



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**STANOVENÍ HYALURONANŮ ELEKTROMIGRAČNÍMI
METODAMI**

DETERMINATION OF HYALURONAN BY ELECTROMIGRATION METHODS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Adéla Bártová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Veronika Řezáčová, Ph.D.

BRNO 2017

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1125/2016
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Adéla Bártová**
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **Ing. Veronika Řezáčová, Ph.D.**
Akademický rok: 2016/17

Název bakalářské práce:

Stanovení hyaluronanů elektromigračními metodami

Zadání bakalářské práce:

1. Literární rešerše na téma hyaluronanů a jejich vlastnosti.
2. Shrnutí analytických metod využitelných pro stanovení hyaluronanů.
3. Experimentální stanovení hyaluronanu vybranou analytickou, nejlépe elektromigrační, metodou.
4. Přehledné zpracování a zhodnocení získaných výsledků.

Termín odevzdání bakalářské práce: 19.5.2017

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

Adéla Bártová
student(ka)

Ing. Veronika Řezáčová, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2017

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Tato práce se zabývá popisem kyseliny hyaluronové, charakterizací jejího chování v roztoku, jejími chemicko-fyzikálními vlastnostmi a využitím v různých průmyslových odvětvích. Součástí práce je také část věnovaná možnostem její analýzy. Druhá polovina práce se soustředí na elektromigrační metody se zvláštní pozorností věnovanou kapilárním elektroforetickým metodám, a to zejména kapilární zónové elektroforéze. Cílem této práce je optimalizovat metodu pro stanovení kyseliny hyaluronové ve vodných roztocích pomocí kapilární zónové elektroforézy.

ABSTRACT

This thesis is focused on description hyaluronic acid, characterization of its behaviour in water solutions, its chemical-physical properties and its using in different industrial sectors. The next part deals with possibilities of its analysis. The following section of the thesis is focused on electromigration techniques with special attention dedicated to capillary electrophoretic methods, especially capillary zone electrophoresis. The aim of this thesis is optimization of the method of determination of hyaluronic acid in water solutions by capillary zone electrophoresis.

KLÍČOVÁ SLOVA

kyselina hyaluronová, elektromigrační metody, kapilární elektroforéza

KEYWORDS

hyaluronic acid, electromigration techniques, capillary electrophoresis

BÁRTOVÁ, A. *Stanovení hyaluronanů elektromigračními metodami*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 42 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Veronika Řezáčová, Ph.D..

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....

podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucí bakalářské práce Ing. Veronice Řezáčové Ph.D. za odborné rady, ochotu, trpělivost a čas, který mi věnovala.

OBSAH

1	ÚVOD	7
2	TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1	Kyselina hyaluronová	8
2.1.1	Historie	8
2.1.2	Chemická struktura.....	8
2.1.3	Kyselina hyaluronová v živých organismech.....	9
2.1.4	Získávání kyseliny hyaluronové.....	11
2.1.5	Syntéza kyseliny hyaluronové	11
2.1.6	Syntéza kyseliny hyaluronové bakteriemi	11
2.1.7	Degradace hyaluronanu	12
2.1.8	Receptory pro hyaluronany	12
2.1.9	Deriváty kyseliny hyaluronové.....	13
2.1.10	Použití kyseliny hyaluronové a jejích derivátů v praxi	13
2.1.11	Možnosti analýzy kyseliny hyaluronové	15
2.2	Elektromigrační metody	17
2.2.1.	Vývoj metody	17
2.2.2.	Kapilární elektroforéza.....	17
2.2.3.	Princip metody	18
2.2.4.	Instrumentace	19
2.2.5.	Techniky kapilární elektroforézy	20
2.2.6.	Porovnání s dalšími metodami	22
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	24
3.1.	Použité chemikálie.....	24
3.2.	Používané přístroje	25
3.3.	Příprava zásobních roztoků	26
3.3.1	Zásobní roztoky elektrolytů.....	26
3.3.2	Zásobní roztok kyseliny hyaluronové	26
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	27
4.1.	Optimalizace metody	27
4.1.1	Optimalizace pufracího systému	27
4.1.2	Optimalizace pH elektrolytu.....	30
4.1.3	Optimalizace koncentrace elektrolytu	31
4.1.4	Optimalizace vlnové délky pro UV detekci analytu.....	32

4.1.5	Optimalizace vkládaného napětí.....	33
4.1.6	Optimalizace podmínek a dávkování vzorků	34
4.1.7	Výsledné parametry metody.....	35
4.1.8	Kalibrační závislosti	36
4.1.9	Meze detekce a meze stanovitelnosti metody.....	37
5	ZÁVĚR	38
6	ZDROJE.....	39
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	42

1 ÚVOD

Kyselina hyaluronová je lineární polysacharid s vysokou molekulovou hmotností (až v řádech milionů Daltonů, tj. $\text{mg} \cdot \text{mol}^{-1}$). Základní jednotkou je disacharid tvořený N-acetylglukosaminem a kyselinou D-glukuronovou. Tyto dvě jednotky jsou v molekule spojeny glykosidickou vazbou. Kyselina je přirozeně se vyskytujícím biopolymerem. Nalézt ji lze v podobě sodné nebo draselné soli téměř ve všech pojivových tkáních. Je základní složkou extracelulární matrix všech obratlovců. Termín hyaluronan je používán pro kyselinu i její soli, v neionizované i v protonované formě. Při fyziologických hodnotách pH dochází k ionizaci všech karboxylových skupin. Díky svým specifickým vlastnostem a schopnosti vázat velké množství vody nachází uplatnění v mnoha oborech jako je kosmetologie, dermatologie, plastická chirurgie, tkáňové inženýrství nebo jako součást krytí při hojení ran.

2 TEORETICKÁ ČÁST

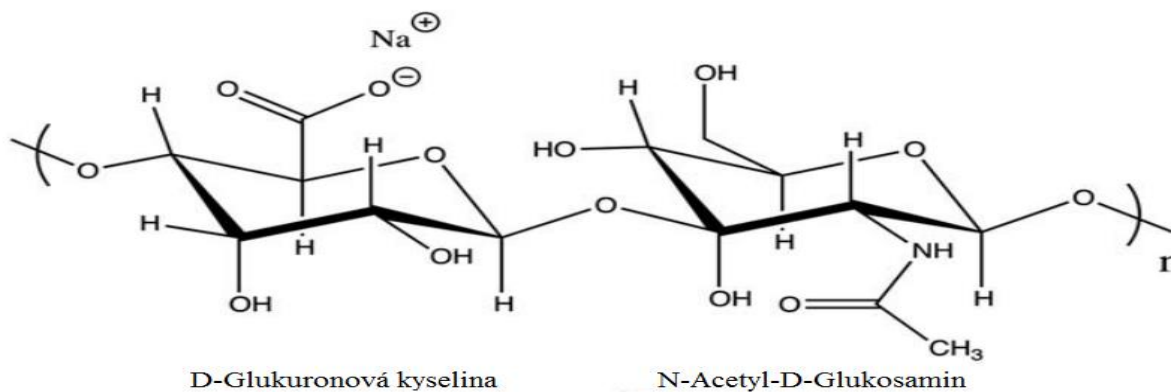
2.1 Kyselina hyaluronová

2.1.1 Historie

V roce 1934 Karl Meyer popsal metody izolace nového glykosaminoglykanu z hovězího očního sklivce. Tento nový objev byl pojmenován kyselina hyaluronová. Společně s Johnem Palmerem dokázal, že tato látka obsahuje uronovou kyselinu a aminosacharid, ale neobsahuje žádné sulfoestery. V průběhu 30. a 40. let byla kyselina postupně objevena jako součást dalších tkání a tělních tekutin, jako jsou synoviální tekutina, pupeční šňůra, kůže nebo kohoutí hřebínky. Hyaluronany jsou také součástí bakterií řádu *Streptococcus*. V průběhu 50. a 60. let byly studovány jeho fyzikální a chemické vlastnosti. Hyaluronan vyniká svojí viskozitou, schopností vázat vodu a dalšími unikátními vlastnostmi. Tyto vlastnosti mu umožňují regulovat rovnováhu vody v organismu, regulovat osmotický tlak, interagovat s proteiny, působit jako síto nebo jako mazivo a stabilizovat strukturu na základě elektrostatických interakcí. V roce 1972 bylo zjištěno, že hyaluronan reaguje s proteoglykany v chrupavkách a že slouží jako opora ve struktuře chrupavek. V 80. letech byly studovány proteiny na buněčném povrchu schopné vázat hyaluronany. Tyto studie byly snahou o pochopení funkce těchto receptorů a procesů, které vazba způsobuje. Zejména objevení receptorů RHAMM a CD44 bylo velkým pokrokem, a to kvůli předpokladu, že se podílí na nádorovém metastazování. V dnešní době je kyselina hyaluronová i její deriváty široce používány a stále probíhající výzkum svědčí o dalším rozvoji [1].

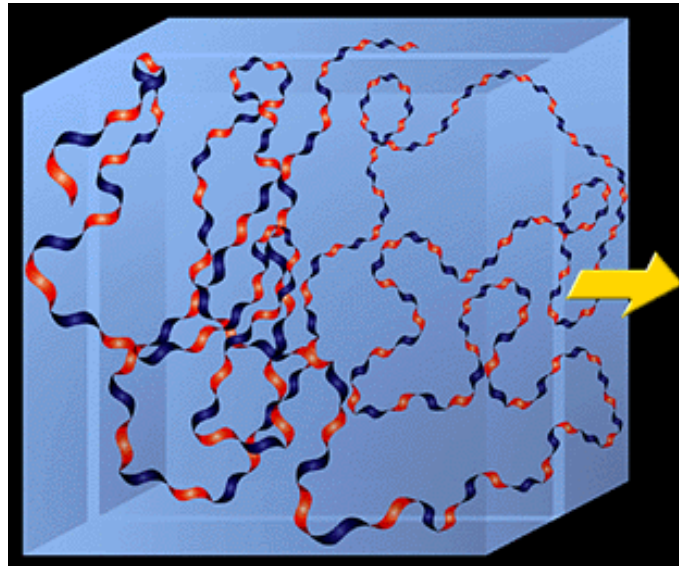
2.1.2 Chemická struktura

Molekuly kyseliny hyaluronové jsou tvořeny opakujícími se disacharidovými jednotkami tvořenými D-glukuronovou kyselinou a D-N-acetylglukosaminem (viz Obr. 1). Tyto jednotky jsou k sobě vázány střídavými β -1,4- a β -1,3- glykosidickými vazbami. Hyaluronový řetězec může obsahovat i více než 10 000 disacharidových jednotek. Tyto disacharidové jednotky mají molární hmotnost přibližně 400 Daltonů. Molekulová hmotnost celého řetězce se tedy blíží hodnotám přibližně 4×10^6 Daltonů [1].



Obr. 1: Opakující se disacharidová jednotka polymeru hyaluronanu [2]

Při fyziologickém pH je struktura hyaluronanu stabilizována vodíkovými můstky a interakcemi s rozpouštědlem. Ve vodě zaujímá preferovanou strukturu, při níž se tvoří vazby mezi hydrofobními částmi řetězce a vzniká tak sekundární struktura podobná tvaru stočené stuhly. Strukturu hyaluronanu ve vodném roztoku je uvedena na obrázku (viz Obr. 2) [1].



Obr. 2: Sekundární struktura hyaluronanu ve vodném roztoku [3]

2.1.3 Kyselina hyaluronová v živých organismech

Kyselina hyaluronová byla poprvé objevena ve sklivci oka v roce 1934 Karlem Mayerem a Johnem Palmerem. Postupně byla objevována i v mnoha dalších buňkách a orgánech. Vyskytuje se také u bakterií rodu *Streptococcus* a *Pasteurella*. Nyní je známa zejména jako součást synoviální tekutiny a extracelulární matrix. Nejvyšší množství kyseliny hyaluronové obsahují měkké pojivové tkáně a vůbec nejvyšší koncentrace byla nalezena v kohoutích hřebínkách. V lidském těle se nejvyšší koncentrace hyaluronanů nachází v synoviální tekutině, pupeční šňůře a v očním sklivci. Přehled zastoupení hyaluronanů shrnuje Tabulka 1.

Celková hmotnost hyaluronanů nacházející se v lidském těle se odhaduje na 20 g. Téměř polovina je obsažena v kůži, konkrétně kolem 8 g. Zde slouží jako matrice pro uložení buněk a zachytává radikály uvolněné působením ultrafialového záření. Tímto působením chrání buňky kůže před oxidačním stresem, který může způsobit jejich degradaci nebo dokonce smrt. V synoviální tekutině pomáhá vysokomolekulární hyaluronan snižovat tření kostí, opotřebení kloubů a také působí jako tlumič nárazů. Při zánětlivých stavech dochází k degradaci řetězců, což vede ke snížení viskozity, a tím ke zhoršení mazací a tlumící funkce synoviální tekutiny. Na buněčné úrovni brání prostupu virů a bakterií přes pericelulární matrix a ovlivňuje proliferaci a diferenciaci buněk [4], [5].

Tabulka 1: Koncentrace hyaluronanu v některých tkáních [4]

<i>Tkáň nebo tělní tekutina</i>	<i>Koncentrace ($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)</i>	<i>Poznámky</i>
Kohoutí hřebínek	7500	Zvířecí tkáň se zdaleka nejvyšším obsahem hyaluronanu.
Lidská pupeční šňůra	4100	Obsahuje především hyaluronan s relativně vysokou molární hmotností.
Lidská synoviální tekutina	1400-3600	Objem synoviální tekutiny roste během zánětu, to vede k poklesu koncentrace hyaluronanu.
Hovězí nosní chrupavka	1200	Často se používá jako model chrupavky v experimentálních studiích.
Lidský sklivec	140-340	Koncentrace hyaluronanu se zvyšuje během zrání této tkáně.
Lidská škůra	200-500	Navržen jako „omlazující“ látka pro kosmetiku.
Lidská pokožka	100	Koncentrace hyaluronanu je vyšší okolo buněk, které ho syntetizují.
Králičí mozek	65	Předpokládá se, že hyaluronan snižuje pravděpodobnost výskytu mozkového nádoru.
Králičí srdce	27	Hyaluronan je hlavní složkou patologické matrix, která se vyskytuje v arterii při koronární restenóze.
Lidská míza	0,2-50	Nízká molekulární hmotnost hyaluronanu se vysvětluje přednostním příjmem velkých molekul jaterními buňkami.
Lidská moč	0,1-0,3	Moč je důležitým zdrojem hyaluronidáz.
Lidské krevní sérum	0,01-0,1	Koncentrace hyaluronanu roste v séru s věkem a u pacientů s revmatickou artritidou a cirhózou jater.

2.1.4 Získávání kyseliny hyaluronové

Zvířecí tkáň, které obsahují vysoké množství hyaluronanu mohou být použity pro jeho izolaci. K izolaci čistého hyaluronanu je zapotřebí několika separačních technik, jakými jsou štěpení proteázami, lyofilizace nebo membránová ultrafiltrace. Největším rozdílem v získávání kyseliny různými metodami je její výsledná molekulová hmotnost, na které závisí většina jejích vlastností. Při získávání kyseliny hyaluronové z kohoutích hřebínků byly tyto tkáň zmrazeny, aby došlo k porušení buněčné membrány. Dalším krokem je extrakce hyaluronanů do vody a jejich následné vysrážení organickými rozpouštědly. Větší množství kyseliny než metodami extrakce ze zvířecích tkání je produkováno bakteriemi *Streptococcus zooepidemicus* nebo *Streptococcus equi*. Z bakterií lze připravit hyaluronan o relativně vysoké čistotě, ale poměrně nízké molekulové hmotnosti, zatímco hyaluronan získávaný extrakcí například z kohoutích hřebínků má molekulovou hmotnost obvykle vyšší [4],[6].

2.1.5 Syntéza kyseliny hyaluronové

Syntéza probíhá v široké řadě buněk, a to za pomoci enzymů hyaluronan syntáz HAS. V současné době byly u savců identifikovány tři druhy hyaluronan syntáz, a to HAS1, HAS2 a HAS3. Tyto syntázy ovlivňují velikost vznikajícího řetězce a množství vznikajícího hyaluronanu. Hyaluronan je na rozdíl od ostatních glykosaminoglykanů syntetizován na vnitřní straně cytoplasmatické membrány a jeho vznikající řetězec je postupně vytlačován do extracelulárního prostoru. Díky tomu mohou vznikat řetězce o velké molekulové hmotnosti. Růst řetězce probíhá postupným připojováním monosacharidové jednotky z uridindifosfoglukoronové kyseliny (UDP-GlcA) a uridindifosfo-N-acetylglukosaminu (UDP-GlcNAc) za uvolňování molekul UDP na redukující konec molekuly [1], [5], [7].

HAS proteiny jsou syntetizovány v endoplasmatickém retikulu. Odkud se prostřednictvím Golgiho aparátu dostávají na plasmatickou membránu, kde dochází k jejich aktivaci [8].

2.1.6 Syntéza kyseliny hyaluronové bakteriemi

Kyselina hyaluronová je syntetizována bakteriemi *Streptococcus zooepidemicus* nebo *Streptococcus equi* za anaerobních podmínek v médiu obohaceném o oxid uhličitý. Oddělení vzniklého polysacharidu od bakterií je prováděno vyhubením bakterií za použití kyseliny trichloroctové. Po odstranění bakteriálních buněk a zkoncentrování polysacharidu dochází k jeho izolaci a čistění srážením a rozsuspendováním. Rozsuspendovaná kyselina se poté lyofilizuje. Takto připravená kyselina má průměrnou molekulovou hmotnost 55 kDa a obsahuje 0,03 až 0,3 % bílkovin. Tento produkt nemá, na rozdíl od kyseliny získávané z kohoutích hřebínků nebo z pupeční šňůry, tak široké využití a to v důsledku své malé molekulové hmotnosti. Metoda syntézy bakteriemi však přináší vysoké výtěžky kyseliny o vysoké čistotě, a to při relativně nízkých nákladech [9].

2.1.7 Degradace hyaluronanu

Kyselina hyaluronová, jakožto biopolymer o velké molekulové hmotnosti, podléhá velmi snadné degradaci. Degradace může být mechanická nebo chemická. Mechanickou degradací se rozumí degradace buď tepelná, nebo pomocí ultrazvuku. Chemickou cestou může být molekula rozložena enzymaticky nebo volnými kyslíkovými radikály.

Při ultrazvukové degradaci jsou rychleji rozloženy řetězce s nižší molekulovou hmotností. I přesto, že byl proveden výzkum za použití různých vzorků hyaluronanu i různé ultrazvukové energie, vědci se shodují, že ultrazvukem nelze řetězec polymeru rozložit až na monomerní jednotky.

Degradace volnými radikály je vedlejší reakcí při zánětech. Enzymaticky generované kyslíkové radikály způsobují degradaci hyaluronanů v synoviální tekutině. Volné radikály náhodně odštěpují postranní skupiny z řetězce, což má dopad na terciální strukturu. Rozpad terciální struktury způsobuje výrazné snížení viskozity v synoviální tekutině. Rovněž vznikají velmi reaktivní aldehydy. Před degradací mohou chránit hyaluronan lapače radikálů, kterými jsou chelatační činidla obsahující železo. Tato činidla blokují vznik radikálů.

Nejrozšířenějším typem degradace v biologických prostředích je enzymatická degradace za katalýzy enzymů hyaluronidáz. Tyto enzymy se v některé literatuře také označují pojmem hyázy. Hyaluronidázy můžeme rozdělit do třech skupin. První z nich jsou savčí neboli endo- β -N-acetylhexosaminidázy. Tyto enzymy štěpí β -1,4-glykosidickou vazbu za vzniku tetrasacharidů a hexasacharidů. Druhou skupinou jsou bakteriální hyaluronidázy, které pomocí β -eliminace štěpí molekuly hyaluronanu na disacharidové jednotky. Poslední skupinou jsou hyaluronidázy, které štěpí β -1,3-glykosidickou vazbu za vzniku tetrasacharidů a hexasacharidů. Tyto enzymy byly objeveny v korýších, pijavicích a dalších parazitech [1], [6].

2.1.8 Receptory pro hyaluronany

Proteiny vázající hyaluronan jsou součástí extracelulární matrix a jsou zapojeny do přenosu signálu mezi buňkami. Nejrozšířenějším receptorem je protein CD44. Tento protein je transmembránový a účastní se fyziologických interakcí buňka-buňka a buňka-matrix, buněčné adheze, migrace a diferenciaci. CD44 existuje v mnoha izoformách, z nichž některé hyaluronan neváží. Dalším receptorem s podobou funkcí je RHAMM-receptor for hyaluronan-mediated motility. RHAMM receptor je na rozdíl od CD44 umístěn uvnitř buňky, je tedy intracelulární. Vně buňky je exprimován jen ve velmi malém množství a za specifických podmínek [1], [5], [8].

2.1.9 Deriváty kyseliny hyaluronové

Hylany jsou síťované deriváty vznikající reakcí formaldehydu, dimethylmočoviny nebo polyisokyanátu s kyselinou hyaluronovou v prostředí s neutrální hodnotou pH. Touto metodou dochází k přípravě gelů, které jsou stejně jako hyaluronany vysoce biokompatibilní, Vyznačují se ale rozdílnými fyzikálními a reologickými vlastnostmi. Tyto gely jsou také charakteristické vysokým obsahem vody. Nacházejí široké využití v distribuci léčiv. Používají se také jako povrchová úprava kontaktních čoček zabraňující jejich vysychání.

Dalšími deriváty jsou například estery kyseliny hyaluronové, které jsou ve vodě nerozpustné. Jejich vlastnosti se výrazně liší od vlastností kyseliny. Estery se stávají předmětem zájmu jako možné látky pro použití v krytí ran nebo uvolňování léčiv [6].

2.1.10 Použití kyseliny hyaluronové a jejích derivátů v praxi

Pro své unikátní vlastnosti, jakými jsou zejména elasticita a schopnost vázání velkého množství vody, nachází v současné době kyselina hyaluronová i její deriváty široké využití. Hyaluronany jsou dokonale biokompatibilní a biodegradabilní. Není proto velkým překvapením, že za období posledních několika let došlo ke schválení řady patentů v oblasti využití hyaluronanů ve farmaceutické, chirurgické nebo kosmetologické praxi.

2.1.10.1. Oftalmologie

Hyaluronan je hlavní složkou očního sklivce a vzhledem ke svým unikátním viskoelastickým vlastnostem je důležitou látkou pro použití v oftalmologii. Používá se například jako ochrana endotelu rohovky při její transplantaci. Díky své elasticitě chrání také oční buňky před poškozením způsobeným kontaktem s chirurgickými nástroji nebo s implantáty. Dále se používá jako prevence proti vysychání oční sliznice při operacích. Dobré viskózní vlastnosti usnadňují mrkání a tím působí proti únavě očí při dlouhodobém používání. V porovnání s vodou je schopen déle udržet a postupně uvolňovat léčivo, a proto se používá také v očních kapkách [4], [6].

2.1.10.2. Ortopedie a revmatologie

Hyaluronan se také používá v kloubech postižených artritidou. Při artritidě dochází ke ztuhnutí kloubů, což vede k velké bolestivosti. V průběhu života dochází k postupné degradaci polymerních sacharidů. Léčba spočívá v aplikaci dávek kyseliny hyaluronové do synoviální tekutiny, což snižuje bolestivost a podporuje reparaci poškozené tkáně [4].

2.1.10.3. Dermatologie a plastická chirurgie

V plastické chirurgii je hyaluronan používán k vyplňování obličejových vrásek a reparaci jizev. Přípravky na bázi kyseliny hyaluronové na sebe váží vodu, a tím vyplňují prázdné prostory. Na rozdíl od přípravků na bázi kolagenu mají přípravky s kyselinou hyaluronovou delší účinnost, i přesto je třeba jejich aplikaci pravidelně opakovat.

Zvažuje se také používání kyseliny hyaluronové jako náhrady silikonového gelu v silikonových implantátech [4], [6].

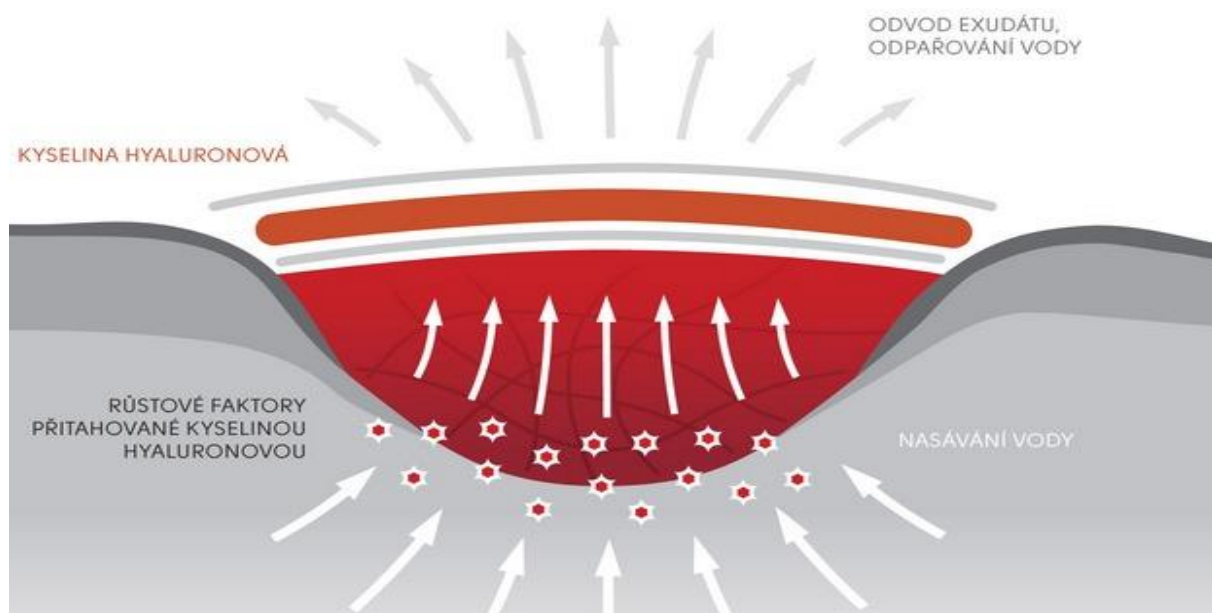
V chirurgii se kyselina hyaluronová používá jako prevence vzniku pooperačních adhezí neboli srůstů. Srůsty vznikají jako následné komplikace po operacích dutiny břišní nebo pánevní. Dochází k abnormálnímu srůstu tkáně s orgány, což může způsobit vážné komplikace. Aplikace kyseliny hyaluronové vede ke snížení rizika vzniku těchto adhezí [6].

2.1.10.4. Hojení ran

Přípravky obsahující kyselinu hyaluronovou se používají zejména jako kryty ran. Svými vlastnostmi pomáhají udržovat vlhkost a působí protizánětlivě.

Použití přípravku Hyiodine při hojení ran

Preparát Hyiodine, který byl vyvinut pro léčbu chronických ran, je kombinací vysokomolekulárního hyaluronanu a jódu. Kyseliny hyaluronové je, se svojí schopností vázat asi 1 000krát více vody než je její vlastní hmotnost, nejvíce hydrofilní molekulou v lidském organismu. Stimulací buněčného dělení v oblasti hojení se podílí na procesu tvorby nových kapilár. Dále se podílí na regulaci zánětlivé reakce. Jód je zde použit díky svým spolehlivým dezinfekčním schopnostem a minimálním vedlejším účinkům. Přítomnost jódu pomáhá také při stabilizaci molekul kyseliny hyaluronové, neboť jeho desinfekční vlastnosti regulují činnost hyaluronidáz. Přípravek Hyiodine má unikátní antiadhezivní účinky, zabraňuje maceraci okolní kůže a zlepšuje podmínky pro granulaci a epitelizaci rány. Na ránu se přikládá jako krytí gáza nasycená tímto preparátem. Kyselina hyaluronová zde slouží také jako scaffold pro tvorbu mezibuněčné hmoty [10].



Obr. 3: Použití přípravku HYIODINE při hojení ran [11]

2.1.10.5. Podávání léčiv

Místo účinku léčiva v organismu je dáno místem absorpce, což je ovlivněno rychlostí a mírou prostupu léčiva přes biologické membrány, a také vlastnostmi daného léčiva. Jakými jsou jeho rozpustnost, velikost molekul, hydrofilní nebo hydrofobní charakter a hodnota pH. Při použití kyseliny hyaluronové jako nosiče léčiv dochází ke změně jedné ze třech reaktivních skupin při současném zachování biokompatibility a k vytvoření vazby s daným léčivem. Kyselina hyaluronová je díky své vysoké molekulové hmotnosti ideálním řešením při snaze o dodání léčiva do lymfatických uzlin. Vysoká molekulová hmotnost zabraňuje difundování léčiva do krevního oběhu, a tím usnadní transport pomocí lymfy [6].

2.1.11 Možnosti analýzy kyseliny hyaluronové

Hyaluronany, jakožto vysokomolekulární látky, lze analyzovat řadou moderních analytických metod.

2.1.11.1. Použití kapilární zónové elektroforézy při analýze hyaluronanu

Kapilární elektroforéza je reprodukovatelná a citlivá technika pro kvantifikaci a charakterizaci hyaluronanu ve vzorku sklivce. Byla také použita pro analýzu chondroitin sulfátu a dermatansulfátu jako odvozených disacharidů.

Kapilární elektroforéza s detekcí UV absorpance při 200 nm byla použita například pro separaci a kvantitativní analýzu glykosaminoglykanu hyaluronanu v lidském a hovězím sklivci. Kalibrace byla provedena za použití standardu vytvořeného z hyaluronanu o známé koncentraci, který byl získán z pupeční šňůry. Čistota daného standardu byla ověřena metodou nukleární magnetické rezonance.

Hyaluronan je hlavní složkou očního sklivce a ve spojení s kolagenem hraje důležitou roli při stabilizaci struktury gelu obsaženém ve sklivci.

Vzorek byl injektován pod tlakem po dobu 5 sekund a separace bylo dosaženo v fosfát-borátovém pufru s přídavkem SDS o pH 9 aplikací napětí o hodnotě 15 kV.

Na výsledném elektroforegramu byl pík viditelný při 14,06 minutách. Zároveň z výsledků této studie vyplývá, že obsah hyaluronanů v hovězím sklivci je několikanásobně vyšší než v lidském.

Tato metoda je kompletně reprodukovatelná, jednoduchá a lze ji plně automatizovat. Nejnižší koncentrace hyaluronanu, kterou lze stanovit se pohybuje v okolí $25 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$. Z výsledků vyplývá, že tato metoda není plně dostačující k analýze koncentrace hyaluronanů ve vodných roztocích, zatímco pro stanovení v gelu je vhodná [12].

2.1.11.2. Použití HPLC při analýze hyaluronanu

Další možností analýzy hyaluronanů je použití vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Při použití této metody je však nutné vysokomolekulární hyaluronany rozštěpit, a to buď použitím hyaluronidáz, což je nákladné, nebo pomocí kyseliny sírové. Vzorky se připraví rozpuštěním 150 mg hyaluronanu v 100 ml destilované vody. Takto připravené vzorky musí být uchovávány v lednici při teplotě 4 °C, stabilní vydrží po dobu maximálně 2 týdnů. Poté může dojít k bakteriální kontaminaci. Pro měření je nutné upravit pH vzorků na hodnotu 5.

K analýze se jako mobilní fáze využívá směs vody a methanolu nebo vody a acetonitrilu v obou případech v poměru 96:4. Takto připravené směsi se musí odplynit pomocí ultrazvuku a uchovávat v pevně uzavřených lahvích. Mobilní fáze protéká rychlostí 0,8 ml za minutu. Vlnová délka detekce je 280 nm v případě mobilní fáze s methanolem a 195 nm v případě acetonitrilu. Výsledky měření vykazují dobrou linearitu pro koncentraci v rozmezí 5–1 500 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ a také vynikající reprodukovatelnost. V porovnání s kapilární zónovou elektroforézou je limit detekce v případě použití HPLC asi 10 krát nižší [13].

2.1.11.3. Analýza pomocí LC-ESI-MS

Jednou z dalších možností kvantifikace kyseliny hyaluronové a jejích fragmentů, je využití tandemových technik. Spojením vysokoúčinné kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie lze dosáhnout unikátních výsledků. Tyto techniky musí být propojeny pomocí ionizačního zdroje, tím může být v tomto případě elektrosprej. Pro dosažení lepších výsledků může být připojen druhý hmotnostní spektrometr [14].

2.2 Elektromigrační metody

Za elektromigrační neboli elektroforetické metody je označován soubor technik využívající pohyb ionizovaných částic v elektrickém poli. Elektromigrační metody lze použít pro separaci látek nízkomolekulárních i vysokomolekulárních. Rozpustí-li se látky s nábojem v elektrolytu a následně je tato soustava umístěna do elektrického pole, začnou se látky pohybovat konstantní rychlostí, která je úměrná velikosti jejich nábojů. Anionty se pohybují k anodě, zatímco kationty ke katodě. Velikost rychlosti pohybu částice je ovlivněna její hnací silou. Tou je síla elektrického pole, proti níž působí brzdící síla vnitřního tření. Při elektroforéze dochází k velmi rychlému ustavení rovnováhy mezi těmito silami. Rychlost pohybu látky může být dále ovlivněna viskozitou prostředí, pH roztoku, iontovou silou roztoku, koncentrací použitého elektroforetického pufru a velikostí iontů. Pro elektroforézu na pevném nosiči patří mezi ovlivňující faktory také pórovitost nosiče nebo interakce daných iontů s nosičem. Separace elektroforetickými metodami je úspěšná jen v případě, že separované látky mají dostatečně odlišné hodnoty efektivní elektroforetické pohyblivosti [15].

2.2.1. Vývoj metody

Elektroforéza byla poprvé představena v roce 1930 Arne Wilhelm Kaurin Tiselium, který ji popsal ve své práci, jež se zaměřovala na oddělování bílkoviny krevní plasmy albuminu od globulinů. Za tento objev byla tomuto švédskému biochemikovi v roce 1948 udělena Nobelova cena za chemii. Od té doby prošla metoda řadou významných změn. V roce 1967 byla představena možnost provádět separaci pomocí elektroforézy v 300 μm skleněné trubici a detekovat sloučeniny pomocí absorpce ultrafialového záření. Toto řešení se však nesetkalo s úspěchem a bylo brzy nahrazeno. Další variantou byla 100 μm křemenná kapilára a napětí 30 kV [16].

Při experimentu v roce 1930 byla použita volná elektroforéza neboli elektroforéza pohyblivého rozhraní. Tato metoda spočívá v umístění roztoku proteinů do trubice ve tvaru U. Roztok proteinů se na obou stranách převrství pufrům. Působením napětí a vytvořením elektrického pole dochází k pohybu iontů k elektrodám s opačnou polaritou. Jednotlivé částice se pohybují různou rychlostí, což vede ke vzniku pohyblivých rozhraní.

Tato metoda byla po čase nahrazena zónovou elektroforézou neboli elektroforézou na nosiči. Při této metodě se vzorek pohybuje na pevném podkladu, kterým může být filtrační papír, celulóza nebo gel (škrob, agar,...). Nedochozí zde ke konvekčnímu míchání v takové míře jako u volné elektroforézy, což umožňuje lepší oddělení složek na jednotlivé zóny [15].

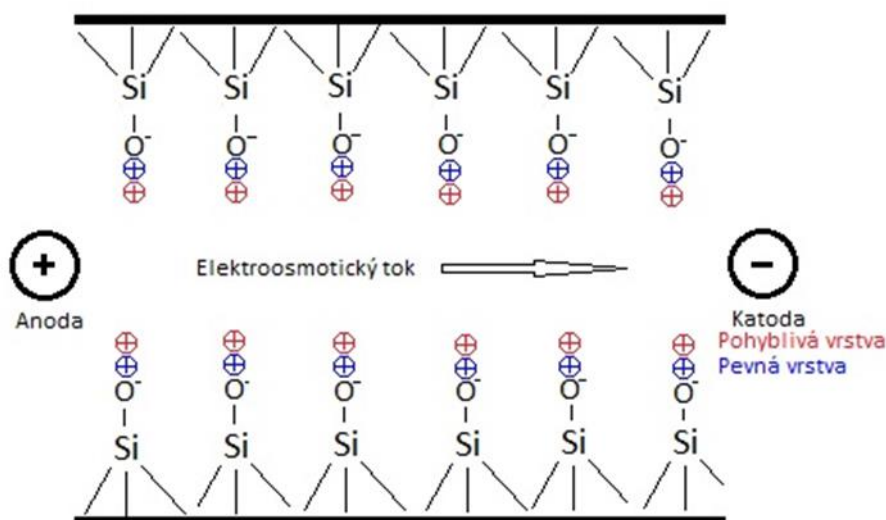
2.2.2. Kapilární elektroforéza

Kapilární elektroforéza patří mezi poměrně mladé metody. Již od jejího prvního uvedení však její popularita roste a dnes je hojně užívána jako analytická metoda k separaci malých iontů, neutrálních molekul i velkých biomolekul. V dnešní době se kapilární elektroforéza používá v širokém spektru oblastí chemie, biochemie nebo farmacie. S kapilární elektroforézou se lze setkat v oborech, jakými jsou například analytická chemie, forenzní chemie, klinická chemie,

organické chemie, farmaceutický průmysl, molekulární biologie a další. V praxi se setkáváme s řadou modifikací jako je kapilární zónová elektroforéza, kapilární gelová elektroforéza, micelární elektrokinetická chromatografie, kapilární isoelektrická fokusace nebo izotachoforéza. Modifikace se liší zejména v typu kolony. Křemenné kapiláry se používají pro kapilární zónovou elektroforézu. Po přidavku micel do pufru se metoda nazývá micelární elektrokinetické chromatografie. Přídavek chirálního činidla do pufru se používá k dělení racemické směsi. Je-li kapilára naplněna gelem, přecházíme ke kapilární gelové elektroforéze [16].

2.2.3. Princip metody

Při elektroforéze je vkládáno stejnosměrné napětí na elektrody, které jsou vyrobeny z inertního materiálu, jako je platina nebo uhlík. Kationty, ionty s pozitivním nábojem, jsou přitahovány ke katodě, která je nabitá záporně, a naopak anionty, záporně nabité ionty, putují směrem ke kladně nabitě anodě. Velikost přitažlivé síly je ovlivněna velikostí náboje daného iontu a koncentračním gradientem v roztoku. Rychlost výsledného pohybu je také ovlivněna odporem prostředí. Rychlost pohybu velkých iontů je menší než rychlost pohybu těch malých. Velikost iontů je dána jejich relativní molekulovou hmotností. Dalším významným faktorem je elektroosmotický tok (viz Obr. 4). Jedná se o pohyb vrstvy kationtů z kapaliny po vrstvě záporně nabitých silanolových skupin, které se nachází na vnitřní stěně skleněné nebo křemenné kapiláry. Vzniká elektrická dvojvrstva, která se skládá z pevné a pohyblivé vrstvy kationtů elektrolytu. Pohybující se vrstva s sebou v důsledku viskozity strhává i další molekuly okolní kapaliny, což vede k pohybu roztoku jako celku směrem ke katodě. Celá metoda je tedy založena na rozdílech v rychlostech pohybu jednotlivých iontů [17], [18].



Obr. 4: Elektroosmotický tok

Kapilára, která je naplněna elektrolytem, je oběma konci zanořena do zásobníků s elektrolytem. Na kapiláru je aplikováno elektrické napětí v hodnotách 5-30 kV. Do kapiláry se dávkuje malé množství vzorku. Vzorek je po průchodu kapilárou analyzován nejčastěji ve fotometrickém detektoru umístěném na konci kapiláry. Z odezvy detektoru je vyhodnocován záznam v závislosti na čase. Tento záznam se nazývá elektroforegram, dříve elektroforeogram. Poloha píků na elektroforegramu udává kvalitativní informaci o stanovované látce, zatímco plocha píku určuje její množství [19].

2.2.4. Instrumentace

Schéma přístroje je zobrazeno na obrázku. (viz Obr. 5)



Obr. 5: Schéma instrumentace kapilární elektroforézy [20]

2.2.4.1. Kapilára

Kapiláry pro kapilární elektroforézu jsou vyráběny z taveného křemene s ochranným polyimidovým obalem, který je v místě detektoru odstraněn. Křemenné sklo bylo pro výrobu kapilár zvoleno z toho důvodu, že dokonale propouští ultrafialové záření. Kapilára obvykle měří 25–100 cm a má vnitřní průměr 25–75 μm . Ke snížení absorpce vzorku nebo ke změně iontového náboje na vnitřní stěně kapiláry se používá chemická modifikace vnitřního povrchu kovalentním vázáním různých látek. Náboj vnitřní stěny kapiláry je silně závislý na pH roztoku. Nejkyselejší ze silanolových skupin disociují již při pH 2. Se zvyšující se hodnotou pH roste i negativní náboj křemene, a to až do hodnoty pH rovny 10, kdy je hydrolyza silanolových skupin tak silná, že dochází k depolymerizaci křemene. K udržení povrchového náboje stěny kapiláry v průběhu měření je nutné promývat kapiláru hydroxidem sodným nebo draselným. Negativní náboj na stěně není pohyblivý, ale přitahuje k sobě kationty z roztoku. Vzniká tak elektrická dvojvrstva [19], [21].

2.2.4.2. Dávkování

Dávkování vzorku je prováděno na konci kapiláry, který je více vzdálen od detektoru. Množství dávkovaného vzorku se pohybuje v rozmezí 10-100 nl. Nejběžněji používaným způsobem dávkování vzorku je dávkování tlakem neboli hydrodynamické dávkování. V tomto případě je na nádobku se vzorkem aplikován zvýšený tlak, který vhání vzorek do kapiláry. Rozdíl tlaků na obou koncích kapiláry společně s dobou, po kterou je tlak aplikován určuje množství nadávkovaného vzorku.

Další možností je méně používané elektrokinetické dávkování, které je založeno na vhánění vzorku přiváděním stejnosměrného napětí. V tomto případě musí být v přístroji umístěna další pomocná elektroda, na kterou se toto napětí vkládá. Tato metoda je zatížena nevýhodou danou rychlostí migrace jednotlivých částic vzorku pod napětím. V důsledku rozdílných migračních rychlostí se mění kvantitativní zastoupení iontů ve vzorku [19], [21].

2.2.4.3. Detektor

Důležitou součástí každého přístroje je detektor. Nejběžněji používané detektory jsou založeny na absorpci ultrafialového záření. Detektory s vyšší citlivostí využívají fluorescenci. Vysokou citlivostí disponuje detektor s laserem indukovanou fluorescencí. Při optické detekci je optická dráha dána průměrem kapiláry, to je 50 až 75 μm . Optická dráha se dá zvětšit využitím kapiláry s bublinovou detekční celou [21].

Dále lze využít propojení s metodou hmotnostní spektrometrie, která poskytuje analýzu vzorku i z hlediska struktury analyzovaných látek [19].

2.2.5. Techniky kapilární elektroforézy

Pro detekci různých analytů, které nelze klasickou metodou stanovit nebo jejich stanovení není dostatečně přesné, byly postupně vyvinuty další techniky kapilární elektroforézy, což přispělo k jejímu rozšíření a hojnějšímu používání.

2.2.5.1. Kapilární zónová elektroforéza

Při kapilární zónové elektroforéze (CZE) je vzorek nanášen aplikací přetlaku na jeden konec kapiláry po přesně stanovenou dobu a je sledován jeho průchod kapilárou s konstantní hodnotou procházejícího proudu. Vzorek je nanášen do základního elektrolytu, jehož koncentrace je obvykle vyšší než koncentrace vzorku. Během průchodu dochází k rozdělení iontů na základě různé rychlosti jejich pohybu. Vznikající zóny, které obsahují jednotlivé složky dělené směsi, poté prochází detektorem. Pomocí této metody je možné dělit široké spektrum látek od malých anorganických iontů až po vysokomolekulární látky. Velký význam má kapilární zónová elektroforéza i v oblasti klinické chemie a biochemie, kde slouží především k analýzám sérových proteinů [18], [22], [23].

Významné je také využití v kombinaci s izotachoforézou. V tomto případě se izotachoforézy využívá jako předseparační techniky. Tato kombinace se uplatňuje například při stanovování stopových kationtových nečistot v iontových kapalinách [22].

2.2.5.2. Kapilární gelová elektroforéza

Při této metodě se používají kapiláry naplněné gelem. Ten pomáhá při separaci molekul, jejichž poměr náboje a hmotnosti je příliš blízký pro kapilární elektroforézu a nedají se proto klasickou metodou rozlišit. Tato metoda nachází uplatnění zejména v biochemii, a to při separaci molekul DNA a proteinů. Gely také zabraňují elektroosmóze, konvekci a minimalizují difúzi roztoku, což napomáhá lepšímu rozlišení. Nevýhodou je nemožnost separace neutrálních molekul, které se bez přítomnosti elektroosmotického toku nepohybují. Tento problém se však dá vyřešit přidáním povrchově aktivních látek, které vytvoří micely (viz níže) [19], [21].

2.2.5.3. Micelární elektrokinetická kapilární chromatografie

Tato metoda byla vyvinuta pro separaci nenabitých sloučenin, které se nedělí použitím kapilární elektroforézy ve volném roztoku. Separace se provádí v roztoku elektrolytu s vysokou hodnotou pH a vysokým obsahem povrchově aktivních látek. Povrchově aktivní látky při dosažení určité koncentrace, jež se nazývá kritická micelární koncentrace, začínají tvořit prostorové agregáty zvané micely. Micely mají tvar kuliček, na jejichž povrchu jsou umístěny hydrofilní části a do jejichž jádra se shlukují hydrofobní řetězce a vytváří tak nepolární jádro. Nepolární jádra pak tvoří takzvanou pseudostacionární fázi, do které se vedle vodného pufru jako mobilní fáze, rozdělují složky vzorku. Látky více zadržované micelami mají delší retenční čas. Některé látky mohou být zcela enkapsulovány do micel. Tato metoda je hojně využívána pro separaci ve vodě nerozpustných sloučenin, jakými jsou například steroidy [19].

2.2.5.4. Kapilární isoelektrická fokusace

Tato metoda se používá k separaci amfolytů, jakými jsou například aminokyseliny, peptidy nebo proteiny. Při separaci se využívají produkty elektrodových reakcí k vytvoření gradientu pH mezi anodou a katodou. Prochází-li takovýmto prostředím aminokyselina nebo peptid pohybuje se vlivem záporného náboje v alkalickém prostředí k anodě a naopak v kyselém prostředí se vytváří kladný náboj, který vede pohyb směrem ke katodě. Tyto pohyby se střídají tak dlouho, než vzorek doputuje do prostředí svého izoelektrického bodu, kde je jeho pohyblivost nulová. Na tomto místě se analyt zakoncentruje, a poté je detekován. Tato metoda má vysokou separační účinnost a výjimečnou zakoncentrovávací schopnost [18], [19], [23].

2.2.5.5. *Kapilární elektrochromatografie*

Kapilární elektrochromatografie je technika, která kombinuje principy kapilární elektroforézy a vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Jako kolony jsou používány kapiláry, které jsou naplněny mikročásticemi stacionární fáze o rozměrech 1,5–5 μm . Pohyb mobilní fáze je zajišťován aplikací stejnosměrného napětí, které vyvolává elektroosmotický tok. Separace složek probíhá na stejném principu jako v případě vysokoúčinné kapalinové chromatografie, což je rozdělení separované složky na základě interakcí s mobilní a stacionární fází. Kapilární elektrochromatografie je technika vhodná pro použití k separaci nabitých i neutrálních látek různých velikostí, od jednoduchých molekul po velké biomolekuly, což ji předurčuje širokou možnost aplikace v odvětvích, jakými jsou biochemie nebo farmakologie [19].

2.2.5.6. *Izotachoforéza*

V izotachoforéze jsou použity dva různé elektrolyty s odlišnou pohyblivostí iontů. Kapilára je naplněna vedoucím elektrolytem, do prostoru druhé elektrody je umístěn koncový elektrolyt. Roztok vzorku je vnášen mezi oba elektrolyty. Různé složení elektrolytů způsobuje, že v různých místech kapiláry prochází proud s různou vodivostí. Například při separaci a stanovení iontů Na^+ a K^+ se používá jako vedoucí elektrolyt roztok kyseliny chlorovodíkové a jako koncový elektrolyt roztok chloridu lithného. Při takto zvolených elektrolytech má kationt vedoucího elektrolytu, tedy H^+ , maximální pohyblivost, zatímco kationt koncového elektrolytu Li^+ má pohyblivost nejnižší. Průtok konstantního proudu vyvolá gradient napětí, díky kterému se ionty o různé pohyblivosti uvedou do pohybu o stejné rychlosti. Působením elektrického proudu vznikají zóny, v nichž se pohybují kationty analytu. Na méně pohyblivé Na^+ ionty působí větší hnací síla, vytváří se tedy větší potenciálový gradient. Na pohyblivější kationty K^+ působí menší hnací síla. Ve výsledku se tedy všechny zóny pohybují stejnou rychlostí. Hranice jednotlivých zón jsou velmi ostré, což způsobuje samozaostřovací efekt. Dostane-li se kationt do zóny, která putuje před zónou, do které sám patří, je snížením hnací síly zpomalen a vrácen zpět do své zóny. Samozaostřovací efekt funguje i při zpomalení kationtu do zóny méně pohyblivého kationtu. Izotachoforeticky lze stanovit jen kationty nebo anionty. Vyhodnocení se provádí měřením gradientu napětí nebo pomocí fotometrického detektoru UV-VIS. Při měření gradientu je výsledkem schodovitý záznam zón, přičemž výška zóny udává kvalitativní údaj a délka zóny údaj kvantitativní [18], [19].

2.2.6. **Porovnání s dalšími metodami**

Kapilární elektroforéza může být použita pro separaci a analýzu velkého množství různých látek. Organické molekuly, anorganické ionty i velké biomolekuly mohou být separovány při použití stejného přístroje a v mnoha případech i za použití stejné kolony. Zásadní proměnnou je tedy složení používaného pufru. Kapilární elektroforéza má nejvyšší rozlišovací schopnost ze všech technik využívajících kapalnou fázi. Kapilární elektroforéza je rychlá, jednoduchá, lze automatizovat a poskytuje kvantitativní data, může být kombinována s dalšími technikami, jako jsou vysokoúčinná kapalinová chromatografie, hmotnostní spektrometrie nebo nukleární magnetická rezonance. Další nespornou výhodou je minimální spotřeba vzorku i používaného pufru, což omezuje odpad a pomáhá tak v ochraně životního prostředí [16].

Tato metoda je široce využívána ke stanovení různých aniontů nebo kationtů. Existují studie zabývající se rozdělením 36 aniontů ve třech minutách nebo 11 iontů kovu v osmi minutách. Velké množství studií se zabývá dělením aminokyselin, peptidů nebo proteinů. Dělení aminokyselin je obtížné z důvodu jejich rozdílných vlastností, některé jsou zásadité, jiné jsou kyselé, některé jsou hydrofobní, další hydrofilní. K dělení aminokyselin se tedy používá micelární elektrokinetická chromatografie a jako detekce se používá laserem indukovaná fluorescence. Kapilární elektroforézu lze také použít ke kontrole čistoty syntetizovaných peptidů. Další možností využití je separace látek z přírodních zdrojů. Rovněž látky jako antibiotika, flavonoidy, isoflavonoidy, steroidy, alkaloidy, nikotin, kofein nebo toxiny jsou separovány s využitím elektroforézy. Kapilární gelová elektroforéza se uplatňuje pro dělení fragmentů nukleových kyselin jakou je i DNA [16].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1. Použité chemikálie

- **Dodecylsírán sodný (SDS)** $\text{NaC}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4$
 $M_r = 288,38$
Sigma Aldrich
CAS 151-21-3
- **Kyselina askorbová** $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$
 $M_r = 176,12$
Sigma Aldrich
CAS 50-81-7
- **Tetraboritan sodný dekahydrát** $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$
 $M_r = 381,37$
Lachema
CAS 1303-96-4
- **Hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát** $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$
 $M_r = 358,14$
Penta
CAS 10039-32-4
- **Hydrogenfosforečnan didraselný** K_2HPO_4
 $M_r = 174,18$
Penta
CAS 7758-11-4
- **Dihydrogenfosforečnan draselný** KH_2PO_4
 $M_r = 136,09$
Penta
CAS 7778-77-0
- **Kyselina citronová** $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$
 $M_r = 192,12$
Sigma Aldrich
CAS 77-92-9
- **Kyselina fosforečná** H_3PO_4
 $M_r = 98,00$
Penta
CAS 7664-38-2

- **Thiomočovina** $\text{CH}_4\text{N}_2\text{S}$
 $M_r = 76,12$
Lach-ner
CAS 62-56-6
- **Hydroxid sodný** NaOH
 $M_r = 39,997$
Penta
CAS 1310-73-2
- **Kyselina hyaluronová** $(\text{C}_{14}\text{H}_{21}\text{NO}_{11})_n$
 $M = 18-30, 80-130, 250-450, 1200-1400 \text{ kDa}$
Contipro a.s.
CAS 9004-61-9

3.2. Používané přístroje

- Kapilární zónová elektroforéza Agilent CE s DAD, Agilent Technologies, Německo (Obr. 6)
- Titrátor TitroLine alpha plus TA10 plus, Si-Analytix, Německo
- Analytické váhy Scaltec SPB 31, Scaltec Instruments, Německo
- Autovortex SA6, Stuart Scientific, Velká Británie
- Spektrofotometr Specord 50 plus, Analytik Jena, Německo
- Magnetická míchačka, IKA Color squid, IKA-Werke, Německo
- Další běžné laboratorní vybavení



Obr. 6: Kapilární zónová elektroforéza Agilent

3.3. Příprava zásobních roztoků

3.3.1 Zásobní roztoky elektrolytů

Zásobní roztok základního elektrolytu byl připraven rozpuštěním vypočteného množství látky v demineralizované vodě. Dané množství požadovaných látek bylo naváženo na analytických vahách a rozpuštěno v kádince. Obsah kádinky byl poté kvantitativně převeden do odměrné baňky. Odměrná baňka byla doplněna po rysku demineralizovanou vodou. Takto připravené roztoky byly uchovávány v chladničce. U všech připravených elektrolytů byla změřena a zaznamenána hodnota pH. V případě potřeby úpravy pH byla použita kyselina fosforečná. Připravené zásobní roztoky elektrolytů můžete vidět na obrázku (viz Obr. 7).



Obr. 7: Zásobní roztoky testovaných základních elektrolytů

3.3.2 Zásobní roztok kyseliny hyaluronové

Byly připraveny zásobní roztoky hyaluronanu o různých koncentracích. Pro účely optimalizace podmínek měření byly připraveny 1% roztoky tří molekulových hmotností analytu, a to konkrétně 15–30 kDa, 80–130 kDa a 250–450 kDa. Pro měření kalibračních závislostí byl připraven 2,5% roztok hyaluronanu o molekulární velikosti 15–30 kDa a 1% roztok velikosti 250–450 kDa. Vypočtené potřebné množství analytu bylo naváženo na analytických vahách a rozpuštěno v roztoku používaného elektrolytu. Pro optimální rozpuštění celého množství navážky byly zásobní baňky umístěny na magnetickou míchačku po dobu 24 hodin. Vzniklý roztok byl uchováván v lednici a používán po dobu maximálně 3 týdnů.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1. Optimalizace metody

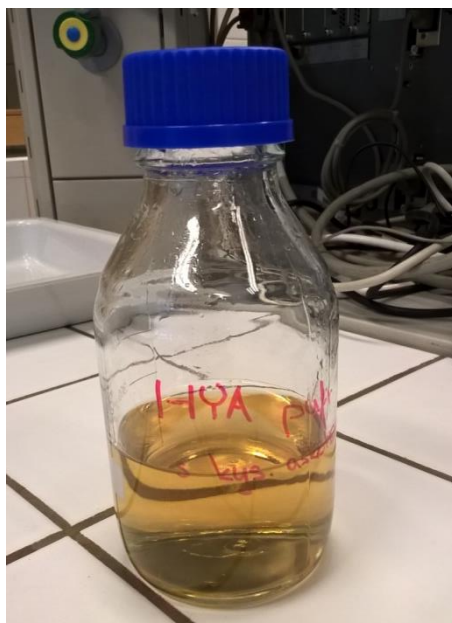
4.1.1 Optimalizace pufracího systému

Součástí optimalizace metody byl výběr vhodného pufracího systému, to je základního elektrolytu. Za tímto účelem byla připravena a k analýzám použita celá řada elektrolytů o různých koncentracích a hodnotách pH. Prvním z připravených elektrolytů byla směs roztoků hydrogen fosforečnanu sodného, tetraboritanu sodného a dodecylsírany sodného (SDS). Tento elektrolyt byl použit v práci profesora Jamese Grimshawa [12]. Roztok s výslednou hodnotou pH rovnou devíti byl vyzkoušen samostatně i v kombinaci s analytem. V důsledku přítomnosti micel SDS docházelo k ucpávání kapiláry a jejímu častému praskání, proto byl tento elektrolyt později nahrazen vhodnějším. Další komplikací bylo uchovávání vzorků, kyselina hyaluronová musí být uchovávána v chladu, zatímco SDS obsažené v roztocích se v chladu sráží. Roztok elektrolytu uchovávaný v chladničce můžete vidět na obrázku (viz Obr. 8).



Obr. 8: Elektrolyt obsahující SDS po vyjmutí z chladničky

Jako další možnost byla vybrána směs hydrogenfosforečnanu didraselného a dihydrogenfosforečnanu draselného o pH 7,7. Tento elektrolyt byl použit v práci zabývající se stanovením hyaluronanů ve farmaceutických přípravcích [13]. Do tohoto pufru byla pro možnost nepřímé detekce pomocí UV-VIS detektoru při vlnové délce 250 nm přidávána kyselina askorbová. Tento roztok byl však nestálý a při jeho uskladnění v chladničce docházelo ke změně zbarvení na žlutohnědé (viz Obr. 9), a to již po několika dnech.



Obr. 9: Elektrolyt s kyselinou askorbovou po 4 dnech od přípravy

Z tohoto důvodu byla následně tato směs použita bez kyseliny askorbové. Tomu byla přizpůsobena i hodnota zaznamenané vlnové délky na 194 nm. Při dalším optimalizačním kroku bylo však i toho jinak vyhovující složení nahrazeno. Všechny použité pufrů a hodnoty jejich pH jsou shrnuty v tabulce (Tabulka 2).

Tabulka 2: Testované pufrы a parametry jejich použití

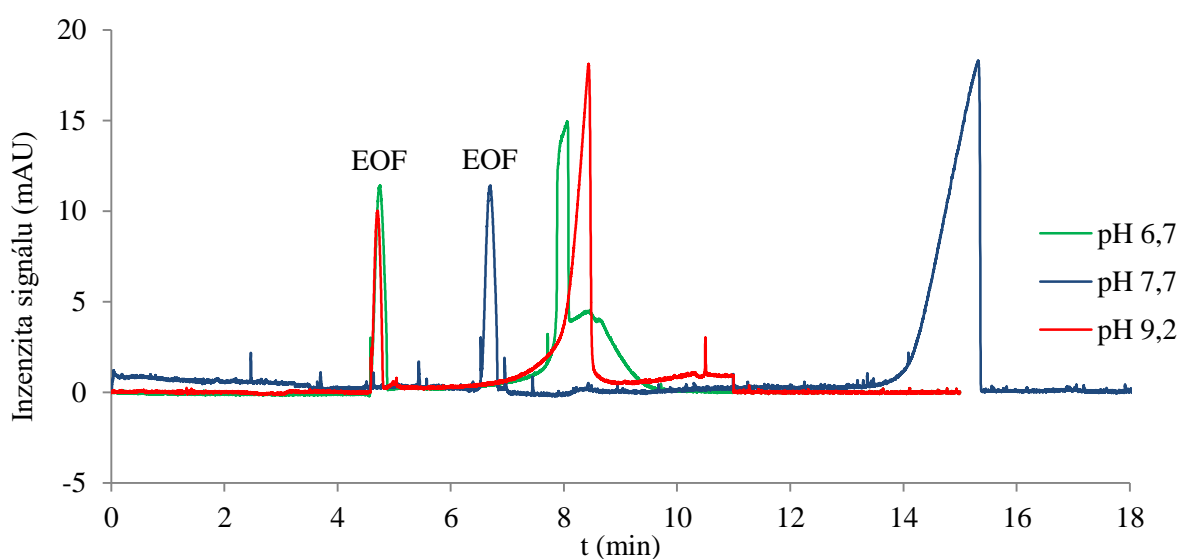
Injektáž vzorku	Tloušťka kapiláry	Délka kapiláry	Napětí	Vlnová délka	Pufr	pH
5 kPa po dobu 5 s	75 μm	58,5 cm celková 50 cm k detektoru	15 kV	200 nm	50 mM fosfátový (Na_2HPO_4) 10 mM borátový ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) 40 mM SDS	9
5 kPa po dobu 10 s	50 μm	48,5 cm celková 40 cm k detektoru	12 kV	194 nm	40 mM fosfátový ($\text{K}_2\text{HPO}_4 + \text{KH}_2\text{PO}_4$)	7,7
5 kPa po dobu 10 s	50 μm	64,5 cm celková 56 cm k detektoru	13 kV	250 nm nepřímá detekce	40 mM fosfátový ($\text{K}_2\text{HPO}_4 + \text{KH}_2\text{PO}_4$) + 10 mM askorbová kyselina	7,7
5 kPa po dobu 5 s	75 μm	52,5 cm celková 44 cm k detektoru	12 kV	215 nm	20 mM fosfátový (K_2HPO_4) + 10 mM kyselina citronová	4
5 kPa po dobu 5 s	75 μm	52,5 cm celková 44 cm k detektoru	12 kV	215 nm	20 mM fosfátový ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) + 20 mM fosfátový ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	6
5 kPa po dobu 5 s	75 μm	52,5 cm celková 44 cm k detektoru	12 kV	215 nm	20 mM fosfátový ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) + 20 mM fosfátový ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	6,7
kPa po dobu 5 s	75 μm	52,5 cm celková 44 cm k detektoru	12 kV	215 nm	pH 4 + kyselina fosforečná	2
5 kPa po dobu 5 s	75 μm	52,5 cm celková 44 cm k detektoru	18 kV	215 nm	50 mM borátový ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$)	9,2

4.1.2 Optimalizace pH elektrolytu

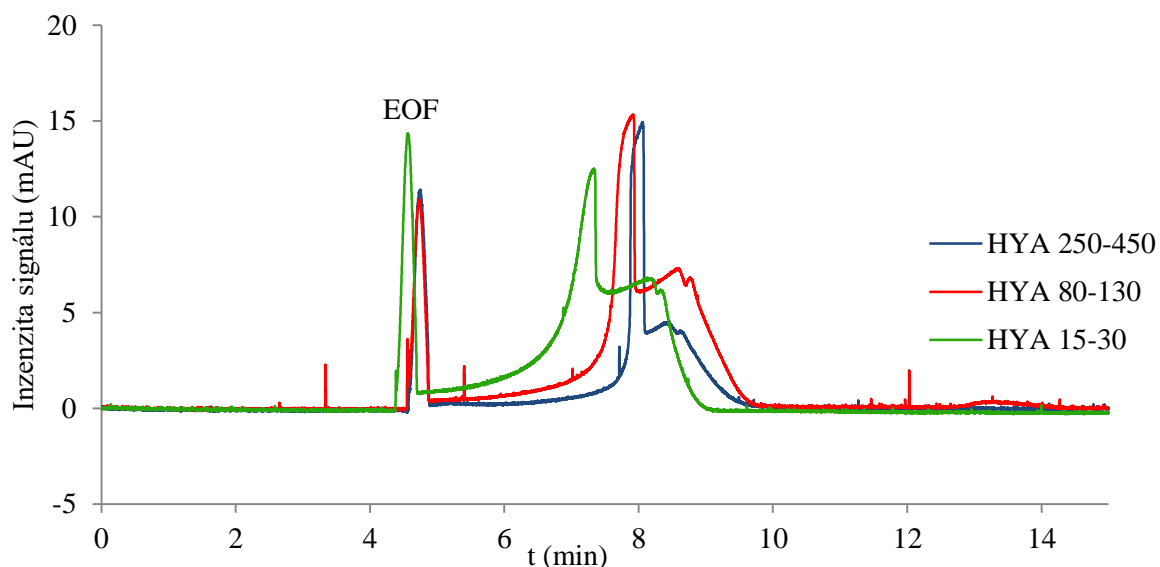
Tvar i šířka jednotlivých píků analytu jsou výrazně závislé na pH používaného elektrolytu. Z toho důvodu bylo v průběhu měření vyzkoušeno několik různých elektrolytů o různých hodnotách pH. Výsledky měření jsou zaznamenány v grafech 1 a 2.

Z grafu (Graf 1) je patrné, že hodnota pH elektrolytu ovlivňuje i migrační čas daného analytu. V případě hodnot pH 2 a 4 byly tyto migrační časy příliš dlouhé, více než 20 minut, a elektrolyty proto nevhodné. Nejlepší variantou z hlediska doby analýzy je borátový pufr o pH 9,2.

V grafu (Graf 2) je zobrazen rozdíl v tvaru píku jednotlivých molekulových hmotností hyaluronanu při pH 6.



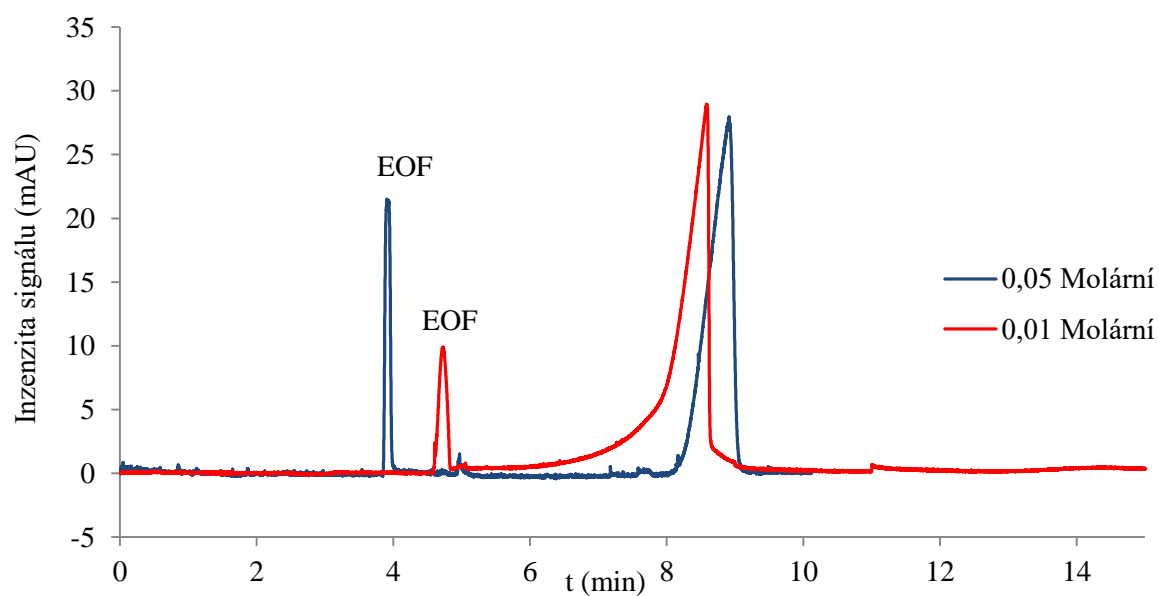
Graf 1: Porovnání vlivu pH na tvar píku analytu



Graf 2: Rozdíly v tvaru píku u jednotlivých analytů při pH 6

4.1.3 Optimalizace koncentrace elektrolytu

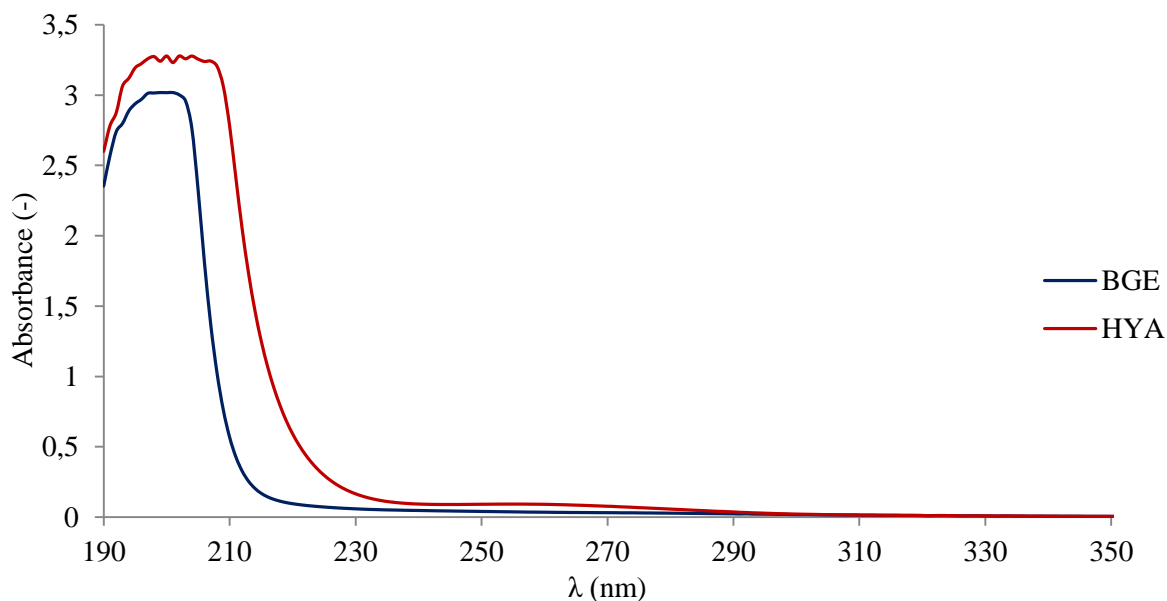
Dalším optimalizačním krokem byl výběr vhodné koncentrace elektrolytu. Z grafu (Graf 3) je patrné, že v tomto případě koncentrace významně neovlivňuje migrační čas analytu, ale má vliv na tvar píku. Při vyšší koncentraci je základna píku menší a pík celkově užší. Z tohoto důvodu byla pro další měření zvolena koncentrace $0,05 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.



Graf 3: Porovnání vlivu koncentrace elektrolytu na tvar píku

4.1.4 Optimalizace vlnové délky pro UV detekci analytu

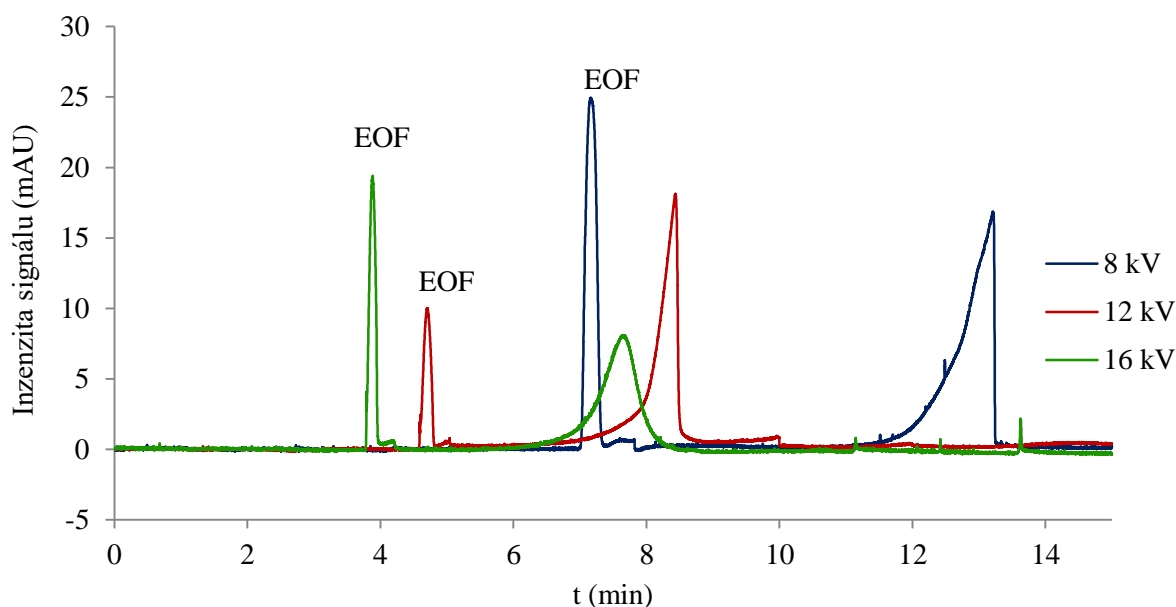
Pro zvolení optimální vlnové délky detekce hyaluronanu bylo proměřeno absorpční spektrum analytu i zvoleného elektrolytu. Tímto měřením bylo zjištěno, že absorpční maximum elektrolytu je v rozmezí 195 až 205 nm, zatímco v případě hyaluronanu se pohybuje v hodnotách 195 až 215 nm. Tato absorpční spektra jsou uvedena v grafu (Graf 4). Na základě výsledků toho měření optimální vlnová délka 215 nm. Při této vlnové délce elektrolyt již téměř neabsorbuje, zatímco kyselina hyaluronová má zde stále téměř své absorpční maximum.



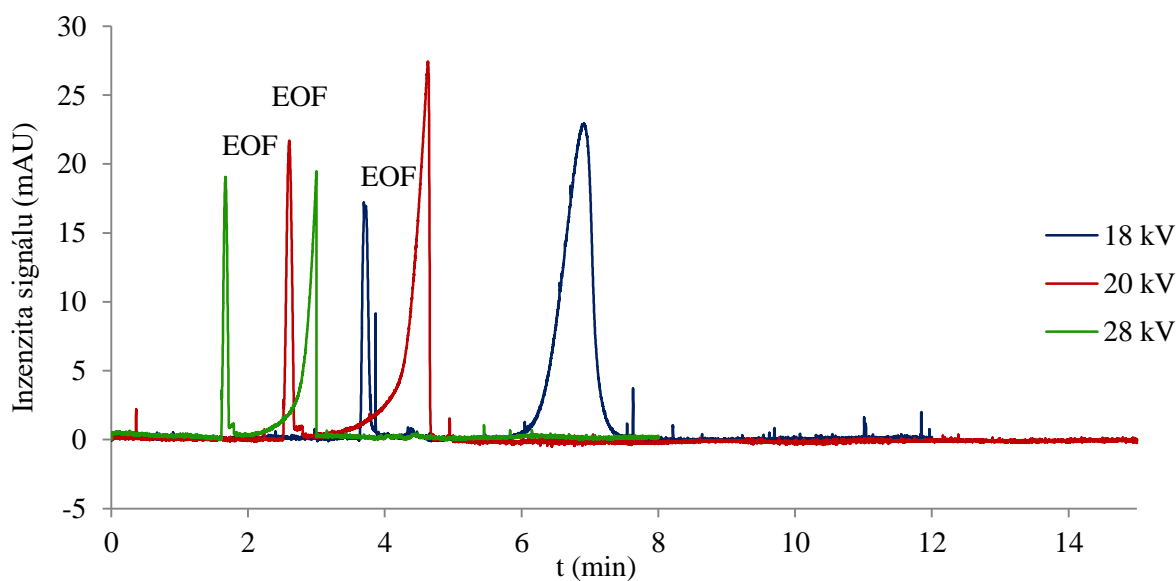
Graf 4: Absorpční spektra základního elektrolytu a analytu.

4.1.5 Optimalizace vkládaného napětí

Po výběru pufru o vhodném pH byla hledána optimální hodnota napětí vkládaného mezi elektrody. Toto napětí výrazně ovlivňuje migrační čas, ale i tvar píku analytu. Pro toto měření byl použit vzorek kyseliny hyaluronové o koncentraci 1 % a molekulové hmotnosti 250–450 kDa. Byly proměřeny hodnoty napětí v rozsahu 8 až 28 kV. Výsledné elektroforegramy jsou zaznamenány v grafech (Graf 5, Graf 6). Jako optimální napětí bylo vybráno 18 kV, při kterém jsou píky analytu nejužší a nemají trojúhelníkovitý tvar.



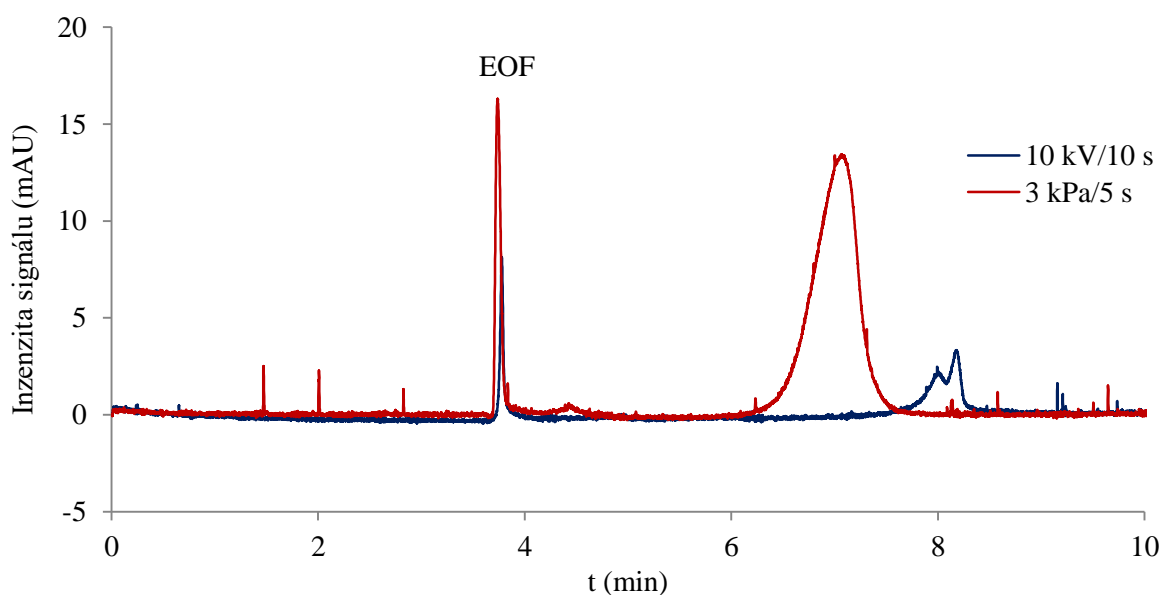
Graf 5: Porovnání různých hodnot vkládaného napětí



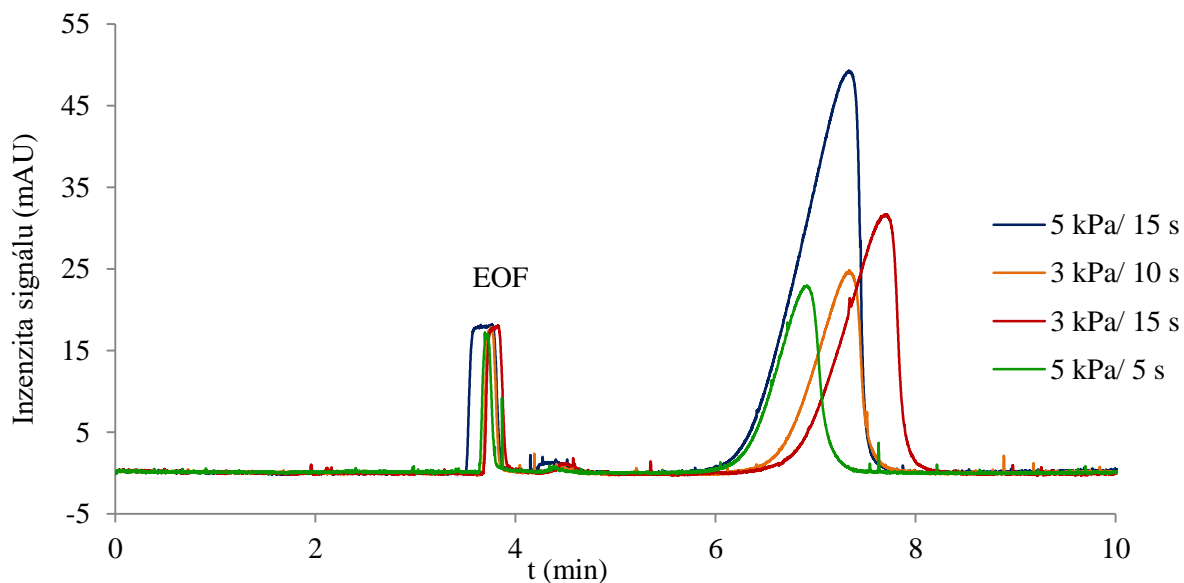
Graf 6: Porovnání dalších hodnot vkládaného napětí

4.1.6 Optimalizace podmínek a dávkování vzorků

V první řadě bylo porovnáno hydrodynamické a elektrokinetické dávkování. Na grafu (Graf 7) je vyobrazeno porovnání výsledků obou těchto způsobů. Při elektrokinetickém dávkování dochází ke zdvojení píků, což je pro další analýzu nevhodné. Další měření byla proto prováděna s využitím hydrodynamického dávkování neboli dávkování tlakem. Pro optimalizaci metody byla provedena měření při několika různých hodnotách vkládaného tlaku a několika hodnotách času, po který byl tlak aplikován. Z grafu (Graf 8) je patrné, že optimálním tlakem je 5 kPa vkládaný po dobu 5 s. Při těchto podmínkách je výsledný pík analytu nejužší a migrační čas nejkratší.



Graf 7: Porovnání elektrokinetické a hydrodynamické metody dávkování vzorku

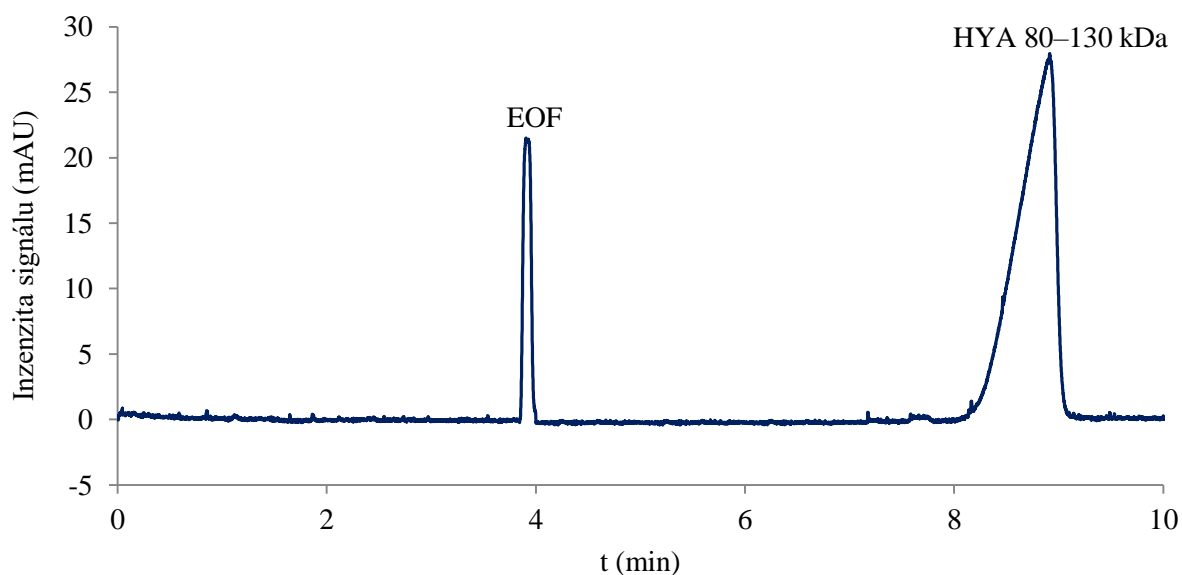


Graf 8: Porovnání různých hodnot dávkování tlakem

4.1.7 Výsledné parametry metody

Tyto parametry byly využity pro další měření včetně kalibračních přímk. Na grafu (Graf 9) je zobrazen elektroforegram získaný za těchto podmínek.

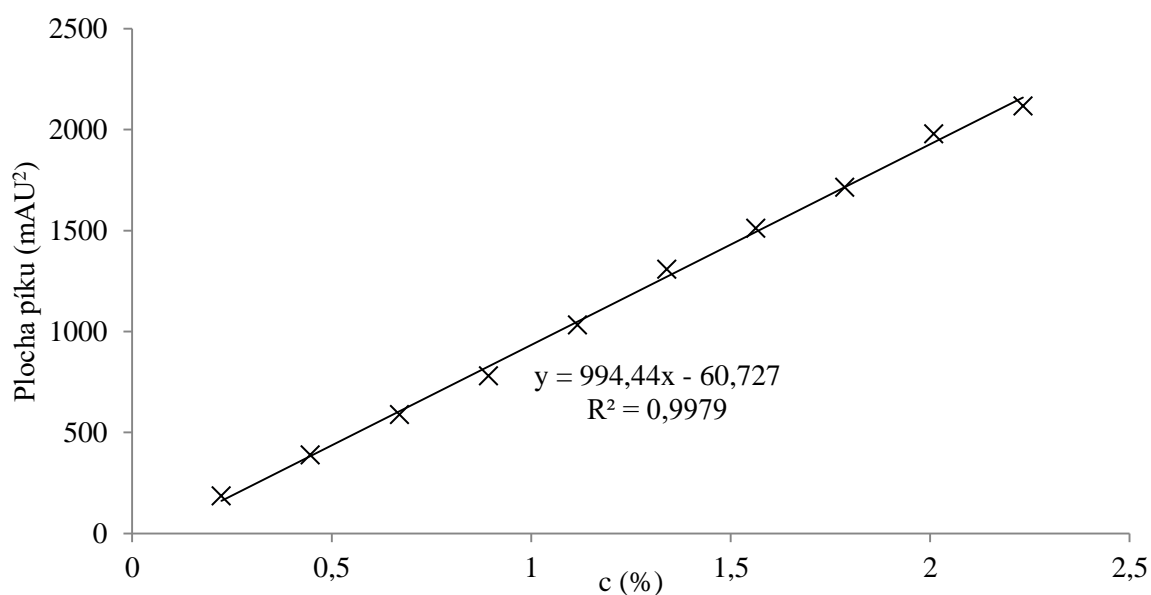
- **Kapilára** křemenná
vnitřní průměr 75 μm
celková délka 52,5 cm
vzdálenost k detektoru 44 cm
- **Teplota** 25 °C
- **Napětí** 18 kV
- **Polarita** pozitivní
- **Dávkování** hydrodynamické
5 kPa po dobu 5 s
- **Elektrolyt** borátový, pH 9,2
koncentrace 0,05 mol \cdot dm⁻³
- **Vlnová délka detekce** 215 nm



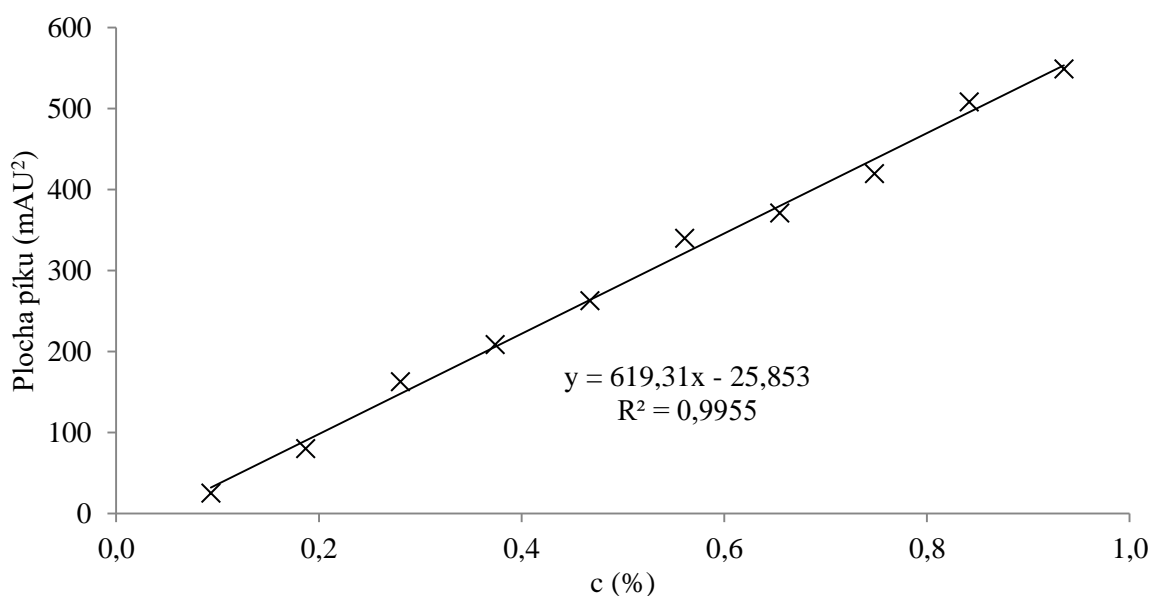
Graf 9: Elektroforegram vzniklý za optimálních podmínek

4.1.8 Kalibrační závislosti

Kalibrační závislosti byly získány za optimálních podmínek. Pro měření byly připraveny roztoky kyseliny hyaluronové (HYA) o molekulových hmotnostech 15–30 a 250–450 kDa. Pro každou molekulovou hmotnost byl připraven zásobní roztok, ze kterého bylo namícháno 10 roztoků o různých koncentracích. Pro hmotnost 15–30 kDa byl připraven zásobní roztok o koncentraci 2,5 %, pro hmotnost 250–450 kDa zásobní roztok o koncentraci 1 %. Na grafu (Graf 10) je zobrazena kalibrační závislost pro molekulovou velikost 15–30 kDa, na grafu (Graf 11) potom kalibrační závislost velikosti 250–450 kDa.



Graf 10: Kalibrační přímka kyseliny hyaluronové o molekulové hmotnosti 15–30 kDa.



Graf 11: Kalibrační přímka kyseliny hyaluronové o molekulové hmotnosti 250–450 kDa.

4.1.9 Meze detekce a meze stanovitelnosti metody

Výše uvedené kalibrační závislosti slouží k získání parametrů optimalizované metody stanovení.

Pro kalibrační přímky se statisticky významným úsekem se pro výpočet meze detekce a meze stanovitelnosti používají vztahy (1) a (2) [24].

Mez detekce (LOD), mez stanovitelnosti (LOQ)

$$LOD = \frac{a + 3 \cdot s_a}{b} \qquad LOQ = \frac{a + 10 \cdot s_a}{b}, \qquad (1,2)$$

kde a je úsek na ose y , s_a je směrodatná odchylka úseku a b je směrnice kalibrační přímky.

Výpočet pro kyselinu hyaluronovou o molekulové hmotnosti 15 – 30 kDa.

$$LOD = \frac{60,727 + 3 \cdot 22,364}{994,439} = 0,129\% \qquad LOQ = \frac{60,727 + 10 \cdot 22,364}{994,439} = 0,286\%$$

Výpočet pro kyselinu hyaluronovou o molekulové hmotnosti 250 – 450 kDa.

$$LOD = \frac{25,853 + 3 \cdot 8,584}{619,307} = 0,083 \% \qquad LOQ = \frac{25,853 + 10 \cdot 8,584}{619,307} = 0,180\%$$

5 ZÁVĚR

Tato bakalářská práce se zabývala optimalizací metody pro stanovení kyseliny hyaluronové a jejích solí ve vodných roztocích kapilární zónovou elektroforézou. V práci jsou shrnuty současné poznatky o vlastnostech a chování kyseliny hyaluronové ve vodných roztocích. Dále je zde popis její syntézy, degradace a využití. V neposlední řadě jsou zde uvedeny také možnosti její kvantifikační analýzy. Ve druhé polovině teoretické části jsou popsány elektromigrační metody a jejich použití.

Při experimentální práci byla prováděna optimalizace metody stanovení. Během měření byly měněny jednotlivé parametry metody, dokud nebylo dosaženo nejlepšího výsledku. Za těchto optimálních podmínek byly proměřeny kalibrační závislosti pro 2 různé molekulové hmotnosti kyseliny hyaluronové, a to konkrétně 15–30 kDa a 250–450 kDa. Obě kalibrační závislosti vykazovaly lineární průběh. Byly vypočteny mez detekce a mez stanovitelnosti.

Výše popsaná metoda je připravena pro další použití v oblasti výzkumu kyseliny hyaluronové.

6 ZDROJE

- [1] STEINBÜCHEL, A. a M. HOFRIKTER. Biopolymers. Chichester: Wiley-VCH, 2003. ISBN 3-527-30226-3
- [2] LIU, Chao, Min WANG, Junxue AN, Esben THORMANN a Andra DÉDINAITÉ. Hyaluronan and phospholipids in boundary lubrication. *Soft Matter* [online]. 2012, 8(40), 10241- [cit. 2016-04-17]. DOI: 10.1039/c2sm26615f. ISSN 1744683x. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c2sm26615f>
- [3] Hascall, V. C., Laurent T. C.: Hyaluronan: Structure and Physical Properties. [HTML dokument]. Dec. 15, 1997, Glycoforum. [citováno 25.4.2017]. Dostupný z: <http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA01/HA01E.html>
- [4] KOGAN, Grigorij, Ladislav ŠOLTÉS, Robert STERN a Peter GEMEINER. Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnology Letters* [online]. 2006-12-8, 29(1), 17-25 [cit. 2016-04-17]. DOI: 10.1007/s10529-006-9219-z. ISSN 01415492. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10529-006-9219-z>
- [5] ALMOND, A. Hyaluronan. *Cellular and Molecular Life Sciences* [online]. 2007, 64(13), 1591-1596 [cit. 2016-04-18]. DOI: 10.1007/s00018-007-7032-z. ISSN 1420-682x. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00018-007-7032-z>
- [6] LAPČÍK, Lubomír, Stefaan DE SMEDT, Joseph DEMEESTER a Peter CHABREČEK. Hyaluronan: Preparation, Structure, Properties, and Applications †. *Chemical Reviews* [online]. 1998, 98(8), 2663-2684 [cit. 2016-04-18]. DOI: 10.1021/cr941199z. ISSN 00092665. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/cr941199z>
- [7] WEIGEL, P. H., V. C. HASCALL a M. TAMMI. Hyaluronan Synthases. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 1997, 272(22), 13997-14000 [cit. 2016-04-17]. DOI: 10.1074/jbc.272.22.13997. ISSN 0021-9258. Dostupné z: <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.272.22.13997>
- [8] VIGETTI, D., A. GENASETTI, E. KAROUSOU, et al. Modulation of Hyaluronan Synthase Activity in Cellular Membrane Fractions. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2009, 284(44), 30684-30694 [cit. 2016-04-18]. DOI: 10.1074/jbc.M109.040386. ISSN 0021-9258. Dostupné z: <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M109.040386>
- [9] BRACKE, James W. a Kipling THACKER. Hyaluronic acid from bacterial culture. USA. US 4517295 A. Uděleno 18. únor 1983. Zapsáno 14. květen 1985.
- [10] SOBOTKA, Luboš, Vladimír VELEBNÝ.: Komplex hyaluronanu a jódu – Hyiodine® – nová metoda při terapii diabetických defektů [HTML dokument]. 4. 11. 2005. [citováno 22.4.2016]. Dostupné z: http://www.prolekare.cz/pdf?ida=vl_06_06_04.pdf

- [11] Hyaluronan v hojení ran. Hyiodine [online]. Dolní Dobrouč, 2010 [cit. 2017-05-01]. Dostupné z: <https://www.hyiodine.cz/spatne-hojeni-ran>
- [12] GRIMSHAW, James, Áine KANE, Jadwiga TROCHA-GRIMSHAW, Alistair DOUGLAS, Usha CHAKRAVARTHY a Desmond ARCHER. Quantitative analysis of hyaluronan in vitreous humor using capillary electrophoresis. Electrophoresis [online]. 1994, 15(1), 936-940 [cit. 2016-04-21]. DOI: 10.1002/elps.11501501137. ISSN 01730835. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/elps.11501501137>
- [13] ALKRAD, Jamal Alyoussef, Yahya MERSTANI a Reinhard H.H NEUBERT. New approaches for quantifying hyaluronic acid in pharmaceutical semisolid formulations using HPLC and CZE. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis [online]. 2002, 30(4), 913-919 [cit. 2017-05-01]. DOI: 10.1016/S0731-7085(02)00329-1. ISSN 07317085. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0731708502003291>
- [14] KÜHN, Andrea V, Klaus RAITH, Volker SAUERLAND a Reinhard H.H NEUBERT. Quantification of hyaluronic acid fragments in pharmaceutical formulations using LC–ESI–MS. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis [online]. 2003, 30(5), 1531-1537 [cit. 2017-05-03]. DOI: 10.1016/S0731-7085(02)00544-7. ISSN 07317085. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0731708502005447>
- [15] KÁŠ, Jan, Milan KODÍČEK a Olga VALENTOVÁ. Laboratorní techniky biochemie. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2005. ISBN 8070805862
- [16] HALEEM J, Issaq. A decade of capillary electrophoresis. Electrophoresis [online]. 2000, 2000(21), 1921-1939 [cit. 2016-04-20]. DOI: 10.1002/1522-2683. Dostupné z: [http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1522-2683\(20000601\)21:10%3C1921::AID-ELPS1921%3E3.0.CO;2-Y/epdf](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1522-2683(20000601)21:10%3C1921::AID-ELPS1921%3E3.0.CO;2-Y/epdf)
- [17] ŠTULÍK, Karel. Analytické separační metody. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2004. ISBN 80-246-0852-9.
- [18] BARTUŠEK, M., Pazourek, J.: Základy metod analytické chemie, Pro bakalářské studijní programy [online]. [cit. 2010-03-13]. Dostupný z: http://www.chemi.muni.cz/~analytika/bartusek_skripta.pdf.
- [19] KLOUDA, Pavel. Moderní analytické metody. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. ISBN 80-863-6907
- [20] Capillary Electrophoresis. LibreTexts: Chemistry [online]. University of Carolina, 2015 [cit. 2017-05-01]. Dostupné z: https://chem.libretexts.org/Core/Analytical_Chemistry/Instrumental_Analysis/Capillary_Electrophoresis
- [21] Elektroanalytické metody: sborník přednášek z kurzu. Český Těšín: 2 Theta, 2001. Analytical standards and equipment. ISBN 80-86380-07-6.

[22] ČÁSLAVSKÝ, Josef a Jiří Georg Kamil ŠEVČÍK. Analýza organických látek: učební text projektu "Příprava kurzů a učebních textů v oboru vzorkování a chemické analýzy" : modul K02-2014. Český Těšín: 2 THETA, 2014. Analytical standards and equipment. ISBN 978-80-260-7085-6.

[23] CHURÁČEK, Jaroslav, Petr BOČEK, Zdeněk DEYL, et al. Pokroky v teorii a instrumentaci moderních analytických metod. Pardubice: Vysoká škola chemicko-technologická, 1985

[24] Mez detekce a mez stanovitelnosti. HPLC.CZ [online]. Česká Republika: Michal Douša, 1999 [cit. 2017-05-03]. Dostupné z: http://www.hplc.cz/Tip/lod_loq.htm#top

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

BGE	Základní elektrolyt
CD44	Specifický receptor pro hyaluronan
CE	Kapilární elektroforéza
CZE	Kapilární zónová elektroforéza
DAD	Detektor s diodovým polem
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
EOF	Elektroosmotický tok
ESI	Elektrosprejová ionizace
HAS	Hyaluronan syntáza
HYA	Hyaluronan
HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie
kDa	kilodalton
LOD	Mez detekce
LOQ	Mez kvantifikace
M	$\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$
MS	Hmotnostní spektrometrie
RHAMM	Specifický receptor pro hyaluronan
SDS	Dodecylsulfát sodný
UDP	Uridindifosfát
UDP-GlcA	Uridindifosfo-glukuronová kyselina
UDP-GlcNAc	Uridindifosfo-N-acetylglukosamin
UV	Ultrafialová oblast elektromagnetického spektra
UV-VIS	Ultrafialová a viditelná oblast elektromagnetického spektra