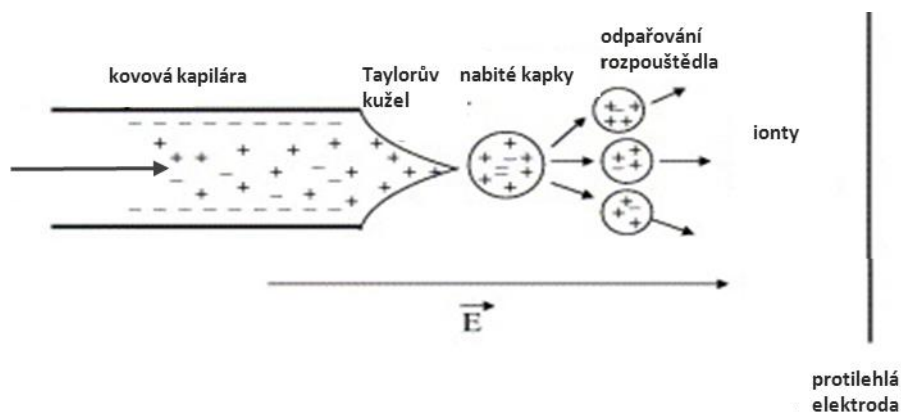
Hmotnostní spektrometrie umožňuje velmi rychlou a přesnou charakterizaci sloučenin na základě určení jejich struktury a molekulové hmotnosti. Mezi nejčastěji používané metody identifikace OHA patří ESI-MS a MALDI-TOF MS. Obě tyto techniky se řadí mezi měkké způsoby ionizace, které nevedou k rozsáhlé fragmentaci výchozí molekuly. Velkou výhodou ESI je možnost on-line spojení se separačními metodami, především vysokoučinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) a kapilární elektroforézou (CE). Naopak předností MALDI je vysoká tolerance k solím a pufrům obsaženým ve vzorku. (Volpi, 2007)

### 3.9.2.1 ESI-MS

Ionizace elektrosprejem (ESI) patří mezi ionizační techniky prováděné za atmosférického tlaku. Při této metodě vznikají ionty z molekul analytu na základě přijmutí nebo odejmutí protonu vodíku. U analytů o molekulové hmotnosti nižší než 1000 Da dochází k tvorbě jednonásobně nabitých iontů, v pozitivním módu vznikají protonované molekuly  $[M+H]^+$  a v negativním módu deprotonované molekuly  $[M-H]^-$ . U analytů o molekulové hmotnosti větší než 1000 Da se tvoří vícenásobně nabitě ionty, v pozitivním módu  $[M+nH]^{n+}$  a v negativním módu  $[M-nH]^{n-}$ . V závislosti na typu použité mobilní fáze a zasolení vzorku je možné pozorovat vznik aduktových iontů s  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $NH_4^+$  nebo  $Cl^-$  (Waters, 2003).

Princip ESI je založen na elektrochemických procesech probíhajících na povrchu kovové kapiláry (Obrázek 4). Eluent z chromatografické kolony nebo analyt rozpuštěný ve vhodném polárním rozpouštědle je pomocí této kapiláry přiváděn do iontového zdroje. Na konec kapiláry je vkládáno vysoké napětí v rozsahu 2-5 kV, podle polaritě vkládaného napětí dochází k rozdělení iontů v roztoku. Při práci v pozitivním módu je aplikované napětí kladné, anionty migrují k povrchu kapiláry, kationty se pohybují směrem k menisku kapaliny, která vzniká na konci sprejovací kapiláry a má tvar tzv. Taylorova kužele. Za pomoci nebulizačního plynu se z povrchu Taylorova kužele uvolňují nabitě kapky, které jsou vlivem silného elektrického pole unášeny směrem k protilehlým elektrodám. Působením desolvatačního plynu dochází k postupnému odpařování rozpouštědla, zmenšování kapek a nárůstu hustoty povrchového náboje. V okamžiku dosažení tzv. Rayleighova limitu převládou repulzní síly mezi náboji a následkem je rozpad nabitých kapek na menší kapičky označovaný jako coulombická

exploze. Opakováním tohoto procesu nakonec dochází k uvolnění iontů v plynné fázi, které vstupují z oblasti atmosférického tlaku do vakua a následně do hmotnostního analyzátoru, kde dochází k jejich rozdělení podle poměru hmotnosti a náboje ( $m/z$ ) (Manisali, a další, 2006).



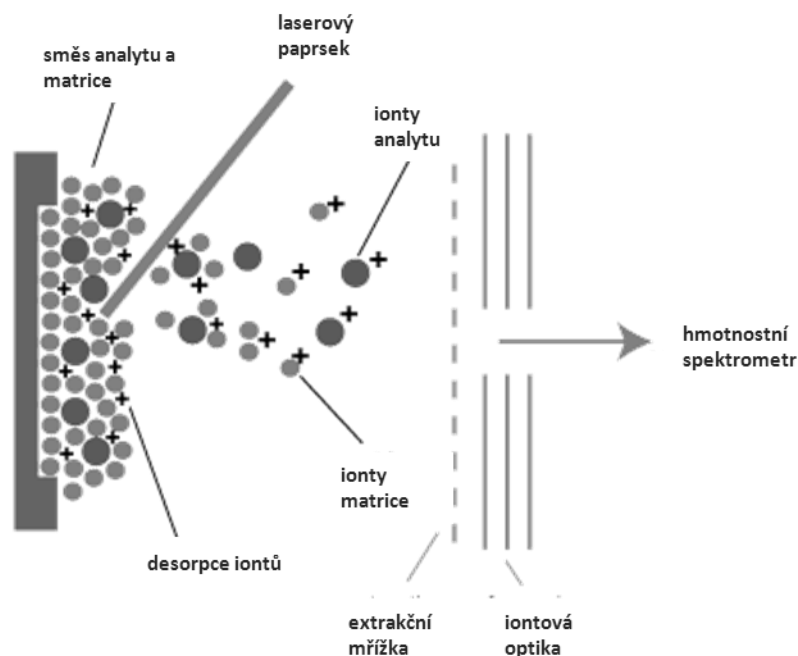
**Obrázek 4** ESI ionizace (převzato z Manisali, a další, 2006).

Pro analýzu OHA obsahujících karboxylové a hydroxylové skupiny se nejčastěji využívá analýza v negativním módu. Volpi (2007) se ve své práci podrobně zabývá separací a identifikací OHA v rozsahu 2- až 40-sacharidových jednotek získaných enzymatickou degradací pomocí testikulární hyaluronidázy. Využívá spojení RPIP HPLC s ESI-MS, při níž dochází ke vzniku vícenásobně nabitých iontů. Zatímco pro 2- až 4-sacharid je pozorována tvorba jednonásobně nabitých iontů, 6- až 10-sacharid se vyznačují vznikem dvojnásobně nabitých iontů, 12- až 18-sacharid trojnásobně nabitých iontů, 20- až 30-sacharid čtyřnásobně nabitých iontů a u 32- až 40-sacharidu pětinasobně nabitých iontů.

### 3.9.2.2 MALDI-TOF MS

MALDI nebo-li desorpce laserem za účasti matrice je technika založená na ionizaci prostřednictvím laserového pulzu (Obrázek 5). Ve většině dostupných přístrojů se využívá pulsního dusíkového laseru generujícího UV záření o vlnové délce 337 nm. Aby nedocházelo k rozsáhlé fragmentaci analytu, je vzorek analytu smísen s nadbytkem vhodné matrice, v případě OHA nejčastěji s 2,5-dihydroxybenzoovou kyselinou nebo 2,4,6-trihydroxyacetofenonem. Výsledná směs je nanášena na MALDI destičku, která je po usušení vložena do evakuovaného prostoru hmotnostního analyzátoru. Po vystavení laserovému pulsu dochází k absorpci energie molekulami matrice a k jejímu následnému přenosu na molekuly analytu. Výsledkem je vznik

jednonásobně nabitých iontů  $[M+H]^+$  nebo  $[M-H]^-$  a jejich uvolnění z povrchu MALDI destičky. Desorbované ionty jsou působením silného elektrického pole nasměrovány do hmotnostního analyzátoru (Kadlčík, a další, 2002).



**Obrázek 5** MALDI ionizace (převzato z University of Bristol, 2004).

MALDI ve spojení s TOF hmotnostním spektrometrem je široce používána při analýze sacharidů. Metoda poskytuje kvalitativní informace o složení komplexních sacharidových směsí, bohužel neumožňuje jejich kvantitativní stanovení. Dříve nebylo možné tuto techniku použít pro analýzu velmi kyselých polysacharidů, jako je např. heparin. Tento problém byl vyřešen přidávkem pozitivně nabitých peptidů vytvářejících s polysacharidy neutrální komplex, který podléhá snadnější desorpci. U méně kyselých OHA není nutná předúprava ani derivatizace vzorku před vlastní analýzou (Capila, a další, 2004).

# Experimentální část

## 4. Materiál a metody

### 4.1 Chemikálie

Kyselina mravenčí p.a., Sigma-Aldrich (Praha, Česká republika)

Metanol HPLC, Lach-Ner (Neratovice, Česká republika)

Amoniak, 25% vodný roztok p.a., Lach-Ner (Neratovice, Česká republika)

Směs oligosacharidů hyaluronanu, připravena v laboratořích Contipro Pharma, a.s. (Dolní Dobrouč, Česká republika)

Standardy oligosacharidů hyaluronanu, připraveny v laboratořích Contipro Pharma, a.s. (Dolní Dobrouč, Česká republika)

### 4.2 Přístroje

Autopurifikační LC-MS systém Waters (Milford Massachusetts, USA) skládající se z automatického dávkovače a sběrače frakcí (2767), vysokotlakého binárního čerpadla (2445), make-up pumpy (515), UV/VIS detektoru (2489) a hmotnostního spektrometru SQ detector 2 (jednoduchý kvadrupól, univerzální iontový zdroj ZSpray™)

Analytické váhy, Mettler Toledo (Praha, Česká republika)

Třepačka, IKA™ (Staufen, Německo)

#### **Podmínky HPLC analýzy pro analytický mód:**

chromatografická kolona: Jupiter 4µm Proteo 90 Å, 250x4,6mm, Phenomenex (Torrance, USA)

složení mobilní fáze: A: 0,1% kyselina mravenčí

B: metanol

gradient mobilní fáze:	čas (min)	mobilní fáze A (%)
	0-2,5 min	100% A
	2,5-10 min	změna z 100% A na 80% A
	10-17 min	80% A
	17-18 min	změna z 80% A na 30% A

průtok mobilní fáze: 1 ml/min

objem nástřiku: 20 µl

délka analýzy: 23 min

### **Podmínky HPLC analýzy pro preparativní mód:**

chromatografická kolona: Jupiter 4 $\mu$ m Proteo 90 Å, 250x21,2mm, Phenomenex  
(Torrance, USA)

složení mobilní fáze: A: 0,1% kyselina mravenčí  
B: metanol

složení eluentů pro  
make-up pumpu: viz. text 4.3.5

gradient mobilní fáze:	čas (min)	mobilní fáze A (%)
	0-2,5 min	100% A
	2,5-15 min	změna z 100% A na 80% A
	15-25,5 min	změna z 80% A na 5% A
	25,5-30 min	5% A
	30-30,7 min	změna z 5% A na 100% A

průtok mobilní fáze: 15,9 ml/min  
objem nástřiku: 1 ml  
délka analýzy: 38 min

### **Podmínky MS analýzy:**

typ ionizace: ESI v negativním a pozitivním módu  
napětí na kapiláře: 3 kV  
napětí na sample cone\* : 60 V  
napětí na extraction cone\* : 3 V  
desolvatační teplota: 250°C  
teplota zdroje: 150°C  
průtok desolvat. plynu: 650 l/h  
průtok cone gas\* : 0 l/h

\* Uvedené anglické termíny jsou všeobecně používané v MS spektrometrii, a protože nemají vhodné ekvivalenty v českém jazyce, jsou ponechány v původním znění.

## **4.3 Příprava vzorků a roztoků**

### **4.3.1 Příprava vzorků OHA**

Pro LC-MS analýzu v analytickém módu byl používán roztok vzorku oligosacharidů hyaluronanu (OHA) o koncentraci 5 mg/ml, který byl připraven navážením 15 mg směsi OHA na analytických vahách a jejím následným rozpuštěním v 3 ml HPLC vody.

Pro LC-MS analýzu v preparativním módu byl používán roztok vzorku OHA o koncentraci 50 mg/ml, který byl připraven rozpuštěním 1,4 g směsi OHA v 28 ml HPLC vody. Před vlastní analýzou byly všechny roztoky vzorků přefiltrovány přes nylonové stříkačkové filtry o průměru 13 mm a velikosti pórů 0,22  $\mu\text{m}$ .

### **4.3.2 Příprava kalibračních roztoků OHA**

Ze standardů 4-sacharidu, 6-sacharidu, 8-sacharidu a 10-sacharidu HA byly připraveny zásobní roztoky o koncentraci 1 mg/ml. Na analytických vahách bylo naváženo 3 mg příslušného standardu, který byl rozpuštěn ve 3 ml HPLC vody. Tyto zásobní roztoky standardů byly následně ředěny HPLC vodou, tak abychom získali od každého standardu řadu kalibračních roztoků o koncentracích 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625; 0,0313; 0,0156; 0,0078 a 0,0039 mg/ml.

### **4.3.3 Příprava vzorků OHA pro zjištění výtěžnosti**

Pro zjištění výtěžnosti byly použity roztoky standardů OHA o koncentraci 0,0313 mg/ml a 0,125 mg/ml. Nejprve byly připraveny zásobní roztoky o koncentraci 0,2 mg/ml rozpuštěním 0,5 mg příslušného standardu v 2,5 ml HPLC vody. Koncentrace 0,0313 mg/ml byla získána smícháním 156  $\mu\text{l}$  zásobního roztoku příslušného standardu s 844  $\mu\text{l}$  HPLC vody. Koncentrace 0,125 mg/ml byla získána smícháním 625  $\mu\text{l}$  zásobního roztoku příslušného standardu s 375  $\mu\text{l}$  HPLC vody.



#### 4.3.4 Příprava mobilních fází pro LC-MS analýzu OHA

0,1% kyselina mravenčí byla používána jako mobilní fáze A. Tato mobilní fáze byla připravena tak, že do odměrné baňky o objemu 5000 ml bylo nalito přibližně 2000 ml HPLC vody, následně bylo přidáno 5 ml kyseliny mravenčí, obsah byl promíchán a doplněn po rysku HPLC vodou. HPLC voda byla připravena filtrací destilované vody přes nylonové membránové filtry Nylaflo™ o průměru 47 mm a velikosti pórů 0,2 µm.

100% metanol byl používán jako mobilní fáze B. Tato mobilní fáze byla připravena pouze přelitím zakoupeného metanolu pro HPLC analýzu do skleněné duranové láhve o objemu 5000 ml.

#### 4.3.5 Příprava eluentů pro make-up pumpu

Při optimalizaci LC-MS analýzy OHA v preparativním módu bylo používáno sedm různých eluentů, které byly přiváděny do systému pomocí make-up pumpy. Každý z těchto roztoků byl připraven o objemu 500 ml do skleněné duranové lahve.

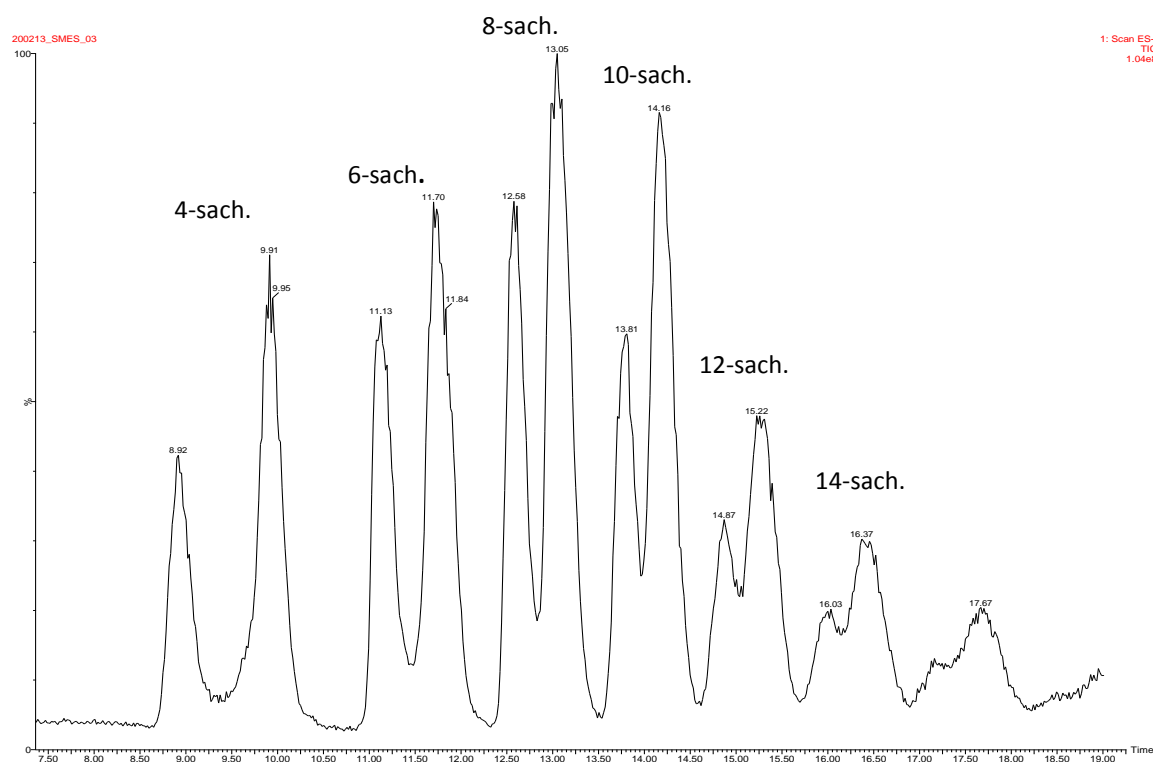
1. 0,1% kyselina mravenčí ve vodě byla připravena do odměrné baňky o objemu 500 ml, do které bylo nejprve nalito přibližně 200 ml HPLC vody, následně bylo přidáno 0,5 ml kys. mravenčí, obsah byl promíchán a doplněn po rysku HPLC vodou.
2. 0,1% kyselina mravenčí v metanolu byla připravena do odměrné baňky o objemu 500 ml, do které bylo nejprve nalito přibližně 200 ml metanolu, následně bylo přidáno 0,5 ml kys. mravenčí, obsah byl promíchán a doplněn po rysku metanolem.
3. 0,1 % kyselina mravenčí ve vodě : metanolu (v poměru 1:1) byla připravena tak, že do odměrné baňky o objemu 250 ml bylo nalito přibližně 100 ml HPLC vody, následně bylo přidáno 0,25 ml kys. mravenčí, obsah byl promíchán a doplněn po rysku HPLC vodou. Do druhé odměrné baňky o objemu 250 ml byl připraven metanol. Následně byly oba roztoky smíchány v poměru 1:1.
4. 100% metanol byl připraven pouze přelitím zakoupeného metanolu pro HPLC analýzu do duranové láhve.

5. 0,1% amoniak ve vodě byl připraven do odměrné baňky o objemu 500 ml, do které bylo nejprve nalito přibližně 200 ml HPLC vody, následně byly přidány 2 ml 25% vodného roztoku amoniaku, obsah byl promíchán a doplněn po rysku HPLC vodou.
  
6. 0,1% amoniak v metanolu byl připraven do odměrné baňky o objemu 500 ml, do které bylo nejprve nalito přibližně 200 ml metanolu, následně byly přidány 2 ml 25% vodného roztoku amoniaku, obsah byl promíchán a doplněn po rysku metanolem.
  
7. 0,1% amoniak ve vodě : metanolu (v poměru 1:1) byl připraven tak, že do odměrné baňky o objemu 250 ml bylo nalito přibližně 100 ml HPLC vody, následně byl přidán 1 ml 25% vodného roztoku amoniaku, obsah byl promíchán a doplněn po rysku HPLC vodou. Do druhé odměrné baňky o objemu 250 ml byl připraven metanol. Následně byly oba roztoky smíchány v poměru 1:1.

## 4.4 Metody a pracovní postupy

### 4.4.1 Separace OHA

Pro separaci oligosacharidů hyaluronanu (OHA) existuje celá řada metod, námi používaná metoda byla vyvinuta pracovníky společnosti Contipro Pharma, a.s., Dolní Dobrouč. Jedná se o separaci OHA pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie na reverzní fázi C12 s použitím mobilních fází 0,1% kyseliny mravenčí a metanolu. Tato metoda umožňuje rozdělení OHA tvořených 2-20 disacharidovými jednotkami. U nižších OHA dochází k separaci  $\alpha$ - a  $\beta$ -anomerů, které patří mezi diastereoizomery lišící se polohou hydroxylové skupiny na poloacetalovém uhlíku. V roztoku se mezi oběma anomery ustaluje rovnováha, a proto je možné v přiloženém celkovém iontovém chromatogramu (TIC, total ion chromatogram) (Obrázek 6) pozorovat dva retenční časy pro každý oligosacharid až po 12-sacharid (retenční čas pro 4-sacharid je u jednoho anomeru 8,92 min a druhého 9,91 min; u 6-sacharidu 11,13 a 11,70 min; u 8-sacharidu 12,58 a 13,05 min; u 10-sacharidu 13,81 a 14,16 min).



Obrázek 6 TIC chromatogram LC-MS analýzy OHA s použitím kolony Jupiter Proteo.

#### 4.4.2 Optimalizace LC-MS analýzy OHA v analytickém módu

Naším cílem bylo optimalizovat podmínky ionizace při LC-MS analýze OHA v analytickém módu. Pro převedení neutrálních molekul OHA na ionty v plynné fázi byla používána technika ionizace elektrosprejem (ESI). Dávkováno bylo 20  $\mu$ l roztoku směsi OHA o koncentraci 5 mg/ml ve dvou po sobě jdoucích nástřicích. V průběhu optimalizace byl sledován vliv změny parametrů iontového zdroje na intenzitě a ploše píků 4-sacharidu, 6-sacharidu, 8-sacharidu a 10-sacharidu HA. Nejprve byla provedena optimalizace pro negativní mód, následně pro pozitivní mód. Na obrázku 7 je znázorněno schéma iontového zdroje, který je používán v hmotnostním spektrometru SQ detector 2, Waters (Milford Massachusetts, USA).

##### Optimalizované parametry:

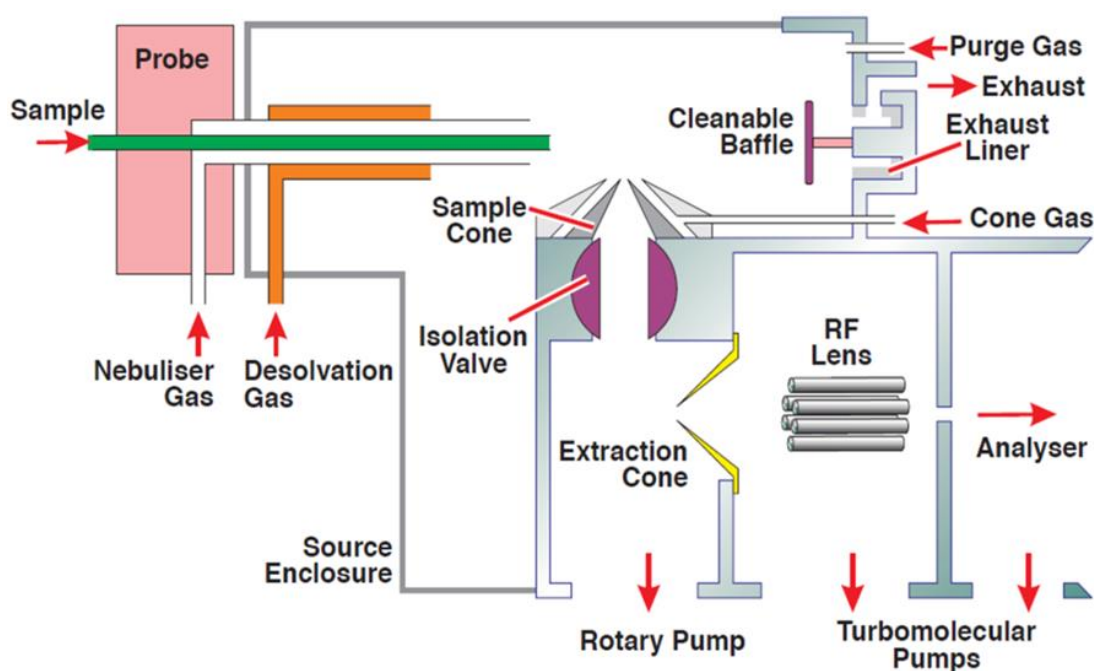
napětí na sample cone - v rozsahu 10-100 V po 10V

napětí na kapiláře - v rozsahu 2,5-4,5 kV po 0,5 kV

desolvatační teplota - v rozsahu 200-650°C po 50°C

průtok desolvatačního plynu- v rozsahu 500-600 l/h po 50 l/h

průtok cone gas - v rozsahu 0-100 l/h po 20 l/h

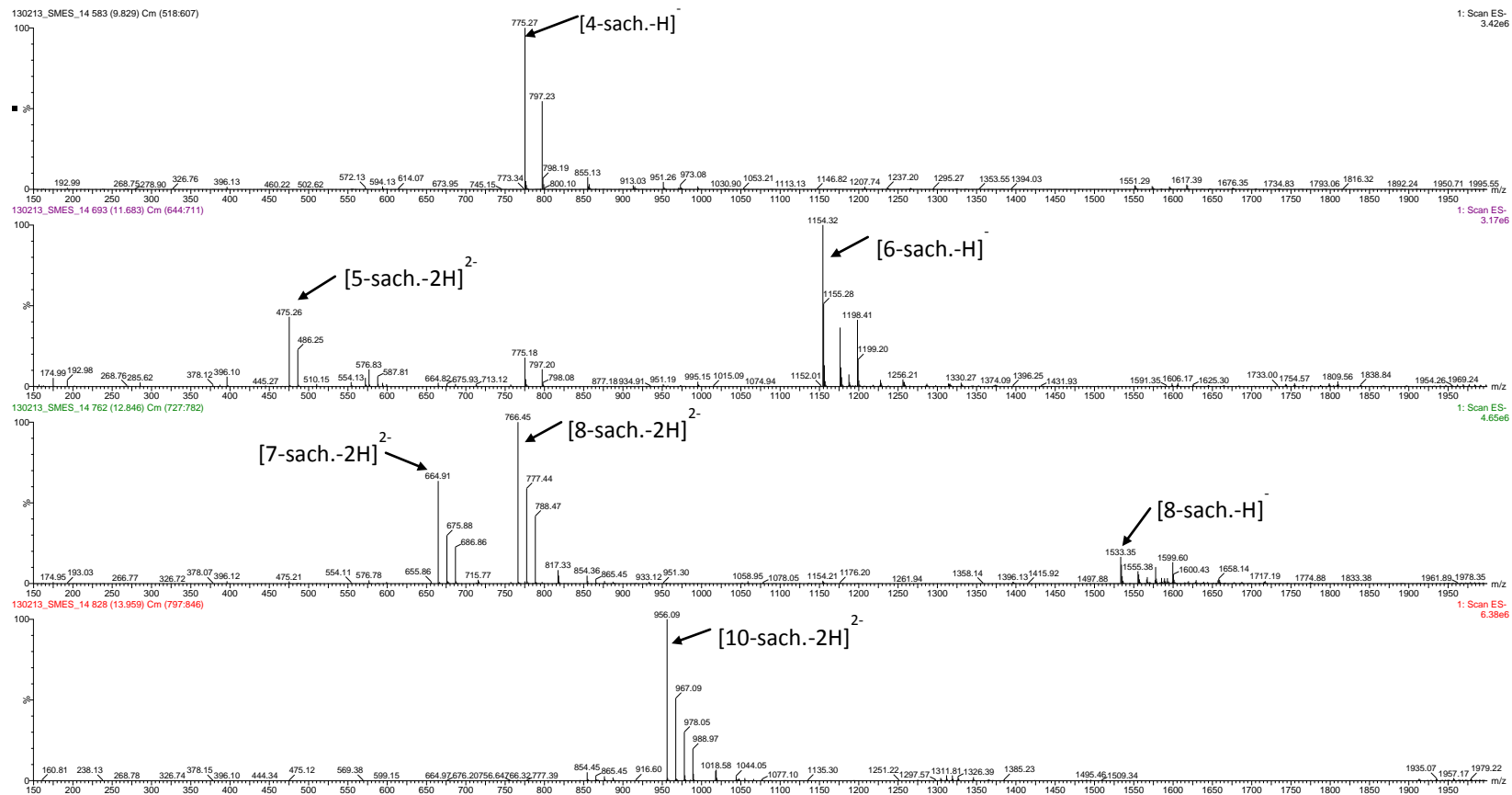


**Obrázek 7** Schéma iontového zdroje ZSpray<sup>TM</sup> Waters/Micromass (převzato z Waters, 2003).

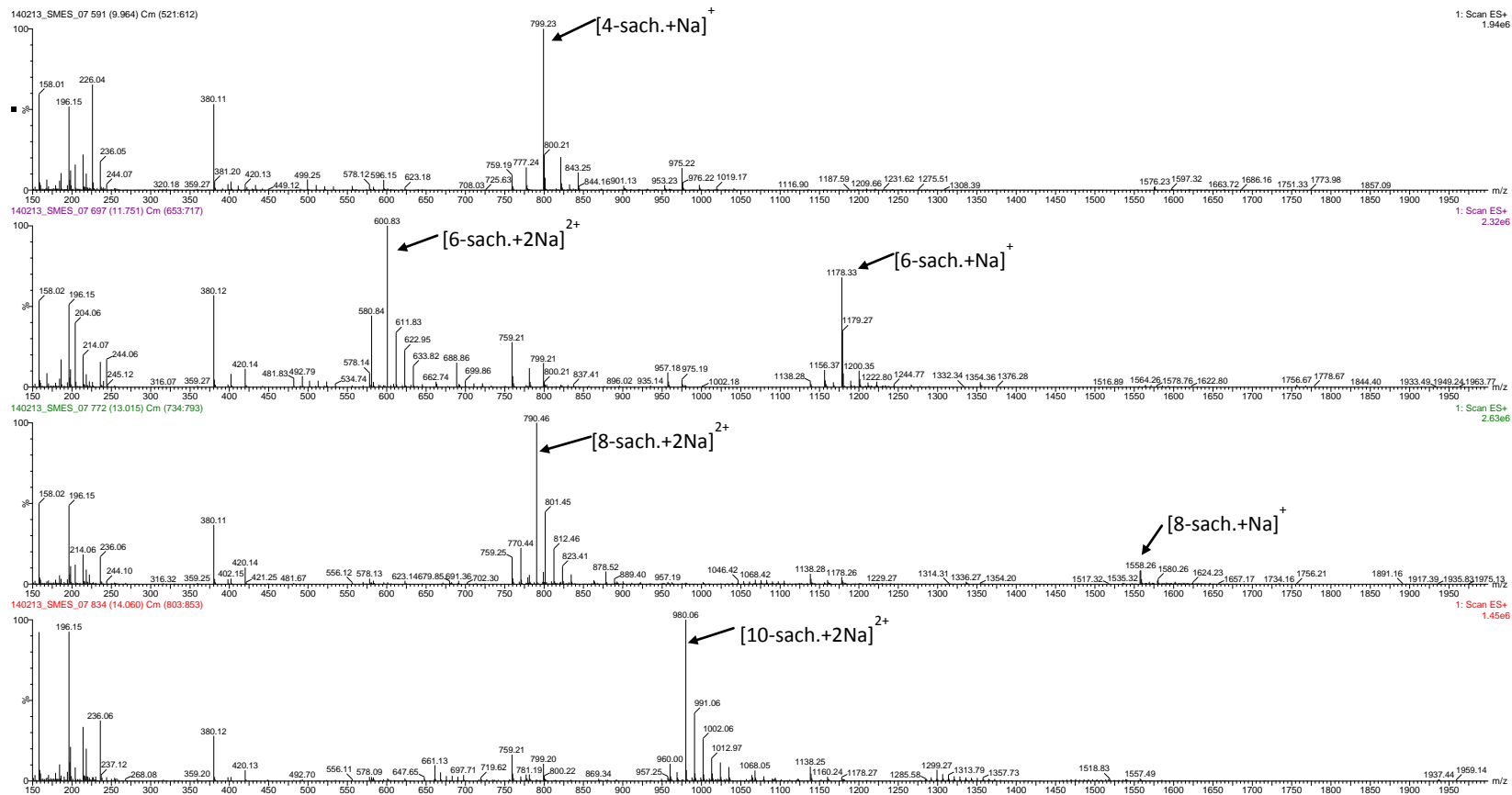
Na základě vypočítaných teoretických hodnot  $m/z$  (viz. Příloha) byly identifikovány jednotlivé píky v MS spektrech patřící OHA (Obrázek 8, Obrázek 9). U 4-sacharidu, 6-sacharidu, 8-sacharidu byly hodnoceny jednonásobně nabitě ionty a u 10-sacharidu byl hodnocen dvojnásobně nabitý iont (v negativním módu je pro 4-sach.  $m/z = 775$ ; pro 6-sach.  $m/z = 1154$ ; pro 8-sach.  $m/z = 1533$  a pro 10-sach.  $m/z = 955$ ; v pozitivním módu je pro 4-sach.  $m/z = 777$ ; pro 6-sach.  $m/z = 1156$ ; pro 8-sach.  $m/z = 1535$  a pro 10-sach.  $m/z = 957$ ).

#### **4.4.3 Kalibrace a určení LOD a LOQ**

LC-MS analýza kalibračních roztoků standardů OHA byla provedena za optimalizovaných podmínek v negativním módu a pozitivním módu (viz. Tabulka 21). Kalibrační roztoky byly připraveny ředěním zásobních roztoků standardů o konc. 1 mg/ml. V negativním módu byla kalibrace proměřena v rozmezí koncentrací 0,0039-0,0625 mg/ml, v pozitivním módu v rozmezí koncentrací 0,0156-0,25 mg/ml. Vynesemím závislosti koncentrace kalibračních roztoků na ploše píků byla pomocí programu Excel sestrojena kalibrační křivka a vypočítána kalibrační rovnice a koeficient determinace  $R^2$ . Limit detekce (LOD) a limit kvantifikace (LOQ) byl získán přímou metodou analytu v programu QC Expert. Po proměření kalibrační závislosti byla zjišťována výtěžnost metody pro každý OHA analýzou roztoku příslušného standardu OHA o koncentraci 0,0313 mg/ml v negativním módu a o koncentraci 0,125 mg/ml v pozitivním módu. Každý vzorek byl proměřen třikrát. Dosazením průměrné hodnoty plochy píků do kalibrační rovnice byla vypočítána koncentrace roztoku příslušného standardu OHA. Hodnota výtěžnosti byla vyjádřena jako poměr vypočítané koncentrace k očekávané/připravené koncentraci roztoku standardu OHA.



**Obrázek 8** MS spektrum 4-sacharidu, 6-sacharidu, 8-sacharidu a 10-sacharidu HA měřené v negativním módu. Nejintenzivnější píky náleží iontům OHA, které vznikly deprotonací molekuly  $[M-H]^-$  nebo  $[M-2H]^{2-}$ , dále je možné pozorovat molekulární adukty OHA se sodnými ionty.



**Obrázek 9** MS spektrum 4-sacharidu, 6-sacharidu, 8-sacharidu a 10-sacharidu HA měřen v pozitivním módu. Nejintenzivnější píky náleží molekulárním aduktům OHA se sodnými ionty  $[M+\text{Na}]^+$  a  $[M+2\text{Na}]^{2+}$ .

#### **4.4.4 Optimalizace LC-MS analýzy OHA v preparativním módu**

V dalším kroku bylo naším cílem optimalizovat složení eluentů a tím zvýšit efektivitu ionizace při LC-MS analýze OHA v preparativním módu. Postupně bylo vyzkoušeno sedm různých eluentů, které byly přiváděny do systému pomocí make-up pumpy a následně míseny s 1/3000 průtokem vystupujícího z chromatografické kolony. Dávkován byl 1 ml roztoku směsi OHA o koncentraci 50 mg/ml ve dvou po sobě jdoucích nástřicích a poté byl sledován vliv složení eluentů na intenzitě a ploše píků jednotlivých OHA.

##### **Optimalizované složení eluentů:**

0,1% kyselina mravenčí ve vodě

0,1% kyselina mravenčí v metanolu

0,1% kyselina mravenčí ve vodě : metanolu (v poměru 1:1)

100% metanol

0,1% amoniak ve vodě

0,1% amoniak v metanolu

0,1% amoniak ve vodě : metanolu (v poměru 1:1)

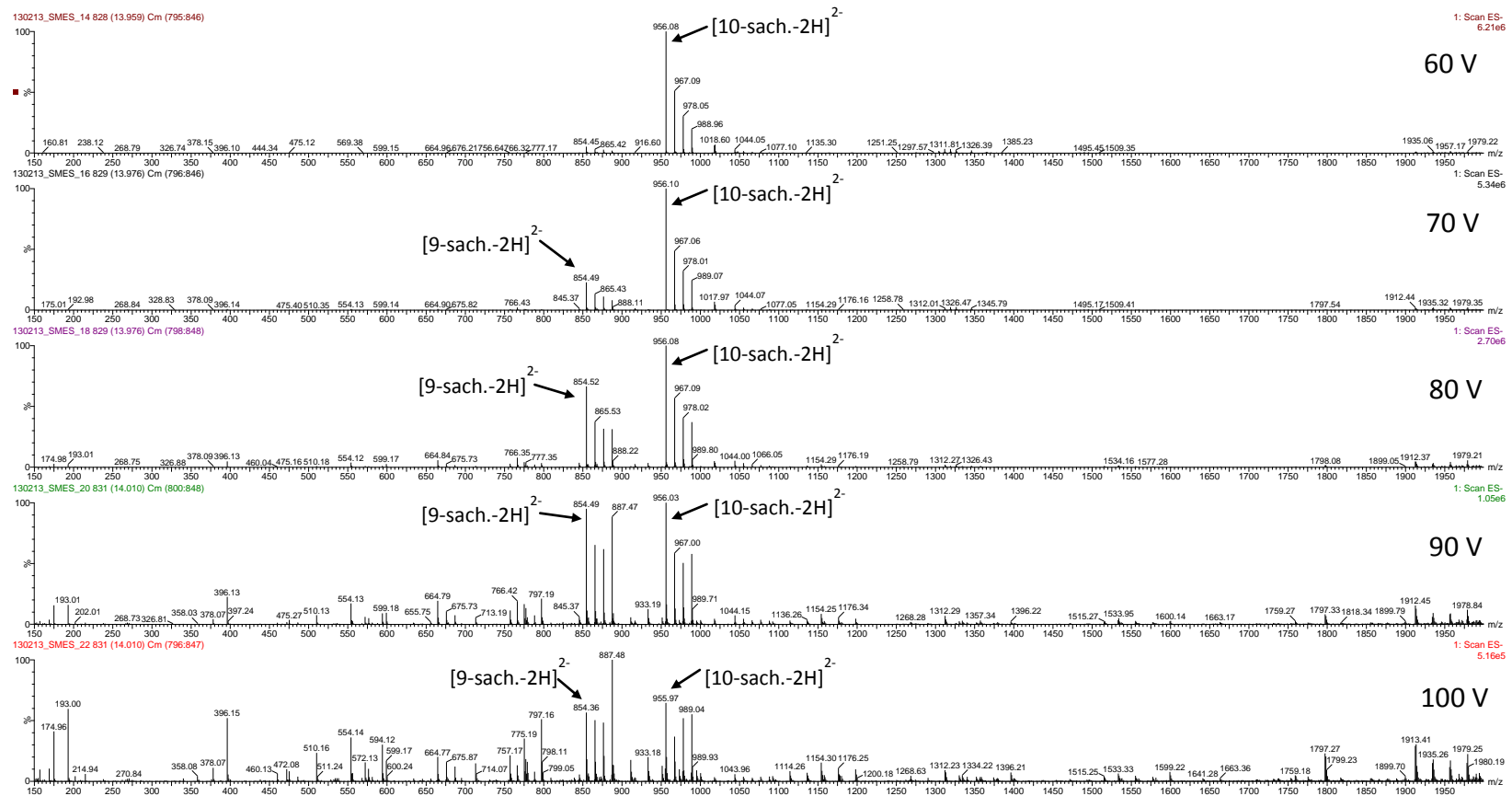


## 5. Výsledky a diskuze

### 5.1 Optimalizace LC-MS analýzy OHA v analytickém módu

#### 5.1.1 Optimalizace napětí na sample cone

Při optimalizaci LC-MS analýzy OHA v analytickém módu byl nejprve sledován vliv změny napětí na sample cone v závislosti na intenzitě a ploše píků 4-sacharidu, 6-sacharidu, 8-sacharidu a 10-sacharidu HA. Nejvyšší hodnoty byly naměřeny při 60 V v negativním módu (Tabulka 1, Tabulka 2) a při 40 V v pozitivním módu (Tabulka 3, Tabulka 4). Při vyšších hodnotách napětí na sample cone byla v MS spektrech pozorována přítomnost píků odpovídající lichým oligosacharidům, které vznikaly v důsledku fragmentace sudých oligosacharidů v iontovém zdroji. V MS spektru 4-sacharidu výrazně vzrůstala intenzita  $[3\text{-sach.-H}]^-$  o  $m/z=572$ ; v MS spektru 6-sacharidu vzrůstala intenzita  $[5\text{-sach.-H}]^-$  o  $m/z=951$ ; v MS spektru 8-sacharidu vzrůstala intenzita  $[7\text{-sach.-}2\text{H}]^{2-}$  o  $m/z=664$  a v MS spektru 10-sacharidu vzrůstala intenzita  $[9\text{-sach.-}2\text{H}]^{2-}$  o  $m/z=854$  (Obrázek 10). Podobné výsledky se objevují i v práci (Prebyl, a další, 2003). Při vyšších hodnotách napětí dochází během srážek iontů s neutrálními molekulami dusíku k předávání většího množství vnitřní energie iontům a k jejich následné fragmentaci. Množství předané vnitřní energie iontu je úměrné velikosti elektrického pole a nábojovému stavu iontu, na které toto elektrické pole působí. Z toho vyplývá, že při stejném napětí na sample cone bude větší vnitřní energie předávána vícenásobně nabitým iontům než jednonásobně nabitým iontům a ty pak budou podléhat snadnější fragmentaci (Prebyl, a další, 2003).



**Obrázek 10** MS spektra 10-sacharidu HA při změně napětí na sample cone v rozsahu 60-100 V měřené v negativním módu. Při postupném zvyšování napětí na sample cone je v MS spektrech 10-sacharidu HA patrný nárůst intenzity  $[9\text{-sach.-}2\text{H}]^{2-}$ .

**Tabulka 1** Intenzity píkú jednotlivých OHA při změně napětí na sample cone měřené v negativním módu. Nejvyšší naměřené hodnoty jsou zvýrazněny.

napětí na sample cone (V)	4-sacharid intenzita (10 <sup>6</sup> imp.)	6-sacharid intenzita (10 <sup>6</sup> imp.)	8-sacharid intenzita (10 <sup>6</sup> imp.)	10-sacharid intenzita (10 <sup>6</sup> imp.)
10V	0,70	0,69	0,13	1,41
20V	1,09	1,25	0,18	2,53
30V	1,63	1,50	0,31	3,43
40V	2,28	2,08	0,33	4,53
50V	3,16	2,87	0,58	6,54
60V	3,76	4,75	0,81	6,60
70V	3,46	4,47	0,94	5,93
80V	2,63	4,60	1,11	2,70
90V	2,01	4,58	1,16	1,06
100V	1,61	4,46	1,35	0,35

**Tabulka 2** Plochy píkú jednotlivých OHA při změně napětí na sample cone měřené v negativním módu. Nejvyšší naměřené hodnoty jsou zvýrazněny.

napětí na sample cone (V)	4-sacharid plocha píku (imp.)	6-sacharid plocha píku (imp.)	8-sacharid plocha píku (imp.)	10-sacharid plocha píku (imp.)
10V	965 136	529 010	105 951	1 047 000
20V	1 557 711	1 123 851	124 970	1 949 533
30V	2 164 354	1 498 102	193 934	2 611 190
40V	3 127 010	2 214 435	290 105	3 764 390
50V	4 249 826	3 631 048	502 096	5 094 895
60V	5 165 706	4 731 354	721 517	5 593 287
70V	5 090 824	4 476 810	845 492	4 655 240
80V	3 585 100	4 243 563	960 144	2 197 240
90V	2 827 063	3 879 616	1 023 793	763 026
100V	2 145 365	3 067 600	1 124 461	253 595

**Tabulka 3** Intenzity píků jednotlivých OHA při změně napětí na sample cone měřené v pozitivním módu. Nejvyšší naměřené hodnoty jsou zvýrazněny.

napětí na sample cone (V)	4-sacharid intenzita ( $10^5$ imp.)	6-sacharid intenzita ( $10^5$ imp.)	8-sacharid intenzita ( $10^5$ imp.)	10-sacharid intenzita ( $10^5$ imp.)
10V	3,41	0,66	0,01	1,47
20V	5,83	1,45	0,06	1,96
30V	5,74	2,42	0,15	1,34
40V	2,83	2,75	0,18	0,31
50V	0,76	1,53	0,17	0,36
60V	0,20	0,59	0,11	0,54
70V	0,11	0,22	0,07	0,52
80V	0,08	0,10	0,04	0,72
90V	0,03	0,04	0,02	0,58
100V	0,03	0,03	0,01	0,44

**Tabulka 4** Plochy píků jednotlivých OHA při změně napětí na sample cone měřené v pozitivním módu. Nejvyšší naměřené hodnoty jsou zvýrazněny.

napětí na sample cone (V)	4-sacharid plocha píku (imp.)	6-sacharid plocha píku (imp.)	8-sacharid plocha píku (imp.)	10-sacharid plocha píku (imp.)
10V	406 074	70 915	1 098	108 033
20V	768 360	156 295	5 717	155 475
30V	788 524	234 475	13 304	102 045
40V	394 439	262 559	15 655	31 989
50V	97 316	147 593	15 313	32 471
60V	28 634	64 957	11 904	61 223
70V	15 099	23 768	6 620	49 573
80V	10 332	10 571	2 342	94 130
90V	6 859	5 172	1 981	51 921
100V	2 074	2 812	1 457	53 140

### 5.1.2 Optimalizace napětí na kapiláře

Princip ESI je založen na elektrochemických procesech probíhajících na povrchu kovové kapiláry, na kterou je vkládáno vysoké napětí. Podle polaritě vkládaného napětí dochází ke vzniku kladných nebo záporných iontů. Při měření v negativním módu je vkládané napětí záporné, povrch kapiláry se chová jako katoda, ke které migrují kationty obsažené v roztoku, naopak anionty migrují do středu kapiláry a následně se hromadí na její špičce, odkud se uvolňují ve formě nabitých kapek (Capila, a další, 2004). Optimalizace kapilárního napětí výrazně ovlivňuje stabilitu a intenzitu iontového proudu, proto byl tento parametr sledován v rozsahu 2,5-4,5 kV po 0,5 kV. Nejvyšších intenzit signálu v negativním módu bylo dosaženo při 3 kV (Tabulka 5), naopak největších ploch píků při 3,5 kV (Tabulka 6), protože rozdíly mezi naměřenými plochami při 3 a 3,5 kV nebyly příliš výrazné, byla jako optimální zvolena hodnota kapilárního napětí 3 kV vykazující vyšší intenzitu signálu. V pozitivním módu byly nejvyšší hodnoty naměřeny při 3,5 kV (Tabulka 7, Tabulka 8).

**Tabulka 5** Intenzity píků jednotlivých OHA při změně napětí na kapiláře měřené v negativním módu. Nejvyšší naměřené hodnoty jsou zvýrazněny.

napětí na kapiláře (kV)	4-sacharid intenzita ( $10^6$ imp.)	6-sacharid intenzita ( $10^6$ imp.)	8-sacharid intenzita ( $10^6$ imp.)	10-sacharid intenzita ( $10^6$ imp.)
2,5kV	2,04	2,27	0,61	6,06
3,0kV	3,23	3,02	0,83	6,67
3,5kV	2,63	2,64	0,94	5,81
4,0kV	1,79	1,83	0,66	4,36
4,5kV	1,92	2,64	0,72	5,76

**Tabulka 6** Plochy píků jednotlivých OHA při změně napětí na kapiláře měřené v negativním módu. Nejvyšší naměřené hodnoty jsou zvýrazněny.

napětí na kapiláře (kV)	4-sacharid plocha píku (imp.)	6-sacharid plocha píku (imp.)	8-sacharid plocha píku (imp.)	10-sacharid plocha píku (imp.)
2,5kV	3 920 917	2 675 081	511 239	5 036 365
3,0kV	4 904 836	3 297 278	690 983	5 538 289
3,5kV	4 607 834	3 441 900	761 975	5 705 530
4,0kV	3 093 436	2 793 596	559 072	3 379 962
4,5kV	3 114 060	3 341 072	613 501	4 945 610

**Tabulka 7** Intenzity píků jednotlivých OHA při změně napětí na kapiláře měřené v pozitivním módu. Nejvyšší naměřené hodnoty jsou zvýrazněny.

napětí na kapiláře (kV)	4-sacharid intenzita ( $10^6$ imp.)	6-sacharid intenzita ( $10^6$ imp.)	8-sacharid intenzita ( $10^6$ imp.)	10-sacharid intenzita ( $10^6$ imp.)
2,5kV	2,66	2,51	0,45	0,53
3,0kV	2,83	2,85	0,46	0,51
3,5kV	3,16	3,22	0,52	0,55
4,0kV	2,70	2,50	0,41	0,43
4,5kV	1,73	1,25	0,20	0,26

**Tabulka 8** Plochy píků jednotlivých OHA při změně napětí na kapiláře měřené v pozitivním módu. Nejvyšší naměřené hodnoty jsou zvýrazněny.

napětí na kapiláře (kV)	4-sacharid plocha píku (imp.)	6-sacharid plocha píku (imp.)	8-sacharid plocha píku (imp.)	10-sacharid plocha píku (imp.)
2,5kV	3 910 178	2 731 952	380 559	351 686
3,0kV	4 224 553	3 076 537	417 942	423 998
3,5kV	7 847 430	3 505 263	496 350	405 670
4,0kV	4 356 905	2 910 151	400 494	384 427
4,5kV	2 524 288	1 447 401	194 147	172 579

### 5.1.3 Optimalizace desolvatační teploty a průtoku desolvatačního plynu

Desolvatační teplota a průtok desolvatačního plynu jsou dalšími důležitými parametry iontového zdroje ovlivňující především rychlost odpařování rozpouštědla. Stejně jako v případě nebulizačního plynu je používaným desolvatačním plynem dusík, který je přiváděn koaxiálním pláštěm obklopujícím nebulizační kapiláru na ESI sondě. Použitá desolvatační teplota závisí na průtoku a složení mobilní fáze (především poměru těkavé organické fáze : vodné fázi). Vyšší hodnoty desolvatační teploty vedou k zvýšení citlivosti metody, ale zároveň mohou přispívat k snížení stability iontového proudu (Waters, 2003). Při optimalizaci desolvatační teploty iontového zdroje byla teplota sledována v rozsahu 200-650°C po 50°C. Na základě měření v negativním módu vyplývá, že se zvyšující desolvatační teplotou roste intenzita a plocha píků jednotlivých OHA (Tabulka 9, Tabulka 10). Při vyšších teplotách mírně narůstala intenzita lichých oligosacharidů v MS spektrech 8-sacharidu a 10-sacharidu, a proto byla jako výsledná

desolvatační teplota zvolena teplota 500°C. V pozitivním módu byly neoptimálnější hodnoty naměřeny při teplotě 450°C (Tabulka 11, Tabulka 12). Průtok desolvatačního plynu byl sledován v rozsahu 500-800 l/h po 50 l/h. Nejvyšší naměřené hodnoty byly získány při průtoku 500 l/h v obou módech (Tabulka 13, Tabulka 14, Tabulka 15, Tabulka 16).

**Tabulka 9** Intenzity píků jednotlivých OHA při změně desolvatační teploty měřené v negativním módu. Nejvyšší naměřené hodnoty jsou zvýrazněny.

desolvatační teplota (°C)	4-sacharid intenzita (10 <sup>6</sup> imp.)	6-sacharid intenzita (10 <sup>6</sup> imp.)	8-sacharid intenzita (10 <sup>6</sup> imp.)	10-sacharid intenzita (10 <sup>6</sup> imp.)
200°C	0,84	2,48	0,58	6,84
250°C	3,23	3,02	0,84	6,67
300°C	3,49	3,37	1,17	7,23
350°C	5,05	5,34	2,00	11,00
400°C	7,18	7,20	2,88	20,00
450°C	9,50	9,29	3,28	21,60
500°C	11,40	13,00	4,44	23,70
550°C	13,70	25,00	8,33	29,30
600°C	17,10	33,30	10,40	30,30
650°C	20,40	44,80	16,70	30,30

**Tabulka 10** Plochy píků jednotlivých OHA při změně desolvatační teploty měřené v negativním módu. Nejvyšší naměřené hodnoty jsou zvýrazněny.

desolvatační teplota (°C)	4-sacharid plocha píku (imp.)	6-sacharid plocha píku (imp.)	8-sacharid plocha píku (imp.)	10-sacharid plocha píku (imp.)
200°C	3 053 288	2 386 968	489 207	3 927 502
250°C	4 904 836	3 297 278	690 983	5 538 289
300°C	5 565 962	4 377 793	954 962	6 910 394
350°C	8 446 115	6 987 138	1 639 223	11 613 319
400°C	12 151 520	8 635 861	2 487 931	15 152 557
450°C	13 876 458	10 992 796	2 873 329	16 925 974
500°C	16 338 440	13 868 239	3 653 853	18 993 522
550°C	19 263 224	26 095 160	6 890 522	2 238 558
600°C	21 769 666	34 609 671	8 857 373	23 473 598
650°C	27 900 605	44 963 272	11 257 755	23 921 072

**Tabulka 11** Intenzity píkú jednotlivých OHA při změně desolvatační teploty měřené v pozitivním módu. Nejvyšší naměřené hodnoty jsou zvýrazněny.

desolvatační teplota (°C)	4-sacharid intenzita (10 <sup>6</sup> imp.)	6-sacharid intenzita (10 <sup>6</sup> imp.)	8-sacharid intenzita (10 <sup>6</sup> imp.)	10-sacharid intenzita (10 <sup>6</sup> imp.)
200°C	2,38	2,24	0,37	0,47
250°C	2,83	2,36	0,48	0,52
300°C	2,81	2,39	0,48	0,52
350°C	3,34	3,45	0,67	0,56
400°C	3,46	4,57	0,86	0,51
450°C	2,93	4,66	0,96	0,36
500°C	1,13	2,74	0,86	0,21
550°C	0,47	0,76	0,33	0,12
600°C	0,14	0,23	0,07	0,12
650°C	0,06	0,12	0,03	0,13

**Tabulka 12** Plochy píkú jednotlivých OHA při změně desolvatační teploty měřené v pozitivním módu. Nejvyšší naměřené hodnoty jsou zvýrazněny.

desolvatační teplota (°C)	4-sacharid plocha píku (imp.)	6-sacharid plocha píku (imp.)	8-sacharid plocha píku (imp.)	10-sacharid plocha píku (imp.)
200°C	3 896 660	2 875 485	322 626	383 579
250°C	4 762 297	3 242 284	443 934	443 439
300°C	4 719 111	3 094 079	462 727	407 928
350°C	5 319 271	4 458 812	585 687	454 944
400°C	5 244 752	5 300 462	759 606	413 118
450°C	4 263 380	5 416 881	980 222	319 909
500°C	1 885 678	3 400 092	836 399	223 602
550°C	774 446	862 466	344 606	136 925
600°C	213 066	245 219	75 351	126 898
650°C	97 357	126 757	30 672	135 848



**Tabulka 13** Intenzity píků jednotlivých OHA při změně průtoku desolvatačního plynu měřené v negativním módu. Nejvyšší naměřené hodnoty jsou zvýrazněny.

průtok desolvat. plynu (l/h)	4-sacharid intenzita ( $10^6$ imp.)	6-sacharid intenzita ( $10^6$ imp.)	8-sacharid intenzita ( $10^6$ imp.)	10-sacharid intenzita ( $10^6$ imp.)
500 l/h	9,68	13,80	4,07	18,80
550 l/h	7,77	11,50	2,95	15,20
600 l/h	8,08	11,10	3,32	15,80
650 l/h	7,77	9,81	3,01	14,70
700 l/h	8,21	11,90	3,13	14,10
750 l/h	7,96	11,50	3,26	16,40
800 l/h	7,64	10,20	3,10	13,60

**Tabulka 14** Plochy píků jednotlivých OHA při změně průtoku desolvatačního plynu měřené v negativním módu. Nejvyšší naměřené hodnoty jsou zvýrazněny.

průtok desolvat. plynu (l/h)	4-sacharid plocha píku (imp.)	6-sacharid plocha píku (imp.)	8-sacharid plocha píku (imp.)	10-sacharid plocha píku (imp.)
500 l/h	13 724 832	15 115 685	3 595 046	15 905 319
550 l/h	11 076 930	12 453 619	2 542 290	12 943 931
600 l/h	11 266 882	12 400 714	2 500 608	12 493 376
650 l/h	11 128 431	10 747 889	2 491 939	13 054 266
700 l/h	11 468 045	13 315 557	2 765 043	12 382 645
750 l/h	11 319 651	13 164 942	2 643 444	13 556 707
800 l/h	11 429 635	11 840 622	2 543 596	12 734 088

**Tabulka 15** Intenzity píků jednotlivých OHA při změně průtoku desolvatačního plynu měřené v pozitivním módu. Nejvyšší naměřené hodnoty jsou zvýrazněny

průtok desolvat. plynu (l/h)	4-sacharid intenzita ( $10^6$ imp.)	6-sacharid intenzita ( $10^6$ imp.)	8-sacharid intenzita ( $10^6$ imp.)	10-sacharid intenzita ( $10^6$ imp.)
500 l/h	2,70	4,15	0,84	0,51
550 l/h	2,55	4,00	0,80	0,47
600 l/h	2,19	3,93	0,84	0,40
650 l/h	2,13	3,85	0,80	0,39
700 l/h	2,09	3,79	0,86	0,34
750 l/h	2,05	3,74	0,83	0,33
800 l/h	1,90	3,68	0,74	0,41

**Tabulka 16** Plochy píků jednotlivých OHA při změně průtoku desolvatačního plynu měřené v pozitivním módu. Nejvyšší naměřené hodnoty jsou zvýrazněny.

průtok desolvat. plynu (l/h)	4-sacharid plocha píku (imp.)	6-sacharid plocha píku (imp.)	8-sacharid plocha píku (imp.)	10-sacharid plocha píku (imp.)
500 l/h	4 666 086	4 790 627	775 236	344 886
550 l/h	3 756 251	4 486 812	791 766	381 802
600 l/h	1 153 154	4 554 811	842 807	296 746
650 l/h	3 437 921	4 691 936	826 165	322 706
700 l/h	3 358 356	4 549 595	879 797	297 326
750 l/h	3 235 606	4 486 712	881 528	295 842
800 l/h	3 062 761	4 682 554	730 057	397 043

#### 5.1.4 Optimalizace průtoku cone gas

V případě cone gas je používán dusík proudící proti iontovému proudu analytu. Tento plyn napomáhá desolvatačnímu procesu a působí proti vzniku klastrů iontů analytu s rozpouštědlem, které vznikají při přechodu iontů z oblasti atmosférického tlaku do vakua a mohou snižovat intenzitu výsledného signálu (Waters, 2003). Průtok cone gas byl sledován v rozsahu 0-100 l/h po 20 l/h. Neoptimálnější hodnoty byly naměřeny při 40 l/h v negativním módu (Tabulka 17, Tabulka 18) a při 0 l/h v pozitivním módu (Tabulka 19, Tabulka 20).

**Tabulka 17** Intenzity píků jednotlivých OHA při změně průtoku cone gas měřené v negativním módu. Nejvyšší naměřené hodnoty jsou zvýrazněny.

průtok cone gas (l/h)	4-sacharid intenzita ( $10^6$ imp.)	6-sacharid intenzita ( $10^6$ imp.)	8-sacharid intenzita ( $10^6$ imp.)	10-sacharid intenzita ( $10^6$ imp.)
0 l/hr	6,96	7,63	2,18	16,40
20 l/hr	7,34	7,95	2,85	16,20
40 l/hr	7,10	9,86	2,95	16,50
60 l/hr	7,05	8,94	2,49	16,00
80 l/hr	6,74	8,82	2,56	15,50
100 l/hr	7,10	9,07	2,53	13,80

**Tabulka 18** Plochy píkú jednotlivých OHA při změně průtoku cone gas měřené v negativním módu. Nejvyšší naměřené hodnoty jsou zvýrazněny.

průtok cone gas (l/h)	4-sacharid plocha píku (imp.)	6-sacharid plocha píku (imp.)	8-sacharid plocha píku (imp.)	10-sacharid plocha píku (imp.)
0 l/hr	10 842 587	8 319 671	1 918 188	13 467 873
20 l/hr	11 155 313	9 680 927	2 523 974	14 252 288
40 l/hr	11 573 413	11 249 263	2 478 839	14 235 788
60 l/hr	10 388 961	10 683 882	2 197 520	14 289 070
80 l/hr	10 425 309	9 983 222	2 129 527	13 536 273
100 l/hr	11 056 852	10 033 404	2 245 849	13 463 013

**Tabulka 19** Intenzity píkú jednotlivých OHA při změně průtoku cone gas měřené v pozitivním módu. Nejvyšší naměřené hodnoty jsou zvýrazněny.

průtok cone gas (l/h)	4-sacharid intenzita ( $10^6$ imp.)	6-sacharid intenzita ( $10^6$ imp.)	8-sacharid intenzita ( $10^6$ imp.)	10-sacharid intenzita ( $10^6$ imp.)
0 l/hr	3,71	5,49	1,21	0,67
20 l/hr	3,52	5,46	1,09	0,55
40 l/hr	3,28	4,77	1,02	0,49
60 l/hr	3,16	4,95	0,92	0,49
80 l/hr	3,64	5,22	1,03	0,51
100 l/hr	3,45	4,74	0,95	0,49

**Tabulka 20** Plochy píkú jednotlivých OHA při změně průtoku cone gas měřené v pozitivním módu. Nejvyšší naměřené hodnoty jsou zvýrazněny.

průtok cone gas (l/h)	4-sacharid plocha píku (imp.)	6-sacharid plocha píku (imp.)	8-sacharid plocha píku (imp.)	10-sacharid plocha píku (imp.)
0 l/hr	5 346 967	6 081 935	1 034 342	489 396
20 l/hr	5 208 160	5 489 791	930 735	445 711
40 l/hr	5 092 008	5 409 816	886 775	448 257
60 l/hr	5 012 069	5 160 384	830 616	383 946
80 l/hr	5 092 008	5 545 835	924 222	415 232
100 l/hr	4 883 754	4 769 697	763 758	422 007

### 5.1.5 Optimalizované parametry

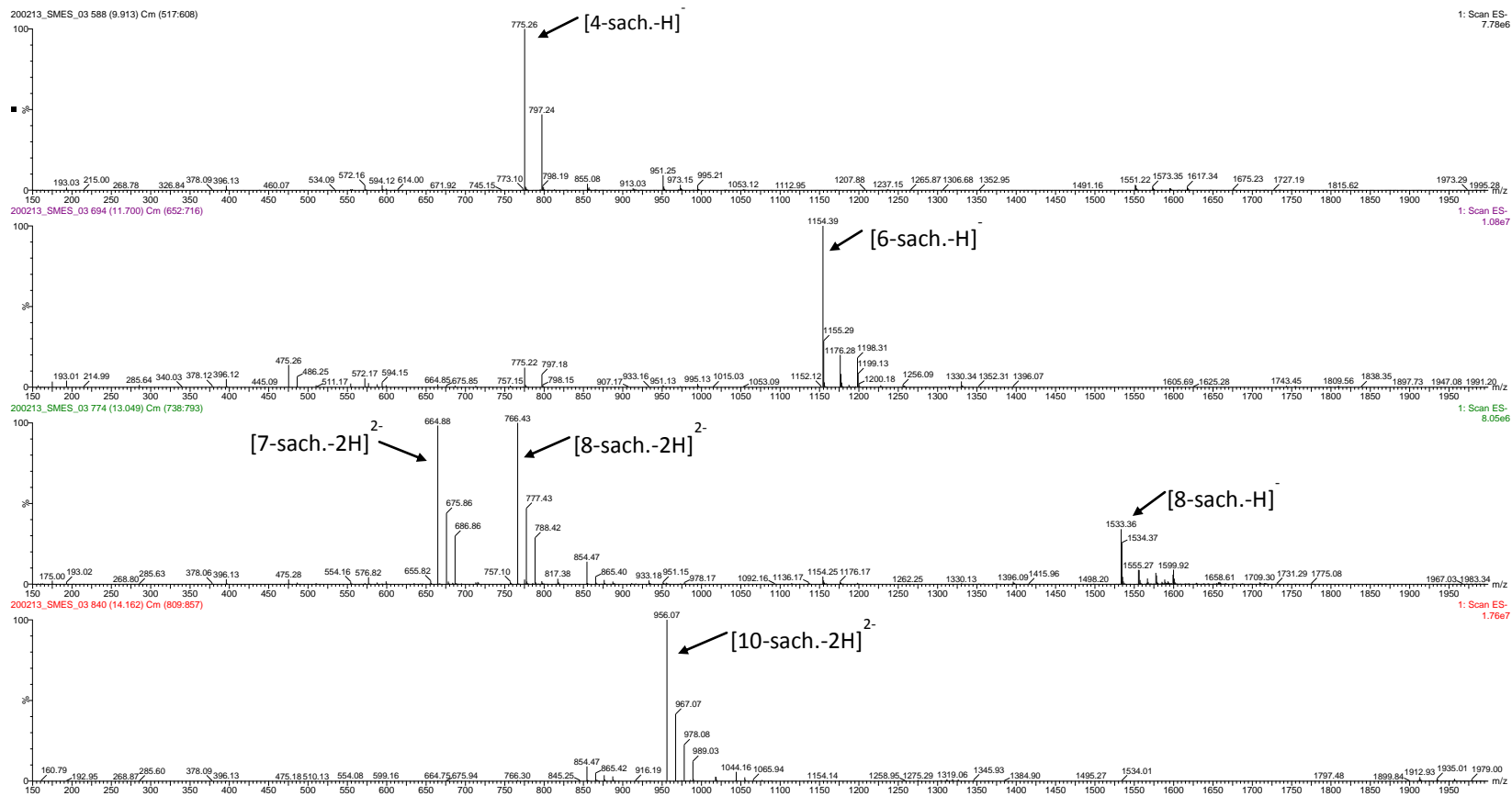
Výsledné optimalizované parametry v obou módech jsou shrnuty v Tabulce 21. Na základě naměřených hodnot bylo zjištěno, že LC-MS analýza OHA v negativním módu vykazuje vyšší intenzity signálu ve srovnání s pozitivním módem.

**Tabulka 21** Optimalizované parametry ionizace při LC-MS analýze OHA v negativním a pozitivním módu

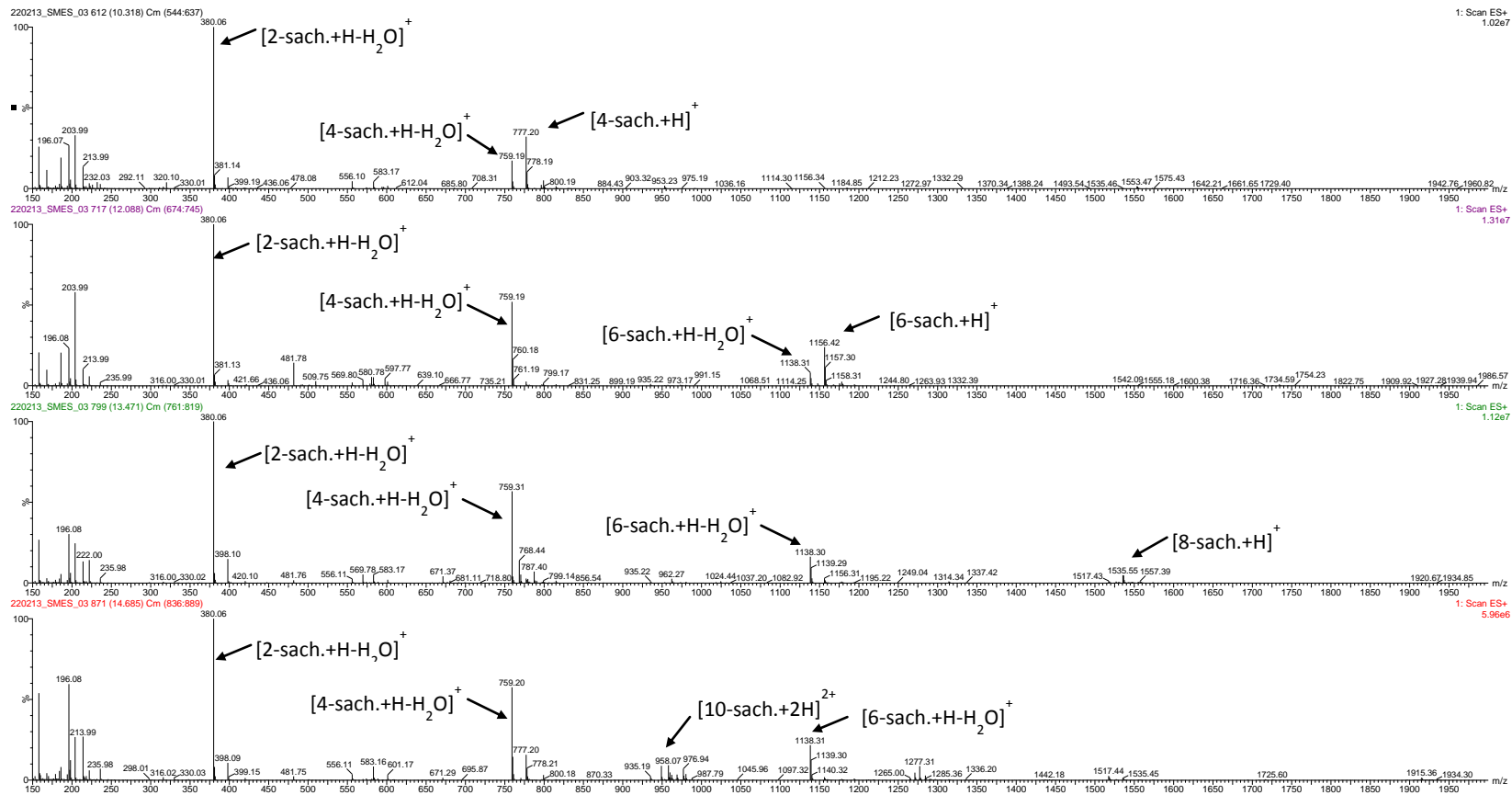
optimalizované parametry	ESI-	ESI+
napětí na sample cone	60 V	40 V
napětí na kapiláře	3 kV	3,5 kV
desolvatační teplota	500°C	450°C
průtok desolvatačního plynu	500 l/h	500 l/h
průtok cone gas	40 l/h	0 l/h

V negativním módu byly v MS spektrech OHA přítomny převážně ionty  $[M-H]^-$  a  $[M-2H]^{2-}$ . Molekulární adukty se sodnými ionty  $[M-2H+Na]^-$  a  $[M-3H+Na]^{2-}$  se vyskytovaly s výrazně nižší intenzitou. Problematická byla pouze interpretace MS spekter 8-sacharidu, kde byl kromě jednonásobně nabitého iontu o  $m/z=1533$  pozorován také dvojnásobně nabitý iont o  $m/z=766$ , což vedlo k nižším dosahovaným intenzitám z důvodu rozdělení výsledného signálu mezi dva píky. Dále byla v MS spektru 8-sacharidu pozorována přetrvávající přítomnost iontu  $[7\text{-sach.}-2H]^{2-}$ , na rozdíl od ostatních OHA v jejichž MS spektrech se za optimalizovaných podmínek liché oligosacharidy nevyskytovaly nebo jen s velmi nízkou intenzitou (Obrázek 11).

V pozitivním módu byly kromě iontů  $[M+H]^+$  a  $[M+2H]^{2+}$  přítomny také aduktové ionty  $[M+Na]^+$ ,  $[M+2Na]^{2+}$  a ionty vzniklé dehydratací protonované molekuly  $[M+H-H_2O]^+$ , které výrazně ztěžovaly interpretaci MS spekter (Obrázek 12). Téměř ve všech MS spektrech měřených v pozitivním módu byly přítomny velmi intenzivní píky o  $m/z=380$  odpovídající  $[2\text{-sach.}+H-H_2O]^+$  a o  $m/z=204$  odpovídající  $[N\text{-acetyl-D-glukosamin}+H-H_2O]^+$ .



**Obrázek 11** MS spektrum 4-sacharidu, 6-sacharidu, 8-sacharidu a 10-sacharidu HA měřené za optimalizovaných podmínek v negativním módu.



**Obrázek 12** MS spektrum 4-sacharidu, 6-sacharidu, 8-sacharidu a 10-sacharidu HA měřené za optimalizovaných podmínek v pozitivním módu. V naměřených MS spektrech byly pozorovány kromě iontů  $[M+\text{H}]^+$  nebo  $[M+2\text{H}]^{2+}$  také ionty vzniklé dehydratací protonované molekuly  $[M+\text{H-H}_2\text{O}]^+$ , především  $[2\text{-sach.}+\text{H-H}_2\text{O}]^+$  o  $m/z=380$  a  $[N\text{-acetyl-D-glukosamin}+\text{H-H}_2\text{O}]^+$  o  $m/z=204$ .

## 5.2 Kalibrace a určení LOD a LOQ

LC-MS analýzou kalibračních roztoků OHA za optimalizovaných podmínek byly stanoveny některé důležité parametry používané analytické metody, především rovnice kalibrace, koeficienty determinace, limity detekce (LOD), limity kvantifikace (LOQ) a výtěžnost metody. Získané výsledky pro negativní mód jsou shrnuty v Tabulce 22 a pro pozitivní mód v Tabulce 23. Koeficienty determinace se pohybovaly v rozmezí 0,9912-0,9997, a proto můžeme prohlásit výslednou kalibrační závislost v obou módech v měřeném rozsahu za lineární. V negativním módu bylo dosahováno výrazně nižších hodnot LOD a LOQ, což umožnilo detekovat nižší koncentrace OHA ve vzorcích a potvrdilo výhodnost analýzy OHA v negativním módu. Výtěžnost metody se pohybovala v rozsahu 93,2-110,3%. Podle ICH guidelines by hodnota výtěžnosti pro obsah aktivní složky 100% měla být v rozsahu 98-102%. Pro přesnější určení koncentrace látky ve směsi bychom, ale museli použít vnitřní standard.

**Tabulka 22** Rovnice kalibrace, koeficienty determinace, limity detekce, limity kvantifikace a výtěžnost pro 4-sacharid, 6-sacharid, 8-sacharid a 10-sacharid HA měřené v negativním módu

	kalibrační rovnice	R <sup>2</sup>	LOD (mg/ml)	LOQ (mg/ml)	výtěžnost
<b>4-sacharid</b>	$y=199311197,24x-18310,08$	0,9993	0,0037	0,0054	93,2%
<b>6-sacharid</b>	$y=2876275,09x-14917,68$	0,9923	0,0113	0,0159	101,8%
<b>8-sacharid</b>	$y=516215,22x-1419,18$	0,9986	0,0050	0,0073	109,8%
<b>10-sacharid</b>	$y=32568451,09x-55744,87$	0,9997	0,0025	0,0037	107,6%

**Tabulka 23** Rovnice kalibrace, koeficienty determinace, limity detekce, limity kvantifikace a výtěžnost pro 4-sacharid, 6-sacharid, 8-sacharid a 10-sacharid HA měřené v pozitivním módu

	kalibrační rovnice	R <sup>2</sup>	LOD (mg/ml)	LOQ (mg/ml)	výtěžnost
<b>4-sacharid</b>	$y=3253325,42x-54933,5$	0,9922	0,0455	0,0637	105,8%
<b>6-sacharid</b>	$y=3860423,91x-79721,17$	0,9946	0,0386	0,0545	93,4%
<b>8-sacharid</b>	$y=554298,37x-12751,35$	0,9912	0,0481	0,0672	94,1%
<b>10-sacharid</b>	$y=591695,09x+7115,94$	0,9921	0,0459	0,0643	110,3%

### 5.3 Optimalizace LC-MS analýzy OHA v preparativním módu

Preparativní mód LC-MS systému umožňuje rychlou purifikaci a frakcionaci OHA. Velkou výhodou tohoto módu je, že jen 1/3000 celkového průtoku vstupuje do MS spektrometru, přičemž eluent přiváděný do systému pomocí make-up pumpy může výrazně ovlivňovat výsledné složení roztoku podílejícího se na ionizaci OHA. V průběhu optimalizace byl sledován vliv složení sedmi různých eluentů. Z našich výsledků vyplývá, že přidání 0,1 % kys. mravenčí podporuje vznik negativních iontů, přidání 0,1 % amoniaku podporuje vznik pozitivních iontů, lepších výsledků bylo dosaženo v případech, kdy byl použitým rozpouštědlem metanol. V negativním módu byly naměřeny nejvyšší hodnoty při použití 100 % metanolu (Tabulka 24, Tabulka 25), v pozitivním módu při použití 0,1% amoniaku v metanolu (Tabulka 26, Tabulka 27).

**Tabulka 24** Intenzity píků jednotlivých OHA při změně složení eluentů měřené v negativním módu. Nejvyšší naměřené hodnoty jsou zvýrazněny.

eluenty	4-sacharid intenzita (10 <sup>6</sup> imp.)	6-sacharid intenzita (10 <sup>6</sup> imp.)	8-sacharid intenzita (10 <sup>6</sup> imp.)	10-sacharid intenzita (10 <sup>6</sup> imp.)
0,1% HCOOH ve vodě	3,99	3,58	0,70	3,72
0,1% HCOOH ve vodě : MeOH	5,80	4,55	0,71	7,56
0,1% HCOOH v MeOH	18,70	13,70	2,89	15,90
MeOH	21,80	16,00	4,89	23,10
0,1% NH <sub>3</sub> ve vodě	2,08	1,63	0,30	2,41
0,1% NH <sub>3</sub> ve vodě : MeOH	2,49	1,75	0,27	3,46
0,1% NH <sub>3</sub> v MeOH	10,98	8,18	1,25	11,00

**Tabulka 25** Plochy píků jednotlivých OHA při změně složení eluentů měřené v negativním módu. Nejvyšší naměřené hodnoty jsou zvýrazněny.

eluenty	4-sacharid plocha píku (imp.)	6-sacharid plocha píku (imp.)	8-sacharid plocha píku (imp.)	10-sacharid plocha píku (imp.)
0,1% HCOOH ve vodě	9 920 076	6 471 584	1 162 225	5 416 264
0,1% HCOOH ve vodě : MeOH	12 875 242	9 286 933	150 784	12 052 692
0,1% HCOOH v MeOH	42 823 172	25 585 048	5 419 518	25 310 844
MeOH	49 804 224	33 100 552	9 183 498	37 992 264
0,1% NH <sub>3</sub> ve vodě	4 866 170	3 145 785	597 768	4 264 634
0,1% NH <sub>3</sub> ve vodě : MeOH	6 113 363	3 420 366	542 363	5 929 351
0,1% NH <sub>3</sub> v MeOH	29 004 403	17 674 687	2 708 756	21 024 138



**Tabulka 26** Intenzity píkú jednotlivých OHA při změně složení eluentů měřené v pozitivním módu. Nejvyšší naměřené hodnoty jsou zvýrazněny.

eluenty	4-sacharid intenzita (10 <sup>6</sup> imp.)	6-sacharid intenzita (10 <sup>6</sup> imp.)	8-sacharid intenzita (10 <sup>6</sup> imp.)	10-sacharid intenzita (10 <sup>6</sup> imp.)
0,1% HCOOH ve vodě	1,13	1,18	1,54	7,34
0,1% HCOOH ve vodě:MeOH	0,44	0,48	0,07	0,06
0,1% HCOOH v MeOH	1,83	2,18	0,29	0,29
MeOH	1,10	1,14	0,15	0,02
0,1% NH <sub>3</sub> ve vodě	1,49	1,17	0,11	0,03
0,1% NH <sub>3</sub> ve vodě : MeOH	0,81	0,78	0,06	0,05
0,1% NH <sub>3</sub> v MeOH	2,63	3,21	0,32	0,15

**Tabulka 27** Plochy píkú jednotlivých OHA při změně složení eluentů měřené v pozitivním módu. Nejvyšší naměřené hodnoty jsou zvýrazněny.

eluenty	4-sacharid plocha píku (imp.)	6-sacharid plocha píku (imp.)	8-sacharid plocha píku (imp.)	10-sacharid plocha píku (imp.)
0,1% HCOOH ve vodě	2 520 747	2 059 687	198 018	120 040
0,1% HCOOH ve vodě:MeOH	932 951	840 748	107 709	76 094
0,1% HCOOH v MeOH	4 035 354	4 168 617	433 160	336 477
MeOH	2 658 472	2 383 900	268 534	115 497
0,1% NH <sub>3</sub> ve vodě	3 508 453	2 318 100	168 091	256 226
0,1% NH <sub>3</sub> ve vodě : MeOH	1 995 530	1 668 175	109 318	193 805
0,1% NH <sub>3</sub> v MeOH	5 986 821	6 954 194	587 338	618 685

## 6. Závěr

Záměrem této práce bylo optimalizovat podmínky LC-MS analýzy OHA v preparativním módu. K sepsání teoretické části byla prostudována literatura týkající kyseliny hyaluronové, přirozeně se vyskytujícího glykosaminoglykanu, který se podílí na regulaci řady biologických pochodů v lidském organismu a pro své unikátní vlastnosti nachází široké uplatnění v medicíně. HA je velmi snadno enzymaticky degradovatelná prostřednictvím savčích hyaluronidáz za vzniku OHA, které mohou být biologicky aktivní v závislosti na jejich molekulové hmotnosti. K separaci OHA se nejčastěji používá vysokoúčinné kapalinové chromatografie. V posledních letech představují velký přínos analytické metody založené na principu hmotnostní spektrometrie využívající měkkých ionizačních technik, zejména ionizaci elektrosprejem. Obrovskou výhodou této ionizační techniky je možnost přímého spojení se separačními metodami. V našem případě probíhala separace OHA pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie na reverzní fázi s využitím chromatografické kolony Jupiter proteo a mobilních fází 0,1% kyseliny mravenčí a metanolu. Tato metoda umožnila velmi dobrou separaci námi sledovaného 4-, 6-, 8- a 10- sacharidu hyaluronanu, které byly následně identifikovány pomocí hmotnostní spektrometrie. Během MS analýzy jsme se zaměřili na optimalizaci podmínek iontového zdroje v analytickém módu. Tento mód je díky nižším průtokům mobilní fáze a menším objemovým nástřikům vhodný k rychlému kvalitativnímu a kvantitativnímu stanovení OHA. Na základě provedených měření se nám podařilo určit neoptimálnější parametry ionizace OHA. Zároveň jsme si ověřili, že je výhodnější analyzovat OHA v negativním módu, při kterém je analýza výrazně citlivější než v módu pozitivním a výsledná MS spektra jsou snadněji interpretovatelná. V dalším kroku jsme provedli optimalizaci složení eluentů v preparativním módu, který se využívá pro purifikaci a frakcionaci OHA. V preparativním módu je pouze 1/3000 celkového průtoku vystupujícího z chromatografické kolony vedena do MS spektrometru, zbývající část může být rozdělena pomocí automatického sběrače frakcí na jednotlivé frakce. Čistotu a složení každé frakce je možné ověřit na základě zjištěných retenčních časů a porovnáním hmotnostních spekter. Nejlepších výsledků ionizace v preparativním módu jsme dosáhli při použití eluentu tvořeného 100% metanolem.

## 7. Seznam zkratk

Arg	Arginin
ECM	Extracelulární matrix
erk	extracellular-signal-regulated kinases
ESI	Ionizace elektrosprejem
FAK	Focal adhesion kinase
GPC	Gelová permeační chromatografie
HA	Kyselina hyaluronová, hyaluronan
HAS	Hyaluronan syntáza
HARE	Receptor HA pro endocytózu
HPAEC	Vysokoúčinná aniontová chromatografie
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HYAL	Hyaluronidáza
IEC	Iontovýměnná chromatografie
IHABP	Intracelulární protein vázající HA
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
imp	Impuls
LC-MS	Spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií
LYVE1	Endoteliální receptor HA v lymfatických cévách
MALDI	Desorpce laserem za účasti matrice
MHC	Hlavní histokompatibilní komplex
MMPs	Matrix metaloproteinázy
MS	Hmotnostní spektrometrie
NMR	Nukleární magnetické resonance
OHA	Oligosacharidy hyaluronanu
RHAMM	Receptor HA zprostředkovávající motilitu

RPIP HPLC	Chromatografie na reverzních fázích s použitím iontových párových činidel
SPAM1	Sperm adhesion molecule 1
TIC	Celkový iontový chromatogram
TNFIP6	Tumor necrosis factor-induced protein 6
TLR-4	Toll-like receptor 4
TOF	Analyzátor doby letu
TSG-6	Tumor necrosis factor-stimulated gene-6
Tyr	Tyrosin

## 8. Seznam literatury

Assmann V., Jenkinson D., Marshall J.F., Hart I.R.: The intracellular hyaluronan receptor RHAMM/IHABP interacts with microtubules and actin filaments. *Journal of cell science*, Vol. 112, No. 22, 1999, str. 3943-3954

Balazs E.A.: Viscoelastic properties of hyaluronan and its therapeutic use. *Chemistry and Biology of Hyaluronan*. 1.vyd. Elsevier, 2004, str. 415-455, ISBN 978-0-08-044382-9

Bollyky P., Bogdani M., Bollyky J., Hull R., Wight T.: The Role of Hyaluronan and the Extracellular Matrix in Islet Inflammation and Immune Regulation. *Current diabetes reports*, Vol. 12, No. 5, 2012, str. 471-480

Burd A.: Hyaluronan and scarring. *Chemistry and Biology of Hyaluronan*. 1.vyd. Elsevier, 2004, str. 367-394, ISBN 978-0-08-044382-9

Brown M.B., Jones S.A.: Hyaluronic acid: a unique topical vehicle for the localized delivery of drugs to the skin. *Journal of the European Academy of dermatology and venerology*, Vol. 19, No. 3, 2005, str. 308-318

Capila I., Sasisekharan R.: Methods for analysis of hyaluronan and its fragments. *Chemistry and Biology of Hyaluronan*. 1. vyd. Elsevier, 2004, str. 21-39, ISBN 978-0-08-044382-9

Csoka A.B., Frost G.I., Stern R.: The six hyaluronidase-like genes in the human and mouse genomes. *Matrix Biology*, Vol. 20, No. 8, 2001, str. 499-508

Day, A.: Understanding Hyaluronan-Protein Interactions [Internet] <http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA16/HA16E.html> (přístup získán 6. prosince 2012)

Duterme C., Mertens-Strijthagen J., Tammi M., Flamion B.: Two Novel Functions of Hyaluronidase-2 (Hyal2) Are Formation of the Glycocalyx and Control of CD44-ERM Interactions. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 284, No. 48, 2009, str. 495-508

Dylevský I.: *Funkční anatomie*. 1 vyd. Praha: Grada, 2009, str. 98-99, ISBN 978-80-247-3240-4

Hascall V., Laurent T.: Hyaluronan: Structure and physical properties [Internet] <http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA01/HA01E.html> (přístup získán 26. listopadu 2012)

Cherr G.N., Yudin A.I., Overstreet J.W.: The dual functions of GPI-anchored PH-20: hyaluronidase and intracellular signaling. *Matrix Biology*, Vol. 20, No. 8, 2001, str. 515-525

Jiang D., Liang J., Noble P.W.: Hyaluronan as an Immune Regulator in Human Diseases. *Physiological reviews*, Vol. 91, No.1, 2011, str. 221-264

Kadlčík V., Kodíček M., Hassman M.: Využití hmotnostní spektrometrie na principu MALDI-TOF pro studium prostorové struktury proteinů. *Chemické listy*, Vol. 96, No. 7, 2002, str. 618-623

Knudson W., Knudson Ch.: The hyaluronan receptor CD44, 2004a [Internet] <http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA10a/HA10aE.html> (přístup získán 12. prosince 2012)

Knudson W., Peterson R.: The hyaluronan receptor: CD44. *Chemistry and Biology of Hyaluronan*. 1.vyd. Elsevier, 2004b, str. 82-115, ISBN 978-0-08-044382-9

Kogan G., Soltés L., Stern R., Gemeiner P.: Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnol Lett*, Vol. 29, No. 1, 2007, str. 17-25

Lüllmann-Rauch R.: *Histologie*. 1.vyd. Praha: Grada, 2012, str. 122-127, ISBN 978-80-247-3729-4

Lepperdinger G., Fehrer Ch., Reitinger S.: Biodegradation of hyaluronan. *Chemistry and Biology of Hyaluronan*. 1.vyd. Elsevier, 2004, str. 71-123, ISBN 978-0-08-044382-9

Manisali I., Chen D., Schneider B.: Electrospray ionization source geometry for mass spectrometry: past, present, and future. *Trends in Analytical Chemistry*, Vol. 25, No. 3, 2006, str. 243-256

Misra S., Heldin P., Hascall V.C.: Hyaluronan-CD44 interactions as potential targets for cancer therapy. *The FEBS Journal*, Vol. 278, No. 9, 2011, str. 1429-1443

Moss G.P.: IUBMB Enzyme Nomenclature. [Internet] <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC4/2/2/1.html> (přístup získán 4. února 2013)

Nečas J., Bartošiková L., Brauner P., Kolar J.: Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Veterinární Medicína*, Vol. 53, No. 8, 2008, str. 397–411

Pavelka K.: Farmakoterapie revmatických onemocnění. 1.vyd. Praha: Grada, 2005, str. 183-194, ISBN 80-247-0459-5

Prebyl B., Kaczmarek C., Tuinman A.: Characterizing the electrospray-ionization mass spectral fragmentation pattern of enzymatically derived hyaluronic acid oligomers. *Carbohydrate Research*, Vol. 338, 2008, str. 1381-1387

Rah M.J.: A review of hyaluronan and its ophthalmic applications. *Optometry*, Vol. 82, No. 1, 2011, str. 38-43

Sadowitz B., Seymour K., Gahtan V., Maier K.G.: The role of hyaluronic acid in atherosclerosis and intimal hyperplasia. *The Journal of surgical research*, Vol. 173, No. 2, 2012, str. 63-72

Schante C., Zuber G., Herlin C., Vandamme T.: Chemical modifications of hyaluronic acid for the synthesis of derivatives for a broad range of biomedical applications. *Carbohydrate Polymers*, Vol. 85, 2011, str. 469–489

Schiraldi Ch., La Gatta A., De Ros M.: Biotechnological Production and Application of Hyaluronan. *Biopolymers*, Sciyo, 2010, str. 387-412, ISBN 978-953-307-109-1

Slevin M., Krupinski J., Gaffney J., Matou S., West D., Delisser H., Savani R.C., Kumar S.: Hyaluronan-mediated angiogenesis in vascular disease: uncovering RHAMM and CD44 receptor signaling pathways. *Matrix Biology*, Vol. 26, No. 1, 2007, str. 58-68

Slíva J., Minárik J.: Hyaluronát – nejen pasivní pozorovatel, nýbrž aktivní modulátor imunitních reakcí. *New EU Magazine of Medicine*, No. 1-2, 2009, str. 75-79

Slonková V., Vašků V., Jedličková H.: Kyselina hyaluronová v léčbě akutních a chronických ran. *GEUM*, No. 1, 2010, str. 3-6

Spicer A., McDonald, J.: Eukariotic Hyaluronan synthases. [Internet] <http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA07/HA07E.html> (přístup získán 25. listopadu 2012)

Stern R., Asari A., Sugahara K.N.: Hyaluronan fragments: An information-rich system. *European journal of cell biology*, Vol. 85, No. 8, 2006, str. 699-715

Stern R., Kogan G., Jedrzejewski M.J., Soltés L.: The many ways to cleave hyaluronan. *Biotechnology Advances*, Vol. 25, No. 6, 2007, str. 537-557

Stern R.: Update on the mammalian hyaluronidases. [Internet] <http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA15a/HA15aE.html>. (přístup získán 5. listopadu 2012)

Tolg C., Hamilton S.R., Turley E.: Hyaluronan receptor RHAMM in wound repair and tumorigenesis. *Chemistry and Biology of Hyaluronan*. 1.vyd. Elsevier, 2004, str. 415-455, ISBN 978-0-08-044382-9

Volpi N.: On-Line HPLC/ESI-MS Separation and Characterization of Hyaluronan Oligosaccharides from 2-mers to 40-mers. *Analytical Chemistry*, Vol. 79, No. 16, 2007, str. 6390-6397

Waters User's Guide Mass spectrometry [Internet] [http://www.waters.com/webassets/cms/support/docs/quattro\\_ultima\\_pt\\_guide\\_reva.pdf](http://www.waters.com/webassets/cms/support/docs/quattro_ultima_pt_guide_reva.pdf) (přístup získán 26. února 2013)

Weigel P.: The Hyaluronan synthases. *Chemistry and Biology of Hyaluronan*. 1.vyd. Elsevier, 2004, str. 553-567, ISBN 978-0-08-044382-9

Yang B., Yang B.L., Savani R.C., Turley E.A.: Identification of a common hyaluronan binding motif in the hyaluronan binding proteins RHAMM, CD44 and link protein. *The EMBO Journal*, Vol. 13, No. 2, 1994, str. 286-296



## 9. Přílohy

**Tabulka 28** Teoretické hodnoty  $m/z$  sudých oligosacharidů HA v negativním módu

oligosacharidy	sumární vzorec	Mr	$[M-H]^-$	$[M-2H]^{2-}$	$[M-3H]^{3-}$
2-sacharid	$C_{14}H_{23}NO_{12}$	397,1220	396,1142		
4-sacharid	$C_{28}H_{44}N_2O_{23}$	776,2335	775,2257	387,1089	
6-sacharid	$C_{42}H_{65}N_3O_{34}$	1155,3449	1154,3371	576,6646	384,1072
8-sacharid	$C_{56}H_{86}N_4O_{45}$	1534,4564	1533,4486	766,2204	510,4776
10-sacharid	$C_{70}H_{107}N_5O_{56}$	1913,5679	1912,5600	955,7761	636,8481

**Tabulka 29** Teoretické hodnoty  $m/z$  lichých oligosacharidů HA v negativním módu

oligosacharidy	sumární vzorec	Mr	$[M-H]^-$	$[M-2H]^{2-}$	$[M-3H]^{3-}$
3-sacharid	$C_{20}H_{31}NO_{18}$	573,1541	572,1463		
5-sacharid	$C_{34}H_{52}N_2O_{29}$	952,2656	951,2577	475,1250	
7-sacharid	$C_{48}H_{73}N_3O_{40}$	1331,3770	1330,3692	664,6807	442,7845
9-sacharid	$C_{62}H_{94}N_4O_{51}$	1710,4885	1709,4807	854,2364	569,1550
11-sacharid	$C_{76}H_{115}N_5O_{62}$	2089,6000	2088,5921	1043,7922	695,5255

**Tabulka 30** Teoretické hodnoty  $m/z$  sudých oligosacharidů HA v pozitivním módu

oligosacharidy	sumární vzorec	Mr	$[M+H]^+$	$[M+2H]^{2+}$	$[M+3H]^{3+}$
2-sacharid	$C_{14}H_{23}NO_{12}$	397,1220	398,1299		
4-sacharid	$C_{28}H_{44}N_2O_{23}$	776,2335	777,2413	389,1246	
6-sacharid	$C_{42}H_{65}N_3O_{34}$	1155,3449	1156,3528	578,6803	386,1228
8-sacharid	$C_{56}H_{86}N_4O_{45}$	1534,4564	1535,4642	768,2360	512,4933
10-sacharid	$C_{70}H_{107}N_5O_{56}$	1913,5679	1914,5757	957,7918	638,8638

**Tabulka 31** Teoretické hodnoty  $m/z$  lichých oligosacharidů HA v pozitivním módu

oligosacharidy	sumární vzorec	Mr	$[M+H]^+$	$[M+2H]^{2+}$	$[M+3H]^{3+}$
3-sacharid	$C_{20}H_{31}NO_{18}$	573,1541	574,1619		
5-sacharid	$C_{34}H_{52}N_2O_{29}$	952,2656	953,2734	477,1406	
7-sacharid	$C_{48}H_{73}N_3O_{40}$	1331,3770	1332,3849	666,6963	444,8002
9-sacharid	$C_{62}H_{94}N_4O_{51}$	1710,4885	1711,4963	856,2521	571,1707
11-sacharid	$C_{76}H_{115}N_5O_{62}$	2089,6000	2090,6078	1045,8078	697,5411

